



**HAL**  
open science

## Développement de vecteurs pharmaceutiques pour le relargage contrôlé de principes actifs

Anne-Claire Le Meur

► **To cite this version:**

Anne-Claire Le Meur. Développement de vecteurs pharmaceutiques pour le relargage contrôlé de principes actifs. Matériaux. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2009. Français. NNT : 2009BOR13945 . tel-00627907

**HAL Id: tel-00627907**

**<https://theses.hal.science/tel-00627907>**

Submitted on 29 Sep 2011

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

N° d'ordre : 3945

# THÈSE

*Présentée à*

## L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

*Par*

**Anne-Claire LE MEUR**

*Pour obtenir le grade de*

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : POLYMÈRES

---

### **Développement de vecteurs pharmaceutiques pour le relargage contrôlé de principes actifs**

---

*Prévue le 18 décembre 2009 après avis de :*

Mme Nora VENTOSA	Directeur de recherche - ICMAB	Rapporteur
M. Jean-Luc SIX	Maître de Conférence - Université Nancy	Rapporteur

*Devant la commission d'examen formée de :*

Mme Nora VENTOSA	Directeur de recherche - ICMAB	Rapporteur
M. Jean-Luc SIX	Maître de Conférence - Université Nancy	Rapporteur
Mme Véronique MONTEBAULT	Maître de Conférence - Université Maine	Examineur
M. Claude DELMAS	Directeur de recherche - CNRS	Examineur
M. François CANSELL	Professeur - IPB	Examineur
M. Frédéric TOUCHARD	Directeur Développement Galénique / Conditionnement Clinique - IDPS	Examineur
M. Cyril AYMONIER	Chargé de recherche - CNRS	Examineur
Mme Valérie HÉROGUEZ	Directeur de recherche - CNRS	Examineur



## SOMMAIRE

<i>Introduction générale</i>	2
<i>Chapitre 1 : Vecteurs thermosensibles pour la délivrance par hyperthermie locale : établissement du cahier des charges</i>	5
<i>Chapitre 2 : Synthèse du vecteur polymérique PNB-POE</i>	41
<i>Chapitre 3 : Caractérisation du comportement du système polymères- CO<sub>2</sub> supercritique - soluté</i>	99
<i>Chapitre 4 : Imprégnation et relargage des vecteurs</i>	145
<i>Chapitre 5 : Partie expérimentale</i>	205
<i>Conclusion générale</i>	211
<i>Annexes</i>	217



## Remerciements

L'accomplissement de ce travail de thèse a été possible grâce aux conseils, au soutien et à l'affection de certaines personnes que je souhaite tout particulièrement remercier.

Je tiens tout d'abord à témoigner ma reconnaissance à Valérie Héroguez et Cyril Aymonier, mes directeurs de thèse, pour m'avoir permis de bénéficier de leurs qualités de scientifiques, d'encadrants et d'êtres humains. C'est avec une grande fierté et un petit pincement au cœur que je termine cette collaboration.

Je remercie aussi Monsieur Henri Cramail et Monsieur Claude Delmas de m'avoir accueillie et soutenue dans leurs laboratoires respectifs. J'aimerais aussi remercier la région Aquitaine qui a co-financé cette thèse.

Je souhaite témoigner ma gratitude à l'entreprise IDPS qui a co-financé cette thèse et m'a accueillie pour une partie de ces travaux me permettant alors de bénéficier de leurs compétences et de découvrir le milieu pharmaceutique.

Je tiens également remercier Madame Nora Ventosa et Monsieur Jea-Luc Six pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je remercie aussi toutes les personnes de l'ICMCB (David, Elsa, Manu, Sabine, Stéphane T...) et du LCPO (Anne-Laure, Aurélie, Aurélien, Bertrand, Charles, Cédric, Célia, David, Elisabeth, Jean, Julie, Julien, Maïté, Maryline, Minh, Samira, Sébastien, Stéphane, Valentina...) qui m'ont permis de travailler dans des environnements des plus agréables. Mes pensées vont tout particulièrement vers Chantal, Floraine, Laurent, Marc, Mathilde, Nicolas, Stef' et la Bretagne, avec lesquels j'ai pu partager de très bons moments (step, dîners presque parfaits, danse libanaise...). Merci à vous tous pour ces belles amitiés.

Je remercie également ma famille, Aline et Jean-Yves, Morgane, Etienne et Marie, Jean-Claude et Brigitte... qui m'ont toujours témoigné beaucoup de soutien et d'affection et m'ont ainsi permis d'évoluer dans de très bonnes conditions.

Enfin... je remercie... pour tous les bons moments que nous avons pu partager (loin et moins loin).



# -INTRODUCTION GENERALE-



L'estimation n'a rien de rassurant : près de 347 000 personnes devraient avoir un diagnostic de cancer en 2009 en France, selon les prédictions de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) rendues publiques le 12 octobre dernier.

La dangerosité d'un cancer dépend du stade auquel il est détecté ().

**Tableau 1: Pourcentage moyen de survivants cinq ans après détection d'un cancer. Cas de détection à différents stade d'évolution de la maladie et pour différents cancers <sup>[1]</sup>.**

Stade d'évolution	Pourcentage de survivants 5 ans après détection			
	Seins	Ovaires	Estomac	Poumons
Stade 1 (tumeur<3cm)	100	93	78	47
Stade 2 (tumeur>3 cm mais toujours dans l'organe)	92	79	58	26
Stade 3 (tumeur a essaimé les ganglions lymphatiques)	67	51	20	8
Stade 4 (cancer a progressé vers autres organes)	20	17,5	8	2

Les chances de guérison sont alors fonction de la rapidité de prise en charge (moins le cancer est avancé, plus il est facile à éradiquer) et du type de traitement. Alors que la recherche dans le domaine de la « Drug Delivery » révèle des systèmes de plus en plus prometteurs, les stratégies de traitement auprès des patients sont restées majoritairement inchangées depuis ces trente dernières années : ablation chirurgicale de la tumeur suivie d'une chimiothérapie et/ ou d'une radiothérapie. La chimiothérapie consiste en l'administration de médicaments qui détruisent les cellules malades et les cellules saines. De ce manque de discernement résulte un certain nombre d'effets indésirables et parfois traumatisants pour les patients.

Dans ce contexte, l'adressage de molécules d'intérêt thérapeutique vers un tissu cible est un défi majeur à relever en matière de Drug Delivery. Depuis ces dix dernières années, de nouvelles technologies de ciblage son apparues faisant appel à l'imagerie médicale. L'objectif est de suivre le cheminement du médicament dans le corps humain jusqu'à la zone cible et de ne provoquer sa libération qu'en cet endroit par l'intermédiaire d'un stimulus externe. Une stratégie originale et prometteuse pour y parvenir est d'utiliser les ondes magnétiques ou les ultra-sons -utilisés aujourd'hui en imagerie médicale pour le diagnostic (IRM, Dopler, Ecographie...) et capables de provoquer des échauffements locaux - couplés à une particule thermosensible. De ce fait, la recherche de vecteurs à la fois capable de vivre suffisamment longtemps dans le corps pour atteindre la zone cible et réactifs à des variations de températures supérieures à celles du corps humain a été lancée.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet global de recherche pour l'établissement de systèmes capables à la fois de suivre et de diriger l'action d'un principe actif (approche aussi connue sous le nom de théragnostique). L'idée est ici de développer un objet détectable par IRM via l'incorporation d'agents de contraste et permettant le relargage contrôlé d'un principe actif par un échauffement local de la température (soit par US, soit par champs magnétiques).

Dans ce contexte, l'objet de la thèse a concerné l'élaboration de vecteurs polymères thermosensibles, première étape de notre projet global. Pour ce faire, la thèse s'est organisée autour de trois principaux objectifs :

1. L'élaboration d'une particule polymère biocompatible et thermosensible dans une gamme de températures supérieures à la température corporelle,
2. L'étude l'imprégnation des vecteurs polymères par un principe actif sous CO<sub>2</sub> supercritique,
3. La validation du comportement thermosensible du vecteur par l'étude du relargage *in vitro* du principe actif imprégné en fonction de la température.

Le premier chapitre de ce document est consacré à une étude bibliographique sur la pharmacocinétique de manière à identifier les barrières susceptibles de bloquer l'action d'un vecteur et d'élaborer le cahier des charges auquel devra répondre la nanoparticule polymère.

Le second chapitre va présenter les résultats sur la synthèse des vecteurs polymères. Ces vecteurs sont constitués d'un cœur de Poly (NorBornène) (PNB), dont la T<sub>g</sub> (35°C) peut être modulée par l'ajout d'un agent réticulant de manière à contrôler la thermosensibilité du matériau, et d'une écorce de Poly (Oxyde d'Éthylène) (POE), afin de prolonger la durée de vie du vecteur dans le corps humain.

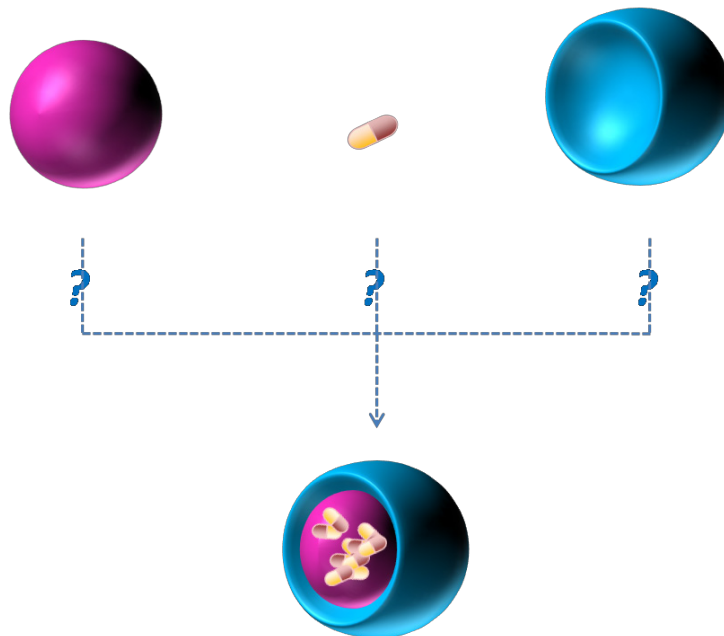
La technique de polymérisation mise en œuvre pour élaborer ces vecteurs d'architecture cœur-écorce est la « Ring-Opening Metathesis Polymerization » (ROMP) en dispersion. Par rapport aux travaux antérieurs, nous avons principalement insisté sur l'incorporation d'un agent réticulant du PNB. Dans le but d'étudier l'influence des différents paramètres (POE, agent réticulant) sur les caractéristiques des particules, un plan d'expériences a été réalisé permettant de déterminer les conditions de synthèse des vecteurs les plus adaptés à l'application visée.

Le troisième chapitre de la thèse va permettre d'appréhender, d'une part, le comportement des particules PNB-POE en présence de CO<sub>2</sub> supercritique et, d'autre part, le système CO<sub>2</sub>-principe actif, l'acide salicylique ayant été retenu comme molécule modèle.

Bibliographie

1. Nagahara, L. A.; Ferrari, M.; Grodzinski, P. *MRS Bulletin* **2009**, 34, (6), 406-414.

*Chapitre 1*  
*Vecteurs thermosensibles*  
*pour la délivrance par*  
*hyperthermie locale :*  
*établissement du cahier des*  
*charges*



## **SOMMAIRE**

<b>1</b>	<b>PHARMACOCINETIQUE<sup>[1]</sup></b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>ABSORPTION-RESORPTION D'UN MEDICAMENT</b>	<b>9</b>
<b>1.2</b>	<b>DISTRIBUTION D'UN MEDICAMENT DANS L'ORGANISME</b>	<b>9</b>
1.2.1	DISTRIBUTION ET FACTEURS TISSULAIRES	9
1.2.2	LE SYSTEME IMMUNITAIRE	10
1.2.3	RESISTANCE D'UN VECTEUR FACE AU SYSTEME IMMUNITAIRE	12
<b>1.3</b>	<b>BIOTRANSFORMATION ET ELIMINATION DES MEDICAMENTS</b>	<b>16</b>
1.3.1	ELIMINATION DES PRINCIPES ACTIFS	16
1.3.2	ELIMINATION DES VECTEURS	16
<b>2</b>	<b>VECTORISATION</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>QUELS MOYENS POUR VECTORISER?</b>	<b>18</b>
2.1.1	POLYMER-PRINCIPE ACTIF CONJUGUES	18
2.1.2	LES LIPOSOMES-POLYMERSOMES	18
2.1.3	LES DENDRIMERES	19
2.1.4	LES MICELLES	19
2.1.5	LES HYDROGELS	19
2.1.6	NANOPARTICULES	20
<b>2.2</b>	<b>QUELS MOYENS POUR CIBLER ?</b>	<b>20</b>
2.2.1	LES NANOPARTICULES CONVENTIONNELLES : CIBLAGE PASSIF DU RES	21
2.2.2	LES NANOVECTEURS DE SECONDE GENERATION : CIBLAGE PASSIF DES ZONES TUMORALES	21
2.2.3	LES NANOVECTEURS DE TROISIEME GENERATION : CIBLAGE ACTIF ET SELECTIF	22
<b>2.3</b>	<b>QUELS MOYENS POUR UNE LIBERATION CIBLEE ?</b>	<b>23</b>
2.3.1	LES TECHNIQUES DE LIBERATION PAR STIMULUS EXTERNE	23
2.3.2	SYSTÈMES THERMOSENSIBLES	25
<b>2.4</b>	<b>QUELS MOYENS POUR ENCAPSULER ?</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>36</b>

L'adressage de molécules d'intérêt thérapeutique vers un tissu cible est un défi majeur à relever dans le domaine de la « *Drug Delivery* ». Considérons une formulation médicamenteuse conventionnelle de principe actif sous sa forme native et son administration dans le sang, la Figure 1.1 - A présente les profils de dissolution de ce principe actif dans le sang en fonction du temps dans le cas d'une administration par voie orale ou intraveineuse. Pour de telles situations, il est difficile de maintenir la concentration nécessaire à la thérapie (dose thérapeutique) sur de longues périodes. Les possibilités offertes sont alors soit d'augmenter la concentration administrée (Figure 1.1-B) ou de multiplier le nombre d'administrations (Figure 1.1-B').

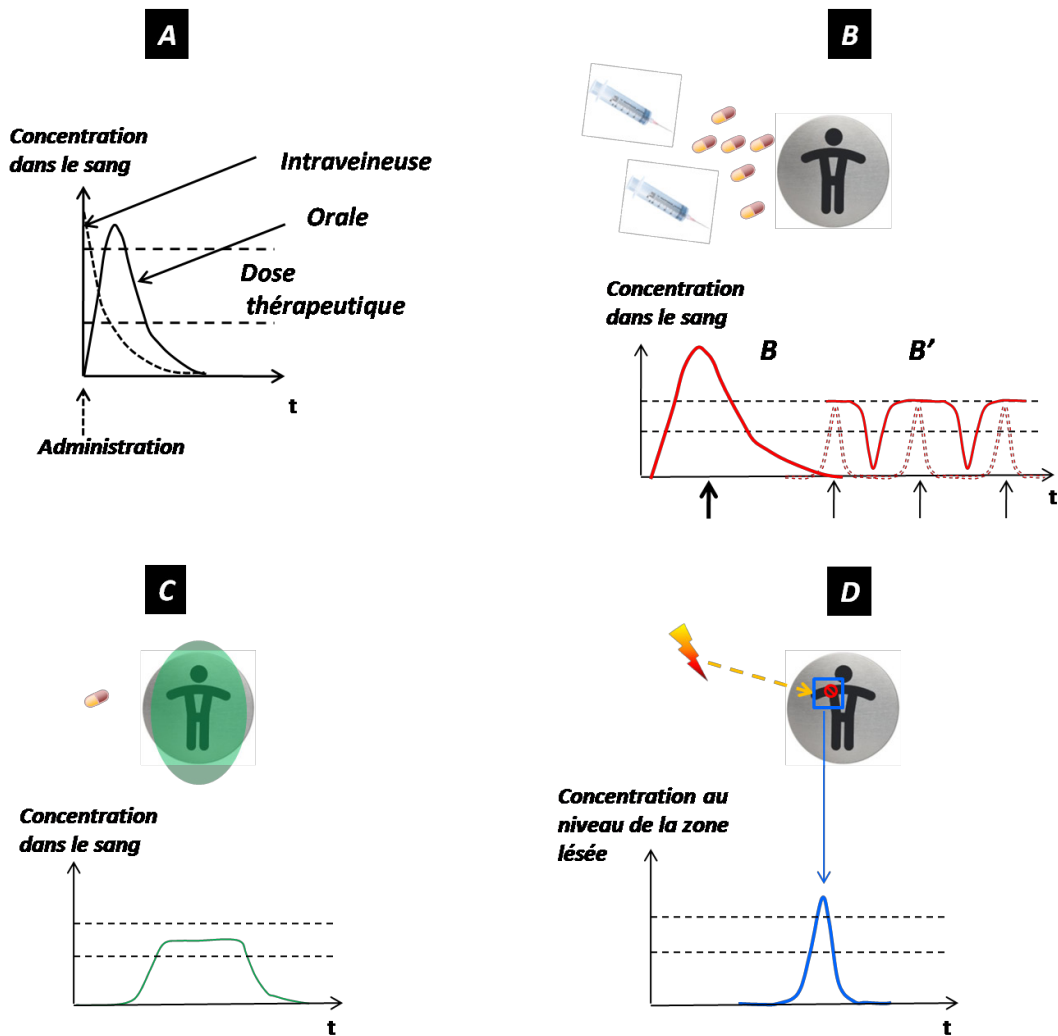


Figure 1.1: Profil de relargage de différents systèmes thérapeutiques : (A) relargage de formulations conventionnelles, (B) multiplication des doses administrées via des formulations conventionnelles, (C) systèmes à relargage prolongé dans le temps et (D) systèmes à relargage ciblé.

La plupart du temps, ces techniques sont contraignantes pour le patient : injections répétitives, concentrations élevées de principe actif capables d'entraîner des effets secondaires... De plus l'action thérapeutique est non ciblée et s'adresse aussi bien aux zones lésées qu'aux tissus sains.

Afin de pallier aux limites des formulations conventionnelles, le vingtième siècle a vu naître un intérêt grandissant pour le développement de médicaments à relargage contrôlé. Parmi ceux-ci, on peut citer les systèmes à relargage prolongé de principe actif (*sustained release delivery*) qui parviennent à maintenir sur un laps de temps contrôlé une concentration thérapeutique de principe actif dans le plasma sanguin (Figure 1.1-C). Bien que plus confortable pour le patient, ce type de système ne permet toujours pas de cibler l'action du principe actif et, de ce fait, ne limite pas les effets secondaires possibles.

Les efforts de la recherche se tournent alors de plus en plus vers des stratégies de ciblage ou encore « on-site release » thérapie (Figure 1.1-D). Le but ici est d'administrer un médicament pouvant vivre suffisamment longtemps dans l'organisme pour atteindre l'organe cible et de contrôler sa délivrance par un stimulus au niveau de la zone lésée. De tels systèmes permettraient alors de maximiser l'efficacité thérapeutique et de minimiser l'attaque de cellules saines situées dans des zones non malades. Ainsi, les efforts de la recherche dans le domaine de la « *Drug Delivery* » se concentrent de plus en plus sur le développement de nano-objets stimuli-sensibles. Différents stimuli sont envisageables parmi lesquels les principaux sont le pH, l'application d'un champ magnétique, les ultrasons ou encore la température <sup>[1]</sup>.

Ce projet de thèse a concerné le développement et l'imprégnation par un principe actif d'un vecteur stimuli-sensible pour lequel la délivrance du médicament est contrôlée par la température. Afin d'établir un cahier des charges du vecteur à élaborer, une étude bibliographique sur la pharmacocinétique et sur les principaux vecteurs développés à ce jour a été effectuée.

### 1 Pharmacocinétique<sup>[1]</sup>

La pharmacocinétique a pour but d'étudier le destin *in vivo* des vecteurs particuliers dans l'organisme. Leur parcours peut être schématisé en quatre grandes étapes :

- **L'absorption-résorption** : l'absorption consiste en la prise du médicament alors que la résorption est le processus par lequel le médicament passe dans la circulation générale depuis son site d'administration.
- **La distribution** : ce processus consiste en la répartition du médicament de la circulation sanguine vers différents compartiments de l'organisme.
- **La biodistribution** : la biodistribution est la transformation par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs métabolites actifs ou inactifs. De nombreux organes peuvent réaliser ces transformations (rein, poumon, foie, estomac...).
- **L'élimination du médicament** : processus d'élimination du médicament et / ou de ses métabolites de l'organisme peut être réalisé par la sueur, la bile ou l'urine.

Nous nous proposons de décrire plus en détails ces quatre grandes étapes dans la suite de ce paragraphe.

### **1.1 Absorption-Résorption d'un médicament**

Le vecteur peut être injecté directement au niveau de la zone malade mais c'est principalement au moyen de la circulation sanguine que le principe actif est transporté dans l'organisme pour atteindre sa cible.

Il existe deux voies principales pour l'administration d'un médicament :

- i. les voies facilitant l'accès à la circulation sanguine (voies intraveineuse, intradermique, sous cutanée, intramusculaire, intra-artérielle...),
- ii. les voies impliquant une muqueuse (voies orale, nasale, pulmonaire, oculaire et vaginale).

Avant de voir quels sont les différents systèmes développés à ce jour, nous allons nous intéresser à la distribution d'un médicament dans l'organisme. Une telle étude va nous permettre d'identifier les différentes barrières immunitaires pouvant limiter la bonne réception d'un vecteur et de définir les premières exigences auxquelles notre système devra répondre.

### **1.2 Distribution d'un médicament dans l'organisme**

La distribution d'un médicament dans le corps humain est fonction d'une part de l'irrigation des tissus et d'autre part des défenses dont dispose le corps humain contre les corps étrangers.

#### **1.2.1 Distribution et facteurs tissulaires**

La circulation sanguine et les vaisseaux lymphatiques constituent un réseau de transport pour les corps étrangers (distribution de nutriments, élimination de virus ou administration de principes actifs). Ainsi, l'irrigation des tissus est un facteur limitant de la distribution tissulaire pour différents éléments et leur concentration au niveau d'un organe est proportionnelle aux débits sanguins environnants <sup>[2]</sup> :

- Les tissus les plus vascularisés sont le cœur, le rein, le foie, les poumons et les glandes endocrinales. Étant ainsi plus facilement accessibles aux corps étrangers, ils présentent un bagage immunitaire conséquent (voir paragraphe 1.2.2 de ce chapitre).
- La peau et les muscles sont moins vascularisés.
- Le tissu adipeux est aussi peu vascularisé, tout comme les os, les phanères et les ligaments. Ces tissus sont de potentiels lieux de stockage de corps étrangers de par leur capacité à les tolérer au-delà des concentrations toxiques redoutées.
- Les zones tumorales sont aussi des lieux d'accumulation sélective de vecteurs médicamenteux en raison d'une vascularisation accrue (elles produisent leurs propres



vaisseaux sanguins) et d'une perméabilité importante. Ce dernier phénomène est connu sous le nom de **EPR (pour Enhanced Permeability and Retention effect)** [3].

## 1.2.2 Le système immunitaire

Le paragraphe suivant expose dans un premier temps les mécanismes en jeu régis par le système immunitaire du corps humain suite à l'absorption d'un corps étranger de manière générale (nutriments, virus, principes actifs ou autres). Ensuite, de façon plus particulière, le cas des vecteurs pharmaceutiques est traité avec une étude sur les facteurs (taille, état de surface) permettant de limiter et / ou de retarder les actions du système immunitaire.

### 1.2.2.1 Quelques bases de l'immunologie

La fonction physiologique du système immunitaire est de prévenir si possible toute infection et d'éradiquer les infections déclarées. Les tissus du système immunitaire sont composés des organes lymphoïdes centraux (moelle osseuse, thymus, foie), sites de maturation et de différenciation des cellules de l'immunité, et des organes lymphoïdes périphériques (ganglions lymphatiques, rate, amygdales), site des réactions immunitaires. L'ensemble de ces organes est connu sous le nom de Système Réticulo-Endothélial (RES) ou Système des phagocytes nucléés (SPM) (Figure 1.2).

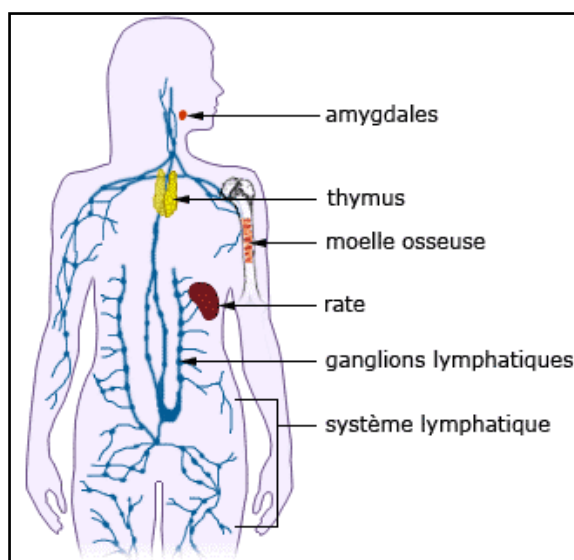


Figure 1.2: Localisation des principaux organes du système réticulo-endothélial.

Les mécanismes de défense de l'hôte se composent d'une **immunité naturelle**, responsable de la protection initiale contre les infections, et d'une **immunité adaptative**, qui se développe plus lentement et met en œuvre une défense tardive et plus efficace contre les infections [4].

- L'immunité naturelle (quelques heures après résorption)

La première ligne de défense de l'immunité naturelle est constituée par les barrières épithéliales (tissus internes des organes) et par des cellules spécialisées. La fonction de tous ces éléments est de bloquer la pénétration des corps étrangers. Si ceux-ci réussissent à passer les épithéliums et à pénétrer dans les tissus ou dans la circulation, ils sont alors reconnus comme du « non-soi » et sont attaqués par les phagocytes, par des lymphocytes spécialisés appelés cellules tueuses ou « natural killers » (NK), et par plusieurs protéines plasmatiques (connues sous le nom de complément). Tous ces mécanismes de l'immunité naturelle reconnaissent et réagissent contre les microbes, mais peuvent rester inactifs contre certaines substances étrangères (paragraphe 1.2.3 de ce chapitre) <sup>[5]</sup>.

- L'immunité adaptative (quelques jours après résorption)

Alors que les mécanismes de l'immunité naturelle reconnaissent des structures non spécifiques, les cellules de l'immunité adaptative ou lymphocytes, agissent suite à la reconnaissance de manière spécifique de différentes substances produites. Ces substances sont appelées antigènes. Les réponses immunitaires adaptatives ne seront déclenchées que si les corps étrangers traversent les barrières épithéliales et sont délivrés dans les organes lymphoïdes où ils peuvent être reconnus par les lymphocytes. Il existe deux types d'immunité adaptative, appelés **immunité humorale** et **immunité à médiation cellulaire**. L'immunité humorale est un processus durant lequel, suite à l'identification du corps étranger, des cellules portant le nom de lymphocytes B sécrètent des anticorps capables de neutraliser et d'éliminer toute substance du même type. L'immunité à médiation cellulaire s'intéresse, quant à elle, à des cellules contaminées ou infectées en raison du corps étranger et agit par l'intermédiaire de cellules (lymphocytes T) capables d'éliminer les cellules infectées <sup>[5]</sup>. Dans ce cas, ce sont de nouveaux récepteurs apparus à la surface des cellules contaminées qui sont reconnus par les cellules de l'immunité.

#### 1.2.2.2 Destruction des corps étrangers ou phagocytose

Que ce soit dans le cadre d'une immunité naturelle ou d'une immunité adaptative, le processus de destruction est le même : la phagocytose. Ce phénomène se déroule en deux étapes. Tout d'abord, le corps étranger est identifié par les macrophages du système immunitaire par fixation en surface de substances élaborées par l'organisme appelées opsonines, c'est l'opsonisation. Ensuite, le tout est englobé par les cellules phagocytaires pour être finalement éliminé de la circulation sanguine <sup>[5]</sup>.

Dans le cas de nanoparticules thérapeutiques, la taille et les caractéristiques de la surface jouent un rôle important dans le processus d'opsonisation. Le paragraphe suivant explique dans quelles mesures ces caractéristiques peuvent permettre un contrôle de la distribution d'un vecteur.

### 1.2.3 Résistance d'un vecteur face au système immunitaire

Nous considérons maintenant un nanovecteur renfermant un principe actif. Une fois dans le sang, il a pour objectif d'atteindre l'organe cible. Il est donc nécessaire que celui-ci survive suffisamment longtemps afin de pouvoir reconnaître son site d'action. Comme il vient d'être exposé, les défenses naturelles du corps présentent de nombreux obstacles à l'action thérapeutique du principe actif sur le site ciblé. Cependant, le contrôle des caractéristiques du vecteur permettent de retarder les réponses immunitaires. La vitesse à laquelle les particules seront phagocytées varie avec la nature du vecteur : les particules les plus hydrophiles et de charge neutre sont moins phagocytées<sup>[6]</sup>. Les vecteurs de taille inférieure à 20 nm ne seront pas détectés par les macrophages. Ainsi, quelques méthodes de camouflages ont été développées permettant temporairement aux nanoparticules de ne pas être reconnues et par conséquent, d'augmenter leur durée de vie dans la circulation sanguine (Figure 1.3).

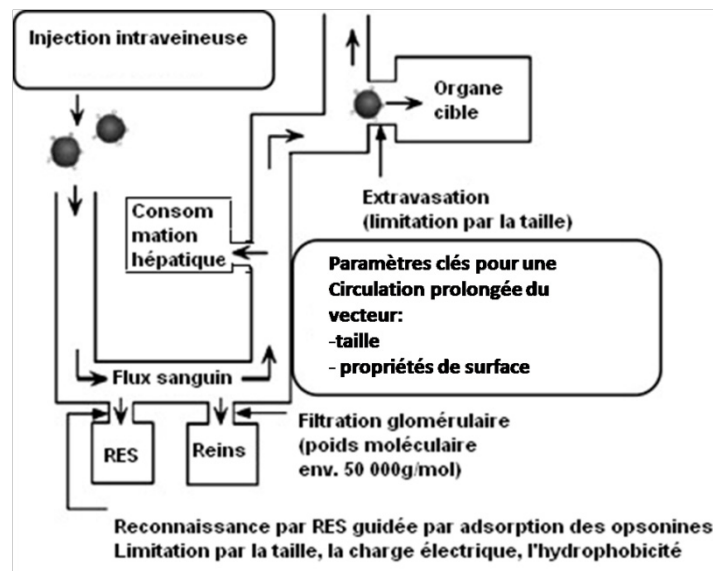


Figure 1.3: Itinéraire d'un vecteur médicamenteux après une injection intraveineuse<sup>[7]</sup>.

#### 1.2.3.1 Influence des propriétés de surface du vecteur

Une des méthodes les plus couramment utilisées afin de ralentir l'opsonisation est l'enrobage par adsorption ou greffage de groupements capables de bloquer les interactions électrostatiques ou hydrophobiques qui aident les opsonines à se lier à la surface du vecteur. Ces groupes sont en général à base de longues chaînes polymère hydrophiles et de tensioactifs non ioniques. Parmi les exemples de polymères ayant déjà été testés, les plus efficaces semblent être les composés à base de poly (oxyde d'éthylène) (POE)<sup>[6, 8]</sup>. Ceux-ci sont très flexibles dans l'eau et fortement hydrophiles, ce qui les rend invisibles des espèces hydrophobes ou chargées présentes dans le sang.

La furtivité apportée par cette chaîne de POE est d'autant plus efficace que sa longueur est importante : un minimum de 2000 g/mol est requis <sup>[6]</sup>. Cette furtivité peut être accrue suivant la densité et la conformation de la chaîne (Figure 1.4). Ainsi, pour une faible densité surfacique de POE, les chaînes polymères ont un plus grand degré de liberté et vont prendre une configuration appelée « champignon » caractéristique de l'étalement de la chaîne sur la particule. Pour des densités trop faibles, des trous apparaîtront dans la barrière de protection et réduiront la furtivité de la particule. Plus la densité est élevée, plus les chaînes tendront à s'organiser sous forme de peigne. Cette configuration permet de recouvrir la particule en totalité mais suppose une diminution de la mobilité des chaînes et par là même de leur propriété d'isolant stérique. Ces systèmes pegylés ont une circulation plasmatique prolongée <sup>[6, 9]</sup>.

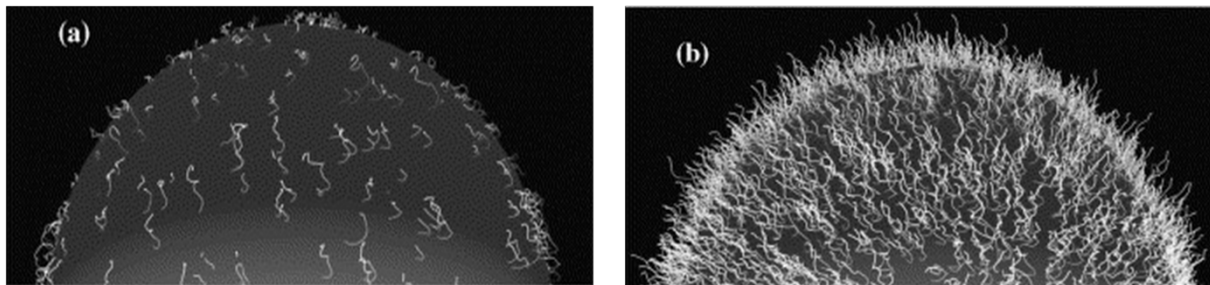


Figure 1.4: Diagramme schématique de la configuration de chaînes de POE en écorce d'une particule. Un faible recouvrement de la surface conduit à des chaînes POE en configuration "champignon" (a). Un important recouvrement de la surface conduit à des chaînes de POE en configuration peigne (b) <sup>[6]</sup>.

D'autres polymères tels que les polysaccharides ont été proposés comme couverture de nanoparticules non biodégradables (poly (méthyl de métacrylate) - PMMA <sup>[10]</sup>, poly (cyanoacrylate d'alkyle) <sup>[11]</sup> et polyester <sup>[12]</sup>). Les exemples sont toutefois plus sporadiques en raison de problèmes d'intolérance. Il est aussi possible de limiter la reconnaissance par le RES en recouvrant le vecteur d'espèces proches du « soi » (en opposition au « non-soi ») comme de l'albumine, de l'acide sialique ou encore des protéines du complément inactivées. On parle alors de « nano-objets biomimants ». Cette approche n'a pas encore fait ses preuves en raison d'une désorption des espèces *in vivo* <sup>[13, 14]</sup>.

**Quel que soit le mode d'administration choisi pour notre application, nous nous proposons d'enrober le vecteur d'une couche de polymère hydrophile comme le poly (oxyde d'éthylène) de manière à diminuer les interactions avec les protéines du plasma. La quantité et la longueur des chaînes de POE utilisées feront l'objet d'une étude approfondie.**

### 1.2.3.2 Influence de la taille <sup>[15]</sup>

Lorsqu'une nanoparticule polymère est opsonisée puis éliminée de la circulation sanguine, elle est rapidement séquestrée dans l'un des organes RES. Dans le cas de particules protégées par du POE, cette séquestration peut être ralentie. L'efficacité de cette furtivité dépend de nombreux facteurs parmi lesquels la taille joue un rôle-clé.

D'un point de vue moléculaire, les particules dont le poids moléculaire est inférieur à 5000 g/mol pourront être naturellement éliminées par les reins. On peut aller jusqu'à 10 fois plus pour des polymères hydrophiles tel que le POE <sup>[7]</sup> et 100 fois plus pour des polymères denses tels que des dendrimères. Au-delà, elles seront séquestrées au niveau des organes du RES <sup>[6]</sup>.

D'un point de vue microscopique, plus les vecteurs sont petits, plus ils parviendront à atteindre des organes divers et variés. Afin de discuter de l'influence de la taille sur la distribution des vecteurs dans la suite de ce chapitre, une distinction entre les différentes gammes de particule est réalisée (normes IUPAC) : toute particule dont la taille est inférieure au micron sera appelée particule nanométrique et toute particule dont la taille est supérieure au micron sera désignée comme particule micrométrique.

De manière générale, les vecteurs de taille inférieure à 20 nm ne seront pas détectés par les macrophages. Cependant, plus les particules sont petites, plus facilement disponible est la molécule active par diffusion des fluides au travers du vecteur. Il en résulte un risque accru de perte de principe actif avant l'accès à la zone libre <sup>[2]</sup>.

Après une injection directe dans la circulation sanguine, les particules micrométriques peuvent causer des embolies au niveau des vaisseaux de faible diamètre, tandis que les particules nanométriques circuleront beaucoup plus facilement. Par exemple, lors d'une action ciblée sur un organe, des particules micrométriques de polystyrène (PS) auront tendance à s'accumuler au niveau de la zone d'injection (au moins 8 semaines pour des particules de 60 µm) alors qu'une heure suffit à des particules de 50 nm à 500 nm pour circuler jusqu'aux reins, poumons, rate et foie et s'y accumuler <sup>[16]</sup>. Indépendamment du temps mis par les particules pour atteindre le foie ou la rate, la concentration en particules micrométriques dans ces organes est beaucoup plus importante que celle des particules nanométriques (2 à 3 fois plus dans la rate et 10 à 40 fois plus dans le foie). Les différences de distributions pharmacocinétiques entre le foie et la rate s'expliquent par des différences de porosité des épithéliums les constituant. De la même façon, l'accumulation de vecteurs de taille micrométrique est facilitée au niveau des zones tumorales en raison d'une porosité accrue (porosité des cellules de 0,2-2 µm au lieu de 50 nm) <sup>[17]</sup>. On comprend donc ici que la distribution est aussi beaucoup fonction de la porosité des tissus (Tableau 1.1).

**Tableau 1.1 : Distribution des vecteurs en fonction de leur taille (données relatives à la porosité des tissus et ne tenant pas compte de la reconnaissance du vecteur en raison de son état de surface).**

<i>Organisme</i>	<i>Limites en taille</i>
Limite derme/ Epithélium	< 1000 nm <sup>[18]</sup>
Reconnaissance macrophages	> 100 nm <sup>[14, 19, 20]</sup> > 200 nm (250) (PEGylé) <sup>[2]</sup>
Accumulation foie et rate	> 200 ~ 250 nm <sup>[2, 6, 17]</sup>
Accumulation moëlle osseuse	> 150 nm <sup>[2, 6, 17]</sup>
Barrière endothéliale	< 100 nm
Porosité vaisseaux tumoraux	100-1000 nm <sup>[19]</sup> 200-2000 nm <sup>[17, 21, 22]</sup> 600 – 800 nm <sup>[14, 23]</sup>
Muqueuse intestinale (passage à la circulation sanguine)	200 nm
Barrière cellulaire	< 50 nm <sup>[18]</sup>

On voit ici se dessiner deux types d'action possibles pour le vecteur <sup>[17]</sup>:

- Soit le vecteur pénètre directement à l'intérieur de la cellule (diamètre inférieur à 50 nm). Dans ce cas, la pénétration du principe actif au sein de la cellule est assurée, mais une augmentation du nombre de substances étrangères internées au cœur de la cellule est à prévoir.
- Soit le vecteur arrive dans la zone cible et libère le principe actif autour de la cellule qui lui seul peut pénétrer par diffusion au travers des membranes cellulaires (diamètre supérieur à 50 nm).

**Afin de limiter les pertes de principe actif en raison du nombre de barrières à franchir, l'administration du vecteur pharmaceutique est prévue par injection. Une action autour de la cellule est envisagée afin de limiter la quantité de substances étrangères pouvant être internées par les cellules. Pour ce faire, le vecteur doit rentrer dans une gamme de taille allant de 100 à 500 nm tout en considérant que le diamètre des particules tolérées peut être augmenté via un greffage de POE <sup>[2, 24]</sup>.**

### 1.3 Biotransformation et élimination des médicaments

#### 1.3.1 Élimination des principes actifs

Le terme de biotransformation désigne les diverses modifications chimiques que subissent les principes actifs dans l'organisme, après relargage, pour donner naissance à des métabolites. Les biotransformations de principes actifs sont essentiellement effectuées grâce à des enzymes, mais certaines d'entre elles se font sans l'intervention d'enzymes, par simple hydrolyse en milieu acide ou alcalin. Les actifs et leurs métabolites s'éliminent essentiellement dans l'urine (élimination rénale) et la bile (élimination hépatique). L'élimination pulmonaire concerne les produits plus volatils.

#### 1.3.2 Élimination des vecteurs

Dans le cas de polymères biodégradables, l'élimination du vecteur suit le même processus que les principes actifs et leurs métabolites. Dans le cas contraire, après injection, le vecteur n'a d'autre choix que de s'accumuler dans le corps (1.2.1). L'utilisation de matériaux au moins biocompatibles est alors inévitable.

##### 1.3.2.1 Terminologie

La notion de **biocompatibilité** a évolué avec l'avènement de nouveaux matériaux utilisés dans le milieu médical. Tout d'abord, le terme **biocompatible** fut utilisé pour désigner tout matériau non toxique et non nocif pour les corps biologiques <sup>[25]</sup>. Puis, avec l'apparition de nouveaux matériaux plus tolérants aux conditions biologiques, le terme tend à désigner la faculté d'un matériau à accomplir une action thérapeutique et ne provoquant qu'une réponse immunitaire de faible niveau. Un matériau biocompatible est un biomatériau. Afin de répondre à ce critère, différents matériaux ont été développés parmi lesquels on retrouve les matériaux biodégradables et les matériaux biostables. Un matériau **biodégradable (ou bio résorbable)** désigne tout matériau organique pouvant être détruit par des enzymes du corps vivant et facilement éliminé. Un matériau **biostable** est quant à lui un matériau non biodégradable mais toléré par le corps humain.

##### 1.3.2.2 Quelques polymères biodégradables

En règle générale, les polymères utilisés pour leur biocompatibilité et leur biodégradabilité sont à base de polyesters aliphatiques. Dans cette catégorie, les homopolymères et les copolymères d'acide lactique (LA – Lactic Acid) et d'acide glycolique (GA – Glycolic Acid) ont été les plus utilisés en raison de leurs taux de dégradation élevés. Ces polyesters sont biorésorbables après une dégradation hydrolytique suivie par une bio-assimilation ou élimination via la dégradation des sous-produits.

Le poly ( $\epsilon$ -caprolactone) est aussi intéressant car il présente une forte perméabilité envers de nombreux principes actifs et une absence de toxicité. Sa dégradation est

malheureusement beaucoup plus lente (de l'ordre de l'année) mais peut être accélérée via une copolymérisation avec des groupements LA ou GA.

Bien qu'il ne soit pas biodégradable, le POE est éliminé du corps par filtration naturelle (relatif à sa furtivité) tant que son poids moléculaire ne dépasse pas  $40\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Il a ainsi été montré que des copolymères de POE et de polyesters aliphatiques ne s'accumulaient pas dans le corps humain, même dans le cas d'injections répétées [7].

### 1.3.2.3 Cas des polymères non-biodégradables

La notion de vecteur non-biodégradable peut paraître inadéquate lorsqu'il s'agit du milieu vivant, mais une trentaine d'années d'expérience dans ce domaine a démontré les potentialités de ces systèmes. En l'occurrence, de nombreuses études montrent clairement qu'une particule non biodégradable peut tout à fait être employée pour des applications biomédicales dans la mesure où soit les macrophages du corps humain pourront procéder à leur élimination ( $< 300\text{ nm}$ ) [26] soit leur biostabilité permet leur accumulation dans les tissus adipeux sans réaction secondaire. Cette dernière possibilité est bien entendu envisageable dans la mesure où l'objectif de ciblage est de limiter la concentration administrée et le nombre d'administrations.

**Bien que très intéressants, les polymères biodégradables cités ci-dessus ne sont pas stimuli-sensibles et ne peuvent être utilisés dans le cadre de l'application visée. De ce fait, le choix concernant le matériau constitutif du vecteur s'oriente vers un polymère thermosensible dont il faudra s'assurer de la biostabilité.**

Les barrières immunitaires susceptibles de bloquer l'action d'un vecteur viennent d'être identifiées. La considération de leurs limites a permis à la recherche dans le domaine de la « *Drug Delivery* » de développer des stratégies afin de dépasser ces barrières parmi lesquelles se trouve le ciblage. L'élaboration de telles stratégies suppose la réponse à quatre questions fondamentales :

- Quel type de vecteur faut-il développer pour le transport du principe actif ?
- Quel moyen pour cibler l'action du principe actif ?
- Quel moyen pour libérer le principe actif ?
- Quel moyen pour encapsuler le principe actif ?

Le paragraphe suivant expose pour chacune de ces questions les réponses recensées dans la littérature et nous ayant permis d'orienter nos choix en termes de type de vecteur, de méthode de ciblage, de méthode de libération et de technique d'encapsulation.



## 2 Vectorisation

### 2.1 Quels moyens pour vectoriser ?

Les moyens de vectorisation correspondent aux supports capables d'acheminer le principe actif jusqu'à la zone cible. Il existe de nombreux systèmes qui vont du greffage de l'actif directement sur une chaîne de polymère linéaire à l'encapsulation au sein d'un assemblage complexe de chaînes macromoléculaires.

#### 2.1.1 Polymère-principe actif conjugués

Ringsdorf fut, dans les années 1970, le premier à proposer l'utilisation d'un polymère hydrosoluble en tant que vecteur de médicament <sup>[27]</sup>. Il suggéra que le vecteur polymère idéal devait être hydrophile pour assurer une bonne solubilité *in vivo* et devait contenir des groupes fonctionnels permettant le greffage covalent de médicaments. Il a également proposé l'ajout d'un bras espaceur biodégradable situé entre le polymère et le médicament pour permettre le clivage enzymatique ou hydrolitique. Ce type de vecteur ne s'adresse qu'à des composés dont une protection n'est pas utile par la voie d'administration choisie. En d'autres termes, il n'est pas concevable d'utiliser cette forme de vecteur pour le transport de substances fragiles telles que les peptides, les protéines ou les oligonucléotides qui se dégraderaient avant d'arriver sur le lieu de l'action. Toutefois, cette technique présente de nombreux avantages comme une très nette augmentation du temps de rétention des médicaments dans l'organisme, une diminution de la toxicité et une meilleure spécificité de l'action du principe actif <sup>[14]</sup>.

#### 2.1.2 Les liposomes-polymersomes

Les liposomes sont considérés comme étant à la base de l'industrie de la « *Drug Delivery* ». Ces macromolécules ont été découvertes en 1965 par Bangham en tant que modèle de membranes cellulaires <sup>[28]</sup>. Depuis, les liposomes ont été très largement étudiés en tant que vecteurs pharmaceutiques. Ces systèmes sont des vésicules artificielles formées par des membranes lipidiques concentriques, emprisonnant entre elles des compartiments aqueux. Obtenus à partir d'une grande variété de lipides amphiphiles, le plus souvent des phospholipides, ils sont biocompatibles. Il est aussi possible de les développer à partir de polymères synthétiques. Ils sont alors appelés polymersomes. Ces objets présentent l'avantage de permettre l'encapsulation aussi bien d'espèces hydrophiles (au sein du cœur aqueux) que de molécules hydrophobes (au niveau de la bicouche). Bien que les liposomes et polymersomes soient très prometteurs, il a été montré que différents facteurs peuvent altérer la structure des liposomes dans la circulation <sup>[29]</sup>. Ainsi, la recherche en matière de « *Drug Delivery* » s'oriente de plus en plus vers de nouveaux systèmes, plus stables *in vivo*.

### 2.1.3 Les dendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules hyperbranchées présentant une architecture tridimensionnelle contrôlée. Ces macromolécules sont constituées de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel. Deux types de méthodes de synthèse peuvent être employés pour obtenir des dendrimères : la synthèse divergente et la synthèse convergente. La synthèse divergente s'effectue du cœur vers la périphérie en greffant un nombre de plus en plus grand de petites molécules sur la surface multifonctionnalisée du dendrimère. La synthèse convergente consiste à construire le dendrimère de la périphérie vers le cœur à l'aide de fragments dendritiques appelés dendrons qui sont rattachés lors d'une étape finale à un cœur plurifonctionnel. Cette structure constitue un réseau capable d'encapsuler différents types de molécules. Les groupements terminaux présents en surface des dendrimères sont fonctionnalisables et peuvent donc être adaptés pour des applications spécifiques. Ainsi, des agents thérapeutiques ou de diagnostics sont usuellement fixés à la surface des dendrimères par modification chimique <sup>[30]</sup>. Bien que leur faible taille permet d'envisager des actions à de nombreux niveaux, elle représente aussi le risque de perdre le contrôle des sites atteints et d'augmenter des effets non désirés (paragraphe 1.2.3.2). Enfin, ces systèmes sont de manière générale limités par une faible capacité d'encapsulation.

### 2.1.4 Les micelles

Les micelles ont été extrêmement étudiées pour la délivrance de nombreux principes actifs. Ces systèmes sont constitués à base de copolymères amphiphiles qui en milieu aqueux forment spontanément un système de type cœur-écorce encapsulant en leur cœur l'espèce active. Les principaux avantages des micelles sont leur temps de circulation prolongé dans le sang grâce à leur petite taille et leur capacité à solubiliser et encapsuler des principes actifs hydrophobes. Bien que très utilisés, ces systèmes sont souvent limités par leur stabilité et leur faible capacité d'encapsulation <sup>[31]</sup>.

### 2.1.5 Les hydrogels

Un hydrogel consiste en un ensemble de chaînes macromoléculaires réticulées constituant une structure tridimensionnelle capable d'encapsuler des molécules actives. La réticulation peut être chimique (cas des gels permanents) ou physique (cas des gels réversibles). Lorsque de telles structures sont mises au contact de solvants thermodynamiquement compatibles, les chaînes polymères se relaxent. Ceci est uniquement possible lorsque la température de travail est au dessus de la  $T_g$  du polymère utilisé <sup>[32]</sup>. Dans le cas des hydrogels permanents, la structure est capable de gonfler en présence d'eau mais ne se dissout pas complètement <sup>[33-35]</sup>.

Les hydrogels réversibles sont une classe d'hydrogels capables de se transformer de façon réversible en solution sous l'application d'un stimulus. Ce type de transition, appelée sol-gel, s'explique par la progressive disparition des nœuds de réticulation de la structure par l'altération des interactions intra-chaînes les constituant <sup>[36]</sup>. Dans ce cas, le stimulus entraîne une transition de phase et non un changement de dimension de la structure des hydrogels, leur donnant notamment la particularité d'être injectables <sup>[37-40]</sup>.

### 2.1.6 Nanoparticules

Les nanoparticules (ou nanosphères) désignent les systèmes de type cœur-écorce avec un cœur solide (biocompatible ou biodégradable) et une écorce hydrophile (adsorbée ou greffée) qui permet leur stabilisation *in vivo*. L'agent d'intérêt thérapeutique peut être encapsulé au cœur, absorbé ou conjugué à la surface de la particule. La formulation de tels systèmes colloïdes permet de balayer une très large gamme de propriétés parmi lesquelles on trouve leur stabilité et le contrôle de la taille et, de ce fait, du taux d'encapsulation accessible.

**Par considération de stabilité et de capacité d'encapsulation des vecteurs, dans le cadre de ce projet, nous nous proposons de travailler avec un système de type nanoparticules.**

Une fois le vecteur du principe actif élaboré une stratégie de ciblage est nécessaire afin d'assurer l'accès à la zone malade. Le paragraphe suivant retrace les principales stratégies qui existent à ce jour.

## 2.2 Quels moyens pour cibler ?

Tableau 1.2 : Principales approches de ciblage.

<i>Ciblage Passif</i>	<i>Ciblage actif</i>
Différence d'environnement au niveau de la zone ciblée (T plus élevée, pH acide...).	Ligands (acide folique, sucres, anti-corps...).
EPR des zones tumorales (1.2.1).	Stimulus physique externe (champs magnétiques, température, pH, ultrasons...).
Perméabilité des différents organes : taille et poids moléculaire.	
Administration directement sur le site (injection ou cathéter).	

Comme nous l'avons vu en introduction de ce chapitre, une stratégie de ciblage suppose non seulement d'augmenter l'efficacité thérapeutique d'un principe actif au niveau

d'une zone malade mais aussi de limiter l'accès aux zones saines et donc de réduire les doses administrées. Il existe de nombreuses méthodes que l'on peut scinder en deux approches : i) un ciblage passif et un ii) ciblage actif. Les principales approches de ciblage sont résumées dans le Tableau 1.2 et décrites par la suite.

Les recherches visant à développer de tels objets ont réellement pris leur essor au cours de la deuxième moitié du vingtième siècle où l'on voit apparaître de nouveaux matériaux parmi lesquels les liposomes, les nanoparticules, et les micelles de polymères tiennent encore à l'heure actuelle une place de choix. A ce jour, trois générations de nanoparticules ont été développées. Le chapitre suivant retrace l'historique de l'apparition de ces trois générations ou comment la recherche s'est orientée vers les matériaux stimulo-sensibles.

### **2.2.1 Les nanoparticules conventionnelles : ciblage passif du RES**

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.3, une fois dans la circulation sanguine, les corps étrangers ont de fortes chances d'être éliminés par opsonisation et de se concentrer au niveau des organes du RES. Ainsi, le foie et la rate agissent comme des réservoirs réceptionnant les espèces reconnues comme du « non-soi ». Les nanoparticules conventionnelles (dites de première génération) tirent profit de cette biodistribution pour traiter spécifiquement les organes du RES. Ne portant pas de fonctionnalité de surface particulière, elles sont facilement reconnues comme des corps étrangers par les systèmes de défense non spécifiques de l'organisme et entraînent une réponse immunitaire naturelle. Ainsi, les nanoparticules de première génération permettent l'adressage passif d'un principe actif vers les organes du RES <sup>[3, 8]</sup>. On comprend donc que ces nanovecteurs sont limités dans la mesure où ils ne permettent pas le ciblage des organes autres que ceux du RES cependant, leur développement a ouvert des perspectives très intéressantes en matière thérapeutique avec notamment l'arrivée des nanovecteurs de seconde génération.

### **2.2.2 Les nanovecteurs de seconde génération : ciblage passif des zones tumorales**

La deuxième génération de nanovecteurs correspond à des particules qualifiées de « furtives » car difficilement reconnues par le RES. Ces systèmes sont capables de circuler plusieurs heures dans la circulation sanguine avant d'y être opsonisés puis phagocytés. La conception de ces nanoparticules consiste à améliorer la biocompatibilité des nanoparticules de première génération en modifiant leurs propriétés de surface (paragraphe 1.2.3.1) de façon à diminuer leur capacité à adsorber des protéines ou à induire l'activation du complément. Ayant un temps de circulation dans le sang plus long, le ciblage de nouveaux organes peut être envisagé. Cependant, ce ciblage ne comporte aucun caractère spécifique. Il permet seulement d'orienter la diffusion du principe actif vers des territoires biologiques dans lesquels la perméabilité de la paroi des vaisseaux sanguins ou des tissus est altérée

(l'EPR notamment). Ils sont tout de même très prometteurs en matière de thérapie cancéreuse.

D'autres systèmes tirent profit de changements environnementaux (pH, température, enzymes...) dans des zones particulières du corps pour cibler l'action d'un vecteur. Comme les vecteurs de seconde génération, ils sont suffisamment furtifs pour permettre leur circulation dans le corps mais ils sont en plus sensibles à des propriétés anatomiques bien particulières. Parmi ceux-ci, on trouve les vecteurs pH sensibles, capables de libérer un principe actif lors d'un changement de pH. Suite à une variation locale de pH, l'action thérapeutique est déclenchée soit par le réarrangement des chaînes du polymère pH-sensible <sup>[41-48]</sup> permettant la diffusion d'un principe actif en dehors du vecteur, soit par clivage d'une liaison existant entre la molécule active et le vecteur <sup>[49]</sup>. Les polymères pH sensibles les plus étudiés sont : le poly (acide acrylique) (PAAc) (base de nombreux polyélectrolytes) et le poly (métacrylate de méthyle) (PMMA). Bien que passive, l'action de ces vecteurs permet de cibler les organes à pH acide et, en particulier, l'estomac. D'autres vecteurs utilisent quant à eux l'élévation de température caractéristique des zones tumorales pour s'y accumuler <sup>[50]</sup>. Bien que ciblée, ces actions n'assurent pas une sélectivité complète de l'action thérapeutique. En effet, le pH et / ou la température varient suivant la fonction des organes <sup>[51]</sup>. Le vecteur circulant librement dans le corps, il peut atteindre et relarguer au niveau de nombreuses zones parmi lesquelles des zones non malades.

### **2.2.3 Les nanovecteurs de troisième génération : ciblage actif et sélectif**

La troisième génération de nanoparticules correspond à des colloïdes de deuxième génération permettant de commander un ciblage spécifique. Ce type de ciblage peut être atteint par le greffage d'un élément de reconnaissance (ligand, anticorps, acide folique, sucres...) capable d'interagir de manière spécifique avec un récepteur présent à la surface des cellules cibles <sup>[52-55]</sup>. Malheureusement, ce type de ciblage présente tout de même quelques limites. Tout d'abord, cibler une catégorie de cellules (tumorales par exemple) comporte le risque de reconnaissance par d'autres cellules semblables aux cellules initialement visées (saines cette fois-ci) limitant alors la sélectivité de l'action <sup>[56]</sup>. D'autre part, la plupart des récepteurs de surface greffés sont hydrophobes et peuvent donc (si présents en trop grande quantité), de nouveau provoquer l'absorption d'opsonines à la surface des particules et ce, en dépit de leur furtivité initiale.

Depuis quelques années, de nouvelles stratégies de ciblage reposant sur le suivi par imagerie et le guidage par champ magnétique sont apparues. Le suivi par imagerie est possible via le couplage du médicament avec une nanoparticule magnétique (ou agent de contraste) permettant de suivre le cheminement du principe actif. Le guidage par champ

magnétique quant à lui utilise le couplage avec une nanoparticule magnétique afin d'amener la nanoparticule jusqu'au site désiré par application de gradients de champ magnétique sur des zones localisées [14, 57-60].

Une fois assuré que le vecteur a atteint la zone souhaitée, le relargage du principe actif peut être provoqué via un stimulus externe. **Grâce à une action rapide et non invasive, ces techniques semblent très prometteuses.**

Dans un cas comme dans l'autre, il est nécessaire de disposer d'un vecteur qui soit, d'une part, capable de retenir le principe actif jusqu'au site souhaité et, d'autre part, capable de le relarguer suite à un stimulus externe. Différents stimuli externes sont envisageables : des champs magnétiques [61] ou électriques [62], des ultrasons [63], une irradiation [64] ou encore la température [6].

**Dans le but d'utiliser une méthode de ciblage soit via un guidage par champs magnétiques soit via une localisation par IRM, nous nous proposons de développer un vecteur stimuli-sensible qui, une fois acheminé sur le site désiré, est capable de relarguer le principe actif en réponse à un stimulus physique externe.**

## 2.3 Quels moyens pour une libération ciblée ?

Différents modes d'actions externes sont envisageables et sont décrits ci-dessous. Ces techniques mettent en œuvre différents types de stimuli : le pH, la force ionique du milieu ou encore la température.

Après avoir étudié les techniques permettant la mise en œuvre d'un stimulus externe appliqué à une zone déterminée du corps, le paragraphe suivant s'attardera sur les systèmes thermosensibles, la température étant le stimulus élu pour provoquer la libération du médicament.

### 2.3.1 Les techniques de libération par stimulus externe

#### 2.3.1.1 Les champs électriques

Les techniques utilisant un champ électrique permettent la libération d'un principe actif encapsulé dans un polymère de type électrolyte contenant un grand nombre de groupements ionisables. De tels polymères sont à la fois pH-sensibles et électro-sensibles. Sous l'application d'un champ électrique, ces systèmes ont tendance à gonfler ou se contracter en raison de mouvements d'ions et permettent la libération d'un principe actif préalablement encapsulé [65].

### 2.3.1.2 Irradiation

La libération d'un principe actif par irradiation suppose le couplage d'un vecteur avec une molécule photosensible et peut se faire de deux façons. La première possibilité implique une molécule photosensible capable de se dissocier sous forme ionique lors de l'application de rayonnements UV. Il en résulte une augmentation de la pression osmotique du vecteur conduisant à son gonflement <sup>[66]</sup>. Une autre possibilité consiste à introduire un chromophore capable d'absorber la lumière puis de la dissiper sous forme de chaleur <sup>[64]</sup>. Ainsi, couplé à un vecteur thermosensible, l'application de rayons UV peut permettre la diffusion d'un principe actif hors du vecteur.

### 2.3.1.3 Les champs magnétiques

Les nanoparticules magnétiques (magnétite, maghémite, pérovskite...) permettent d'envisager l'établissement de systèmes de relargage ciblé prometteurs. En effet, en plus d'être détectables par imagerie IRM, les particules magnétiques sont capables de générer de la chaleur localement sous l'application d'un champ magnétique <sup>[20]</sup>. L'échauffement ainsi émis dépend alors de la taille des particules ainsi que de leurs propriétés magnétiques. Les nanoparticules de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) et de maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) sont les plus utilisées en raison de leur compatibilité avec les milieux biologiques et de leurs propriétés magnétiques adaptées à l'application au biomédical.

### 2.3.1.4 Les Ultrasons (US)

Les US constituent une autre méthode prometteuse de relargage non invasif et ciblé de principes actifs. Les US sont capables de traverser les tissus sans les léser et sans nécessiter de pénétration à l'aide d'un applicateur, tout en se focalisant sur une cible à détruire. En fonction du mode d'utilisation, on peut privilégier soit des effets thermiques, en mode continu, à faible température (permettant des effets biologiques thermo-induits) ou à haute température allant jusqu'à la nécrose tissulaire (permettant la thermoablation), soit des effets mécaniques, en mode pulsé, à faible énergie (permettant des effets biologiques) ou à haute énergie (permettant l'ablation dite histotritie). La thermoablation par US focalisés connaît un fort développement dans de nombreux organes <sup>[67]</sup>. Sa place est déjà bien définie pour le cancer de la prostate et le fibrome utérin. Elle doit encore être évaluée dans d'autres types de tumeurs comme le cancer du sein. Associée à un vecteur, cette technique permet non seulement d'enclencher le relargage de principes actifs mais aussi d'augmenter la quantité ingérée par les cellules. L'efficacité constatée est alors attribuée, d'une part, à l'activation de la libération du principe actif par le vecteur et, d'autre part, à l'amélioration de sa diffusion en raison d'une perméabilité accrue de la membrane des cellules. Ainsi Rapoport *et al.* ont breveté ce mode d'action sur des vecteurs de type micelles présentant un caractère thermosensible <sup>[68]</sup>.

Les ultrasons focalisés permettent un contrôle de la libération du principe actif mais pas de son ciblage. Ainsi, il est tout de même nécessaire de coupler cette technique avec un suivi par imagerie ou un guidage par champ magnétique.

**Bien que leur efficacité ait été prouvée, les travaux témoignant de l'association des technologies impliquant des champs magnétique ou des US avec un vecteur stimuli-sensible sont encore peu aboutis. Notamment, dans le domaine des US, la volonté d'associer un vecteur thermosensible à l'action des US est de plus en plus grande. Le but serait alors de coupler l'action de destruction d'une zone tumorale (thermoablation) avec le relargage en cette même zone d'un principe actif par un vecteur (thermothérapie). Ainsi en même temps qu'une tumeur est ablatée, elle pourrait aussi être traitée. Afin de répondre aux besoins des techniques de relargage ciblé via un stimulus externe, nous nous proposons de développer un vecteur thermosensible capable de retenir le principe actif tant que la température est inférieure à 40-45°C et qui ne le libère que pour des températures supérieures.**

Le paragraphe suivant recense les différents systèmes thermosensibles envisageables.

### **2.3.2 Systèmes thermosensibles**

La température est un des stimuli les plus utilisés et étudiés. La raison d'un tel intérêt est tout d'abord la possibilité de relarguer un principe actif dans le corps humain de façon non sélective, sans stimulus externe : la température du corps (37°C) augmentant en présence d'agents pathogènes (39-42°C dans le cas de tumeurs), cette déviation peut être utilisée pour activer le relargage uniquement au niveau des zones infectées. Cependant, la température du corps pouvant varier (cas d'une simple fièvre), le traitement de pathologies plus sérieuses peut s'avérer complexe suivant la sensibilité du système thermosensible. Dans ce cas, la température peut être utilisée comme stimulus externe appliqué localement.

La thermosensibilité de certaines macromolécules peut s'expliquer par différentes caractéristiques des polymères telles que leurs propriétés physico-chimiques en solution, leur température de transition vitreuse (cas des polymères amorphes) ou encore leur température de fusion (cas de polymères semi-cristallins) <sup>[65]</sup>. Toutes ces propriétés sont relatives à une température critique.

- On parle de **LCST** (*Lower Critical Solution Temperature*) pour décrire la température au-delà de laquelle un polymère n'est plus soluble dans une solution donnée (l'eau dans le cas des milieux physiologiques). En dessous de la LCST, la contribution enthalpique domine et entraîne la formation de liaisons hydrogène entre l'eau et les groupements



polaires de la chaîne macromoléculaire permettant ainsi au polymère d'être à l'état dissous dans l'eau. Au-delà de la LCST, la contribution entropique l'emporte et entraîne la multiplication des interactions hydrophobes intra-chaînes.

- On parle de **UCST** (*Upper Critical Solution Temperature*) pour décrire la température au-dessus de laquelle un polymère n'est plus soluble dans une solution donnée.
- Enfin, on parle de température de transition vitreuse ( $T_g$ ) dans le cas d'un polymère seul pour désigner la température au dessus de laquelle les chaînes sont mobiles.

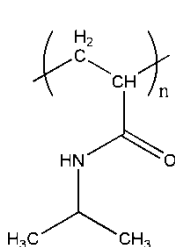
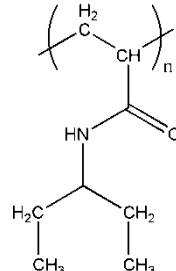
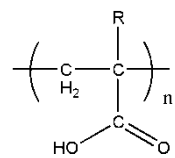
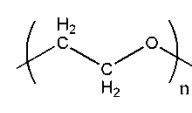
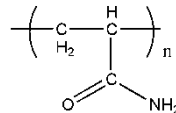
### 2.3.2.1 Les polymères à thermosensibilité basée sur une LCST

Les principaux systèmes thermosensibles développés pour des applications biomédicales sont basés sur le concept de LCST parmi lesquels on retrouve le poly (N-isopropyl acrylamide) (PNIPAAm) et le poly (acide acrylique) (PAAc) (Tableau 1.3).

Le PNIPAAm et ses dérivés (Poly (*N,N'*-diéthylacrylamide ou PDEAAm, poly (2-carboxyisopropylacrylamide) ou PCIPAAm...) forment la catégorie de polymères à LCST la plus largement étudiée en raison d'un domaine de LCST (25-32°C) qui se trouve être entre la température ambiante et la température corporelle. Il a été montré que le PNIPAAm est très peu, voire non cytotoxique, et biocompatible<sup>[69]</sup>. Les propriétés de ce polymère ainsi que sa préparation relativement simple font de ce système un candidat très attractif dans le cadre de la recherche sur la vectorisation médicamenteuse.

Cependant, les hydrogels de PNIPAAm présentent un désavantage important en vue d'une application dans le domaine pharmaceutique : leur faible résistance mécanique intrinsèque fragilise la structure à l'état gonflé. Le greffage d'entités par copolymérisation le long de la chaîne de PNIPAAm a permis d'améliorer la résistance des hydrogels et d'optimiser leur contrôle via la température<sup>[37, 70-73]</sup>. Le greffage de groupements hydrophiles permet d'augmenter la LCST, et le greffage de groupements hydrophobes l'abaissent<sup>[74]</sup>. Ainsi, grâce à l'ajout d'AAc, Guan *et al.* ont pu développer des hydrogels à base de poly (NIPAAm) facilement injectables et capables de former des gels de grande résistance au-delà de 37°C. Suffisamment flexibles pour envisager une diffusion progressive du plasma sanguin, il est envisageable de contrôler le relargage dans le temps d'un principe actif par ces systèmes<sup>[37]</sup>.

Tableau 1.3 : Les principaux polymères à LCST et leur valorisation.

Principaux polymères impliqués dans systèmes à LCST				
<b>PNIPAAm</b> 	<b>PDEAAm</b> 	<b>PAAc et dérivés</b> 	<b>POE</b> 	<b>PAAm</b> 
32°C	25°C – 35°C	< 75°C	95°C – 120°C	Soluble
Valorisation				
Polymère/ copolymère	LCST	Brevets	Littérature	
<b>PNIPAAm</b> : Poly (N-isopropylacrylamide)	32°C	82	815	
<b>PDEAAm</b> : Poly (N,N'-diéthylacrylamide)	25-35°C	3	67	
<b>PNIPAA-co-PAAm</b> : Poly (N-isopropylacrylamide)-co-poly(acrylamide)	35-100°C	11	44	
<b>PNIPAAm-co-PAAc</b> : Poly (N-isopropylacrylamide)-co-poly (acrylamide)	30-75°C	46	323	
<b>PNIPAAm-co-POE</b> : Poly (N-isopropylacrylamide)-co-poly (oxyde d'éthylène)	26-33°C	28	108	

En plus, des copolymères statistiques de PNIPAAm permettant de moduler leur LCST, des copolymères à blocs ont été étudiés. Ces copolymères forment en général des micelles piégeant en leur cœur la partie la plus hydrophobe. Ainsi, la configuration des copolymères de PNIPAAm sous forme d'hydrogels a été modifiée pour développer des gels capables de s'auto-assembler. Lin et Cheng ont développé des copolymères à blocs linéaires et étoilés à base de PNIPAAm et de POE formant des hydrogels injectables et capables de gélifier rapidement sous l'effet de la température et ce, de manière réversible [39].

Chung *et al.* ont développé des micelles à base de méthacrylate de butyle (PNIPAAm-b-PBMA) qui ont été utilisées pour l'encapsulation d'adriamycine [69, 75]. Ces systèmes en solution ont montré une réponse réversible lors de variations de température proche de leur LCST (34,5 °C). L'équipe de Neradovick a quant à elle développé des micelles de POE-PNIPAAm d'écorce de POE et présentant une LCST de 31°C. L'incubation de ces polymères dans une solution aqueuse provoque l'hydrolyse des chaînes à base de PNIPAAm augmentant ainsi l'hydrophilie des chaînes permettant d'obtenir une LCST de l'ordre de 37°C. Dans un cas comme dans l'autre, dès que l'on dépasse la LCST du système, les particules se déstabilisent et relarguent leur contenu [76, 77] (Figure 1.5). Les températures

critiques restent cependant trop basses pour envisager le couplage de ces systèmes avec des technologies de stimulus externe. Certaines équipes sont tout de même parvenues à développer des systèmes prometteurs dont la LCST varie de 38°C à 42°C. On citera notamment les travaux de Nakayama *et al.* avec des micelles de P(NIPAAm-*b*-DL-lactide) (PNIPAAm-PLA) [78].

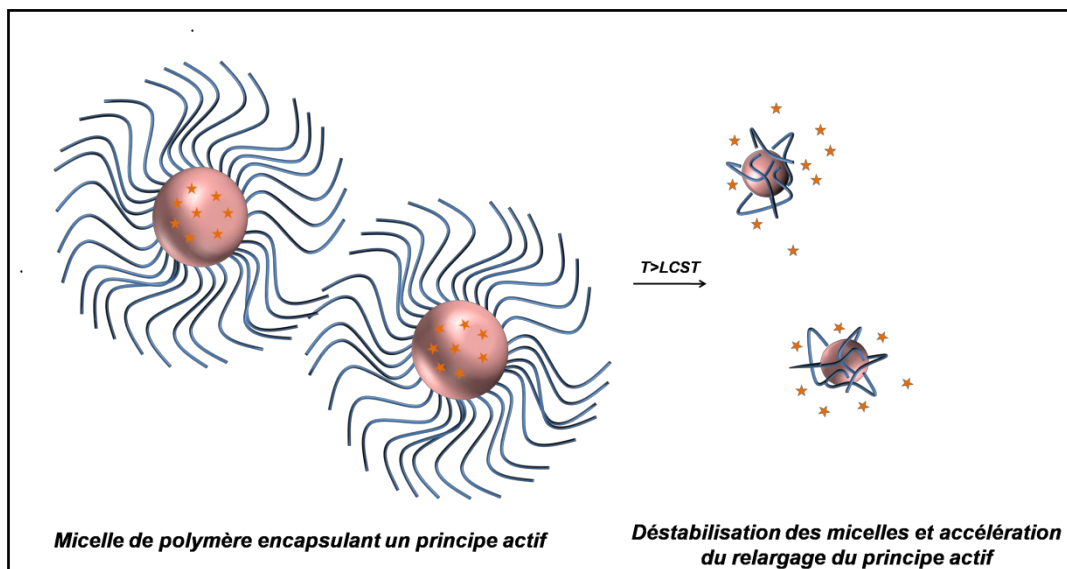


Figure 1.5: Relargage de principe actif par des micelles déstabilisées au-dessus de leur LCST.

Enfin, la copolymérisation de NIPAAm avec des monomères d'acide acrylique (AAc) peut permettre d'obtenir des copolymères à la fois thermosensibles et pH-sensibles [79, 80] (paragraphe 2.2.2).

En dépit des faibles cytotoxicités annoncées des polymères à base de PNIPAAm, ses produits de dégradation posent un problème pour des administrations sur du long terme. Dans le cadre de cette problématique, Lutz *et al.* ont développé les 2-(2-méthoxy éthoxy) éthyl methacrylate-*co*-oligo(éthylène glycol) méthacrylate (MEO<sub>2</sub>MA-*co*-OEGMA) comme alternative aux PNIPAAm. Ces copolymères non linéaires sont constitués de segments pendants d'oligo(éthylène glycol) et présentent des LCST allant de 26°C à 90°C qui peuvent être ajustées en fonction de la quantité de comonomère additionnée. Par exemple, des copolymères statistiques à base de 5, 8 et 10% d'unités OEGMA par chaîne ont respectivement des LCST de 32, 37 et 39°C. Principalement composés à base de segments d'oligo (éthylène glycol) biocompatibles, ce type de système semble très prometteur [81, 82].

### 2.3.2.2 Les polymères à thermosensibilité basée sur une UCST

Très peu de systèmes à UCST compatibles avec la température du corps humain ont été développés à ce jour. Les principaux sont rassemblés dans le Tableau 1.4.

Tableau 1.4 : Les principaux systèmes à UCST et leur valorisation.

Systèmes à UCST	
Brevet: 1	
Littérature publique: 100	
<b>Réseau de polymères interpénétrés à base de :</b>	
Polyacrylamide	Poly(acrylic acid) and derivated
$\left( \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---C---C---} \\   \quad   \\ \text{H}_2 \quad \text{H} \\   \\ \text{C} \\ // \quad \backslash \\ \text{O} \quad \text{NH}_2 \end{array} \right)_n$	$\left( \begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{---C---C---} \\   \quad   \\ \text{H}_2 \quad \text{H} \\   \\ \text{C} \\ // \quad \backslash \\ \text{HO} \quad \text{O} \end{array} \right)_n$
<b>20-70°C</b>	

La formation d'un réseau interpénétré (*IPN ou Interpenetrating Polymer Network*) de poly (acide acrylique) (PAAc) et de polyacrylamide (PAAm) est un des rares exemples de système à UCST (20 à 40°C) applicables au biomédical recensé dans la littérature [6, 73, 83-86]. Le comportement de type UCST résulte de la formation de complexes entre polymères via des liaisons hydrogène secondaires (les primaires étant les liaisons hydrogènes intra-chaînes) (Figure 1.6) [6].

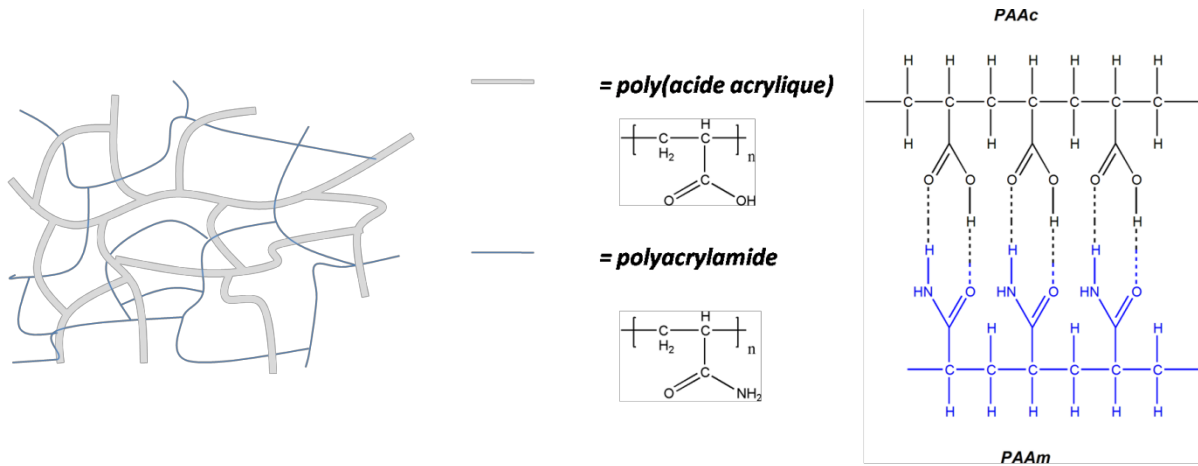


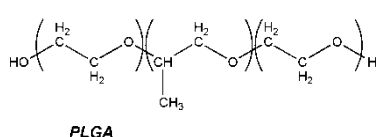
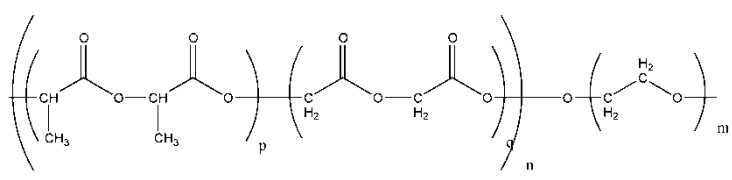
Figure 1.6: Réseau interpénétré de polymères à base de PAAm et PAAc associés par liaisons hydrogènes [6].

En raison de leur faible énergie d'interaction, les liaisons hydrogène sont plus fortes à faible température [73]. Par conséquent, aux faibles températures les complexes formés entre les chaînes sont à l'état « collapsé ». Cependant, lorsque l'on augmente la température au-delà de l'UCST, ces liaisons deviennent trop faibles et la nature hydrophile des polymères domine conduisant à l'hydratation rapide des chaînes et au gonflement de la particule. Ce concept a été breveté récemment par Owens *et al.* avec la formation d'IPNs capables de

gonfler vers 40°C et dont l'action a été couplée à un échauffement localisé via un laser de DLS (*Dynamic Light Scattering* – Diffusion Dynamique de la Lumière) [87]. Cette UCST peut être déplacée vers des températures plus élevées en copolymérisant l'AAm avec un monomère fortement accepteur d'hydrogènes comme le diméthylacrylamide (DMAAm). Cette copolymérisation permet de diminuer la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires des chaînes de PAAm en favorisant des liaisons intermoléculaires plus stables avec le PAAc [83].

### 2.3.2.3 Les polymères à thermosensibilité basée sur une balance amphiphile

Tableau 1. 5 : Les principaux polymères à balance amphiphile et leur valorisation.

Polymère à balance amphiphile
Brevets: 100
Littérature publique: 852
<p><i>POE-POP-POE - Pluronics (BASF)</i></p>  <p style="text-align: center;"><i>PLGA</i> <span style="margin-left: 200px;"><i>POE</i></span></p>  <p style="text-align: center;"><i>25-50°C</i></p>

Les polymères à thermosensibilité basée sur une balance amphiphile sont constitués à partir de copolymères à blocs de type AB ou ABA, portant un bloc hydrophobe et un bloc hydrophile permettant un assemblage sous forme de structure micellaire. Ici, l'hydrogel est formé via une transition de type sol-gel. La phase sol est une solution qui s'écoule alors que la phase gel est un solide ne pouvant s'écouler. Cette phase gel ne se forme qu'à partir d'une certaine température et pour une concentration minimale en copolymères. Ainsi, ces polymères existent en général sous forme de solution à température ambiante et sous forme de gel aux températures physiologiques permettant leur administration sous forme injectable. Ces systèmes sont particulièrement attractifs dans le domaine de la « *Drug Delivery* » car ils forment des gels encapsulant un principe actif très peu de temps après leur injection et constituent ainsi des systèmes à relargage contrôlé dans le temps [88]. Ils sont dits « thermogelling ».

Typiquement, les systèmes de type thermogel constitués de trois blocs sont pour la plupart des analogues des copolymères de poly (oxyde d'éthylène-*b*-oxyde de propylène-*b*-oxyde d'éthylène) (**POE-POP-POE**) aussi connus sous le nom de Pluronics (BASF) ou de Poloxamer (ICI) <sup>[89]</sup>. A faible concentration et à température ambiante, ces triblocs forment des micelles dans l'eau. Après injection, le POP se déshydrate et les micelles ont tendance à s'écraser en provoquant la gélification du système (Figure 1.7). Rapoport *et al.* ont breveté des systèmes à base de Pluronics s'agencant sous forme de micelles et dont le relargage est provoqué par l'action d'ultrasons <sup>[68]</sup>. Ils ont pu alors remarquer que dans le cas d'US pulsés, l'arrêt des US conduisait à la « ré-encapsulation » du principe actif.

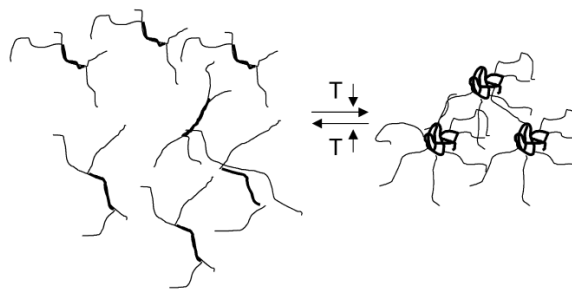


Figure 1.7: Mécanisme de gélation des Poloxamères.

En matière de polymères biodégradables et biocompatibles, Jeong *et al.* ont synthétisé des copolymères triblocs à base de poly (oxyde d'éthylène) et de poly (L-lactic acid) <sup>[90]</sup>. Ils ont tout d'abord montré que la transition sol-gel de ces copolymères pouvait être contrôlée par leur concentration, leur composition et la température appliquée. De plus, pour un système donné, ils ont montré que l'injection d'une solution de copolymères conduisait à un gel capable de relarguer de manière contrôlée dans le temps un principe actif. Ce contrôle est alors d'autant plus rapide que le principe actif est hydrophile : les molécules hydrophobes se logent préférentiellement au cœur où la diffusion du plasma est plus lente alors que des molécules hydrophiles se répartiront de manière plus homogène notamment dans l'écorce et sont relarguées plus rapidement.

### 2.3.2.4 Les polymères à thermosensibilité basée sur une $T_g$

Deux approches sont envisageables avec les polymères thermosensibles basés sur une  $T_g$  :

- Soit la  $T_g$  est inférieure aux températures physiologiques et le relargage de l'actif repose sur les cinétiques de relaxation des chaînes polymères lorsque l'environnement se trouve à une température proche de la  $T_g$ . Des actions de relargage contrôlé dans le temps sont alors envisageables.
- Soit la  $T_g$  est supérieure aux températures physiologiques et elle peut alors être utilisée comme action de relargage suite à un stimulus (échauffement localisé).

#### 2.3.2.4.1 Cas des polymères à $T_g < T_{corp}$

On parle dans ce cas d'hydrogels à gonflement contrôlé. Ces systèmes sont des hydrogels réticulés de façon permanente (chimiquement). Le gonflement progressif du réseau est l'expression macroscopique du passage par la transition vitreuse. Les molécules actives diffusent au travers du milieu dissolvant, traversant la zone de polymère gonflée autour de l'hydrogel. En effet, lorsque l'hydrogel est placé au contact du milieu de dissolution, les molécules d'eau pénètrent dans le réseau et envahissent progressivement la surface de l'hydrogel entraînant l'apparition d'un front mobile séparant la phase de polymère non solvaté donc encore vitreux, de celle où il est gonflé et forme un hydrogel à l'état caoutchoutique. Le polymère situé au front est quant à lui exactement à la transition vitreuse. Différents modes de relargage peuvent être constatés (Figure 1.8) :

- Si la  $T_g$  du polymère est bien en dessous de la température expérimentale, le polymère sera à l'état caoutchoutique et ses chaînes présenteront une forte mobilité facilitant la pénétration du solvant au sein de l'hydrogel et par conséquent le relargage de l'espèce active. On observe alors une diffusion de Fick caractérisée par un taux de diffusion (du solvant ou du principe actif)  $R_{diff}$  plus lent que le taux de relaxation des chaînes du polymère  $R_{relax}$ .
- Si la température expérimentale est juste en dessous de la  $T_g$ , les chaînes de l'hydrogel ne sont pas assez mobiles pour permettre une absorption rapide du solvant. On a alors une diffusion non fickienne avec  $R_{diff} \gg R_{relax}$  ou une diffusion irrégulière (« *anomalous diffusion* ») lorsque  $R_{diff} \approx R_{relax}$  [32].

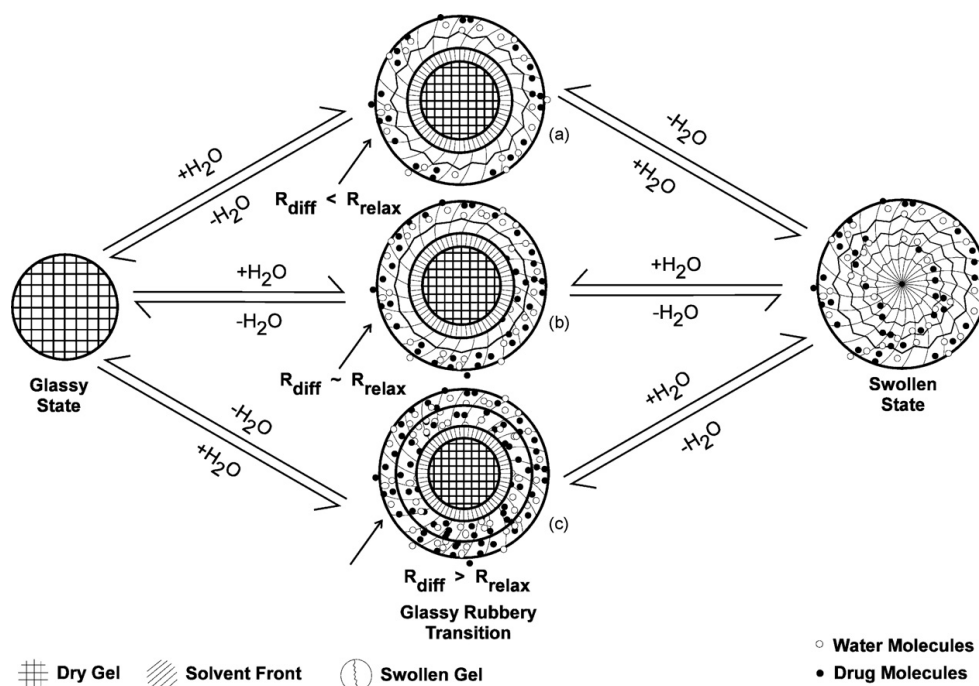


Figure 1.8: Mécanisme de diffusion des espèces dans des polymères amorphes <sup>[32]</sup>.

La particularité des systèmes de relargage par gonflement contrôlé réside en la possibilité de diffuser une molécule active à des taux constants sur une longue période (« *sustained release* »). Le taux de principe actif relargué est fonction de l'équilibre entre la diffusion du médicament d'après un gradient de concentration, la relaxation des chaînes polymères et la pression osmotique apparaissant durant le gonflement. Ainsi, Peppas *et al.* ont pu montrer que le poly (méthacrylate de 2-hydroxyéthyl-co-méthacrylate de méthyle) (P(HEMA-co-MMA)) et le poly (alcool vinylique) (PVA) pouvaient relarguer des espèces sur des périodes de plus de 500h. Ils ont aussi pu montrer que ce relargage est fonction des caractéristiques structurales des polymères, de la réticulation et de la nature des solutés utilisés <sup>[91]</sup>.

*Remarque : Le terme d'hydrogel pour désigner ces systèmes est unanimement repris. Il est à noter tout de même que ces systèmes ne sont pas initialement des hydrogels car à l'état sec au départ, mais ils le deviennent au fur et à mesure de la diffusion d'eau.*

#### 2.3.2.4.2 Polymères à $T_g > T_{corp}$

Considérons un vecteur dont la  $T_g$  est supérieure aux températures physiologiques dans lequel est encapsulé un principe actif. Cette fois-ci le relargage n'est possible que suite à l'application d'un échauffement au dessus des températures physiologiques ( $T_{corp}$ ) (mais tolérables par le corps humain) via une source externe d'échauffement. Ce concept est tout à fait adapté aux méthodes de ciblage thérapeutique par stimulus externe (paragraphe 2.3.1 de ce chapitre). En effet, une fois dans la circulation sanguine, ce vecteur reste rigide et



retient le principe actif en son cœur. Le relargage du principe actif est alors possible suite à l'application d'un échauffement localisé au niveau d'une zone atteinte par le vecteur. Cette action permet alors de ne cibler qu'une zone unique et de s'assurer qu'aucune autre zone ne sera traitée.

Jusqu'à ce jour, seuls les polymères à thermosensibilité basée sur une  $T_g$  en dessous des températures physiologiques ont fait l'objet d'études dans le domaine de la «*Drug Delivery*» probablement en raison de la difficulté à trouver un matériau dont la  $T_g$  soit légèrement au-dessus de la température du corps humain ( $T_{corp}$ ). Le polynorbornène (PNB) est une polyoléfine dont la  $T_g$  est de l'ordre de 35-37°C, c'est-à-dire de l'ordre de la  $T_{corp}$ . Cette  $T_g$  peut être augmentée par l'ajout d'agent réticulant <sup>[92]</sup> ce qui permet d'envisager l'utilisation de ce polymère pour le développement de vecteurs pharmaceutiques dont la  $T_g$  est supérieure à  $T_{corp}$ .

Bien que référencé dans le domaine médical, le PNB reste toutefois un matériau peu connu : seule un poignée d'articles le mentionne <sup>[93, 94]</sup>. Cependant, à la fois le monomère (NB) et le polymère (PNB) ont fait l'objet d'études de toxicologie révélant l'absence de cytotoxicité <sup>[95]</sup>.

**Suite à l'étude des différents systèmes thermosensibles, nous nous proposons de développer un nouveau concept de relargage thermosensible utilisant la  $T_g$  d'un polymère comme stimulus de relargage. Pour ce faire, des vecteurs à base de PNB vont être synthétisés et l'ajout d'un agent réticulant est envisagé dans le but d'obtenir un matériau de  $T_g$  supérieure à 40°C. Le PNB a déjà été utilisé dans le domaine biomédical notamment pour le relargage pH-sensible de molécules actives<sup>[49]</sup>, cependant, il reste très peu étudié dans ce domaine et son application en tant que matériau pour le relargage thermosensible de principes actifs n'a encore jamais été démontrée à ce jour.**

Connaissant le type de vecteur avec lequel nous allons travailler, la dernière question pour le développement du vecteur pharmaceutique concerne le moyen d'encapsulation.

## **2.4 Quels moyens pour encapsuler ?**

Dans le cas de systèmes auto-assemblés type micelles ou vésicules, l'encapsulation peut être réalisée lors de l'auto-assemblage. Les copolymères sont ajoutés au goutte à goutte à une solution aqueuse contenant le principe actif. Au fur et à mesure que la solution devient concentrée en polymères, les blocs vont s'auto-assembler en encapsulant le principe actif <sup>[96-98]</sup>.

Dans les autres cas (nanocapsules, IPNs...), d'autres approches ont été développées. L'encapsulation peut se faire lors de la synthèse du vecteur en présence du principe actif afin qu'il s'y imprègne directement <sup>[91]</sup>. L'utilisation de solvants organiques étant susceptible de limiter la bioactivité de l'actif, la fiabilité de cette technique reste encore à démontrer. Une autre approche consiste à immerger le vecteur dans une solution aqueuse dans laquelle est solubilisé le principe actif. Cette solution est laissée sous agitation puis, les particules imprégnées sont filtrées, rincées en surface par de l'eau ionisée et enfin séchées sous vide <sup>[69, 91]</sup>. En plus d'être fastidieuse, cette technique nécessite parfois le chauffage du milieu et peut alors représenter un risque de déstabilisation du vecteur. Enfin, le contrôle de la dispersion du principe actif dans le vecteur par ces techniques n'est pas toujours assuré.

Enfin, il est possible d'utiliser une phase mobile capable à la fois de solubiliser le principe actif et de gonfler le vecteur pour assurer la diffusion du premier dans le second. La principale limite rencontrée par l'industrie pharmaceutique au travers de ce procédé est l'utilisation quasi systématique de solvants toxiques (nécessité d'un bon solvant du polymère) difficiles à éliminer en totalité et responsables de résidus toxiques <sup>[91]</sup>.

L'imprégnation sous dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) supercritique permet de remplacer ces solvants organiques. En conditions supercritiques, le CO<sub>2</sub> est capable de gonfler les polymères. Le procédé d'imprégnation est possible si la molécule active est suffisamment soluble dans le CO<sub>2</sub> supercritique. Le CO<sub>2</sub> supercritique est alors utilisé comme une phase mobile capable de transporter le principe actif au sein du vecteur. Le CO<sub>2</sub> à température et pression ambiante étant gazeux, le matériau imprégné récupéré est dépourvu de toute trace de CO<sub>2</sub>. En moyenne, une imprégnation sous fluide supercritique prend deux à trois heures. Un tel procédé permet de récupérer en quelques heures une poudre sèche de particules imprégnées, sans trace de solvant. Enfin, il a été montré que le CO<sub>2</sub> supercritique avait la capacité d'inactiver les bactéries et d'aller vers une stérilisation des systèmes imprégnés. En matière d'encapsulation pharmaceutique, cette technique commence à faire ses preuves et des premiers brevets apparaissent <sup>[99, 100]</sup>.

**L'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique semble être une technique d'encapsulation très prometteuse. De par l'absence de résidus toxiques assurée et l'effet stérilisant annoncé, nous nous proposons d'encapsuler le vecteur thermosensible par ce moyen. De plus, cette technique pourra également être appliquée pour incorporer des nanostructures inorganiques dans les vecteurs dans les projets qui prolongent ces travaux.**

### 3 Conclusion et objectifs de la thèse

Ce premier chapitre nous a permis d'établir le cahier des charges du vecteur pharmaceutique à élaborer. Nous nous proposons de synthétiser un vecteur pour le relargage ciblé de principes actifs répondant à la demande des technologies de ciblage par stimulus externe (élévation locale de température sous ultrasons ou sous champs magnétiques...). Pour ce faire, le vecteur développé devra présenter les caractéristiques suivantes :

- Le vecteur doit être recouvert d'une couche de polymère hydrophile tel que le poly (oxyde d'éthylène) de manière à prolonger sa durée de vie dans le corps humain.
- Une action autour de la cellule est envisagée. Ainsi, le mode d'administration choisi est l'injection par intraveineuse et le vecteur doit avoir une taille pouvant aller de 100 nm à 500 nm.
- Dans l'optique de répondre aux besoins des techniques de relargage ciblé via un échauffement local externe, le vecteur doit être capable de retenir le principe actif tant que la température est inférieure à 40-45°C et de le libérer uniquement pour des températures supérieures.
- Le vecteur est une nanoparticule à base de polymères biocompatibles et thermosensibles.
- La technique d'encapsulation de la molécule active dans le vecteur est l'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique. Les raisons motivant ce choix sont notamment l'effet stérilisant du CO<sub>2</sub> supercritique, l'absence de solvants toxiques et la possibilité d'imprégner en parallèle des nanostructures inorganiques.

A partir de ces caractéristiques, les différents objectifs de cette thèse ont été définis. Le premier objectif de cette thèse est l'élaboration d'un vecteur thermosensible répondant aux attentes qui viennent d'être énoncées et fait l'objet du chapitre 2 de ce manuscrit. Le vecteur synthétisé est une nanoparticule de polynorbornène (PNB), polymère thermosensible dont la T<sub>g</sub> (35°C) peut être modulée par l'ajout d'un agent réticulant de manière à contrôler la thermosensibilité du matériau. Dans le but de le rendre furtif, ce matériau est recouvert de POE.

Le second objectif de cette thèse consiste à valider l'applicabilité des techniques supercritiques à l'imprégnation de particules à base de PNB et de POE. Pour ce faire, les études du comportement de ces vecteurs ainsi que de la molécule active modèle (l'acide salicylique) sous CO<sub>2</sub> supercritique sont détaillées dans le troisième chapitre.

Enfin, le chapitre 4 fait l'objet, d'une part, de l'étude de l'imprégnation de ces vecteurs par le principe actif modèle sous CO<sub>2</sub> supercritique et, d'autre part, de l'étude du relargage *in vitro* en fonction de la température de ce principe actif par ces particules afin de valider la thermosensibilité du système, objectif principal de cette thèse.

Bibliographie

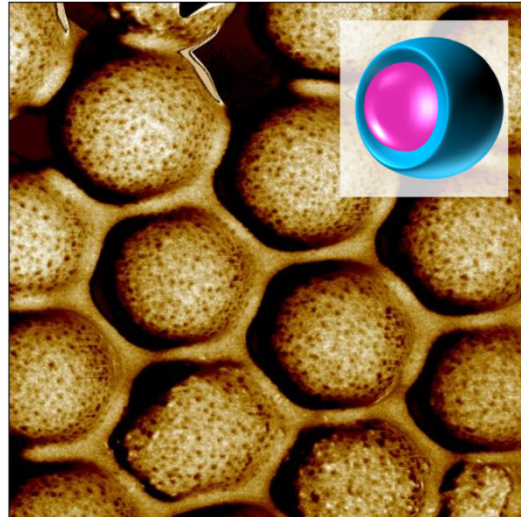
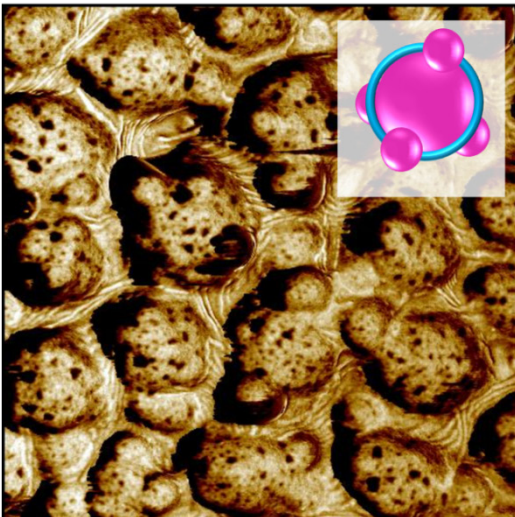
1. Alain, P. [www.pharmacorama.com](http://www.pharmacorama.com).
2. Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *FASEB J.* **2005**, 19, (3), 311-330.
3. Grislain, L.; Couvreur, P.; Lenaerts, V. *Int. J. Pharm.* **1983**, 15, (3), 335-345.
4. Chatenoud, L.; Bach, J., *Immunologie*. Paris, 2008; Vol. 5, p 400.
5. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Baker, D. L.; Baker, A.; Masson, P. L., *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Campus référence 2008; Vol. 1 vol., p 283 p.
6. Owens III, D. E.; Peppas, N. A. *Int. J. Pharm.* **2006**, 307, (1), 93-102.
7. Van Butsele, K.; Jérôme, C.; Jérôme, R. *Polymer* **2007**, 48, (26), 7431-7443.
8. Gref, R.; Domb, A.; Quéllec, P.; Blunk, T.; Muller, R. H.; Verbavatz, J. M.; Langer, R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995**, 16, (2-3), 215-233.
9. Peracchia, M. T.; Vauthier, C.; Passirani, C.; Couvreur, P.; Labarre, D. *Life Sci.* **1997**, 61, (7), 749-761.
10. Passirani, C.; Ferrarini, L.; Barratt, G.; Devissaguet, J. P.; Labarre, D. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1999**, 10, (1), 47-62.
11. Chauvierre, C.; Leclerc, L.; Labarre, D.; Appel, M.; Marden, M. C.; Couvreur, P.; Vauthier, C. *Int. J. Pharm.* **2007**, 338, (1-2), 327-332.
12. Gref, R.; Rodrigues, J.; Couvreur, P. *Macromolecules* **2002**, 35, (27), 9861-9867.
13. Daniel, J.; Pichot, C., *Les latex synthétiques*. Tec & Doc Lavoisier ed.; **2006**; p 1324 p.
14. Vasir, J. K.; Reddy, M. K.; Labhasetwar, V. D. *Curr. Nanosci.* **2005**, 1, 47-64.
15. Courtes, M.; Laborde, N.; Lesca, E.; Meneau, A. *La toxicité des nanoparticules organiques*; **2007**.
16. Kohane, D. S.; Lipp, M.; Kinney, R. C.; Anthony, D. C.; Louis, D. N.; Lotan, N.; Langer, R. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2002**, 59, (3), 450-459.
17. Igarashi, E. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, 229, (1), 121-134.
18. Lamy, P.; Saboungi, M.-L. *Nanomatériaux: Risques pour la santé et l'environnement*; **2005**.
19. Adams, M., L. ; Lavasanifar, A.; Kwon, G., S. . *J. Pharm. Sci.* **2003**, 92, (7), 1343-1355.
20. Vauthier, C.; Couvreur, P. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2007**, 3, (3), 223-234.
21. Hashizume, H.; Baluk, P.; Morikawa, S.; McLean, J. W.; Thurston, G.; Roberge, S.; Jain, R. K.; McDonald, D. M. *Am. J. Pathol.* **2000**, 156, (4), 1363-1380.
22. Hobbs, S. K.; Monsky, W. L.; Yuan, F.; Roberts, W. G.; Griffith, L.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, (8), 4607-4612.
23. Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, 303, (5665), 1818-1822.
24. Moghimi, S. M.; Hedeman, H.; Muir, I. S.; Illum, L.; Davis, S. S. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1993**, 1157, (2), 233-240.
25. Williams, D. *Liverpool, UK: Liverpool University Press* **1999**, 40.
26. Barratt, G. M. *Pharm. Sci. Technol. Today* **2000**, 3, (5), 163-171.
27. Ringsdorf, H. *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **1975**, (51), 135-153.
28. Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, (1), 238-252.
29. Machy, P.; Leserman, L., *Liposomes in cell biology and pharmacology*. 1987.
30. Tomalia, D. A.; Fréchet, J. M. J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2002**, 40, (16), 2719-2728.
31. Kim, S.; Kim, J. H.; Jeon, O.; Kwon, I. C.; Park, K. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, 71, (3), 420-430.
32. Bajpai, A. K.; Shukla, S. K.; Bhanu, S.; Kankane, S. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, 33, (11), 1088-1118.
33. Díez-Peña, E.; Quijada-Garrido, I.; Barrales-Rienda, J. M. *Polymer* **2002**, 43, (16), 4341-4348.

34. Annaka, M.; Tanaka, C.; Nakahira, T.; Sugiyama, M.; Aoyagi, T.; Okano, T. *Macromolecules* **2002**, 35, (21), 8173-8179.
35. Varga, I.; Gilányi, R. M.; Genoveva F., Miklós Z., T.; Mészáros, R.; Filipcsei, G.; Zrínyi, M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, (38), 9071-9076.
36. Gil, E. S.; Hudson, S. M. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, (12), 1173-1222.
37. Guan, J.; Hong, Y.; Ma, Z.; Wagner, W. R. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (4), 1283-1292.
38. Hatefi, A.; Amsden, B. *J. Controlled Release* **2002**, 80, (1-3), 9-28.
39. Lin, H. H.; Cheng, Y. L. *Macromolecules* **2001**, 34, (11), 3710-3715.
40. Jeong, B.; Bae, Y. H.; Lee, D. S.; Kim, S. W. *Nature* **1997**, 388, (6645), 860-862.
41. Akala, E. O.; Kopecková, P.; Kopecek, J. *Biomaterials* **1998**, 19, (11-12), 1037-1047.
42. Brannon-Peppas, L.; Peppas, N. A. *Biomaterials* **1990**, 11, (9), 635-644.
43. Ghandehari, H.; Kopecková, P.; Kopecek, J. *Biomaterials* **1997**, 18, (12), 861-872.
44. Gupta, K. C.; Ravi Kumar, M. N. V. *Polym. Int.* **2000**, 49, (2), 141-146.
45. Khare, A. R.; Peppas, N. A. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1993**, 4, (3), 275-289.
46. Kim, B.; Peppas, N. A. *Macromolecules* **2002**, 35, (25), 9545-9550.
47. Kim, B.; Peppas, N. A. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2002**, 13, (11), 1271-1281.
48. Risbud, M. V.; Hardikar, A. A.; Bhat, S. V.; Bhonde, R. R. *J. Controlled Release* **2000**, 68, (1), 23-30.
49. Quémener, D.; Héroguez, V.; Gnanou, Y. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, (1), 217-229.
50. Meyer, D. E.; Shin, B. C.; Kong, G. A.; Dewhirst, M. W.; Chilkoti, A. *J. Controlled Release* **2001**, 74, (1-3), 213-224.
51. Bawa, P.; Pillay, V.; Choonara, Y. E.; Du Toit, L. C. *Biomed. Mater.* **2009**, 4, (2).
52. Suh, W. H.; Suh, Y. H.; Stucky, G. D. *Nano Today* **2009**, 4, (1), 27-36.
53. Oh, S.; Kim, B. J.; Singh, N. P.; Lai, H.; Sasaki, T. *Cancer Lett.* **2009**, 274, (1), 33-39.
54. Liu, Z.; Jiao, Y.; Wang, Y.; Zhou, C.; Zhang, Z. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, (15), 1650-1662.
55. Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmaële, D.; Hoebeke, J.; Renoir, M.; D'Angelo, J.; Cattell, L.; Couvreur, P. *J. Pharm. Sci.* **2000**, 89, (11), 1452-1464.
56. Kane, P. D. Localized non-invasive biological modulation system. US 20060057192A1 Mar. 16, 2006, 2006.
57. Belikov, V. G.; Kuregyan, A. G. *Pharm. Chem. J.* **2001**, 35, (2), 88-95.
58. Crommelin, D. J. A.; Scherphof, G.; Storm, G. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995**, 17, (1), 49-60.
59. Saho, N.; Nishijima, N.; Tanaka, H.; Sasaki, A. *Phys. C (Amsterdam, Neth.)* **2009**, 469, (15-20), 1286-1289.
60. Terada, T.; Fukui, S.; Mishima, F.; Akiyama, Y.; Izumi, Y.; Nishijima, S. *Phys. C (Amsterdam, Neth.)* **2008**, 468, (15-20), 2133-2136.
61. Chen, H.; Langer, R. *Pharm. Res.* **1997**, 14, (4), 537-540.
62. Kim, S. Y.; Lee, Y. M. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, 74, (7), 1752-1761.
63. O'Neill, B. E.; Li, K. C. P. *Int. J. Hypothermia* **2008**, 24, (6), 506-520.
64. Suzuki, A.; Tanaka, T. *Nature* **1990**, 346, (6282), 345-347.
65. Anal, A. K. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* **2007**, 1, 83-90.
66. Mamada, A.; Tanaka, T.; Kungwatchakun, D.; Irie, M. *Macromolecules* **1990**, 23, (5), 1517-1519.
67. Moonen, C.; Quesson, B.; Vimeux, F.. FR, FR2823678 (A1) 2002-10-25, **2002**.
68. Rapoport, N.; Pitt, W., G. US Patent, 6649702/ B1, **2003**.
69. Chung, J. E.; Yokoyama, M.; Yamato, M.; Aoyagi, T.; Sakurai, Y.; Okano, T. *J. Controlled Release* **1999**, 62, (1-2), 115-127.
70. Okuyama, Y.; Yoshida, R.; Sakai, K.; Okano, T.; Sakurai, Y. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1993**, 4, (5), 545-556.
71. Yoshida, R.; Sakai, K.; Okano, T.; Sakurai, Y. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1992**, 3, (3), 243-252.

72. Yoshida, R.; Sakai, K.; Ukano, T.; Sakurai, Y.; Bae, Y. H.; Kim, S. W. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1991**, 3, (2), 155-162.
73. Okano, T.; Bae, Y. H.; Jacobs, H.; Kim, S. W. *J. Controlled Release* **1990**, 11, (1-3), 255-265.
74. Kwon, Y. M.; Kim, S. W., *Thermosensitive biodegradable hydrogels for the delivery of therapeutic agents*. Drugs and the Pharmaceutical Sciences Polymeric Drug Delivery Systems: **2005**; Vol. 148, p 653.
75. Kohori, F.; Sakai, K.; Aoyagi, T.; Yokoyama, M.; Sakurai, Y.; Okano, T. *J. Controlled Release* **1998**, 55, (1), 87-98.
76. Neradovic, D.; Soga, O.; Van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. *Biomaterials* **2004**, 25, (12), 2409-2418.
77. Neradovic, D.; Van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. *Macromolecules* **2001**, 34, (22), 7589-7591.
78. Nakayama, M.; Okano, T.; Miyazaki, T.; Kohori, F.; Sakai, K.; Yokoyama, M. *J. Controlled Release* **2006**, 115, (1), 46-56.
79. Serres, A.; Baudys, M.; Kim, S. W. *Pharm. Res.* **1996**, 13, (2), 196-201.
80. Kim, Y. H. *J. Controlled Release* **1994**, 28, (1-3), 143-152.
81. Lutz, J. F.; Andrieu, J.; Üzgün, S.; Rudolph, C.; Agarwal, S. *Macromolecules* **2007**, 40, (24), 8540-8543.
82. Lutz, J. F.; Akdemir, O.; Hoth, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, (40), 13046-13047.
83. Aoki, T.; Kawashima, M.; Katono, H.; Sanui, K.; Ogata, N.; Okano, T.; Sakurai, Y. *Macromolecules* **1994**, 27, (4), 947-952.
84. Bouillot, P.; Vincent, B. *Colloid. Polym. Sci.* **2000**, 278, (1), 74-79.
85. Katono, H.; Maruyama, A.; Sanui, K.; Ogata, N.; Okano, T.; Sakurai, Y. *J. Controlled Release* **1991**, 16, (1-2), 215-228.
86. Schmaljohann, D. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, 58, (15), 1655-1670.
87. Owens, D., E.; Peppas, N. A. US Patent, 013430 A1, **2008**.
88. Bikram, M.; West, J. L. *Expert Opin. Drugs . Deliv.* **2008**, 5, (10), 1077-1091.
89. Jeong, B.; Kim, S. W.; Bae, Y. H. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, (1), 37-51.
90. Jeong, B.; Bae, Y. H.; Kim, S. W. *J. Controlled Release* **2000**, 63, (1-2), 155-163.
91. Brazel, C. S.; Peppas, N. A. *Polymer* **1999**, 40, (12), 3383-3398.
92. Sheng, X.; Lee, J. K.; Kessler, M. R. *Polymer* **2009**, 50, (5), 1264-1269.
93. Noël, T.; Franceschi, S.; Perez, E.; Vicendo, P.; Rico-Lattes, I. *Langmuir* **2000**, 16, (23), 8980-8983.
94. Watson, K. J.; Anderson, D. R.; Nguyen, S. T. *Macromolecules* **2001**, 34, (11), 3507-3509.
95. Fisher, W., B.; Crescentini, L., *Poly(bicycloheptene) and related polymers*. Encyclopedia of chemical technology **1982**; Vol. 18.
96. Collette, F. Supramolecular engineering of vesicles via self-assembly: application to drug delivery. **2005**. Thèse.
97. Nardin, C.; Hirt, T.; Leukel, J.; Meier, W. *Langmuir* **2000**, 16, (3), 1035-1041.
98. Nardin, C.; Thoeni, S.; Widmer, J.; Winterhalter, M.; Meier, W. *Chem. Commun.* **2000**, (15), 1433-1434.
99. Carli, F.; Colombo, I.; Alessi, P.; Cortesi, A. Pharmaceutical compositions having the shape of powders of cross-linked polymers loaded with drugs and related preparation process by supercritical fluids. WO, **1999**.
100. Fages, J.; Freiss, B.; Marciacq, F.; Sauceau, M.; Lochard, H.; Letourneau, J.-J.; Jousset-Dubien, C. FR Patent, 2830760/ A1, 200-02-08, **2008**.

## Chapitre 2

### Synthèse du vecteur polymérique PNB-POE





**SOMMAIRE**

<b>1</b>	<b>Bibliographie : synthèse d'une particule de PNB réticulée</b>	<b>44</b>
<b>1.1</b>	<b>POLYMERISATION PAR METATHÈSE DES CYCLO-OLEFINES</b>	<b>44</b>
1.1.1	HISTORIQUE ET ENJEUX	44
1.1.2	MECANISME REACTIONNEL DE LA ROMP	45
1.1.3	LES COMPLEXES AMORCEURS DE LA ROMP	47
<b>1.2</b>	<b>PROCESSUS DE POLYMERISATION : CHOIX DES MILIEUX DISPERSÉS</b>	<b>51</b>
<b>1.3</b>	<b>POLYMERISATION PAR METATHÈSE EN MILIEU DISPERSÉ : CHOIX DE LA DISPERSION</b>	<b>52</b>
1.3.1	LES MILIEUX DISPERSÉS	52
1.3.2	DESCRIPTION ET SPÉCIFICITÉ DES DIVERS PROCÉDES	54
1.3.3	LA DISPERSION	56
<b>1.4</b>	<b>SYNTHÈSE D'UNE PARTICULE RÉTICULÉE EN DISPERSION</b>	<b>60</b>
1.4.1	PHÉNOMÈNES DE RÉTICULATION ET MILIEUX DISPERSÉS	60
1.4.2	PARTICULES DE PNB RÉTICULÉES	63
<b>2</b>	<b>Synthèse des vecteurs polymériques PNB-POE</b>	<b>64</b>
<b>2.1</b>	<b>SYNTHÈSE DE L'AGENT STABILISANT RÉACTIF : AS</b>	<b>64</b>
<b>2.2</b>	<b>SYNTHÈSE DE L'AGENT RÉTICULANT : AR</b>	<b>67</b>
2.2.1	CHOIX DE L'AGENT RÉTICULANT	67
2.2.2	SYNTHÈSE DES AGENTS RÉTICULANTS	70
<b>2.3</b>	<b>SYNTHÈSE DE PARTICULES DE PNB-POE RÉTICULÉES</b>	<b>73</b>
2.3.1	DISPERSION DE PARTICULES DE PNB-POE RÉTICULÉES	73
2.3.2	ÉTUDE CINÉTIQUE	74
2.3.3	PLAN D'EXPÉRIENCES	78
2.3.4	COMPRÉHENSION DE L'APPARITION DES NODULES	88
<b>3</b>	<b>Conclusions et bilan par rapport aux objectifs</b>	<b>94</b>

Dans le chapitre précédent le cahier des charges du vecteur thermosensible a été établi. Deux exigences fondamentales ont été avancées : assurer une durée de vie du vecteur suffisante pour permettre l'accès d'une zone cible et contrôler la thermosensibilité des matériaux pour un relargage du principe actif dans une gamme de températures tolérées *in vivo*. Nous avons choisi de développer un matériau polymère de type cœur-écorce dont la composition et la structure ont été définies. L'allongement de son temps de circulation sera assuré par un recouvrement de la surface des particules par du poly (oxyde d'éthylène) (POE). La thermosensibilité de la diffusion du principe actif sera possible grâce à l'élaboration d'un cœur de polynorbornène (PNB) qui, de par sa température de transition vitreuse ( $T_g$ ), devrait être capable d'effectuer des cycles de gonflement-dégonflement en fonction de la température et ce, dans une gamme de températures tolérées par les cellules. Le contrôle de la thermosensibilité du relargage est envisagé par l'ajout d'un agent réticulant du polynorbornène qui, suivant la quantité dans laquelle il est incorporé, permettra de moduler la  $T_g$  du cœur du matériau.

Le chapitre suivant établit dans un premier temps un bilan des techniques de synthèse envisageables pour le développement d'un tel vecteur. La polymérisation par métathèse par ouverture de cycle du polynorbornène sera présentée ainsi que les divers processus de polymérisation possibles avec un accent porté sur la technique qui a été choisie, la Dispersion<sup>1</sup>. Le cas particulier des vecteurs réticulés sera traité par la suite. Enfin, la deuxième partie de ce chapitre expose et discute les différents résultats de synthèse de particules de PNB-POE réticulées obtenues dans le cadre de ce travail de thèse.

---

<sup>1</sup> Pour éviter toute confusion entre la technique de synthèse par dispersion utilisée dans ces travaux et la dispersion qui est l'action d'émulsifier une phase dans une autre, la première sera notée avec un D majuscule et la seconde avec un d minuscule.

## 1 Bibliographie : synthèse d'une particule de PNB réticulée

### 1.1 Polymérisation par métathèse des cyclo-oléfines

L'obtention du polynorbornène se fait par polymérisation par métathèse. Les paragraphes suivants décrivent les origines et les principes de cette technique de polymérisation.

#### 1.1.1 Historique et enjeux

Jusqu'au début des années 50, les polymérisations à partir d'oléfines suscitaient très peu d'intérêt en raison des faibles poids moléculaires atteints. Ainsi, alors qu'elle essayait d'oligomériser l'éthylène par un catalyseur d'alkyl d'aluminium, l'équipe de Ziegler n'a pu obtenir que des molécules de butène <sup>[1]</sup>. C'est en explorant l'efficacité d'autres métaux que Ziegler et Natta ont trouvé une série de sels de titane permettant la synthèse de polymères à haut poids moléculaire à partir d'éthylène et de propylène. Ces travaux, récompensés par un prix Nobel de Chimie en 1963, constituent les fondements de l'industrie des polyoléfines. Dans ce contexte, de nombreuses études se sont intéressées au développement de nouveaux systèmes catalytiques permettant de polymériser d'autres oléfines <sup>[2]</sup>. En 1955, Anderson et Merckling de l'entreprise Dupont de Nemours introduisent les premiers polyalcénamères obtenus à partir de la catalyse de systèmes hétérogènes comme  $\text{MoO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$  activés par  $\text{LiAlH}_4$  (dérivés des catalyseurs type Ziegler-Natta) <sup>[3]</sup>. Notamment, ils développent la polymérisation du norbornène par ouverture de cycle et mettent en évidence la conservation des doubles liaisons le long de la chaîne polymère (ROMP, Figure 2.1) <sup>[4]</sup>. Parallèlement à ces recherches sur les techniques de polymérisation des oléfines, Peters et Evering <sup>[5]</sup> (Standard Oil Company) et Banks Bailey <sup>[6]</sup> (Philips Petroleum) ont décrit la transalkylidénation du propène en un mélange d'éthylène et de but-2-ène, (CM, Figure 2.1). C'est en 1967 que Calderon (Goodyear) fait le lien entre la polymérisation par ouverture de cycle et la transalkylidénation et baptise cette réaction du nom de métathèse <sup>[7]</sup>.

Du latin méta, signifiant changement et tithémis, place, la métathèse est définie comme une réaction d'échange entre deux molécules, contenant toutes les deux des doubles liaisons carbone-carbone. Dans la métathèse des oléfines, les atomes des doubles liaisons changent de partenaires pour créer deux nouvelles molécules, contenant chacune une double liaison carbone-carbone. Cette transalkylidénation offre de nombreuses possibilités en chimie organique telles que l'ouverture ou la fermeture de cycles (Figure 2.1 RCM, ROMP) ou encore la réorganisation de substituants autour de doubles liaisons (Figure 2.1 CM, HM).

Appliquée aux oléfines cycliques, la métathèse conduit à des polymères linéaires eux-mêmes porteurs de doubles liaisons et permet d'envisager la synthèse de polymères insaturés à forts poids moléculaires.

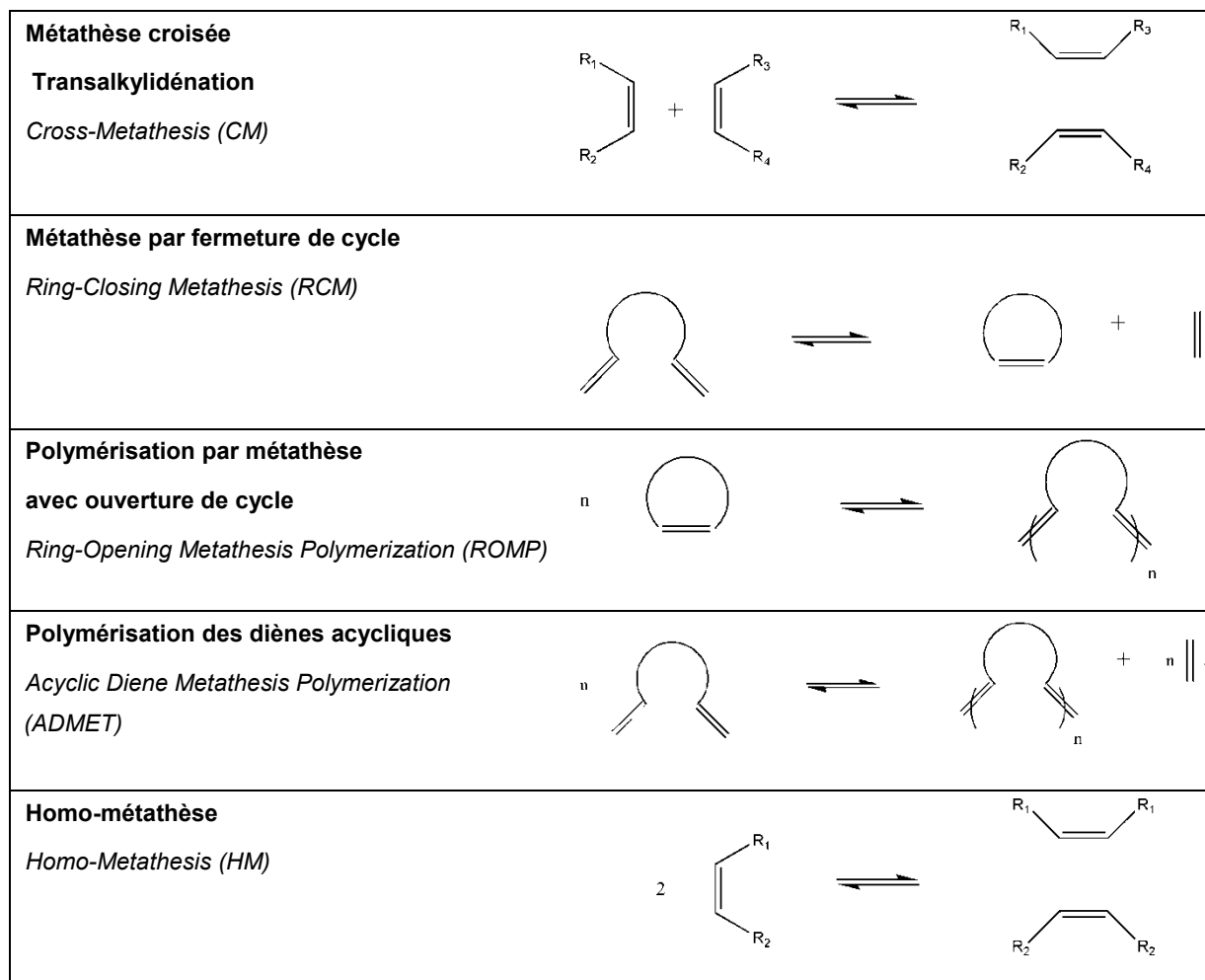


Figure 2.1 : Différents types de métathèse.

### 1.1.2 Mécanisme réactionnel de la ROMP

Nombreuses sont les équipes de recherche à avoir tenté d'élucider le mécanisme de la métathèse mais c'est celui proposé par Chauvin en 1971 <sup>[8-11]</sup> qui est aujourd'hui unanimement accepté. Rappelons qu'il valut à son auteur de recevoir le prix Nobel de chimie en 2005<sup>2</sup>. Ce mécanisme introduit l'intervention du catalyseur en tant que métalla-carbène (Figure 2.2). Sous cette forme, le métal peut se complexer avec la cyclooléfine. C'est cette espèce qui amorce la réaction par cycloaddition [2+2] formant ainsi un métalla-cyclobutane.

<sup>2</sup> Distinction partagée avec deux autres chercheurs : Richard Schrock et Robert Grubbs.

Suite à un glissement perpendiculaire des liaisons, une nouvelle oléfine est formée ainsi qu'un nouveau métalla-carbène. Dans le cadre d'une ROMP, l'étape de propagation est assurée par additions successives de molécules de monomères sur cette espèce métalla-carbène en croissance <sup>[12]</sup>. Dans le cas d'espèces métalla-carbènes à réactivité contrôlée, la réaction est délibérément désactivée par un réactif spécifique de manière, d'une part, à terminer la réaction et supprimer de la chaîne polymère le métal de transition et, d'autre part, à positionner un groupement fonctionnel connu en bout de chaîne <sup>[13]</sup>.

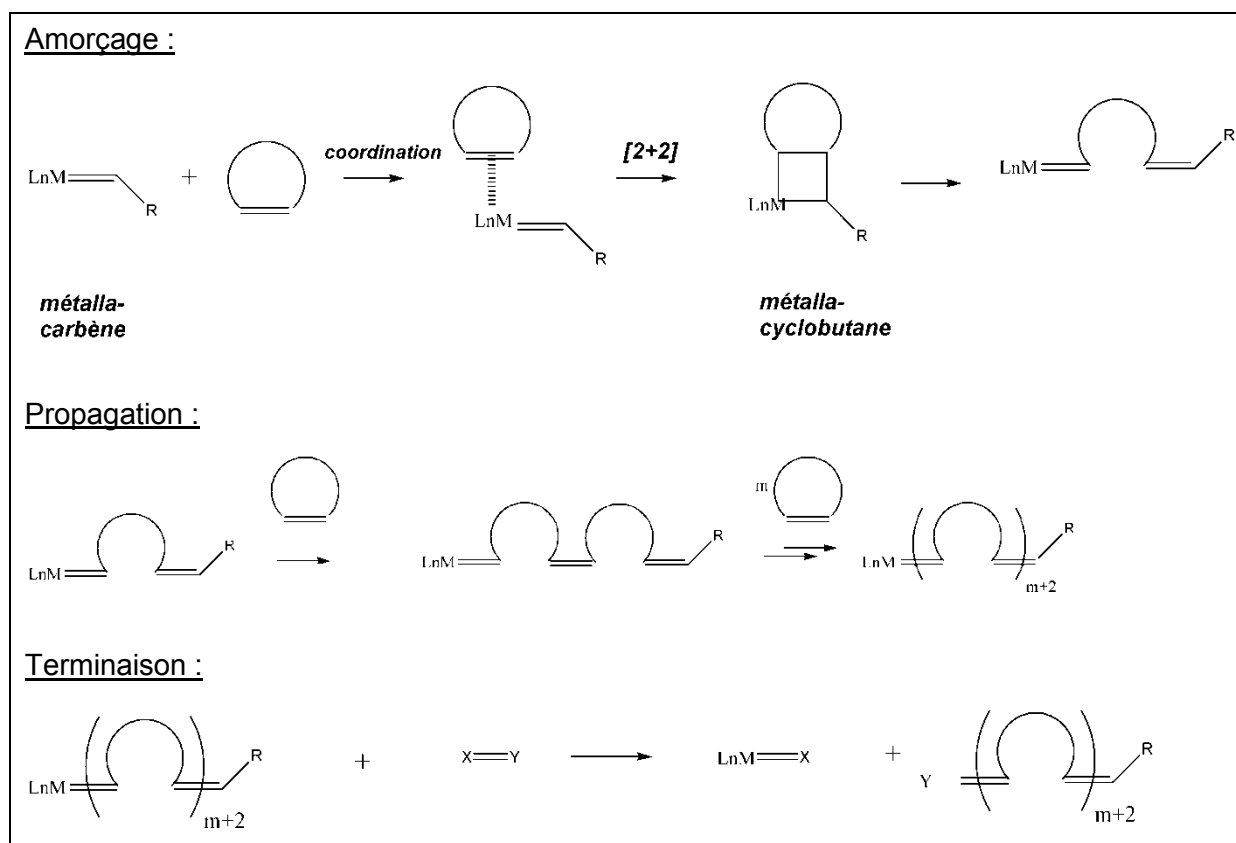


Figure 2.2 : Mécanisme de la ROMP proposé par Chauvin <sup>[12, 13]</sup>.

Tout comme la plupart des réactions de métathèse, les ROMP sont en règle générale réversibles et par conséquent, le mécanisme de base exposé en Figure 2.2 peut conduire à une dépolymérisation. Cependant, la position de l'équilibre formé entre le monomère et le polymère dépend des caractéristiques thermodynamiques de la polymérisation. Comme dans de nombreuses polymérisations par ouverture de cycle, la libération d'énergie lors de l'ouverture de la cyclooléfine est la force motrice de la ROMP. Cette contribution enthalpique s'oppose cependant à une contrainte entropique, favorisant la dépolymérisation. Ainsi, seule la polymérisation de monomères à forte tension de cycle ( $> 5\text{kcal.mol}^{-1}$ ) permet d'atteindre des résultats quantitatifs <sup>[13]</sup>. C'est notamment le cas du norbornène.

En plus des risques de dépolymérisation, l'équilibre de la ROMP peut être perturbé par des réactions de transfert inter- et intra-moléculaires (aussi appelé *backbiting*). Ces réactions secondaires de métathèses (Figure 2.3) conduisent nécessairement à un élargissement de la distribution en taille des chaînes polymères <sup>[13]</sup>.

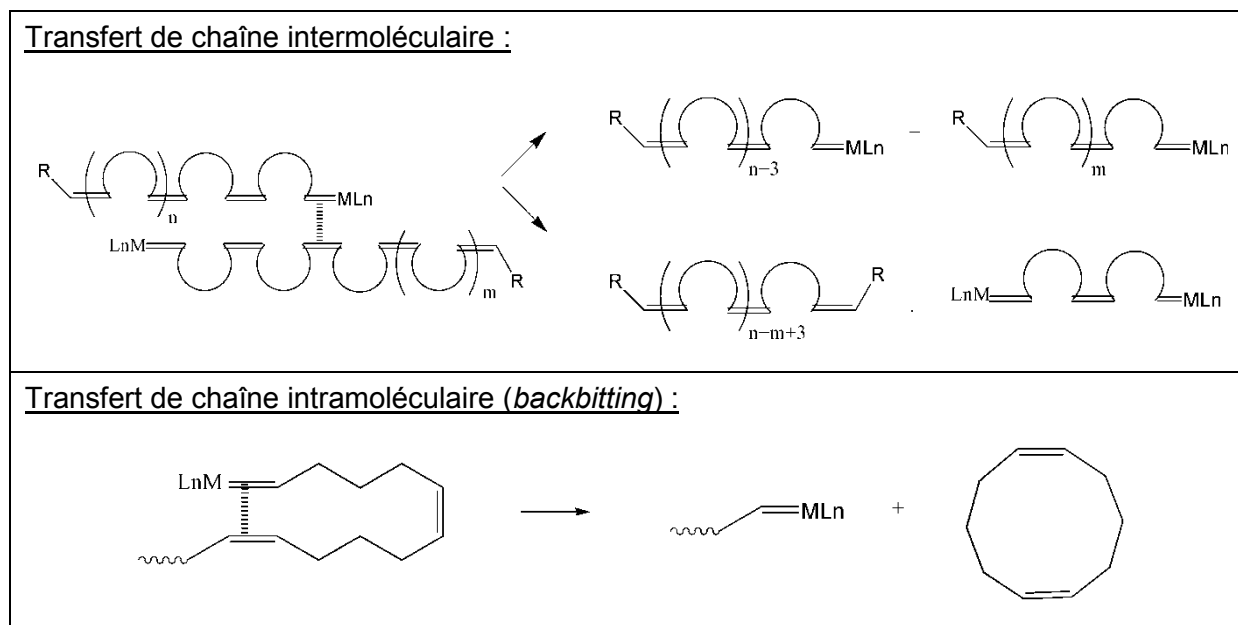


Figure 2.3 : Exemple de réactions secondaires possibles lors d'une ROMP.

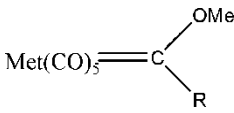
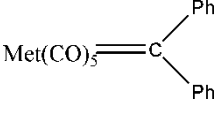
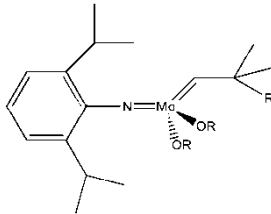
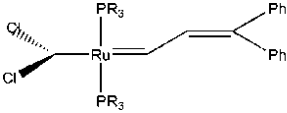
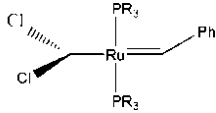
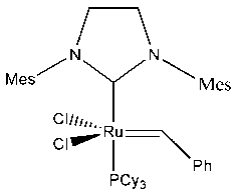
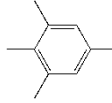
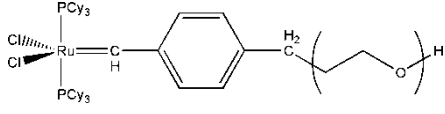
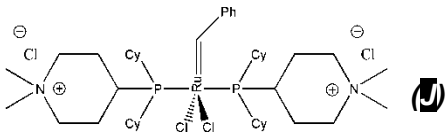
Le contrôle de la ROMP a été possible grâce aux avancées réalisées concernant les systèmes catalytiques mis en jeu. L'objectif des recherches était de rendre la ROMP vivante et contrôlée<sup>3</sup>, ce qui suppose notamment le développement d'un catalyseur capable d'amorcer rapidement la réaction et de limiter les réactions secondaires (transfert, terminaison, dépolymérisation...) <sup>[13]</sup>.

### 1.1.3 Les complexes amorceurs de la ROMP

Le Tableau 2.1 reprend les différentes familles de catalyseurs qui ont marqué l'évolution de la recherche en matière de ROMP. Leurs principales caractéristiques sont décrites par la suite.

<sup>3</sup> Le caractère vivant d'une polymérisation désigne la propriété de persistance/pérennité des centres actifs (pas de réaction de transfert de chaînes ou de terminaison) tandis que le caractère contrôlé désigne l'accès à des masses molaires souhaitées avec de faibles indices de polymolécularité.

Tableau 2.1 : Quelques exemples de complexes utilisés en polymérisation par métathèse.

Non tolérants vis-à-vis de l'eau	<b>Structures mal définies : (A)</b> $\text{TiCl}_4\text{-LiAl}(\text{C}_7\text{H}_{15})_4$ , $\text{Mo}(\text{CO})_6/\text{Al}_2\text{O}_3$ , $\text{WO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$ , $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3$ , $\text{SnMe}_4$ , $\text{WCl}_6/\text{SnMe}_4$ , $\text{ReCl}_5/\text{EtAlCl}_2$ , $\text{WCl}_6/\text{EtAlCl}_2/\text{EtOH}$		
	<b>Les métalla-carbènes</b> $\delta^- \text{Met}=\text{C}^{\delta+}$		
	(B) 	(B') 	R : OCH <sub>3</sub> , Ph ; Met : Mo, W
<b>Les métalla-alkylidènes</b> $\delta^+ \text{Met}=\text{C}^{\delta-}$			
(C) 	R' = CH <sub>3</sub> ou Ph R = tBu ou C(CH <sub>3</sub> )(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ou C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (CF <sub>3</sub> )		
Tolérants vis-à-vis de l'eau. Solubles en milieux organiques.	<b>Catalyseurs de Grubbs de première génération (D)</b>		
	(D) 	(D') 	D a : R = C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> (Cy) b : R = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (Ph)
	<b>Catalyseurs de Grubbs de seconde génération (E)</b>		
(E) 	Mes : 		
Hydrosolubles	<b>Structures mal définies : RuCl<sub>3</sub>, xH<sub>2</sub>O (F), Ru(tos)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> (G)</b>		
	Ajout d'une chaîne hydrophile	Ligands hydrosolubles cationiques	
	(F) 	(G) 	

### 1.1.3.1 Première classe de catalyseurs : les systèmes « mal définis »

Les premiers systèmes catalytiques à avoir été développés ont des structures « mal définies ». De nature homogène ou hétérogène, ils sont constitués de mélanges de sels métalliques et d'agents alkylants ou de sels de métaux de transition. Un grand nombre de systèmes catalytiques de ce type ont été développés à partir d'une large gamme de métaux de transition <sup>[14-20]</sup> (Tableau 2.1, A). Pour de tels systèmes, l'espèce active est formée *in situ*.

Bien que très réactifs, ces systèmes présentent une efficacité limitée. D'une part, la production *in situ* d'une double liaison métal-carbone exige des conditions « dures » impliquant notamment des acides de Lewis relativement forts. D'autre part, l'espèce active ainsi formée est très sensible à l'eau et à l'air et le contrôle de la concentration en espèces actives est donc très limité.

### 1.1.3.2 Seconde classe de catalyseurs : les structures définies

Bien que « non vivants », les premiers systèmes catalytiques ont constitué les fondements du développement d'une seconde classe de catalyseurs. Mieux définis, ces composés sont des systèmes porteurs d'une liaison carbone-métal stable préformée et permettent de s'affranchir de l'étape de formation *in situ*. Ainsi, le composé étant directement additionné sous sa forme active, il est possible d'amorcer la réaction dans des conditions plus douces et de façon contrôlée. Cette catégorie de complexes se scinde en deux groupes : les métalla-carbènes et les métalla-alkylidènes. Le premier groupe désigne les composés à caractère électrophile, disposant d'un métal de transition de faible degré d'oxydation (parmi eux, les catalyseurs de Fischer <sup>[21]</sup> et Casey <sup>[22]</sup>, Tableau 2.1, B et B'). Le second groupe concerne quant à lui les composés au comportement nucléophile avec un métal de transition possédant un haut degré d'oxydation et offre un meilleur compromis entre stabilité et réactivité (parmi eux, le catalyseur de Schrock, Tableau 2.1, C).

### 1.1.3.3 Vers une troisième classe de catalyseurs : les systèmes tolérants aux milieux protiques

Durant les vingt dernières années, la société ayant pris conscience de l'importance du respect de la sécurité, de la santé et de l'environnement, la substitution des solvants organiques par des solvants plus inoffensifs est devenue une exigence croissante dans l'industrie chimique. Dans ce contexte, la Science des Polymères se tourne de plus en plus vers la synthèse et l'application de nanoparticules de polymère dispersées dans un non solvant comme l'eau. Une autre caractéristique inhérente aux procédés en milieux dispersés est la présence quasi systématique de fonctions polaires localisées soit sur les molécules de monomère, soit sur celles de solvant ou de stabilisant. Très sensibles aux groupes fonctionnels, les processus de polymérisation catalytique tels que la ROMP ont vu leur



utilisation en milieu dispersé considérablement limitée. Cependant, un élément de transition se démarque de par sa réactivité sélective vis-à-vis des oléfines : le ruthénium (Ru). Ainsi, les polymérisations du cyclobutène et du 3-méthylcyclobutène <sup>[23, 24]</sup>, du bicyclo[4,2,0]oct-7-ène et du norbornène <sup>[17, 25]</sup> ont été réalisées en milieu protique (alcoolique ou émulsion aqueuse) à l'aide d'un amorceur à base de trichlorure de ruthénium hydraté (Tableau 2.1, F). L'utilisation du Ru pour la ROMP en milieu dispersé fut introduite pour la première fois par l'équipe de Booth en 1993. A partir d'un sel de Ruthénium (première classe), ils ont été capables de synthétiser un latex par ROMP en émulsion aqueuse de l'exo-2,3-bis(metoxyméthyl)-7-oxanorbornène. Malgré les faibles efficacités avérées (mauvaises conversions du monomère, limitation aux cyclo-oléfines tendues, longue période d'induction...), ces études mettent en avant l'adaptabilité de la ROMP aux procédés en milieu dispersé <sup>[26, 27]</sup>.

C'est la synthèse de catalyseurs à base de Ru mieux définis (deuxième classe) qui a permis les premières polymérisations vivantes de diverses cyclo-oléfines fonctionnalisées et tendues en présence d'eau ou de solvants protiques <sup>[28]</sup> (catalyseurs de Grubbs, Tableau 2.1, D et E). Ces complexes sont stables lors de leur dissolution dans des solvants organiques secs et dégazés (benzène, dichlorométhane...) et ce, sur de longues périodes (> semaines). Enfin, aucune décomposition de ces complexes n'a pu être observée en présence d'eau, d'alcools, d'éthers ou autres fonctions aldéhyde et cétone. En revanche, ils présentent une réactivité exceptionnelle vis-à-vis des oléfines. La combinaison de tous ces avantages fait de ces catalyseurs des complexes de choix pour l'amorçage en milieu dispersé de la ROMP de cyclo-oléfines plus ou moins tendues <sup>[13]</sup>.

Ce sont Grubbs *et al.* qui furent les premiers en 1996 à mettre en évidence le bon fonctionnement d'une ROMP en milieu hétérogène à partir des catalyseurs D<sub>a</sub> ou D'<sub>a</sub>. Ces systèmes mettent en évidence l'aptitude de ces complexes à amorcer la ROMP dans des milieux majoritairement protiques (aqueux en l'occurrence) mais sans assurer la stabilité colloïdale des objets ainsi synthétisés <sup>[29]</sup>. En 2000, notre équipe a développé au LCPO à partir d'un de ces systèmes catalytiques une technique de synthèse de particules de PNB par ROMP en milieu dispersé (à base d'un mélange éthanol-dichlorométhane) <sup>[30]</sup>. Il a ainsi été montré que non seulement cette technique de polymérisation conduisait à des rendements quantitatifs en monomère mais en plus elle permettait d'obtenir des particules bien définies, monodisperses et sur lesquelles pouvaient être greffées des molécules actives pour une application dans le domaine de la « *Drug Delivery* » <sup>[31, 32]</sup>. Ayant été choisie comme technique de synthèse de nos vecteurs, elle fera l'objet d'une étude plus approfondie au paragraphe 1.4 de ce chapitre.

Il faut tout de même noter que l'utilisation de ces catalyseurs organosolubles nécessite une pré-dissolution dans une phase organique. Afin de contourner ce problème, depuis une dizaine d'années, les principaux travaux de recherche en matière de catalyseurs de métathèse tendent à rendre hydrosolubles les composés ruthéniums-carbènes initialement hydrophobes. Les premières stratégies consistent à remplacer un ou plusieurs ligands du ruthénium par des homologues hydrosolubles <sup>[33-37]</sup> (Tableau 2.1, J) mais elles s'orientent de plus en plus vers le greffage de longues chaînes polymères hydrophiles (essentiellement POE) <sup>[38-41]</sup> (Tableau 2.1, H et I).

**La technique de synthèse utilisée dans le cadre des travaux de thèse exposés dans ce manuscrit se déroule dans un mélange dichlorométhane-éthanol. L'hydrosolubilité du catalyseur n'était donc pas une nécessité et nous avons utilisé le catalyseur reconnu comme étant le plus réactif vis-à-vis des oléfines tout en étant stable en milieu protique : le catalyseur de Grubbs de première génération (Tableau 2.1, D'a).**

## 1.2 Processus de polymérisation : choix des milieux dispersés

Deux processus sont envisageables : la polymérisation en milieu homogène (en solution ou en masse) ou la polymérisation en milieu hétérogène (catalyse supportée ou milieu dispersé). Seule la dernière catégorie concerne notre projet et a été traitée ici.

Comparée à la polymérisation en milieu homogène, la polymérisation en milieu dispersé présente de nombreux avantages parmi lesquels :

- La présence d'une phase dispersante permet de dissiper les échauffements provoqués par l'exothermicité de la réaction de polymérisation.
- Différents types de phase dispersante sont envisageables (hydrocarbures inertes, eau, CO<sub>2</sub> supercritique) toujours plus respectueux de l'environnement et des utilisateurs.
- La compartimentation du milieu permet d'envisager la récupération de matériaux sous forme divisée avec des morphologies particulières diverses et des tailles pouvant aller de quelques dizaines de nanomètres jusqu'à quelques millimètres. Ainsi, dans le domaine industriel, la polymérisation en milieu dispersé peut amener à simplifier la synthèse de nombreux matériaux : des supports catalytiques, des latex filmifiants (peintures, vernis...), des vecteurs thérapeutiques (cas de principes actifs encapsulés), des vecteurs pour l'imagerie biomédicale (cas d'encapsulation ou de greffage d'agents de contraste)...

Le paragraphe suivant présente tout d'abord les milieux dispersés de façon générale (formation et stabilisation) suivis d'une rapide présentation des différents procédés envisageables pour l'élaboration du vecteur. Enfin, la Dispersion, technique choisie pour la synthèse de particules PNB-POE fera l'objet d'une étude plus approfondie.

### **1.3 Polymérisation par métathèse en milieu dispersé : choix de la Dispersion**

#### **1.3.1 Les milieux dispersés**

La polymérisation en milieu dispersé conduit à des particules de polymère dispersées dans une phase continue. Le milieu de départ est constitué d'une phase dispersante et d'une phase monomère (miscible ou non dans la phase dispersante), le tout étant stabilisé grâce à une agitation contrôlée et / ou un agent tensioactif. Le procédé le plus ancien et le plus connu est l'émulsion (les premiers travaux remontent à plus de 70 ans). L'idée était alors de compatibiliser deux liquides non miscibles de manière à ce que leur mélange puisse être manipulé <sup>[42]</sup>. Le processus initial consistait à émulsifier une phase dans l'autre en utilisant une agitation mécanique, d'une part, et un composé émulsifiant, d'autre part. On obtenait ainsi une dispersion de gouttelettes d'une phase dans l'autre. Depuis, cette technique s'est répandue permettant la préparation de dispersions colloïdales de plus en plus diversifiées pour un nombre croissant d'applications. Les procédés qui en sont dérivés tels que la polymérisation en mini-, micro- émulsion ou la Dispersion<sup>4</sup> qui visent un meilleur contrôle de la taille des particules, ont donné lieu à de nombreuses études académiques et permettent de mieux en mieux de contrôler la taille, la morphologie et les caractéristiques des objets ainsi formés.

*Remarque : Il existe deux grandes catégories de milieux dispersés suivant que la phase dispersante soit aqueuse ou non. On distingue ainsi les émulsions directes (gouttelettes d'huile dans de l'eau) des émulsions inverses (gouttelettes d'eau dans de l'huile). Le sujet étant ici lié à la polymérisation de monomères hydrophobes conduisant à des particules de polymères dispersés dans une phase CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOH, le paragraphe suivant traite uniquement le cas des émulsions directes.*

Les dispersions colloïdales ne sont pas des états stables de la matière. En effet, la dispersion d'une espèce dans une autre suppose la création d'interfaces et donc l'apparition

---

<sup>4</sup> La polymérisation en Dispersion ne fait pas intervenir de milieu biphasique initial mais l'hétérogénéité du milieu apparaît dès le début de la polymérisation où le polymère précipite sous forme particulaire dans une phase dispersante.

de tensions de surface. Ces tensions représentent le coût énergétique de la création d'interfaces. Afin de retourner à un état moins coûteux en énergie, ces tensions vont tendre à réduire l'aire totale d'interface. L'état le plus stable thermodynamiquement pour le système est celui dans lequel chacune des deux phases (dispersée – dispersante) a une aire d'interface minimale et est donc macroscopiquement séparée de l'autre. Pour réduire l'énergie libre totale des interfaces, le système peut avoir recours à différents procédés (Figure 2.4):

- **Agrégation** : étant animées d'un mouvement brownien, les gouttelettes dispersées sont amenées à s'entrechoquer. Si une interaction attractive suffisante existe entre les gouttes ainsi mises en contact<sup>5</sup>, elles restent associées.
- **Coalescence** : suite à l'agrégation des gouttelettes, celles-ci fusionnent pour ne former qu'une grosse goutte. Si ce processus se répète, la phase dispersante démixte et l'on revient au système diphasique.
- **Mûrissement d'Ostwald** : il arrive qu'à l'issue de l'étape d'émulsification, la population de gouttelettes ne soit pas homogène en taille. Les plus petites gouttelettes présentent une pression interne (pression de Laplace) plus importante et elles auront tendance à se déverser dans les plus grosses.

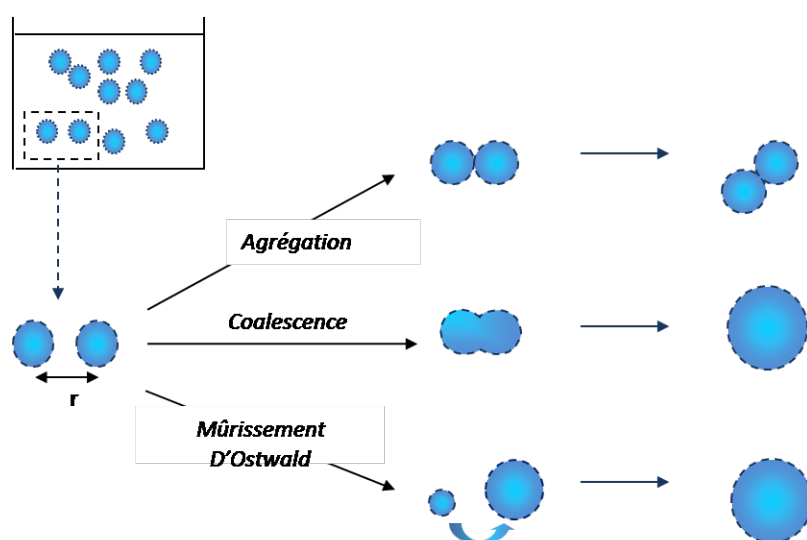


Figure 2.4 : Principaux phénomènes de déstabilisation pour des gouttelettes d'huile dispersées dans une phase liquide.

Ces phénomènes sont d'autant plus prononcés que la polymérisation se réalise en présence d'un agent réticulant <sup>[43-47]</sup>. Une évaluation de ces risques est effectuée au paragraphe 1.4.1 de ce chapitre.

<sup>5</sup> Ce sont en règle générale les forces de Van der Waals qui s'expriment après collisions entre les particules.

L'enjeu de la formulation est de contrecarrer ces phénomènes afin de maintenir l'état dispersé des gouttes. Si l'on souhaite limiter les phénomènes d'agrégation ou de coalescence, il est nécessaire de compenser les forces de Van der Waals. En pratique, ce processus est possible par l'addition d'agents de surface (ou tensioactifs). Ces agents permettent de diminuer l'énergie de surface et de conserver la stabilité des gouttelettes. Selon la nature du stabilisant, les gouttelettes sont maintenues à distance les unes des autres par l'intermédiaire de répulsions électrostatiques (introduction de charges supplémentaires), stériques (introduction de longues chaînes polymères) ou électrostériques (combinaison des deux).

Si l'on souhaite limiter le mûrissement d'Ostwald, l'addition d'un composé ultrahydrophobe, miscible dans la phase dispersée permet de diminuer le potentiel chimique des plus petites gouttelettes et donc de diminuer leur déversement dans les plus grosses gouttelettes.

*Remarque : Dans le cas de dispersions de particules, seuls les phénomènes d'agrégation ou de coalescence peuvent avoir lieu. Ici, la coalescence ne conduit pas à la démixtion de la phase dispersante mais à l'agencement des particules sous forme de coagulats. Il est tout de même primordial de limiter leur occurrence afin d'assurer la bonne conservation du latex. De la même façon que pour les gouttelettes d'émulsion, l'ajout d'agents tensioactifs (ioniques, stériques ou électrostériques) peut minimiser ces phénomènes de destabilisation. Ces derniers peuvent être greffés ou adsorbés directement durant la synthèse ou bien après, à partir de fonctions réactives superficielles.*

### **1.3.2 Description et spécificité des divers procédés**

Il existe quatre grandes catégories de polymérisation en milieu dispersé : l'émulsion, la suspension, la précipitation et la Dispersion. Leurs différences proviennent de la taille des particules obtenues mais aussi et surtout des mécanismes de formation et de croissance de ces dernières. Chacun de ces procédés est constitué d'une phase monomère, d'une phase dispersante, d'un amorceur et d'entités stabilisantes (sauf dans le cas de la précipitation où l'individualité des particules est assurée par l'utilisation d'une grande quantité d'agent réticulant). Suivant la solubilité du monomère dans la phase dispersante, le système de départ est soit hétérogène (cas de l'émulsion et de la suspension formées de gouttelettes de monomères dispersées dans la phase continue) soit homogène (cas de la précipitation et de la Dispersion où le monomère est initialement soluble dans la phase continue). Dans le premier cas, la formation des particules se fera généralement directement dans les gouttelettes dispersées alors que dans le second, l'hétérogénéité du système proviendra de l'insolubilité des polymères en croissance dans la phase dispersante. Leur composition est

fonction de la technique d'émulsification (milieu initialement homogène, hétérogène, type d'agitation...) et de la stratégie permettant de limiter les phénomènes de déstabilisation (agent ultrahydrophobe, agents stabilisants...). Le Tableau 2.2 résume les principales caractéristiques de ces procédés et envisage leur pertinence dans le cadre de ce projet de thèse.

**Tableau 2.2 : Résumé des caractéristiques des principaux procédés de polymérisation en milieu dispersé (S=concentration en stabilisant, CMC=Concentration Micellaire Critique<sup>6</sup>). Estimation de l'adaptabilité des procédés face aux problématiques de l'étude.**

Procédé	Type de formulation	Phase dispersante	Nature de l'amorceur	Stabilisation	Refs ROMP	Pertinence face à la problématique
Suspension	<b>50-1000 µm</b> Gouttelettes	Aqueuse	Organo-soluble	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitation primordiale</li> <li>• S&lt;CMC</li> </ul>	[48-50]	<b>Taille des particules trop grosse</b>
Emulsion	<b>50-10000 nm</b> Coexistence Gouttelettes- micelles	Aqueuse	Hydro-soluble	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S&gt;CMC</li> </ul>	[17, 18, 29, 34, 35]	<b>Utilisation d'un catalyseur hydrophile → étape de synthèse supplémentaire</b>
Mini-émulsion	<b>50-500 nm</b> Gouttelettes	Aqueuse	Hydro-soluble ou organo-soluble	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S&lt;CMC</li> <li>• Agitation par ultra-sonification</li> <li>• Agent ultrahydrophobe</li> </ul>	[41, 50]	- Amorceur hydrosoluble : utilisation d'un catalyseur hydrophile → étape de synthèse supplémentaire - Amorceur organosoluble : <b>NB trop réactif</b>
Micro-émulsion	<b>10-50 nm</b> Micelles gonflées	Aqueuse	Hydro-soluble ou organo-soluble	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S&gt;&gt;CMC</li> <li>• Co-surfactant</li> </ul>	[34, 51, 52]	- Forte quantité de stabilisant (et/ou co-stabilisant) ; - Concentration en polymère par échantillon <10%
Précipitation	<b>Taille variable</b>	Organique Aqueuse	Dépend du milieu dispersant	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de S</li> <li>• Agent réticulant</li> </ul>		<b>Fortes quantités d'agent réticulant → contrôle difficile de la T<sub>g</sub></b>
Dispersion	<b>0,1-20 µm</b>	Organique Aqueuse	Dépend du milieu dispersant	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S stérique</li> </ul>	[27, 32, 41, 53, 54]	<b>Possibilité de greffer directement une écorce de stabilisant POE</b>

<sup>6</sup> La CMC (Concentration Micellaire Critique) est la concentration en agent stabilisant au-delà de laquelle des micelles commencent à se former. La formation des micelles dépend du solvant et des molécules de tensioactif.

Après étude et comparaison des différents procédés, la Dispersion a été choisie comme technique de synthèse en milieu dispersé. Tout d'abord, la présence d'une phase organique autorise l'utilisation des complexes carbéniques de Grubbs organosolubles sans avoir à les modifier. D'autre part, des études menées dans notre équipe [32, 41, 53, 54] ont montré qu'il était possible de stabiliser en Dispersion des particules de PNB via un macromonomère de POE sur lequel est fixée une entité réactive norbornényle. Comme nous avons pu le voir au chapitre 1, le recouvrement du vecteur par une écorce de POE est envisagé afin de lui conférer un caractère furtif. La ROMP par Dispersion permet donc de greffer directement cet agent de furtivité sur la particule et nous dispense d'une étape de coating supplémentaire.

Afin de mieux comprendre les phénomènes de nucléation et de croissance propre à la Dispersion, le chapitre suivant présente de façon plus approfondie ce procédé.

### 1.3.3 La Dispersion

#### 1.3.3.1 Origine

La polymérisation en Dispersion est née dans les années 60 en réponse au besoin de l'industrie des peintures de trouver une alternative aux émulsions aqueuses (difficiles à conserver et à sécher). Dans ce contexte la polymérisation en Dispersion organique a été développée pour la première fois par Osmond *et al.* de la société ICI [55]. Bien que des efforts de recherche important aient conduit au dépôt de nombreux brevets dans les années 1970, le développement du procédé de polymérisation en Dispersion en milieu organique s'est ensuite heurté aux contraintes de plus en plus pressantes liées à la protection de l'environnement et visant à limiter les quantités de composés organiques volatils (COV) émis dans les procédés industriels. De ce fait, de nombreux travaux se sont réorientés vers les milieux polaires [56-66]. En 2002, notre équipe de recherche a rapporté l'étude de la polymérisation en Dispersion de norbornène en présence d'un macromonomère de POE ( $\alpha$ -norbornényl-poly (oxyde d'éthylène)) dans un milieu dichlorométhane-éthanol [54].

#### 1.3.3.2 Principe général

La polymérisation en Dispersion peut être définie comme une synthèse par précipitation en présence d'un agent stabilisant doté de longues chaînes polymères capables de stabiliser le polymère précipité. Différents types de latex ont été préparés selon ce procédé (cœur-écorce, fonctionnalisés, thermosensibles...) pour répondre à des attentes technologiques parfois difficiles à satisfaire par d'autres procédés de polymérisation en milieux dispersés. Aujourd'hui, ces applications se situent essentiellement dans le secteur

biomédical (supports de réactifs de diagnostic, vecteurs de médicaments...), dans l'instrumentation analytique (phase stationnaire pour chromatographie, étalons de granulométrie...), dans l'industrie des peintures, en électronique (espaceurs pour écrans à cristaux liquides) ou en reprographie (formulation d'encre et de toner).

Ce type de polymérisation nécessite généralement quatre composants : un solvant, le monomère, le système amorceur et un stabilisant stérique (voir 1.3.3.3). Le milieu réactionnel est choisi de telle façon qu'il soit un bon solvant du monomère et de l'agent stabilisant tout en étant un mauvais solvant du polymère correspondant. Ainsi, le mélange des composés de départ forme une solution homogène qui une fois l'amorceur ajouté/activé, devient hétérogène en raison de l'insolubilité des chaînes polymères en croissance. Ces chaînes se dispersent ensuite sous forme de particules par incorporation ou adsorption de l'agent stabilisant. Le milieu réactionnel initialement translucide, devient laiteux dès que les particules formées sont capables de diffuser la lumière. L'apparition de cette hétérogénéité suppose un partage des espèces en jeu entre la phase précipitée (les particules) et le milieu continu. Par conséquent, durant l'étape de croissance, la polymérisation peut avoir lieu dans les particules et/ou dans le milieu dispersant.

### 1.3.3.3 Stabilisation

La polymérisation en Dispersion ayant été initialement développée en milieu hydrocarbure aliphatique où la stabilisation ionique est inefficace (en raison d'une faible constante diélectrique du milieu), un intérêt particulier a été porté à la stabilisation stérique. Ce type d'agent stabilisant consiste en général en un copolymère à blocs (préformé ou généré *in situ*) dont un bloc présente une bonne solubilité dans le milieu dispersant. C'est lui qui via ses longues chaînes, limite l'agrégation des particules et assure la stabilité colloïdale du système. Deux phénomènes physiques gouvernent ce mode de stabilisation :

- **Un effet entropique** : Lorsque les deux particules s'approchent, l'interpénétration des couches de polymère constituant la barrière stérique induit une rétention de configuration de ces chaînes de polymère entraînant localement une perte d'entropie. Afin de pallier cette perte, le système tend à distancer les deux particules.
- **Un effet osmotique** : Lors de l'interpénétration des couches polymères de deux particules, l'augmentation dans la zone d'interaction de la concentration en chaînes polymères provoque une augmentation de la pression osmotique. Celle-ci entraîne une diffusion de solvant dans la région à forte concentration en stabilisant générant une force répulsive qui tend à séparer les particules rentrées en contact.

Ces effets sont d'autant plus prononcés que la couche de polymère soluble est épaisse. Cette épaisseur est elle-même étroitement liée à la masse molaire des chaînes



stabilisantes et à la densité de polymère dans la couche. Pour stabiliser des particules avec des polymères de faibles masses molaires, il faudra atteindre une densité de greffage élevée pour former une barrière stérique efficace <sup>[67]</sup>.

Majoritairement, deux types de stabilisants stériques peuvent être utilisés <sup>[68]</sup> :

- **Copolymères greffés** : Ces copolymères sont en règle générale élaborés *in situ* à partir de chaînes polymères solubles dans la phase dispersante. Le greffage peut se faire soit par transfert <sup>[63]</sup> soit par réaction via des entités réactives telles que des doubles liaisons présentes le long de la chaîne <sup>[55]</sup>. Une autre voie de synthèse consiste à utiliser un polymère soluble dans la phase dispersante porteur d'une entité copolymérisable. Ils sont connus sous le nom de macromonomères <sup>[32, 69]</sup>. Ces stabilisants n'assurent pas une stabilité directe des particules mais sont des précurseurs de stabilisation.
- **Copolymères à blocs** : En règle générale, ces copolymères sont synthétisés *ex situ* <sup>[68]</sup>. Cependant, il existe quelques techniques pour les synthétiser directement lors de la synthèse. Ces méthodes reposent sur l'utilisation de polymères solubles dans la phase dispersante présentant en leur extrémité une fonction d'amorçage ou de transfert. On parle alors de macro-amorceur <sup>[70]</sup> ou de macro-agent de transfert ou transurf <sup>[71]</sup>.

**Dans le cadre des travaux de thèse exposés dans ce manuscrit, la stabilisation stérique via un macromonomère de NB-POE est le mode de stabilisation qui a été choisi.**

### 1.3.3.4 Mécanismes de formation des particules

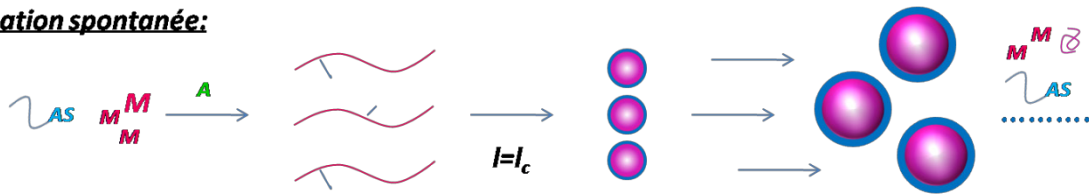
Les mécanismes de polymérisation en milieu dispersé comportent 4 étapes principales : 1) l'amorçage des chaînes, 2) la nucléation de particules, 3) la croissance des particules et 4) la terminaison. Une des étapes cruciales pour la qualité colloïdale des particules est la nucléation. Elle correspond à l'étape de formation des premières particules stabilisées. Plus cette étape a lieu tôt et rapidement, plus les particules sont petites et monodisperses. Dans le cas de la Dispersion, trois types de nucléation sont envisageables (Figure 2.5) :

- **Nucléation spontanée** (appelée nucléation homogène en émulsion) : une fois la polymérisation amorcée, les premiers oligomères commencent à croître. Dans le cas de la nucléation spontanée, les premiers nucléi se forment lorsque les oligomères ont atteint une longueur critique au-delà de laquelle ils ne sont plus solubles dans le milieu. Cette

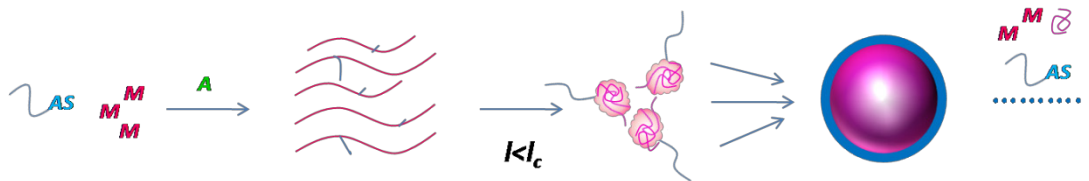
longueur critique (notée  $l_c$ ) est non seulement fonction de la nature et de la longueur du stabilisant (chaînes plus ou moins solubles) mais aussi de la nature du solvant.

- **Nucléation agrégative** : dans ce cas les nucléi sont issus de chaînes en croissance de longueur  $l < l_c$  qui s'associent pour former des agrégats insolubles qui donnent des particules. Plus le milieu est concentré, plus le risque de nucléation agrégative est grand.
- **Nucléation coagulative** : ce type de nucléation est une association des deux cas précédents. Les oligomères en croissance précipitent sous forme de toutes petites particules qui s'agrègent avant même de pouvoir être stabilisées.

**Nucléation spontanée:**



**Nucléation agrégative:**



**Nucléation coagulative:**

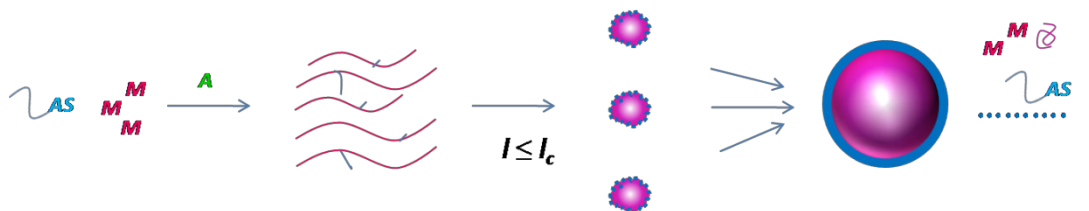


Figure 2.5 : Nucléations possibles en Dispersion.  $M$  : monomère ;  $A$  : amorceur ;  $AS$  : agent stabilisant.

De nombreux résultats expérimentaux tendent à prouver que la formation des particules se ferait généralement par coexistence de nucléations spontanées, agrégatives et coagulatives <sup>[55, 72]</sup>.

Ainsi, une polymérisation en milieu dispersé se déroulerait comme suit :

- Au départ, monomère, agent stabilisant et amorceur sont solubles dans le solvant et forment un milieu homogène.
- Ensuite, les premières particules nucléent : nucléation spontanée, agrégative, coagulative ou coexistence.

- Une fois ces particules formées, le système devient biphasique et les espèces (solvant, monomère, amorceur, polymère, oligomères, agent stabilisant) se partagent entre la phase dispersante et les particules. Deux mécanismes peuvent alors être envisagés pour la croissance des particules :
  - Croissance par incorporation de chaînes d'oligomères ou d'agents stabilisants encore présents dans la phase continue et par coagulation des derniers petits nucléi.
  - Croissance par polymérisation de molécules de monomère gonflant les particules.
- A la fin de la polymérisation, seules les particules matures sont observées.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, **l'ajout d'un agent réticulant est envisagé**. Le paragraphe suivant explique tout d'abord les phénomènes de réticulation pour ensuite envisager leur applicabilité dans le cas de la polymérisation en Dispersion.

#### **1.4 Synthèse d'une particule réticulée en Dispersion**

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre 1, le concept sur lequel repose ce travail de thèse consiste à utiliser la  $T_g$  du PNB comme contrôle de thermosensibilité. La  $T_g$  du PNB seul étant proche de 35°C, l'action *in vivo* d'un tel vecteur n'est envisageable que si le contrôle de cette  $T_g$  est possible. L'un des moyens d'augmenter la  $T_g$  d'un matériau est de réticuler ce dernier de façon à rigidifier sa structure. Cependant, la mise en œuvre de la réticulation peut s'avérer être un épineux problème une fois appliquée aux milieux dispersés (risques d'agréations voir de déstabilisation complète du latex).

Avant de faire état des travaux existants sur la réticulation du polynorbornène ou de ses dérivés, le chapitre suivant présente les différents phénomènes mis en jeu lors d'une polymérisation en présence d'agent réticulant et tout particulièrement, dans le cas des milieux dispersés.

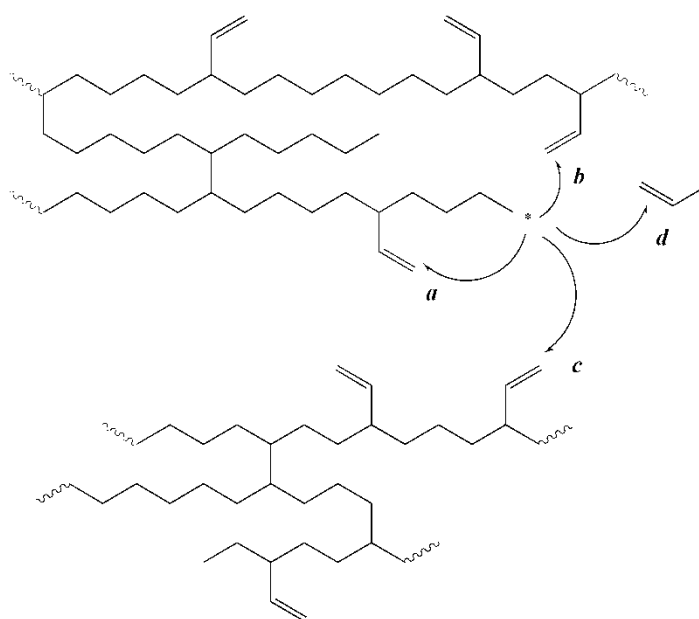
##### **1.4.1 Phénomènes de réticulation et milieux dispersés**

###### **1.4.1.1 Polymérisation et réticulation**

Les phénomènes de réticulation mettent en jeu des monomères dont la fonctionnalité est supérieure ou égale à deux et conduisent à la formation de réseaux polymères ou gels. Aucun travail concernant la description des phénomènes de réticulation dans le cas de la ROMP n'a été recensé. La plupart des théories existantes sur la formation de gels de polymères ont été énoncées dans le cas de polymérisations radicalaires mettant en jeu un

monomère de styrène (St) avec comme agent réticulant le divinylbenzène (DVB). Elles sont toutefois transposables dans le cas d'une ROMP.

Dans un cas comme dans l'autre, la polymérisation commence dès les premiers instants suivant l'ajout et/ou l'activation de l'amorceur et conduit à la formation de nombreux oligomères. Une fois l'agent réticulant incorporé, les chaînes propageantes ont le choix de réagir avec une nouvelle unité monomère (Figure 2.6, d) ou avec une fonction réticulante pendante présente le long de la même chaîne (Figure 2.6, a, b) ou fixée sur une autre chaîne (Figure 2.6, c). De manière générale, ces réactions sont classées en deux catégories principales <sup>[73]</sup>: les réactions intramoléculaires et les réactions intermoléculaires.



**Figure 2.6 : Phénomènes de réticulation schématisés ici dans le cas de fonctions polymérisables vinyliques - Réactions intramoléculaires (a, b) et réactions intermoléculaires (c, d). L'espèce active est représentée par un astérisque et l'entité réticulante est représentée par une double liaison pendante.**

Les réactions intramoléculaires (Figure 2.6, a et b) ne participent pas à la croissance de la chaîne macromoléculaire mais provoquent un phénomène de contraction qui a pour conséquence de limiter la capacité de gonflement du réseau et d'engendrer une gêne stérique limitant l'accessibilité des entités réticulantes pendantes ou des espèces actives. Son occurrence augmente avec la concentration et la réactivité des fonctions réticulantes pendantes.

Les réactions de réticulation intermoléculaires participent quant à elles à la croissance de la macromolécule (Figure 2.6, c). Il est important de noter que seules les réactions intermoléculaires assurent l'élasticité d'un réseau <sup>[73]</sup>.

La combinaison de ces deux phénomènes a tendance à favoriser les réactions en périphérie et peut conduire à l'agrégation des macromolécules en croissance. On comprend alors très vite pourquoi, appliqué aux milieux dispersés, ce type de réaction risque de compromettre l'individualité des particules en croissance.

### 1.4.1.2 Polymérisation en milieux dispersés et réticulation

Shashoua et Beaman furent les premiers à mettre en évidence les différences entre les procédés de polymérisation en milieux dispersés suivant que le système mis en jeu est linéaire ou réticulé. Lors de l'étude de la polymérisation en émulsion de styrène en présence de DVB, ils ont constaté une tendance à la coagulation au cours de la polymérisation et ce, de manière d'autant plus significative que la quantité d'agent réticulant est importante [74]. De nombreuses études ont ainsi été menées afin de permettre l'introduction d'un agent réticulant à un procédé d'émulsion mais beaucoup tendent à prouver que les effets d'agrégation souvent observés en masse ont ici tendance à être accentués [75-77]. En émulsion, la nucléation des particules se faisant principalement dans les micelles et leur croissance étant assurée par diffusion du monomère des gouttelettes vers ces micelles, il n'y a pas de réelle compartimentation des espèces et l'échange possible des espèces au travers de la phase continue constitue un risque supplémentaire d'agrégation entre les particules. La microémulsion, procédé mettant en jeu une meilleure couverture des gouttelettes/particules, permet de limiter les réactions entre particules mais suppose l'utilisation d'une plus grande quantité de stabilisant [78, 79]. La suspension et la miniémulsion, procédés pour lesquels la diffusion du monomère n'intervient pas dans le processus de croissance, semblent quant à eux être mieux adaptés à l'ajout d'un réticulant. En effet, après nucléation dans les gouttelettes, ces dernières se comportent comme des miniréacteurs assurant un cloisonnement quasi parfait de la polymérisation et permettent la synthèse de particules fortement réticulées ([80-85] pour la suspension, [86-88] pour la miniémulsion).

Le cas de la Dispersion est plus complexe. De nombreuses citations de la littérature affirment que, au-delà de 0,5% en masse, la présence d'agent réticulant lors d'une polymérisation par Dispersion conduit à des résultats inattendus allant de l'observation de morphologies originales en passant par des structures irrégulières jusqu'à la perte totale de stabilité [45, 66, 89, 90]. Les premiers travaux rapportant les conséquences de l'ajout d'un agent réticulant lors d'une Dispersion furent réalisés par Tseng *et al.* en 1986 [66]. Lors de l'étude de la polymérisation en Dispersion du St réticulé par du DVB dans l'éthanol, ils constatèrent que l'ajout de 0,3% en masse de réticulant conduisait à une augmentation de la taille et de la distribution en taille des particules, voire même à la coagulation du système pour des quantités supérieures de DVB. Ce phénomène peut s'expliquer non seulement par la contribution des réactions intermoléculaires qui lient les particules entre elles, mais aussi et

surtout par les réactions intramoléculaires qui conduisent à la rigidification de la structure. Le cœur de la particule empêche l'absorption de monomère et piège certaines chaînes de stabilisant qui ne peuvent plus jouer efficacement leur rôle. Ce phénomène s'accompagne de l'apparition de nouvelles particules issues soit de la précipitation de chaînes encore en croissance via le monomère présent dans le milieu, soit de la coagulation/agrégation de particules mal stabilisées. On parle alors de re-nucléation <sup>[43, 66, 91]</sup>. Ce phénomène peut être limité en jouant sur le pouvoir solvatant du milieu dispersant <sup>[46, 91]</sup>, le mode d'addition de l'agent réticulant <sup>[46, 92]</sup>, ou encore sa nature et sa réactivité <sup>[45, 93-96]</sup>.

#### 1.4.2 Particules de PNB réticulées

L'addition d'un agent réticulant en ROMP permet d'obtenir différents types de matériaux : polymères cicatrisants <sup>[97]</sup>, mousses <sup>[98]</sup>, ou encore des matériaux résistants de forme calibrée (RIM-Réaction après injection dans un moule) <sup>[99, 100]</sup>. La plupart de ces travaux étant réalisés en masse, ils n'abordent pas les risques de l'application de la réticulation aux milieu dispersé <sup>[101]</sup>.

Le seul exemple recensé de ROMP en présence d'agent réticulant en milieux dispersés est celui de particules de PNB développées en suspension par Lee *et al.* Dans le but d'élaborer des résines comme supports réactionnels, ils ont développé toute une gamme d'agents réticulants polymères à base de norbornène présentant des capacités de gonflement variables <sup>[49]</sup>. Chacun de ces agents a ensuite permis de synthétiser par suspension des billes de PNB réticulées, de structure totalement sphérique et bien définie (une description plus détaillée de ces objets est donnée au 2.2.1 de ce chapitre) .

**Il apparaît ici clairement que l'incorporation d'un agent réticulant peut compromettre le bon déroulement de la ROMP en Dispersion de particules PNB-POE. Une étude approfondie de l'incorporation d'un agent réticulant lors de la synthèse devra donc être réalisée.**

Cette étude bibliographique nous a permis de déterminer par quelles techniques les particules PNB-POE peuvent être synthétisées. Le choix s'est orienté vers une synthèse par ROMP en Dispersion de manière à élaborer des particules de PNB sur lesquelles le POE est directement fixé. Il a été vu que l'application de la réticulation à de telles techniques peut compromettre le bon déroulement de la synthèse. Ainsi, le principal objectif de ce chapitre est d'étudier l'incorporation d'un agent réticulant au cours de la synthèse par ROMP en Dispersion de particules PNB-POE réticulées. Une étude approfondie de cette synthèse

permettra en parallèle de déterminer les paramètres permettant le contrôle de la taille et de la dispersion des particules.

## 2 Synthèse des vecteurs polymériques PNB-POE

La synthèse des vecteurs se fait par ROMP en Dispersion. Comme nous l'avons vu au 1.3.3 de ce chapitre, cette synthèse est réalisée en présence d'un agent stabilisant réactif, le NB-POE et dans le cadre de notre étude, certaines expériences ont été effectuées en présence d'un agent réticulant. Les propriétés des particules résultantes (morphologie, profil d'imprégnation, profil de relargage...) vont dépendre de la longueur de la chaîne de POE et des quantités de PNB, de POE, et d'agent réticulant incorporées. Ainsi, un plan d'expérience a été réalisé afin d'évaluer l'influence de ces différents paramètres sur les caractéristiques des vecteurs synthétisés.

Dans ce chapitre, la synthèse du macromonomère ainsi que celle de l'agent réticulant sont présentées dans un premier temps. Ensuite, la technique de Dispersion utilisée est explicitée et enfin, les différents résultats obtenus dans le cadre du plan d'expériences sont détaillés.

### 2.1 Synthèse de l'agent stabilisant réactif : AS

La synthèse de chaînes de POE portant une insaturation norbornényle est possible par polymérisation anionique de l'oxyde d'éthylène (OE) (Figure 2.7).

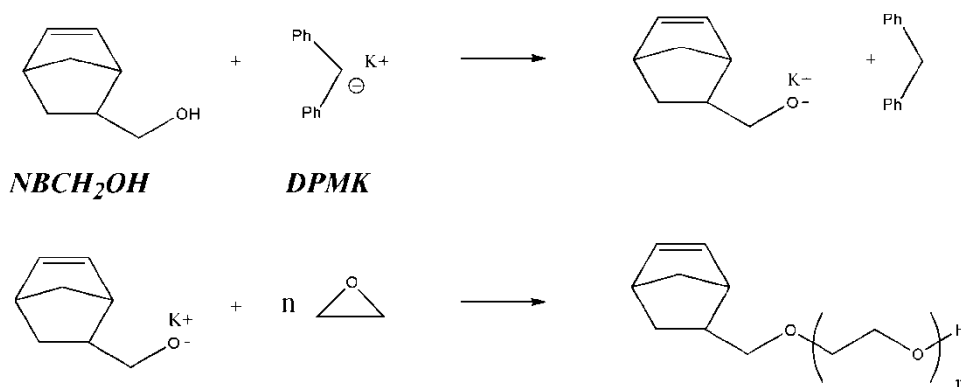


Figure 2.7 : Synthèse du macromonomère NB-POE par polymérisation anionique de l'OE.

L'amorceur utilisé est obtenu par déprotonation de le 2-hydroxyméthyl bicyclohept-5-ène (NBCH<sub>2</sub>OH) par le diphenylméthyl potassium (DPMK ou Ph<sub>2</sub>CHK). Une attention particulière est portée quant à la purification des solvants afin d'éviter la présence d'impuretés protoniques qui pourraient désactiver la polymérisation de l'OE et donner lieu à

des chaînes plus courtes. De la même façon, la quantité de DPMK à introduire dans le milieu réactionnel pour déprotoner le NBCH<sub>2</sub>OH est déterminée avec soin de façon à éviter tout excès en agent déprotonant susceptible de conduire à des chaînes non fonctionnalisées (DPMK en léger défaut). La désactivation se fait par ajout de méthanol en fin de synthèse <sup>[53]</sup>.

Le macromonomère ainsi synthétisé présente une distribution en masse des chaînes étroite et monomodale (PD<sub>SEC</sub> - Tableau 2.3). La masse théorique  $\overline{M}_{n_{théorique}}$  est calculée à partir des volumes d'amorceur et d'OE additionnés. Le nombre de chaînes POE fonctionnalisées par une entité norbornényle a été déterminé par comparaison de l'analyse par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN du <sup>1</sup>H) à la mesure expérimentale de la masse molaire  $\overline{M}_{n_{expérimental}}$  (SEC ou Maldi Tof). La RMN permet de comparer les aires des signaux correspondant aux protons de la double liaison présente sur l'entité norbornényle de l'amorceur ( $\delta=5,9$  et  $6,1$  ppm, 2 H par entité, aire totale :  $A_1$ ) à ceux portés par l'unité de POE ( $\delta=3,8$  ppm, 4 H par motif, aire totale :  $A_2$ ) (Figure 2.8).

Le degré de polymérisation moyen en nombre ( $DP_n$ ) des chaînes (déterminé à partir de la mesure de  $\overline{M}_{n_{expérimental}}$ ) comparé à l'aire  $A_1$  permet de calculer l'aire  $A'_2$  des protons appartenant à une chaîne POE fonctionnalisée :

$$A'_2 = 2.DP_n.A_1 \quad \text{Equation 1}$$

Le pourcentage de chaînes fonctionnalisées  $f$  est alors calculable à partir de l'aire totale  $A_2$  :

$$f = \left( \frac{A'_2}{A_2} \right) . 100 \quad \text{Equation 2}$$

Le NB-CH<sub>2</sub>OH étant un mélange endo-exo, le macromonomère est lui aussi constitué d'un mélange endo-exo. Ce rapport se détermine aisément en RMN. En effet, les protons de la double liaison norbornényle sont décalés suivant que le cycle est porteur de la fonction alcool en exo ou en endo (notamment  $b_{endo}$   $\delta=5,9$  ppm et  $b_{exo}$   $\delta=6,03$  ppm) <sup>[102]</sup> (Figure 2.9). Si l'on compare les aires des protons  $b$  appartenant à des entités endo ( $A_{endo}$ ) aux aires des protons appartenant à des entités exo ( $A_{exo}$ ), on peut trouver la proportion en endo et en exo  $R_{exo}$  :

$$R_{exo} = \frac{A_{exo}}{A_{exo} + A_{endo}} . 100 \quad \text{Equation 3}$$



Par la suite, ce macromonomère sera systématiquement désigné par AS.

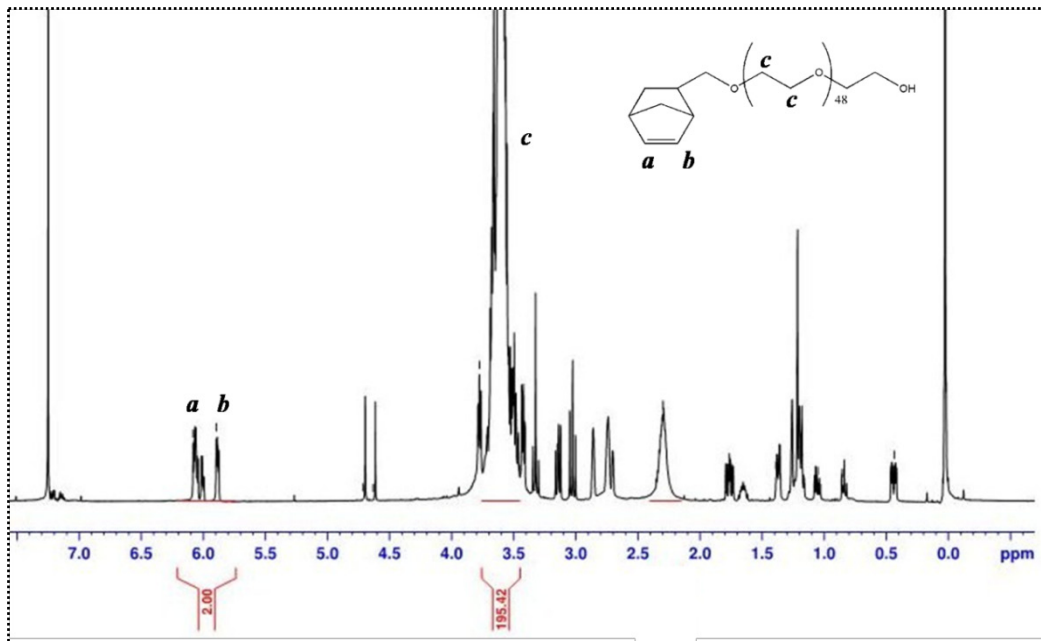


Figure 2.8 : RMN d'un macromonomère de NB-POE utilisé pour la synthèse par Dispersion de particules de PNB. Exemple d'un macromonomère de masse  $Mn_{théo}$ :  $2000 \text{ g.mol}^{-1}$ .

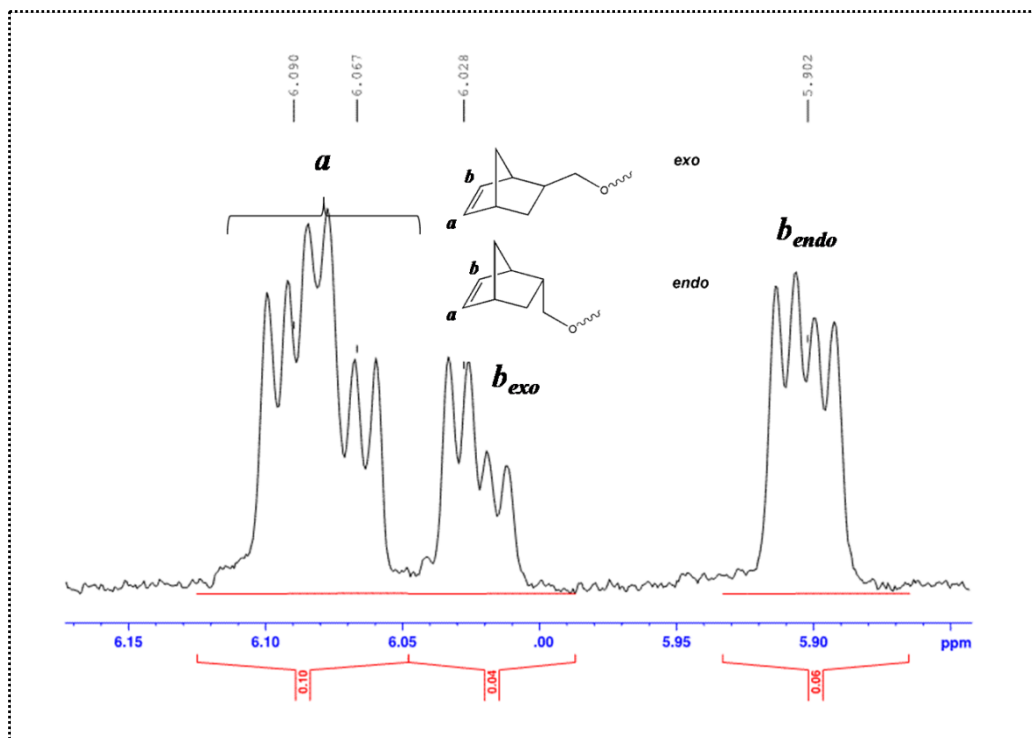


Figure 2.9 : Spectre RMN d'un macromonomère de NB-POE utilisé pour la synthèse par Dispersion de particules de PNB. Zoom sur les pics du norbornène pour la détermination du ratio exo/endo.

Trois AS ayant trois masses molaires différentes ont été synthétisés. Leurs caractéristiques sont exposées dans le Tableau 2.3.

**Tableau 2.3 : Caractéristiques des trois macromonomères NB-POE de différentes masses molaires élaborés pour ce projet de thèse.**

$\bar{M}_{n_{théorique}}$ (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	2000	5000	8000
$\bar{M}_{n_{expérimental}}$ (g.mol <sup>-1</sup> )	1947 <sup>1</sup>	5256 <sup>2</sup>	7660 <sup>2</sup>
$PD_{SEC} = M_w/M_n$	1,10	1,17	1,02
Rendement (% mass.)	80	70	99
Ratio exo (%)	35,24	34,5	35
Fonctionnalité (%)	94	83	97

<sup>1</sup>  $Mn_{expérimental}$  déterminé par SEC (Mesure donnée à partir d'un étalonnage équivalent POE).

<sup>2</sup>  $Mn_{expérimental}$  déterminé par Maldi Tof.

<sup>3</sup>  $Mn_{théorique}$  déterminé à partir des masses de réactif ajoutées.

Les masses molaires expérimentales des macromonomères (déterminées par SEC, RMN ou Maldi-Tof) sont en accord avec les masses molaires théoriques et témoignent d'une relativement bonne fonctionnalité des chaînes de POE par une entité norbornényle (en moyenne, 91 % des chaînes fonctionnalisées) (Tableau 2.3).

Le deuxième élément constitutif des particules est l'agent réticulant. Le paragraphe suivant explique les choix d'agents réticulants que nous avons fait pour ce travail de thèse ainsi que leur synthèse.

## 2.2 Synthèse de l'agent réticulant : AR

### 2.2.1 Choix de l'agent réticulant

Les principaux agents réticulants du PNB recensés dans la littérature sont présentés en Figure 2.10.

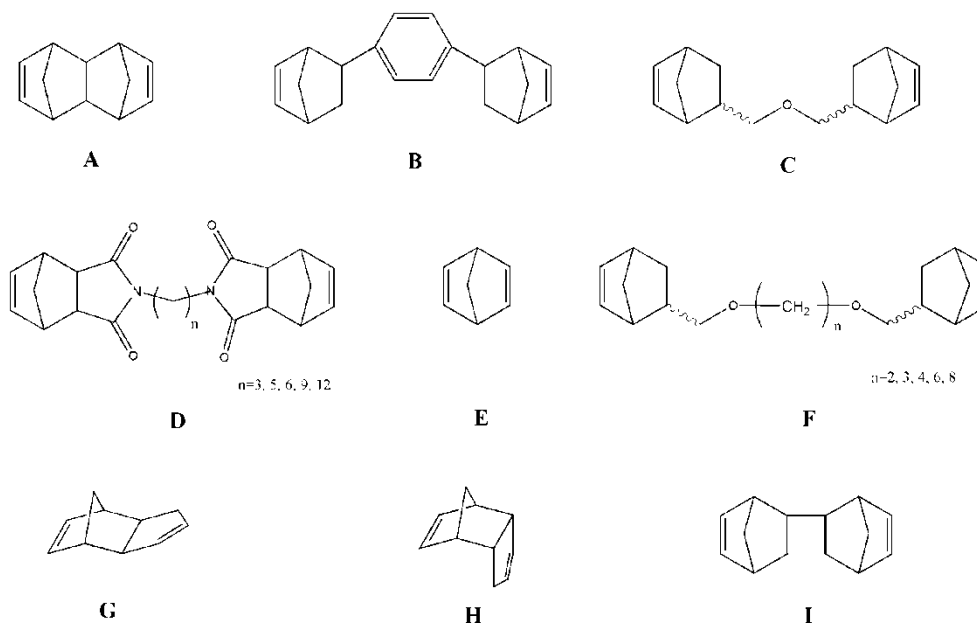


Figure 2.10 : Principaux agents réticulants de ROMP.

Sheng *et al.* ont montré que l'ajout de dinorbornène (Figure 2.10, A) lors de la polymérisation de l'endo-dicyclopentadiène (*endo*-DCPD) (Figure 2.10, H) ou du 5-éthylidène-2-norbornène (ENB) induit une hausse de la  $T_g$  du matériau résultant (Tableau 2.4) <sup>[97]</sup>.

Tableau 2.4 : Influence de la concentration en agent réticulant A <sup>[97]</sup>.

	Quantité d'AR A (% mass.)	$T_g$ <sup>1</sup> (°C)
ENB/A	0	111,4
	5,7	115,6
	10,3	117,3
	14,8	121,1
	19,6	122,3
DCPD/A	0	140,0
	5,2	151,7
	9,9	157,4
	15,1	162,2
	20,3	164,4

<sup>1</sup>  $T_g$  mesurée par DSC.

Cette hausse de  $T_g$  de 4 à 25°C témoigne d'une réduction de la mobilité des chaînes. Par conséquent, plus la concentration en A est importante, plus le gonflement des matrices formulées en présence de bon solvant est restreint (Figure 2.11).

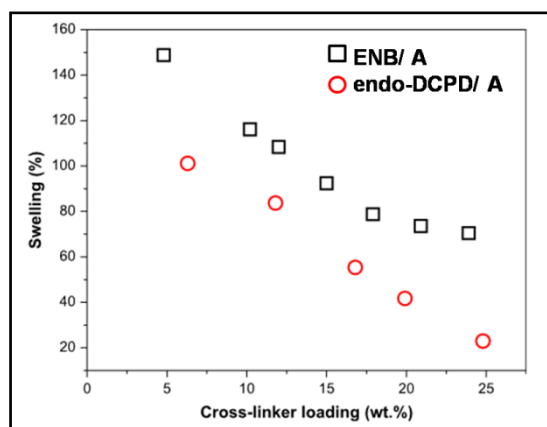


Figure 2.11 : Gonflement des polymères à base d'ENB ou de DCPD réticulés avec AR A (Figure 2.10). Swelling = rapport entre le poids de la matrice gonflée par du toluène et le poids de la matrice non gonflée<sup>[97]</sup>.

Lee *et al.* ont quant à eux mis en évidence l'influence de la nature d'un agent réticulant sur l'élasticité d'un réseau polymérisé par ROMP. Ainsi, lors de la synthèse par suspension de leurs particules de polynorbornène (exemple du 1.4.2), ils ont montré que l'insertion d'un pont éther (Figure 2.10, C) ou d'une chaîne alkyle (Figure 2.10, F) entre deux entités norbornényle permet d'atteindre de meilleurs taux de gonflement en bon solvant : de 6,7 mL.g<sup>-1</sup> pour A à 10,6 mL.g<sup>-1</sup> pour F (Tableau 2.5).

Tableau 2.5 : Evolution du gonflement de billes de PNB réticulées en fonction de la nature de l'agent réticulant<sup>[49]</sup>.

Agent réticulant (AR)	Quantité d'AR (% mol.)	Gonflement de la résine par du THF (mL/g)	Gonflement de la résine par du CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (mL/g)
A	1	6,7	6
C	1	12,1	9,2
F	1	10,6	9,2

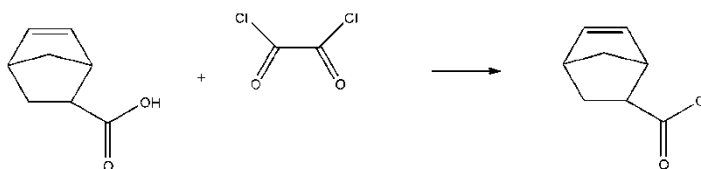
Au vue de ces résultats, nous avons envisagé la synthèse d'un agent réticulant de nature proche de celles de C et de F (Figure 2.10). Nous espérons ainsi obtenir des particules formant un réseau suffisamment réticulé pour encapsuler une espèce et suffisamment élastique pour la libérer par gonflement et / ou contraction. Deux agents ont donc été envisagés :

- Un premier par insertion d'une chaîne de POE entre deux entités norbornényle : NB-POE-NB.
- Un second par insertion d'une chaîne alkyle entre deux entités norbornényle : le (1,5-norbornène) pentanoate qui sera noté NB-pentanoate-NB.

## 2.2.2 Synthèse des agents réticulants

La synthèse des agents réticulants se fait par fixation de deux entités norbornényle à chaque extrémité d'un diol.

### Etape 1:



### Etape 2:

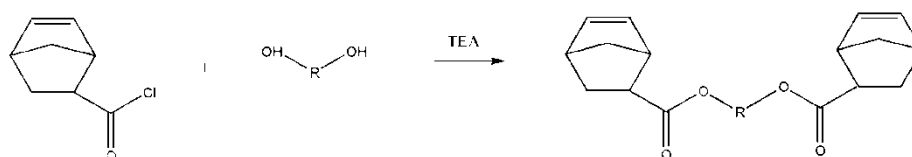


Figure 2.12 : Equation bilan de la synthèse des agents réticulants avec R = C<sub>5</sub>H<sub>10</sub> pour le NB-pentanoate-NB et R = -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>9</sub>- pour le NB-POE-NB.

La double fonctionnalité est obtenue par estérification d'un diol (pentane-1,5-diol ou poly (éthylène glycol) de 400 g.mol<sup>-1</sup>) par du 5-norbornényl-2-acide carboxylique (mélange endo-exo). De manière à obtenir un meilleur rendement, une première étape consiste à transformer la fonction acide carboxylique en chlorure d'acide par ajout de chlorure d'oxalyle. Dans une seconde étape, 2,1 équivalents de ce chlorure d'acide sont additionnés à un équivalent de diol en présence de triéthylamine (la TEA piège le HCl sous forme de sel). L'équation bilan de cette réaction est exposée Figure 2.12. L'analyse RMN <sup>1</sup>H des agents obtenus est donnée en Figure 2.13 et Figure 2.14.

La fonctionnalité des agents réticulants a été déterminée en comparant les aires des signaux correspondants aux protons de la double liaison présente sur l'entité norbornényle ( $\delta = 5,9$  et  $6,1$  ppm, 2 H par entité, aire totale : A<sub>1</sub>) à ceux situés en  $\alpha$  des groupements carbonyle présents aux extrémités de chaque chaîne ( $\delta = 4$  ppm, 4 H par chaîne : A<sub>3</sub>) (Figure 2.14 et Figure 2.15 pour le NB-pentanoate-NB et Figure 2.13 pour le NB-POE-NB):

$$\bar{f} = \frac{4.A_1}{2.A_3} \quad \text{Equation 4}$$

L'acide carboxylique utilisé pour cette synthèse est un mélange *endo/exo* (70/30) par conséquent, les agents réticulants synthétisés doivent eux aussi avoir des entités *endo/exo*. Rule *et al.* ont montré dans le cas de la ROMP du DCPD que la réactivité de l'*exo*-DCPD était très proche de celle du norbornène alors que celle de l'*endo*-DCPD était vingt fois inférieure à celle du norbornène <sup>[103]</sup>. Il est donc intéressant de regarder quelles sont les

proportions résultantes en entités *exo* et *endo* présentes sur les agents réticulants après synthèse. La méthode de détermination de ce rapport a été décrite au paragraphe 2.1.

Les différentes caractérisations effectuées pour chaque agent réticulant sont résumées dans le Tableau 2.6.

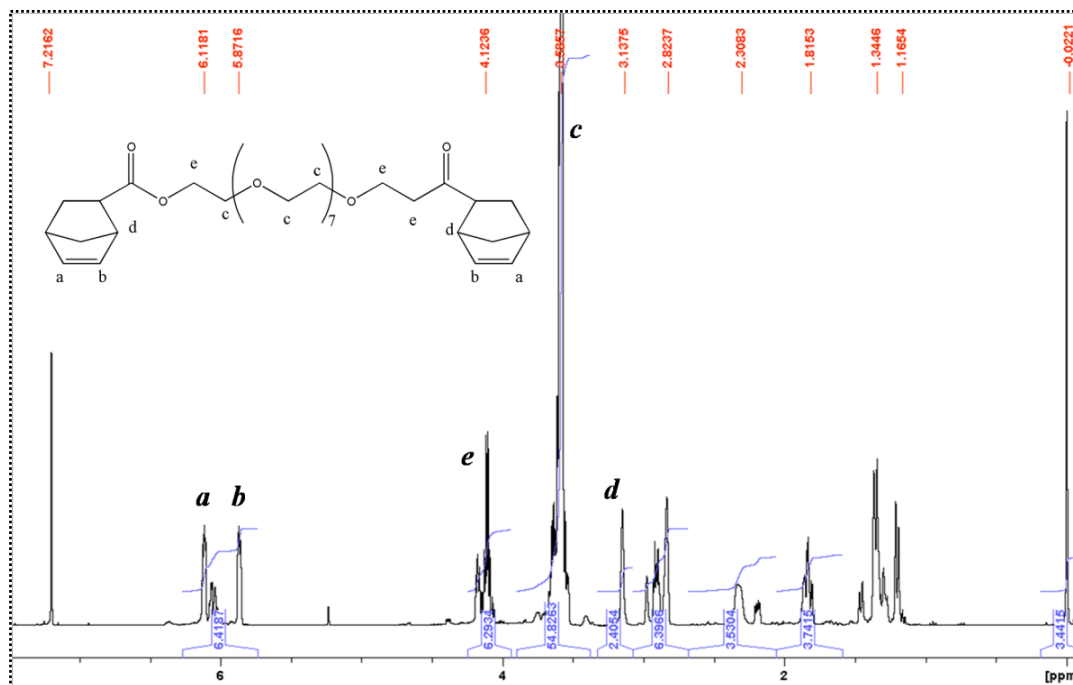


Figure 2.13 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'agent réticulant NB-POE-NB.

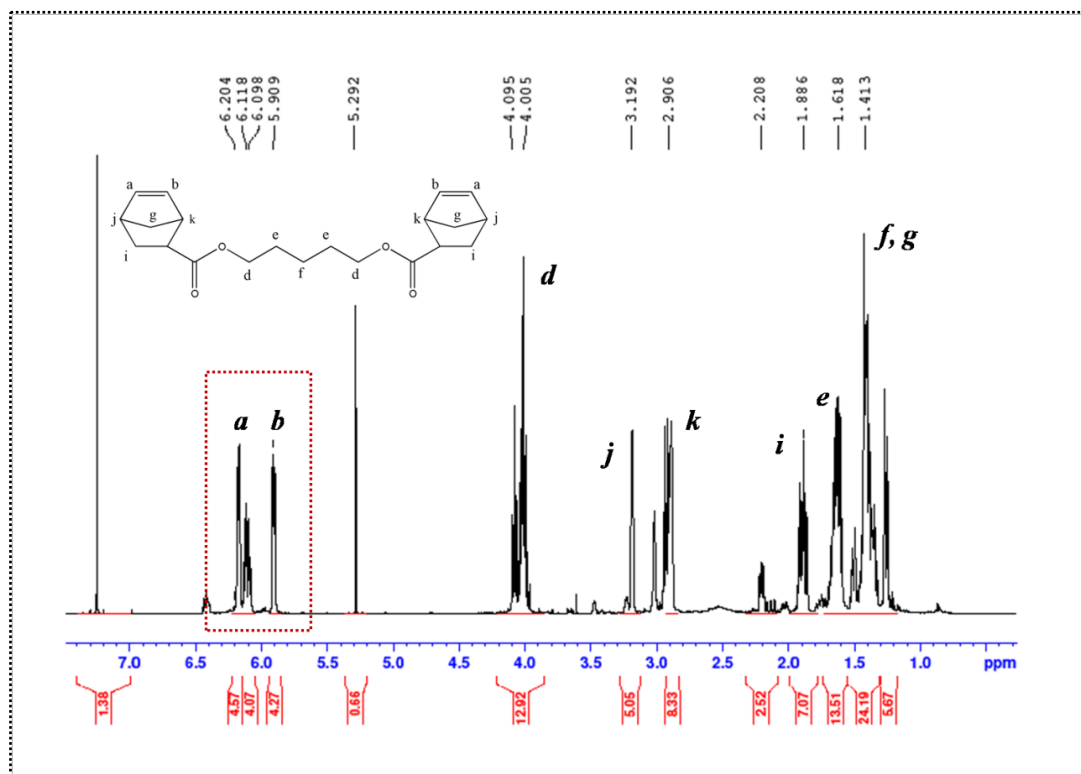


Figure 2.14 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'agent réticulant NB-pentanoate-NB.

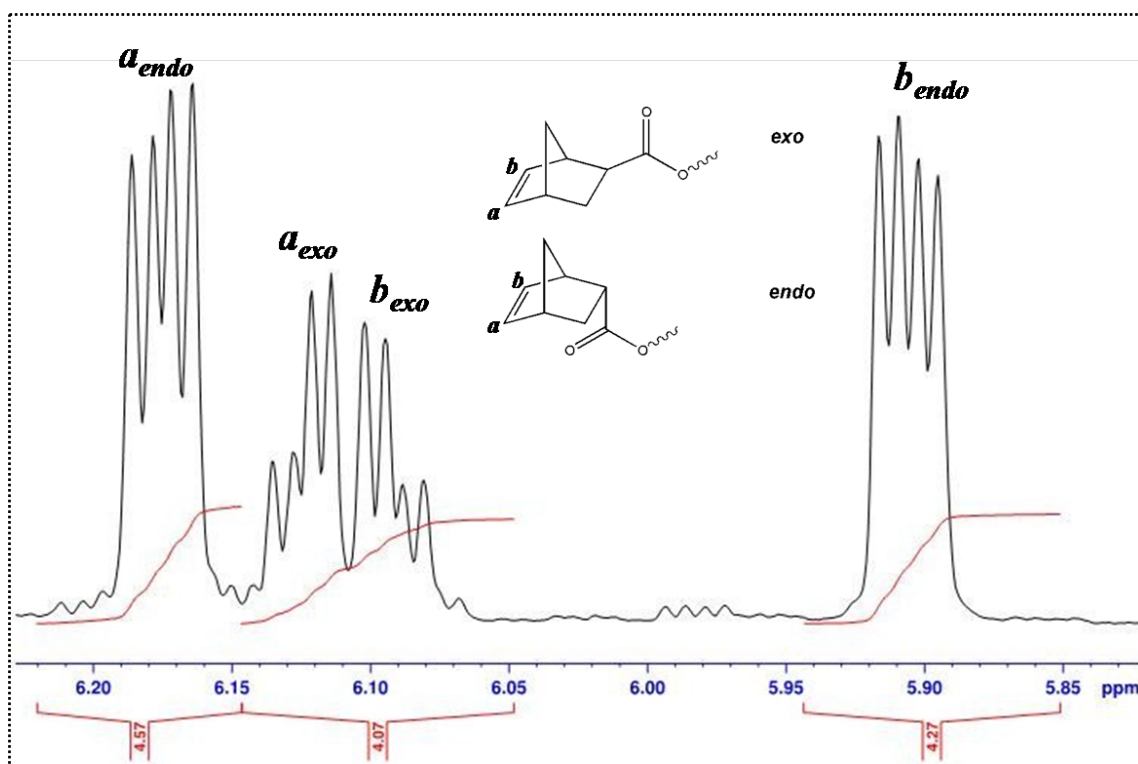


Figure 2.15 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du NB-pentanoate-NB. Zoom sur les protons portés par l'entité norbornényle pour la détermination du nombre d'entités endo et exo ( $\delta_{endo} = 6,175$  et  $5,9$  ppm ;  $\delta_{exo} = 6,125$  et  $6,075$  ppm).

Tableau 2.6 : Bilan sur la synthèse des agents réticulants.

Agent réticulant	Rendement (% mass.)	Fonctionnalité ( $f$ )	$R_{exo}$ (%)
NB-pentanoate-NB	90	2,00	31,5
NB-POE-NB	90	2,04	25

Au regard des fonctionnalités obtenues, les agents réticulants sont bien di-fonctionnels et les résultats sont conformes aux attentes en vue de la synthèse de particules réticulées.

A ce stade de l'étude, nous disposons de deux agents réticulants de natures différentes et de trois macromonomères de longueurs différentes. Le paragraphe suivant décrit l'influence de chacun de ces paramètres sur des particules synthétisées de PNB-POE par ROMP en Dispersion.

## 2.3 Synthèse de particules de PNB-POE réticulées

### 2.3.1 Dispersion de particules de PNB-POE réticulées

Le procédé de synthèse est inspiré des travaux réalisés auparavant dans notre équipe [50, 54]. Comme nous l'avons vu au 1.3.3, la polymérisation en Dispersion est un procédé dans lequel le milieu réactionnel est initialement homogène. La polymérisation en Dispersion de norbornène en présence de macromonomère de NB-POE est réalisée dans un mélange de dichlorométhane-éthanol (41/59 % vol.). Si le macromonomère est soluble dans ces deux solvants, le norbornène, l'agent réticulant (ici noté AR) et l'amorceur sont uniquement solubles dans le dichlorométhane. Ainsi, le mélange dichlorométhane - éthanol est établi dans des concentrations telles que le milieu soit un bon solvant du norbornène, de l'agent réticulant et de l'amorceur tout en étant un mauvais solvant du polynorbornène. L'amorçage se fait quant à lui par le catalyseur de Grubbs de première génération (Figure 2.16).

Les essais ont été réalisés sous agitation, à température ambiante et sous atmosphère inerte. Dans un exemple typique, 20 mg de catalyseur sont dissous dans 10 mL d'un mélange dichlorométhane – éthanol (50/50 % volumique). 1,5 g d'un mélange norbornène-agent réticulant-macromonomère sont dissous dans 14 mL de dichlorométhane-éthanol (35/65 % volumique). La deuxième solution est ajoutée à la première sous courant d'azote. Dès les premiers instants, le milieu prend un aspect turbide caractéristique de la nucléation de particules. Le milieu est maintenu sous agitation durant vingt quatre heures avant d'être désactivé par de l'éthyl vinyl éther.

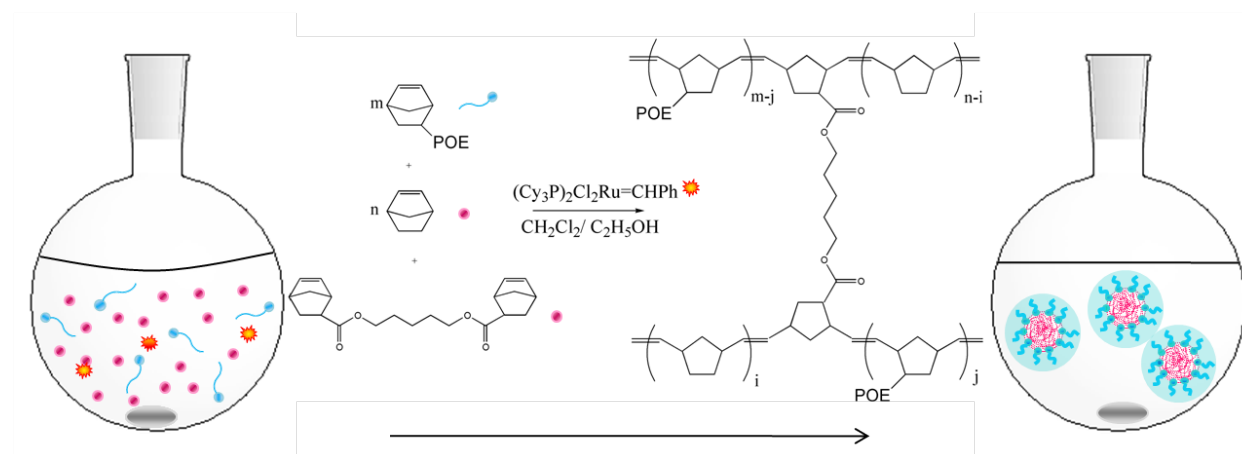


Figure 2.16 : Réaction de ROMP en Dispersion du NB dans un mélange éthanol-dichlorométhane en présence d'un macromonomère NB-POE et d'un agent réticulant.



### 2.3.2 Etude cinétique

De manière à appréhender les conversions des espèces en jeu lors de la synthèse de particules de PNB-POE une étude cinétique a été réalisée et s'est appuyée sur deux essais en particulier : une synthèse sans AR qui constitue une référence et une synthèse en présence d'AR. Pour ces essais, l'AR utilisé est le NB-pentanoate-NB. Les compositions sont données ci-dessous :

- a) Essai en présence d'agent réticulant: 5% mass. d'AR (NB-pentanoate-NB) - 30% de macromonomère -  $M_n$  (NB-POE) = 5000 g.mol<sup>-1</sup>,
- b) Essai en absence d'agent réticulant : 0% mass. d'AR (NB-pentanoate-NB) - 30% de macromonomère -  $M_n$  (NB-POE) = 5000 g.mol<sup>-1</sup>.

La conversion du norbornène au cours du temps a été suivie par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) par la méthode de l'étalon interne (dans ces expériences, le dodécane). La conversion du macromonomère ainsi que celle de l'agent réticulant ont été suivies par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC) toujours avec la méthode de l'étalon interne (dans ces expériences, du polystyrène).

*Remarque : Pour tous les autres essais, seules les conversions finales ont été déterminées. Il est admis que les tendances observées dans les cas a et b sont généralisables aux autres essais.*

#### 2.3.2.1.1 Conversion du norbornène

Lors de la Dispersion de particules de PNB-POE, le norbornène est consommé dans sa totalité durant les deux premières minutes de la synthèse (Figure 2.17, courbe en pointillés) <sup>[50]</sup>. La présence d'agent réticulant perturbe peu la consommation en NB au cours de la synthèse (Figure 2.17). En effet, 94% du norbornène est consommé durant les cinq premières minutes et 100 % au bout de 10 minutes en présence d'agent réticulant.

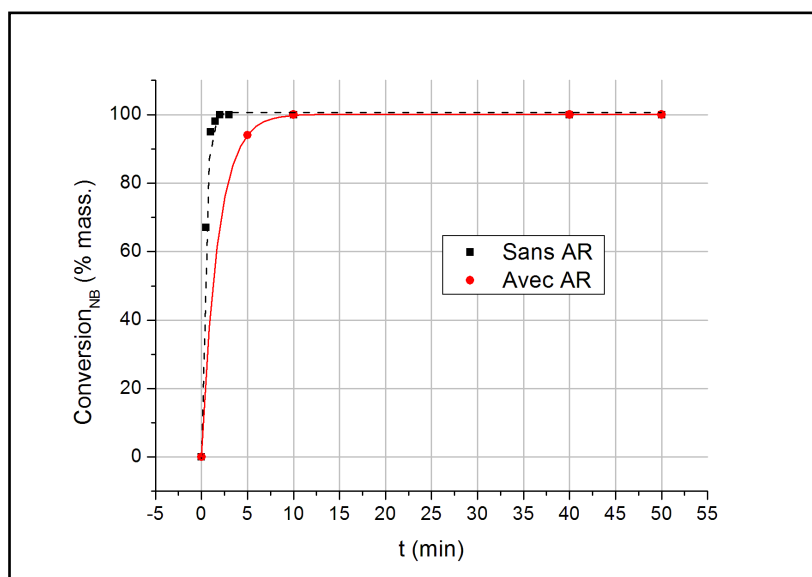


Figure 2.17 : Conversion du NB au cours des 30 premières minutes de la synthèse. Comparaison des synthèses en présence d'AR (5% AR, 30% AS, AS de  $5000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) et en absence d'AR (0% AR, 30% AS, AS de  $5000 \text{ g.mol}^{-1}$ , Chemtob *et al.* [54]).

Ce résultat peut s'expliquer par la « rigidification » du cœur des particules réticulées rendant l'accès aux entités réactives un peu plus difficile qu'en l'absence d'agent réticulant.

### 2.3.2.1.2 Conversion du macromonomère

La consommation du macromonomère est beaucoup plus lente que celle du norbornène et ce, que la synthèse se passe avec ou sans agent réticulant (Figure 2.18 et Figure 2.19). Cet écart de réactivité peut être expliqué par deux phénomènes physiques : d'une part, le difficile accès aux entités réactives par les longues chaînes de POE et, d'autre part, l'incompatibilité entre les chaînes en croissance de PNB (hydrophobes) qui constituent le cœur de la particule avec les chaînes de POE (hydrophiles).

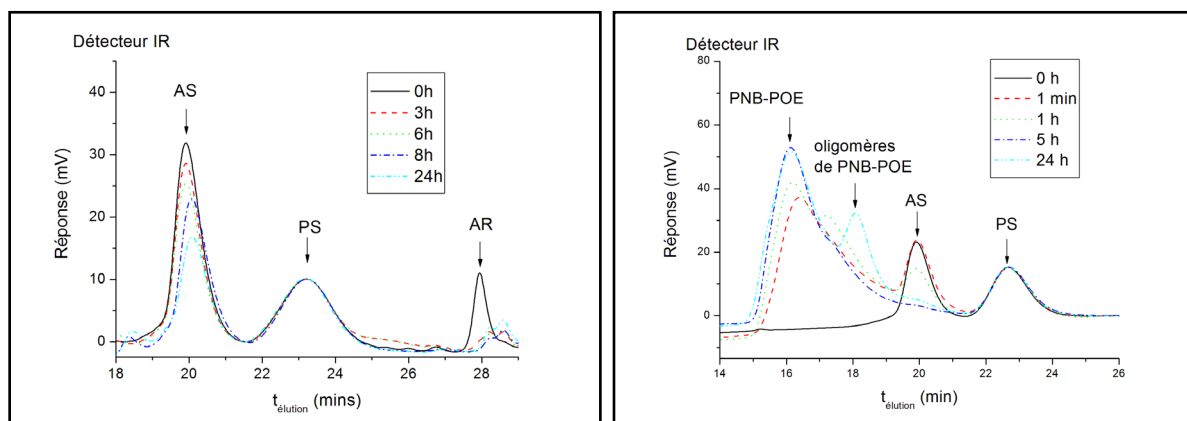
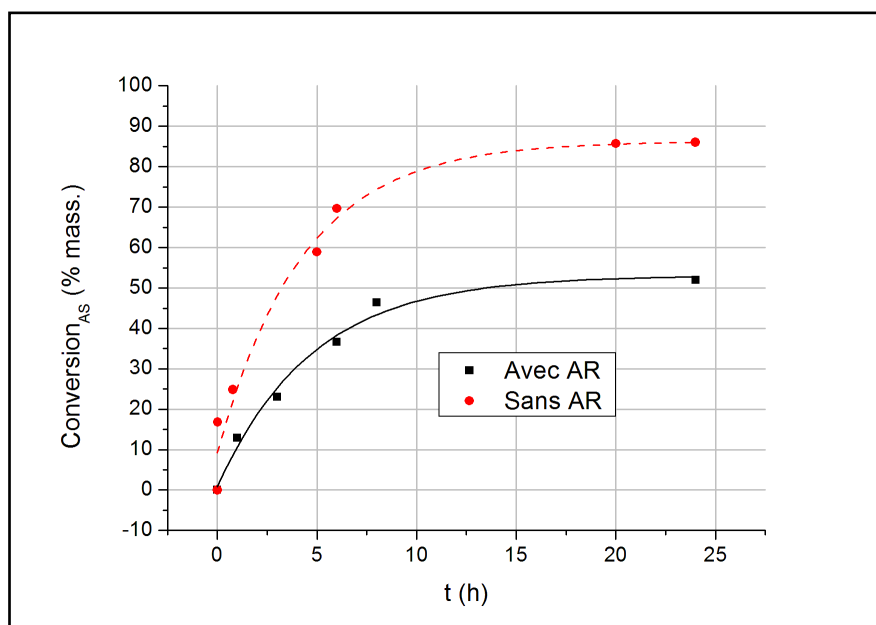


Figure 2.18 : Spectres SEC des prélèvements cinétiques d'une Dispersion de particules PNB-POE en présence d'agent réticulant (gauche) et en absence d'agent réticulant (droite).



**Figure 2.19 : Conversion du macromonomère au cours du temps lors d'une synthèse de particules PNB-POE à partir de l'analyse SEC (Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Comparaison des synthèses en présence d'AR (trait plein, 5% AR, 30% AS, AS de 5000 g.mol<sup>-1</sup>) et en absence d'AR (ligne en pointillés, 0% AR, 30% AS, AS de 5000 g.mol<sup>-1</sup>).**

Dans le cas d'une synthèse en présence d'agent réticulant (Figure 2.19, trait plein), la consommation en macromonomère est non seulement ralentie mais surtout, elle est nettement moins importante qu'en absence d'AR. Cette différence de réactivité peut encore une fois s'expliquer par une « rigidification » de la structure de la particule (liée à la réticulation) rendant moins accessible les entités réactives pour les chaînes de macromonomère et par conséquent ralentissant considérablement la consommation des espèces encore dispersées.

### 2.3.2.1.3 Conversion de l'agent réticulant

Le suivi par SEC de la conversion de l'AR au cours de la polymérisation rend compte de son insertion dans une chaîne en croissance via l'une de ses fonctions réticulantes ; il ne représente donc pas forcément la vitesse à laquelle la réticulation se manifeste. D'après ces résultats (Figure 2.20), la consommation de l'AR suit deux cinétiques : une première rapide (66% en 1 h) et une seconde, plus lente (21% en 7h).

La comparaison des conversions des trois espèces en jeu (NB-AR-AS) révèle qu'au départ, les chaînes de PNB en croissance sont riches en AR. Les réactions intramoléculaires sont probablement favorisées et les premiers nucléi formés sont fortement réticulés. Il s'en suit une incorporation limitée des espèces encore dissoutes c'est-à-dire de l'AS (vu précédemment) mais aussi de l'AR.

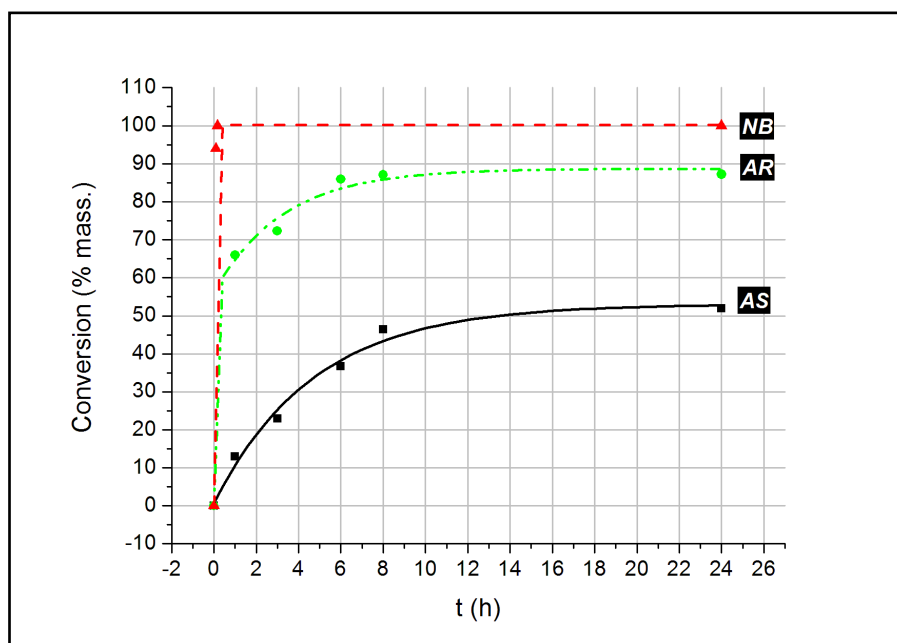


Figure 2.20 : Conversions du norbornène (NB), du macromonomère (AS) et de l'agent réticulant (AR) au cours du temps lors de la synthèse de particules PNB-POE réticulées déterminées par SEC (Figure 2.19). La conversion du NB provient de l'analyse CPG (Figure 2.17).

*Remarque : Plusieurs essais de synthèse ont été réalisés dans les mêmes conditions et pour lesquels les rendements finaux en agent réticulant et en macromonomère ont été calculés. Ces derniers sont quelque peu supérieurs à ceux obtenus lors du suivi cinétique de la synthèse : 60% pour le macromonomère et 100% pour l'AR. Cette différence provient sans doute d'une désactivation de certains centres actifs lors des multiples prélèvements effectués au cours de la synthèse réalisée dans le cadre du suivi cinétique.*

L'étude cinétique de la Dispersion de particules PNB-POE en présence de NB-pentanoate-NB sur le cas particulier de l'essai (5% AR et 30 % d'AS de  $5000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) permet de poser des premières conclusions quant au déroulement de cette synthèse:

- Au départ de la polymérisation, on forme des chaînes riches en PNB et en AR mais pauvres en AS. Les premières particules formées sont fortement réticulées et présentent peu d'AS en surface qui de surcroît doit être faiblement disponible dans la phase dispersante.
- Dans un deuxième temps, seuls l'AS et l'AR restant (30%) sont consommés.

Afin d'évaluer l'influence des quantités d'AS et d'AR sur les particules PNB-POE, un plan d'expériences a été réalisé.

### 2.3.3 Plan d'expériences

#### 2.3.3.1 Principe

La mise au point et la compréhension de certains procédés sont d'autant plus complexes que le nombre de paramètres intervenant est important. Permettant une modélisation mathématique d'un procédé, la méthodologie des plans d'expériences connaît un grand développement et ce, dans de nombreux secteurs d'activités (mécanique, électronique, agro-alimentaire, médecine, métallurgie, pharmacie ou chimie etc...). Cette méthodologie s'appuie sur des calculs statistiques pour proposer les meilleures séries d'expériences possibles pour une étude envisagée avec comme objectifs d'en réaliser le moins possibles (économie de coût et de temps) et d'obtenir la meilleure précision possible sur les résultats afin de maîtriser au mieux le phénomène étudié.

Cette technique suppose dans un premier temps de définir les grandeurs dont on souhaite connaître l'évolution en fonction des conditions expérimentales. Elles sont appelées réponses. Ensuite, il est nécessaire de déterminer tous les paramètres susceptibles d'avoir une incidence sur le procédé. Dans le cadre de la synthèse de particules PNB-POE réticulées, deux réponses ont été étudiées, le diamètre des particules ( $D_n$ ) et la polydispersité du latex ( $P$ ). De plus, trois paramètres ont été choisis : la quantité d'agent réticulant [ $AR$ ], la quantité de macromonomère [ $AS$ ] ainsi que la masse molaire du macromonomère ou autrement dit sa longueur  $L$ . Le principe des plans d'expériences consiste alors à déterminer le domaine de variation de chacun des paramètres [ $AS$ ], [ $AR$ ] et  $L$  et de ne travailler qu'avec les coordonnées limites (ou bornes) de ce domaine.

#### 2.3.3.2 Choix des bornes du plan d'expériences

##### 2.3.3.2.1 Agent réticulant (AR)

Deux agents réticulants ont été synthétisés (2.2.2). Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de déterminer les concentrations limites d'utilisation de chacun d'entre eux. Quatre Dispersions de particules PNB-POE ont été réalisées en présence d'un même macromonomère et pour des quantités variables d'AR. La stabilité de ces échantillons a été évaluée par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS ou *Dynamic Light Scattering*) ou par simple contrôle visuel (cas des coagulats). La réticulation a été qualifiée par évaluation visuelle de la turbidité du latex après redissolution dans un bon solvant ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Ces résultats sont exposés dans le Tableau 2.7 :

**Tableau 2.7 : Caractéristiques des Dispersions en présence d'AR: étude de l'influence de la nature de l'AR et de la quantité ajoutée ( $m_{AR}$ ).**

AR	$m_{AR}$ (% mass.)	$M_n$ (AS) $g.mol^{-1}$	$m_{AS}$ (% mass.)	$D_n$ (nm)	Test dissolution dans bon solvant
NB-POE-NB	15	2500	45	Non déterminé	oui
NB-POE-NB	30	2500	45	Coagulats	non
NB-pentanoate-NB	12,6	2500	45	313,8	non
NB-pentanoate-NB	30	2500	45	Coagulats	non

La Dispersion de particules en présence de 30% massique d'agent réticulant conduit systématiquement à la coagulation des particules. Aux vues des cinétiques de conversion des espèces NB-AR-AS, on sait qu'au départ peu d'agent stabilisant recouvre les particules qui sont alors mal stabilisées. Ce phénomène est probablement d'autant plus prononcé que la quantité d'agent réticulant est importante. Ainsi, à 30% massique d'AR introduit, l'incorporation d'AS est trop lente et trop faible pour maintenir la stabilité du latex.

Par contre, alors que 15% massique de NB-POE-NB conduit à des particules non réticulées, l'ajout de 12,6% de NB-pentanoate-NB permet d'obtenir des particules bien définies et réticulées. Dans le cas du NB-POE-NB, une fois la première fonction réticulante consommée, la chaîne de POE a tendance à se disposer à la surface de la particule afin de limiter son contact avec le cœur de PNB et à se déployer dans la phase dispersante réduisant la probabilité d'occurrences des réactions intramoléculaires. Dans le cas du NB-pentanoate-NB, la chaîne alkyle insérée entre les deux entités norbornényle n'a pas d'affinité avec le milieu dispersant. Par conséquent, une fois la première fonction réticulante consommée, la chaîne pendante aura tendance à se replier sur le cœur de PNB et à favoriser les réactions intramoléculaires nécessaires pour la réticulation du cœur.

**Suite à ces résultats, l'utilisation du NB-POE-NB pour ces travaux a été abandonnée. Seul le NB-pentanoate-NB a fait l'objet d'une étude. Les quantités dans lesquelles il est ajouté vont de 0 à 10% en masse de manière à éviter les phénomènes de coagulation et /ou une hausse trop importante de la  $T_g$ .**

#### 2.3.3.2.2 Agent stabilisant (AS)

Des travaux préliminaires réalisés dans notre équipe ont permis d'étudier l'influence de la quantité et de la masse molaire d'AS ajouté lors d'une Dispersion sur des particules de PNB. Travaillant avec trois macromonomères (4700-6800-7500  $g.mol^{-1}$ ) ajoutés dans trois quantités différentes (30-45-63% mass.), ils sont parvenus à obtenir des particules bien

définies <sup>[54]</sup>. Cependant, ils ont aussi montré que l'utilisation d'un macromonomère long en grande quantité ou l'utilisation d'un macromonomère plus court en petite quantité pouvaient conduire à un élargissement de la distribution en taille des particules. Nous avons pour notre part constaté que l'utilisation d'un AS de 2000 g. mol<sup>-1</sup> à 45% en masse permettait aussi l'obtention de particules bien définies.

**Ainsi, afin d'évaluer les influences croisées de la longueur de l'AS et de sa quantité, le plan d'expériences utilise des macromonomères dont la masse molaire varie de 2000 à 8000 g.mol<sup>-1</sup> et la quantité de 15% à 45% en masse.**

### 2.3.3.3 Mise en place de la matrice des essais

Afin de rendre le plan d'expériences plus opératoire vis-à-vis des calculs et de permettre une comparaison aisée des variations des facteurs entre elles, des unités centrées réduites sont utilisées. Ainsi, chaque facteur est fixé à deux niveaux :

- Un niveau bas symbolisé par -1,
- un niveau haut symbolisé par +1.

Le passage d'un type d'unité à un autre se fait alors au moyen de l'équation suivante :

$$x_i = \frac{F - F_{moy}}{(F_{max} - F_{min}) / 2} \quad \text{Equation 5}$$

où *i* est un des facteurs (concentration de l'agent réticulant, longueur de l'agent stabilisant ou masse de l'agent stabilisant), *F* est la valeur pour l'expérience du facteur *i*, *F<sub>max</sub>* est la borne maximale pour le facteur *i*, *F<sub>min</sub>* est la valeur minimale pour le facteur *i* et *F<sub>moy</sub>* est la valeur moyenne située entre la valeur maximale et la valeur minimale. Ce qui pour chaque facteur revient à écrire :

$$x_{[AR]} = \frac{[AR] - 5}{5}; x_{[AS]} = \frac{[AS] - 30}{15}; x_L = \frac{L - 5000}{3000} \quad \text{Equation 6 : Conversion des variables en unités centrées réduites.}$$

Les niveaux (-1, 1 et 0) sont les valeurs que l'on attribue à chacun des facteurs. On peut alors représenter l'ensemble des données de l'expérimentation sur un tableau nommé matrice d'expériences ou matrice des essais (Tableau 2.8):

Tableau 2.8 : Matrice des essais pour le plan d'expériences programmé pour la synthèse de particules de PNB-POE.

<i>Essai</i>	$x_{AR} / [AR]$	$x_{AS} / [AS]$	$x_L / L$
1	-1 / 0%	-1 / 15%	1 / 8000
2	-1 / 0%	1 / 45%	1 / 8000
3	-1 / 0%	-1 / 15%	-1 / 2000
4	-1 / 0%	1 / 45%	-1 / 2000
5	1 / 10%	-1 / 15%	1 / 8000
6	1 / 10%	1 / 45%	1 / 8000
7	1 / 10%	-1 / 15%	-1 / 2000
8	1 / 10%	1 / 45%	-1 / 2000

O1	0 / 5%	0 / 30%	0 / 5000
O2	0 / 5%	0 / 30%	0 / 5000
O3	0 / 5%	0 / 30%	0 / 5000

L'intérêt du plan d'expériences est de permettre une modélisation mathématique du système. En règle générale, l'équation qui lie une réponse aux paramètres peut être plus ou moins complexe, mais si on ne la connaît pas, on peut approximer le modèle par des termes de degré peu élevé, généralement 1, 2 ou éventuellement 3.

Dans notre cas, nous allons nous limiter au premier degré et écrire que les réponses sont du type :

$$D = D_0 + D_{[AR]} \cdot x_{[AR]} + D_{[AS]} \cdot x_{[AS]} + D_L \cdot x_L + D_{[AS]L} \cdot x_{[AS]} \cdot x_L + D_{[AR]L} \cdot x_{[AR]} \cdot x_L + D_{[AS][AR]} \cdot x_{[AS]} \cdot x_{[AR]}$$

$$P = P_0 + P_{[AR]} \cdot x_{[AR]} + P_{[AS]} \cdot x_{[AS]} + P_L \cdot x_L + P_{[AS]L} \cdot x_{[AS]} \cdot x_L + P_{[AR]L} \cdot x_{[AR]} \cdot x_L + P_{[AR][AS]} \cdot x_{[AR]} \cdot x_{[AS]}$$

où  $(D_0, P_0)$  sont les réponses moyennes,  $(D_{[AS]}, P_{[AS]})$  sont des coefficients (qui seront déterminés par le plan d'expériences) quantifiant respectivement les effets de la quantité de macromonomère sur le diamètre et les effets de la quantité de macromonomère sur la polydispersité du latex. Il en est de même pour  $D_L, P_L, D_{[AR]}$  et  $P_{[AR]}$ .  $D_{[AS][AR]}, D_{[AS]L}, D_{[AR]L}, P_{[AS][AR]}, P_{[AS]L}, P_{[AR]L}$  sont des facteurs d'interactions qui, lorsqu'ils sont significatifs, témoignent de l'existence d'une « synergie » entre certains paramètres. Dans notre cas,



seuls  $D_{[AS]L}$  et  $P_{[AS]L}$  risquent d'être significatifs, la quantité de macromonomère, le nombre de chaînes de macromonomères et sa masse molaire étant étroitement liés.

*Remarque : La température de transition vitreuse du cœur des différentes particules aurait naturellement pu être une autre réponse de ce plan d'expériences. Malheureusement, le pic de recristallisation de l'écorce de POE masque la transition vitreuse caractéristique du cœur de PNB.*

#### 2.3.3.4 Résultats

Le Tableau 2.9 résume les résultats obtenus sur la synthèse des particules synthétisées dans le cadre du plan d'expériences. Les conversions du macromonomère ont été suivies par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC). La taille et l'isométrie des particules ont été caractérisées par Microscopie Electronique en Transmission (MET) et par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS). Suite à l'analyse de ces résultats, deux lois ont pu être énoncées permettant de quantifier l'influence de chacun des facteurs sur la taille et la polydispersité des particules (utilisation du logiciel Modde, plus de détails dans l'Annexe 1).

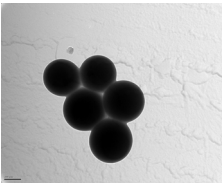
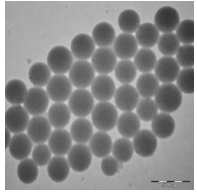
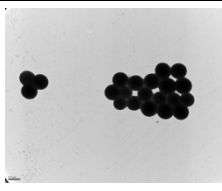
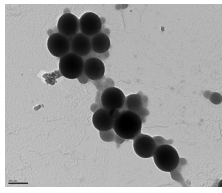
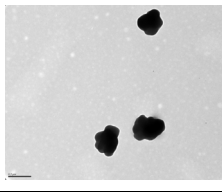
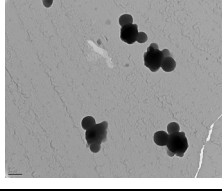
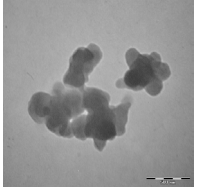
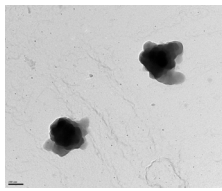
$$\text{Diamètre} \Rightarrow D_n = 413 + 4,36.x_{AR} - 127,34.x_{AS} - 8,38.x_L \quad [1]$$

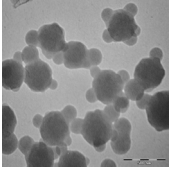
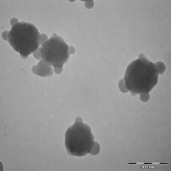
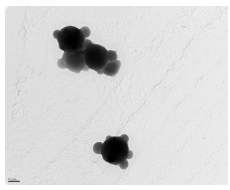
$$\text{Polydispersité} \Rightarrow P_n = 0,086 + 0,024.x_{AR} - 0,005.x_{AS} - 0,019.x_L \quad [2]$$

*Remarque : Les facteurs d'interactions entre la longueur du macromonomère et sa masse ajoutée n'ont pas été pris en compte dans le calcul car l'étude a montré qu'ils n'étaient pas significatifs et pouvaient de ce fait entacher le modèle d'erreurs.*

Ainsi, la taille et l'isométrie des particules ont pu être prédites d'après les équations [1] et [2]. Les résultats obtenus ont été reportés dans le Tableau 2.9.

**Tableau 2.9 : Bilan des résultats obtenus pour les essais du plan d'expériences : prédiction de la taille et de la polydispersité d'après les lois [1] et [2], mesure de la taille (MET), de la polydispersité (MET), de la conversion du macromonomère (Conv AS) et de la conversion de l'agent réticulant (Conv AR).**

<i>Essai</i>	<i>AR</i> % m.	<i>AS</i> % m.	<i>L</i> g/mol	<i>Conv AS</i> % m.	<i>Conv AR</i> % m.	<i>Dn<sub>préd</sub></i> (nm) <i>PDI<sub>préd</sub></i>	<i>MET</i>	<i>Dn<sub>MET</sub></i> (nm) <i>PDI<sub>MET</sub></i>
<b>1</b>	0	15	8000	100%	-	481 PDI = 0,048		500 +/- 38 PDI = 0,023
<b>2</b>	0	45	8000	80%	-	254 PDI = 0,038		316 +/- 30 PDI = 0,036
<b>3</b>	0	15	2000	100%	-	525,7 PDI = 0,086		573 +/- 65 PDI = 0,051
<b>4</b>	0	45	2000	96%	-	298,7 PDI = 0,076		256 +/- 30 PDI = 0,054
<b>5</b>	10	15	8000	-	-	575 PDI = 0,096		535 +/- 97 PDI = 0,131
<b>6</b>	10	45	8000	73%	77%	348 PDI = 0,086		340 +/- 50 PDI = 0,0865
<b>7</b>	10	15	2000	-	-	620,1 PDI = 0,134		599,2 +/- 115 PDI = 0,147
<b>8</b>	10	45	2000	86%	98,4%	393 PDI = 0,124		273 +/- 52 PDI = 0,145

Essai	AR % m.	AS % m.	L g/mol	Conv AS % m.	Conv AR % m.	$D_{n_{préd}}$ (nm) $PDI_{préd}$	TEM	$D_{n_{TEM}}$ (nm) $PDI_{TEM}$
O1	5	30	5000	60%	100%	437 PDI = 0,086		420 +/- 48 PDI = 0,052
O2	5	30	5000	53%	86%	437 PDI = 0,086		382 +/- 45 PDI = 0,055
O3	5	30	5000	60%	100%	437 PDI = 0,086		464 +/- 67 PDI = 0,083

Remarque :  $D_n$  (MET) a été déterminé par le logiciel Image J et correspond à la taille des particules mesurées à partir des clichés MET : le diamètre dans le cas de particules non réticulées, le diamètre du cœur et d'un nodule dans le cas de particules réticulées. Un bon accord a été obtenu entre la mesure DLS et la mesure MET et de ce fait, seule la caractérisation par MET a été reportée dans le Tableau 2.9.

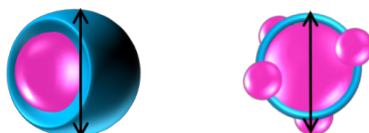


Figure 2.21 : Prise de mesure du diamètre des particules non réticulées (gauche) et des particules réticulées (droite).

La comparaison des résultats de la prédiction avec ceux de l'analyse TEM témoignent d'un bon accord entre le modèle et l'expérience. Les équations de détermination du diamètre et de la polydispersité des particules en fonction de la quantité d'agent stabilisant, de sa longueur et de la quantité d'agent réticulant sont donc fiables. Dans les paragraphes suivants, nous nous proposons d'interpréter ces résultats.

#### 2.3.3.4.1 Facteurs influant sur le diamètre des vecteurs

Le facteur le plus significatif de l'équation [1] est ( $D_{AS}$ ) révélant ainsi que la quantité d'agent stabilisant est le facteur le plus influent sur la taille des objets. Ce facteur étant négatif, le diamètre est inversement proportionnel à la quantité d'AS additionnée. En effet d'après le Tableau 2.9, plus cette quantité est importante, plus les particules sont petites ( $Dn(2) < Dn(1)$  ;  $Dn(4) < Dn(3)$  ;  $Dn(6) < Dn(5)$  et  $Dn(8) < Dn(7)$ ). Comme nous l'avons vu au 1.3.3.4, après ajout de l'amorceur, les premiers oligomères se forment et gardent une bonne solubilité dans la phase continue jusqu'à atteindre une longueur critique  $l_c$ , au-delà de laquelle ils précipitent et forment les premiers nucléi. Ces particules au contact ont tendance à coaguler et une particule stable n'est formée qu'une fois l'incorporation de suffisamment de macromonomères assurée. Ainsi, à une longueur de POE fixée, il est fort probable que plus la quantité de macromonomère est importante, plus les nucléi en incorporent tôt et se stabilisent tôt. On forme donc plus vite des particules stables qui donneront des particules de latex plus petites.

#### 2.3.3.4.2 Facteurs influant sur la polydispersité des vecteurs

Le facteur le plus significatif de l'équation [2] est ( $D_{AR}$ ) révélant ainsi que la quantité d'agent réticulant est le facteur le plus influent sur la polydispersité des objets. Ainsi, plus cette quantité est importante, plus les particules obtenues sont polydisperses. Ceci peut, d'une part, s'expliquer par la cinétique de consommation des agents réticulants et stabilisants. Comme nous l'avons vu au 2.3.2, la présence d'agent réticulant a tendance à ralentir et diminuer la consommation en macromonomère dès le début de la polymérisation. La formation de particules stables est, de ce fait, plus espacée dans le temps que dans une Dispersion « classique » : les particules résultantes sont plus polydisperses. D'autre part, dans le cas de particules réticulées, la structure plus rigide de l'objet empêche l'accès en périphérie aux chaînes de POE incorporées dans les premiers temps de la synthèse et le milieu se retrouve chargé de nucléi mal stabilisés. Il en résulte un mode de nucléation agrégative souvent caractéristique d'échantillons plus polydisperses que dans le cas d'une nucléation spontanée.

#### 2.3.3.4.3 Facteurs influant sur la morphologie des vecteurs

Il est à signaler, qu'en plus d'influer sur la polydispersité des particules, la présence d'agent réticulant conduit à des morphologies originales. Les images MET du Tableau 2.9 (expériences 5, 6, 7, 8, O1, O2 et O3) montrent des particules présentant des nodules (plus ou moins bien définis), proches d'une structure type « framboise ». Un zoom des particules O3 est présenté ci-dessous.

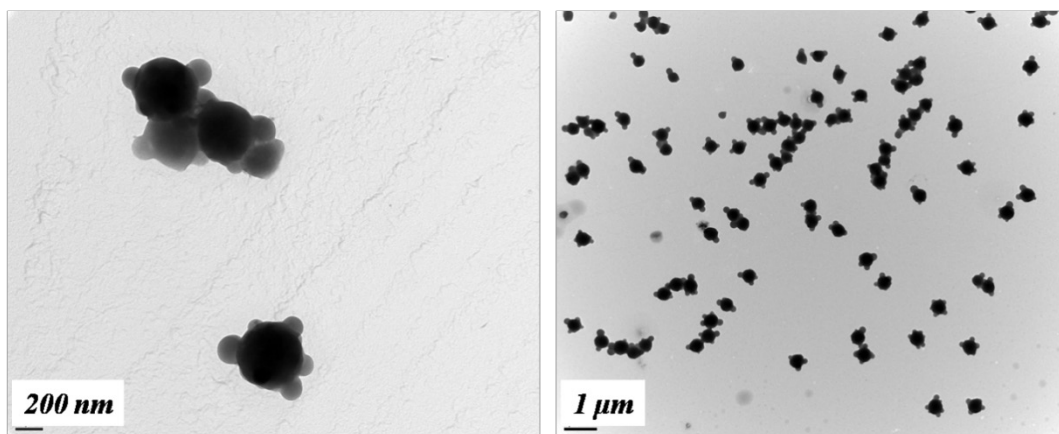


Figure 2.22 : Observation par Microscopie Electronique à Transmission (MET) de particules de O3 (5% d'AR, 30% m. d'AS de  $M_n$  de  $5000 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

L'AR est consommé très tôt et réticule probablement très vite. Il y aurait donc formation de réactions intra (contraction du réseau) et / ou inter moléculaires (assemblage des premiers nuclei) dès le départ expliquant l'apparition de nodules. Thomson *et al.* ont fait le même type de constatation lors de la dispersion de particules de PS réticulées par du DVB (dont les deux entités réticulantes sont très réactives). Ils ont étudié l'influence du mode d'addition de l'agent réticulant sur la morphologie de leurs particules. Alors que l'ajout de la totalité de l'AR dès le départ conduit à des particules présentant des nodules, les particules issues de l'addition progressive de DVB ne présentent aucune excroissance. Le DVB étant très réactif, son ajout progressif permet de ralentir les phénomènes de réticulation et de conduire à des structures plus homogènes <sup>[46]</sup>.

Ces résultats, bien que très intéressants, étaient inattendus. En effet, le concept de départ était d'ajouter un agent réticulant du polymère de cœur se répartissant de façon homogène au sein d'une particule sphérique de PNB-POE et permettant le contrôle de sa température de transition vitreuse. Au regard des clichés exposés en Figure 2.22, on est amené à se poser la question de l'homogénéité de la répartition de l'agent réticulant au cœur de la particule et aussi de son effet sur les profils d'imprégnation et de relargage.

L'analyse par Microscopie à Force Atomique (AFM) de ces particules n'a pas révélé de différence de dureté entre les nodules et le cœur du matériau (Figure 2.23). Il semble donc que les compositions du cœur et des nodules soient similaires. Cependant la dureté-mollesse des nodules et du cœur du matériau est probablement masquée par la présence d'une couche de POE (dur et cristallin) qui recouvre les particules. Les petits points noirs observés sur les particules témoignent probablement d'une absence de POE dévoilant le PNB, plus mou.

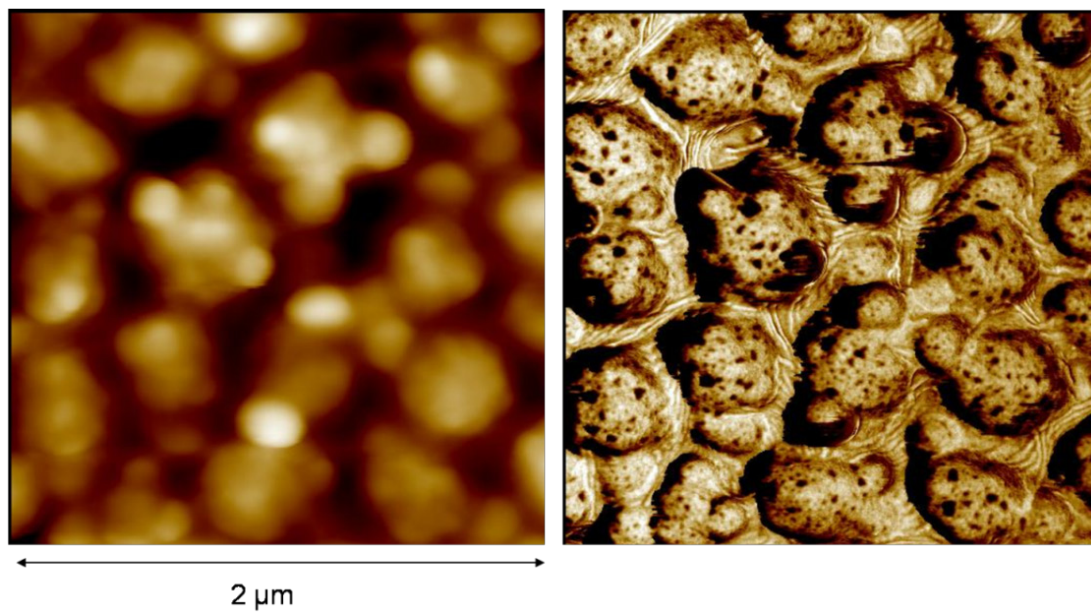


Figure 2.23 : Observation par AFM en mode intermittent (*tapping mode en anglais*) des particules O1 (5% d'AR, 30% m. d'AS de  $M_n$  de  $5000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). A gauche, image de « hauteur », à droite, image de « phase ».

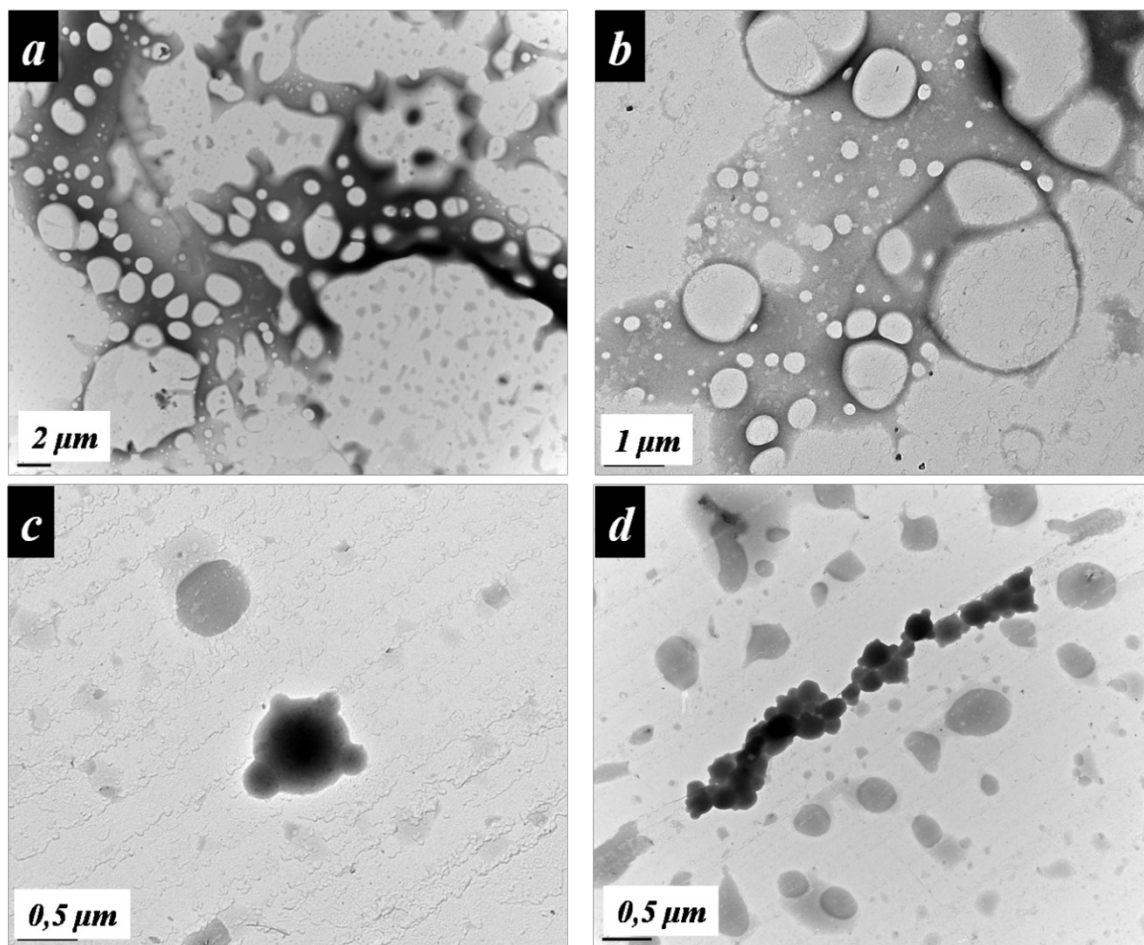


Figure 2.24 : Clichés de particules dissoutes dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : a et b) particules sans agent réticulant, c et d) particules avec 5% mass. d'agent réticulant.

Toujours dans le but d'évaluer l'homogénéité de la répartition de l'AR, la dissolution des particules dans du dichlorométhane (bon solvant du PNB) a été opérée (clichés MET en Figure 2.24). D'après ces clichés, on remarque que contrairement aux clichés *a* et *b* de particules non réticulées qui se défont complètement dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , les clichés *c* et *d* prouvent que, même après ajout de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , les particules conservent leur morphologie et ce que ce soit au niveau du cœur ou au niveau des nodules. Il semblerait donc bien que l'agent réticulant soit uniformément réparti dans la particule.

**L'étude de ce plan d'expériences permet de tirer les conclusions suivantes:**

- **Les particules sont d'autant plus petites que la quantité d'AS est grande. Ainsi, il est possible de moduler la taille du vecteur entre 280 et 600 nm.**
- **Les particules sont d'autant plus polydisperses que la quantité d'AR est élevée.**
- **En présence d'AR, les particules ont une structure de type framboise dont le cœur et les nodules sont réticulés.**

Afin de comprendre la raison de l'apparition de ces nodules, différents essais complémentaires au plan d'expériences ont été réalisés. Le paragraphe suivant expose trois hypothèses possibles pour justifier ce phénomène avant de détailler et d'analyser les essais complémentaires.

### **2.3.4 Compréhension de l'apparition des nodules**

Il existe de nombreuses techniques de fabrication de particules à nodules que l'on retrouve sous le nom de framboise (*raspberry type*), daisy (*daisy shaped*) ou pieuvre (*octopus like*). Les plus communes sont l'hétérocoagulation <sup>[104-108]</sup>, la polymérisation par ensemencement <sup>[109-112]</sup> et la Dispersion <sup>[45, 46, 90, 91]</sup>. Suivant le cas de figure, trois théories ont été proposées dans la littérature permettant d'expliquer les phénomènes observés.

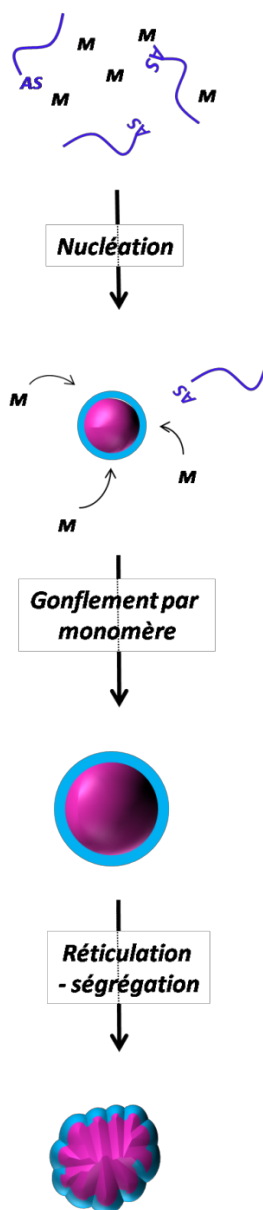
#### **2.3.4.1 Particules framboises : trois mécanismes possibles**

Les trois mécanismes recensés dans la littérature sont résumés en Figure 2.25. Le premier mécanisme correspond au cas de particules partiellement gonflables par un monomère. La croissance se fait par incorporation d'entités monomères présentes au cœur mais ne peut être homogène et entraîne une forme de ségrégation conduisant à l'apparition de nodules. Ces cas de figures ont été décrits sur des systèmes comportant des particules réticulées constituant un réseau polymère gonflable pour lequel la croissance se fait au travers des mailles du réseau <sup>[46, 113]</sup>.

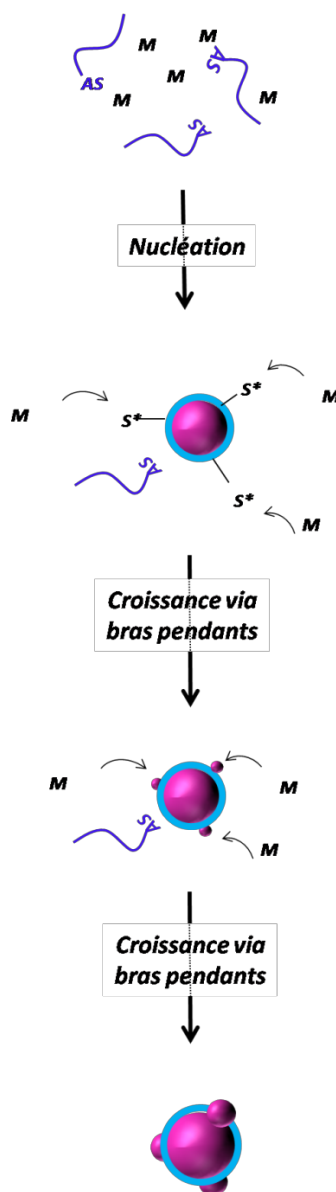
Le second mécanisme décrit la nucléation de particules non gonflables et présentant en leur surface des sites de croissance préférentielle. Ces sites préférentiels peuvent être des groupements réactifs <sup>[111]</sup> ou des chaînes de stabilisants <sup>[46]</sup> à partir desquels et / ou au sein desquels la polymérisation peut se poursuivre.

Le troisième mécanisme considère lui aussi la nucléation de particules non gonflables mais qui, cette fois-ci, ne peuvent incorporer de nouveaux constituants. Il en résulte une seconde nucléation dans la phase dispersante à partir des espèces encore dissoutes. L'apparition de nodules résulte alors de l'association des deux populations de particules <sup>[43, 112]</sup>.

**Mécanisme 1**



**Mécanisme 2**



**Mécanisme 3**

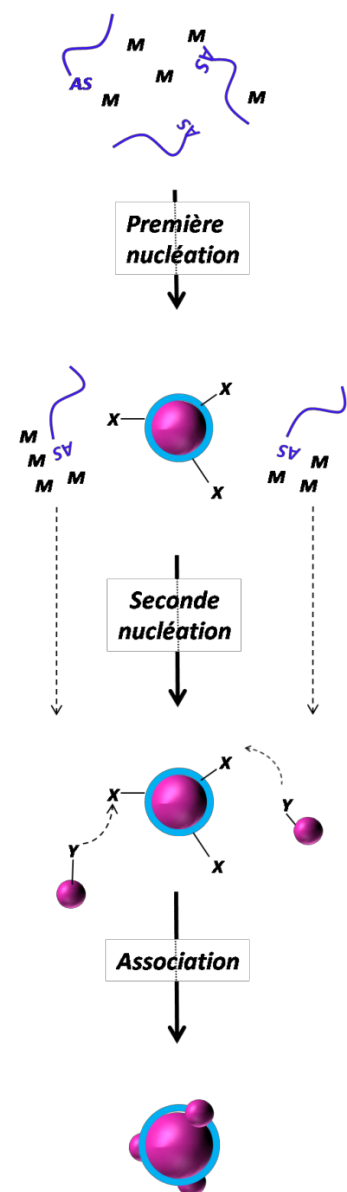


Figure 2.25 : Mécanismes de formation de nodules recensés dans la littérature (M: monomère, AS: Agent Stabilisant, S\*: site préférentiel de croissance, X et Y: entités réactives).



### 2.3.4.2 Cas des particules PNB-POE réticulées

Dans le cas de particules de PNB-POE réticulées avec du NB-pentanoate-NB, nous savons que les particules nucléées au départ ont incorporé beaucoup d'AR et sont donc probablement fortement réticulées. Elles sont par conséquent peu gonflables et l'apparition de nodules d'après le mécanisme 1 semble peu probable.

De plus, nous avons vu que la totalité du NB est consommée durant les dix premières minutes de la polymérisation. De ce fait, si l'apparition des nodules est le résultat d'une croissance au niveau de sites préférentiels, son alimentation est assurée par l'incorporation d'AR restant ou d'AS. Etant donné la forte réactivité du NB-pentanoate-NB (2.3.3.4.3), il est plus probable que ce dernier réagisse avec des espèces solubles dans le milieu dispersant (l'AS) plutôt qu'avec des entités réactives présentes sur la particule. Par conséquent, le second mécanisme ne semble pas être une description adaptée à notre système.

Ainsi, l'observation de nodules dans le cas de particules de PNB-POE réticulées pourrait s'expliquer par le troisième mécanisme. La particularité du dernier mécanisme vient de la nucléation de deux populations de particules. Dans le paragraphe suivant, nous avons essayé de mettre en évidence ces différentes nucléations.

### 2.3.4.3 Etude de l'étape de nucléation

Afin de distinguer cette étape clé de nucléation, des prélèvements au cours de la synthèse de particules PNB-POE réticulées (type O<sub>3</sub>) ont été réalisés, suivis d'une inactivation immédiate par ajout d'éthyl vinyl éther permettant de figer le système dans l'état. Chacun de ces échantillons a été analysé par imagerie MET (Figure 2.26). Les clichés *a* et *c* correspondent à la Dispersion respectivement après une heure et deux heures de polymérisation. On remarque qu'aucun nodule n'est présent. Le cliché *b* correspond au cliché *a* retraité par imagerie de manière à ne faire ressortir que les particules les plus contrastées. On remarque que, via ce traitement, certaines particules disparaissent (exemple cliché *a* - rectangle en pointillés). Cette différence de contraste suppose une différence de nature entre les deux populations de particules observées. Elle est encore plus évidente sur les clichés de 2h. De plus, les particules les plus sombres sont globalement plus grosses que les plus claires. Enfin, l'analyse des clichés aux temps finaux montrent bien l'apparition des nodules.

Précédemment, nous avons vu que suite à l'étape de nucléation lors de la Dispersion de particules de PNB-POE réticulées, le milieu est constitué de particules fortement réticulées et peu stabilisées, d'AR et d'AS n'ayant pas encore réagi. La réactivité de l'AR étant probablement très élevée, il a plutôt tendance à réagir avec les espèces encore solubilisées dans le milieu et à provoquer une seconde nucléation. A ce stade de la

polymérisation, il ne reste que de l'AS dans le milieu et par conséquent les particules issues de cette seconde nucléation sont principalement constituées de POE. Absorbant moins les électrons du faisceau incident que le PNB, les particules de POE ont un contraste plus faible. N'ayant pas pu incorporer de PNB, ces particules sont aussi plus petites.

Nous savons aussi que les particules nucléées présentent une faible quantité de stabilisant en surface. Par conséquent, l'accessibilité d'entités réactives est importante. Ainsi, dans un temps final les deux populations de particules s'associent via des bras pendants d'AR disponibles en surface. Il est à noter que le contraste des nodules est souvent plus clair que le cœur, sur les clichés de particules aux temps finaux, ce qui encore une fois laisse à penser que ces nodules sont plus riches en POE et moins riches en PNB.

*Remarque : cet essai a conduit à la formation de nodules plus gros. Il est fort probable que la multiplication des prélèvements lors de la synthèse ait désactivé certains centres actifs, limitant encore une fois l'incorporation d'AS et rendant encore plus accessibles les bras pendants en surface. Il est alors envisageable que deux particules se fixent l'une à l'autre.*

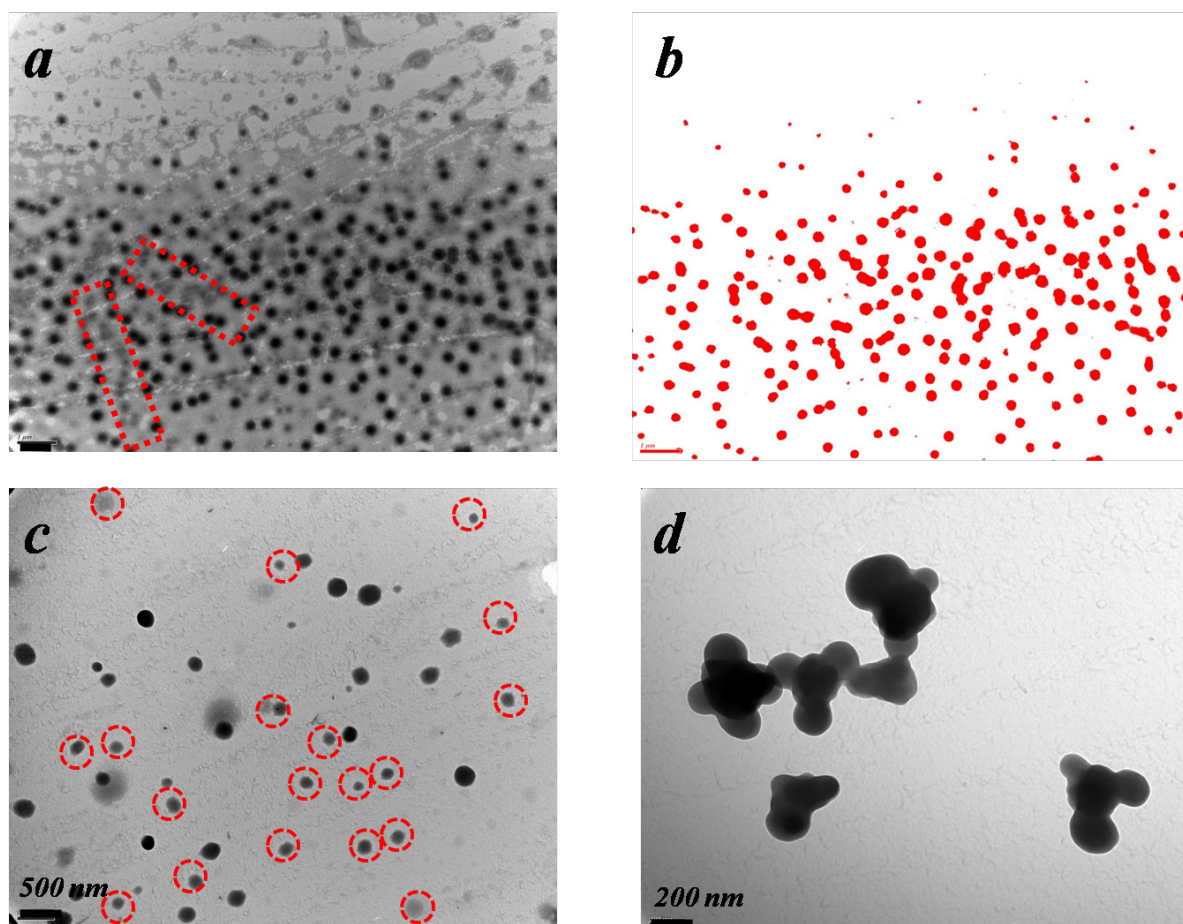


Figure 2.26 : Clichés MET à différents stades de la Dispersion de particules réticulées par 5% de NB-pentanoate-NB : *a*)  $t = 1h$ , *b*)  $t = 1h$  (cliché traité en contraste par le logiciel *Image J*), *c*)  $t = 2h$  et *d*)  $t = 24h$ .

Cette étude tend à montrer que le mécanisme 3 décrit bien la polymérisation en Dispersion de particules PNB-POE réticulées par le NB-pentanoate-NB.

#### 2.3.4.4 Décomposition de l'étape d'incorporation de l'AR

Afin de confirmer cette hypothèse, une Dispersion avec ajout de l'AR dans un second temps a été tentée. L'idée était ici de vérifier que la présence d'AR (c'est-à-dire de fonctions réactives pendantes à la surface du cœur) est essentielle à la formation de nodules. Pour ce faire, une synthèse de particules de PNB-POE classique a été amorcée puis, après 5 minutes de synthèse (le NB ayant déjà réagi en totalité), 5% en masse d'agent réticulant a été ajouté.

Tableau 2.10 : Conditions expérimentales et caractérisations pour la synthèse de particules O5. Les quantités de réactifs ajoutées au départ ainsi que leurs conversions sont données en pourcentage massique (%m.).

Essai	AR (%m.)	AS (%m.)	L (%m.)	Conv AS (%m.)	Conv NB (%m.)	Conv AR (%m.)	Dn (TEM) (nm)
O5	5% d'AR ajouté à t=5min	30	5000	63%	98,7%	Pas de trace finale d'AR 100%	Bimodal sphérique 431 +/- 37 264 +/- 83

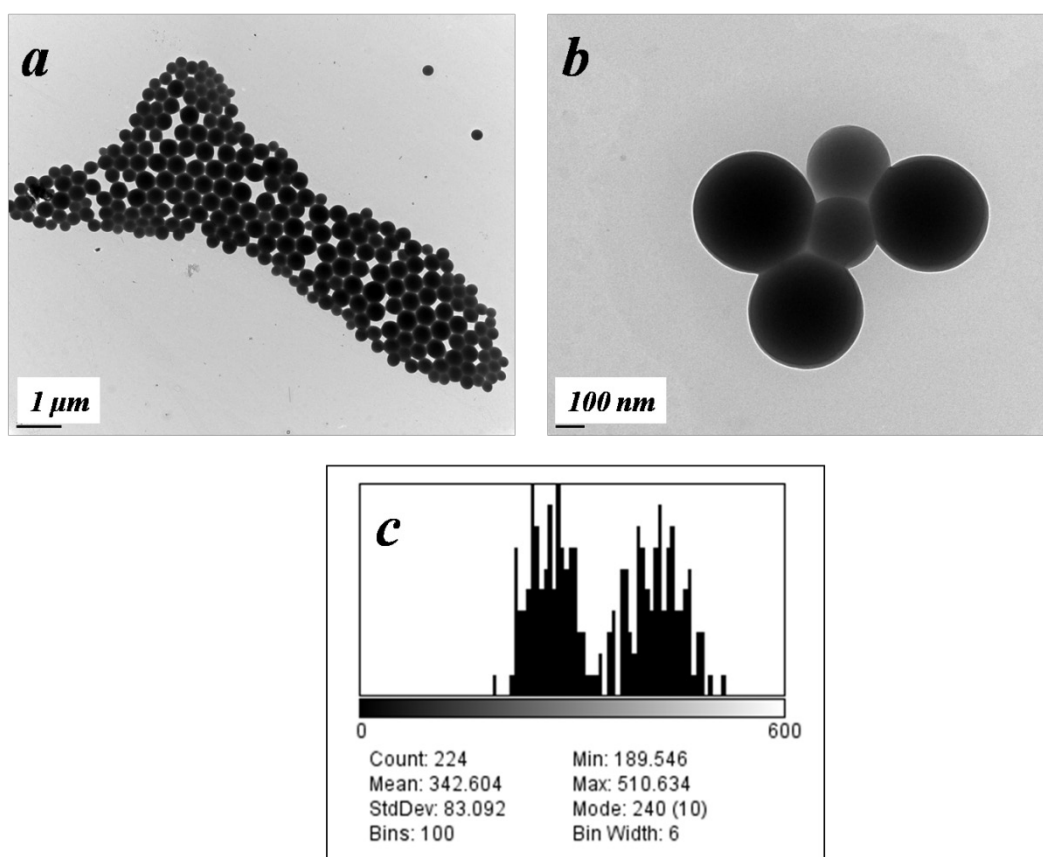


Figure 2.27 : Observation MET des particules de PNB-POE avec ajout de réticulant à t=5min (a). Analyse du cliché (a) via Image J (c).

La Figure 2.27 nous montre que l'analyse des clichés obtenus par MET révèle l'existence de deux populations distinctes de particules totalement sphériques : une première population de particules de taille moyenne 260 nm et une seconde de taille moyenne 430 nm. Si l'on compare ces deux populations, on note une différence de contraste suggérant une fois encore des compositions différentes (Figure 2.27, b). Aucune apparition de nodules n'a été observée. Les petites particules n'ont pu être observées ni par DLS ni par ALV probablement en raison d'une faible concentration et aussi par un masquage de leur signal dû à la forte diffusion des plus grosses particules, présentes en plus grande concentration.

La Figure 2.28 représente l'observation des particules O5 par AFM. Ici encore, on retrouve deux populations de particules.

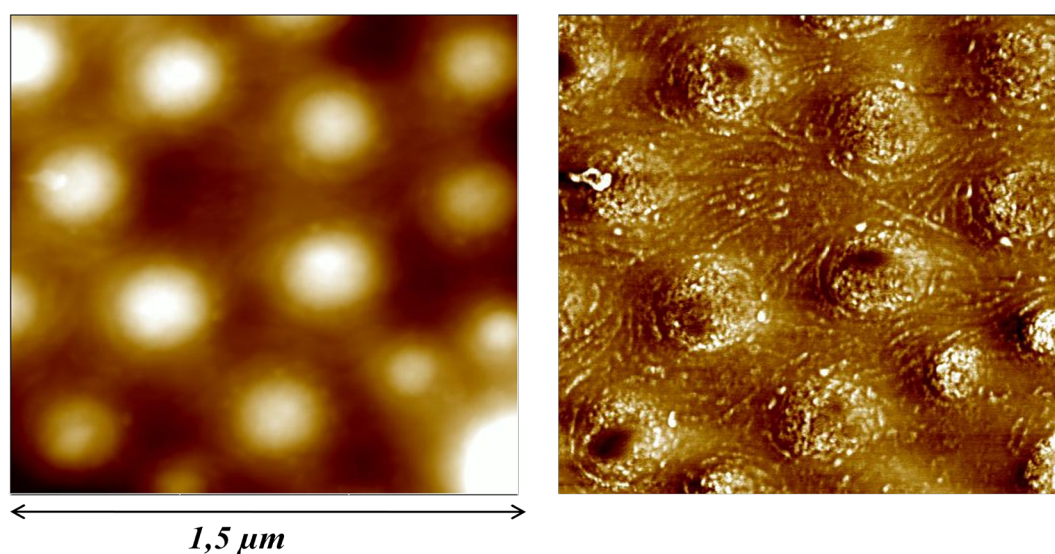


Figure 2.28 : Observation par AFM en mode intermittent (*tapping mode en anglais*) des particules de O5 (PNB-POE avec ajout de réticulant à  $t=5\text{min}$ ). A gauche, image de « hauteur », à droite, image de « phase ».

Ces observations peuvent être interprétées comme suit. Au départ de la réaction, les seules espèces dissoutes sont le norbornène et le macromonomère. Une fois l'amorceur ajouté, la polymérisation démarre et la croissance d'oligomères de PNB va petit à petit conduire à la nucléation de particules stables. A ce stade de la réaction, sont encore dans le milieu les particules en croissance et l'AS. Si l'on vient ajouter à ce moment une certaine quantité d'agent réticulant (dans ce cas, 5 % en masse 5 minutes après addition de l'amorceur), ce dernier se dissout dans la phase dispersante et a alors plus de chances de rencontrer un AS encore dissous qu'une entité réactive présente au niveau des particules ayant déjà précipité. Encore une fois, l'AR étant très réactif, son incorporation par l'AS conduit très vite à leur précipitation. Une nouvelle nucléation a donc lieu, conduisant à un latex composé de deux populations de particules : une population plus grosse dépourvue en agent réticulant et une plus petite population (car peu, voire pas de PNB) concentrée en

agent réticulant. Aucune association des deux populations de particules n'est observée en raison, d'une part, de l'absence totale d'agent réticulant dans la première population et, d'autre part, d'un bon recouvrement de la particule par l'AS qui bloque l'accessibilité au cœur de PNB. Cet essai appuie encore une fois le mécanisme 3.

### **3 Conclusions et bilan par rapport aux objectifs**

Au travers de ce chapitre, la synthèse de particules PNB-POE par Dispersion a été décrite. Cette technique permet de synthétiser des particules, dans une gamme de tailles allant de 280 nm à 600 nm, adaptées au ciblage de divers organes suite à une administration par injection de médicaments, les plus grosses étant plutôt destinées au ciblage des cellules tumorales (EPR).

La Dispersion permet le greffage de chaînes de NB-POE directement à la surface des particules leur apportant la furtivité nécessaire à une circulation prolongée dans le corps humain.

Dans l'optique de contrôler la  $T_g$  du cœur des vecteurs, un agent réticulant a été ajouté lors de la synthèse : le NB-pentanoate-NB. Un plan d'expériences supposant la synthèse de particules avec différentes quantités d'agent réticulant (0-5-10 % en masse), différentes quantités d'agent stabilisant (15-30-45 % en masse) et différentes longueurs d'agent réticulant (2000-5000-800  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) a été réalisé. Ce plan a permis de montrer que, d'une part, la taille des particules est d'autant plus petite que la quantité d'agent stabilisant est importante et, d'autre part, que la polydispersité des particules est fonction de la quantité d'agent réticulant. Notamment, l'ajout d'agent réticulant lors de la Dispersion de particules de PNB-POE a révélé l'apparence de nodules à la surface des particules.

Une étude plus poussée de cette synthèse en présence d'agent réticulant a permis de montrer que l'apparition des nodules est le résultat d'une double nucléation : une première correspondant à la consommation rapide de NB en présence d'agent réticulant et une seconde correspondant à la consommation plus lente du NB-POE et de l'agent réticulant.

Comme il a été mentionné précédemment, la  $T_g$  du cœur des matériaux ne pouvant être mesurée, l'évaluation du comportement thermodynamique de ces vecteurs se fera lors de l'étude du relargage d'un principe actif *in vitro* en fonction de la température. La molécule modèle choisie pour ces études est l'acide salicylique et son encapsulation est réalisée sous  $\text{CO}_2$  supercritique. Le chapitre suivant présente les fluides supercritiques, leurs applications et dans quelles mesures ils permettent l'encapsulation de molécules actives dans des polymères.

## Bibliographie

1. Ziegler, K.; Holzkamp, E.; Breil, H.; Martin, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1955**, 67, (19-20), 541-547.
2. Natta, G.; Pino, P.; Corradini, P.; Danusso, F.; Mantica, E.; Mazzanti, G.; Moraglio, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, (6), 1708-1710.
3. Anderson, A. W.; Merckling, N. G. US patent, 2 721 189, 1955.
4. Eleuterio, H. S. US Patent, 3 074 918, 1963.
5. Peters, E. F.; Evering, B. L. U.S. Patent, 2 963 447, 1960.
6. Banks, R. L.; Bailey, G. C. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1964**, 3, (3), 170-173.
7. Calderon, N.; Chen, H. Y.; Scott, K. W. *Tetrahedron Let.* **1967**, 8, (34), 3327-3329.
8. Bradshaw, C. P. C.; Howman, E. J.; Turner, L. *J. Catal.* **1967**, 7, (3), 269-276.
9. Calderon, N.; Ofstead, E. A.; Ward, J. P.; Judy, W. A.; Scott, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, (15), 4133-4140.
10. Hérisson, J.; Chauvin, Y. *Makromol. Chem.* **1971**, 141, 161-76.
11. Lewandos, G. S.; Pettit, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, (25), 7087-7088.
12. Chauvin, Y. *ChemInform* **2007**, 38, (19).
13. Bielawski, C. W.; Grubbs, R. H. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, (1), 1-29.
14. Dall'Asta, G.; Mazzanti, G.; Natta, G.; Porri, G. *Makromol. Chem.* **1962**, 56, 224-227.
15. Natta, G.; Dall'Asta, G.; Mazzanti, G.; Motroni, G. *Makromol. Chem.* **1963**, 49, 163-79.
16. Natta, G.; Dall'Asta, G.; Mazzanti, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1964**, 3, 723-9.
17. Michelotti, F.; Keaveney, W. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1965**, 3, 895-905.
18. Rinehart, R.; Smith, H. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Lett.* **1965**, 3, (12), 1049-1052.
19. Kroll, W. R.; Doyle, G. *J. Chem. Soc. D* **1971**, (15), 839.
20. Pampus, G.; Lehnert, G. *Makromol. Chem.* **1974**, 175, (2605-16).
21. Fischer, E. O.; Maasbøl, A. *Angewandte Chemie - International Edition* **1964**, 3, 580.
22. Casey, C. P.; Tuinstra, H. E.; Saeman, M. C. *J. of Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 608.
23. Natta, G.; Dall'Asta, G.; Motroni, G. *J. Polym. Sci., Polym. Lett.* **1964**, B2, 349.
24. Natta, G.; Dall'Asta, G.; Porri, G. *Makromol. Chem.* **1965**, 81, 253.
25. Lahouste, J.; Lemattre, M.; Stern, C. *Chem. Abstr.* **1976**, 84, 122568.
26. Lu, S. Y.; Quayle, P.; Heatley, F.; Booth, C.; Yeates, S. G.; Padget, J. C. *Macromolecules* **1992**, 25, (10), 2692-2697.
27. Lu, S.-Y.; Quayle, P.; Booth, C.; Yeates, S. G.; Padget, J. C. *Polymer International* **1993**, 32, (1), 1-4.
28. Nguyen, S. T.; Johnson, L. K.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, (10), 3974-3975.
29. Lynn, D. M.; Kanaoka, S.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, (4), 784-789.
30. Héroguez, V.; Fontanille, M.; Gnanou, Y. *Macromol. Symp.* **2000**, 150, 269-274.
31. Quémener, D.; Héroguez, V.; Gnanou, Y. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, (1), 217-229.
32. Chemtob, A.; Héroguez, V.; Gnanou, Y. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2004**, 42, (5), 1154-1163.
33. Lynn, D. M.; Mohr, B.; Grubbs, R. H. *Am. Chem. Soc., Polymer Preprints, Division of Polym. Chem.* **1998**, 39, (1), 278-279.
34. Lynn, D. M.; Mohr, B.; Grubbs, R. H.; Henling, L. M.; Day, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, (28), 6601-6609.
35. Claverie, J. P.; Viala, S.; Maurel, V.; Novat, C. *Macromolecules* **2001**, 34, (3), 382-388.
36. Jordan, J. P.; Grubbs, R. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, (27), 5152-5155.
37. Samanta, D.; Kratz, K.; Zhang, X.; Emrick, T. *Macromolecules* **2008**, 41, (3), 530-532.
38. Breitenkamp, K.; Emrick, T. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, (22), 5715-5721.

39. Castle, T. C.; Hutchings, L. R.; Khosravi, E. *Macromolecules* **2004**, 37, (6), 2035-2040.
40. Gallivan, J. P.; Jordan, J. P.; Grubbs, R. H. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, (15), 2577-2580.
41. Quémener, D.; Héroguez, V.; Gnanou, Y. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, 44, (9), 2784-2793.
42. Pichot, C., Introduction à la polymérisation en milieu hétérogène et à la polymérisation radicalaire. In *Les latex synthétiques*, Lavoisier ed.; Daniel, J.-C.; Pichot, C., Eds. 2006; pp 183-205.
43. Kim, J. W.; Suh, K. D. *Colloid Polym Sci* **1999**, 277, (1), 66-72.
44. Song, J. S.; Tronc, F.; Winnik, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (21), 6562-6563.
45. Song, J. S.; Winnik, M. A. *Macromolecules* **2005**, 38, (20), 8300-8307.
46. Thomson, B.; Rudin, A.; Lajoie, G. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, 59, (13), 2009-2028.
47. Zhang, H. T.; Huang, J. X.; Jiang, B. B. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, 85, (10), 2230-2238.
48. Chemtob, A.; Héroguez, V.; Gnanou, Y. *Macromolecules* **2004**, 37, (20), 7619-7627.
49. Lee, B. S.; Mahajan, S.; Clapham, B.; Janda, K. D. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, (10), 3319-3329.
50. Quémener, D.; Chemtob, A.; Héroguez, V.; Gnanou, Y. *Polymer* **2005**, 46, (4 SPEC. ISS.), 1067-1075.
51. Monteil, V.; Wehrmann, P.; Mecking, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, (42), 14568-14569.
52. Airaud, C.; Héroguez, V.; Gnanou, Y. *Macromolecules* **2008**, 41, (9), 3015-3022.
53. Héroguez, V.; Breunig, S.; Gnanou, Y.; Fontanille, M. *Macromolecules* **1996**, 29, (13), 4459-4464.
54. Chemtob, A.; Héroguez, V.; Gnanou, Y. *Macromolecules* **2002**, 35, (25), 9262-9269.
55. Barret, K. *Wiley-Interscience, Londres* **1975**.
56. Almog, Y.; Reich, S.; Levy, M. *British Polymer Journal* **1982**, 14, (4), 131-136.
57. Ober, C. K.; Hair, M. L. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1987**, 25, (5), 1395-1407.
58. Ober, C. K.; Lok, K. P. *Macromolecules* **1987**, 20, (2), 268-273.
59. Ober, C. K.; Lok, K. P.; Hair, M. L. *J. Polym. Sci. Polym.lett. ed.* **1985**, 23, (2), 103-108.
60. Okubo, M.; Ikegami, K.; Yamato, Y. *Colloid Polym. Sci.* **1989**, 267, (3), 193-200.
61. Okubo, M.; Katayama, Y.; Yamato, Y. *Colloid Polym. Sci.* **1991**, 269, (3), 217-221.
62. Paine, A. J. *Macromolecules* **1990**, 23, (12), 3109-3117.
63. Paine, A. J. *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, 138, (1), 157-169.
64. Paine, A. J.; Deslandes, Y.; Gerroir, P.; Henrissate, B. *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, 138, (1), 170-181.
65. Paine, A. J.; Luymes, W.; McNulty, J. *Macromolecules* **1990**, 23, (12), 3104-3109.
66. Tseng, C. M.; Lu, Y. Y.; El-Aasser, M. S.; Vanderhoff, J. W. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1986**, 24, (11), 2995-3007.
67. De Gennes, P. G. *Macromolecules* **1980**, 13, 1069-1075.
68. Lacroix-Desmazes, P., Polymérisation en dispersion. In *Les latex synthétiques*, Lavoisier ed.; Daniel, J.-C.; Pichot, C., Eds. 2006; pp 259-288.
69. Lacroix-Desmazes, P.; Guyot, A. *Polym. Adv. Technol.* **1997**, 8, (10), 601-607.
70. Nakamura, K.; Fujimoto, K.; Kawaguchi, H. *Colloids Surf. A* **1999**, 153, (1-3), 195-201.
71. Bourgeat-Lami, E.; Guyot, A. *Colloid Polym Sci* **1997**, 275, (8), 716-729.
72. Feeney, P. J.; Napper, D. H.; Gilbert, R. G. *Macromolecules* **1984**, 17, (12), 2520-2529.
73. Funke, W.; Okay, O.; Joos-Müller, B. *Adv. Polym. Sci.*, **1998**; Vol. 136, pp 138-234.
74. Shashoua, V.; Beaman, R. *Journal of Polymer Science* **1958**, 33, (126), 101-117.
75. Matsumoto, A.; Kodama, K.; Aota, H.; Capek, I. *European Polymer Journal* **1999**, 35, (8), 1509-1517.

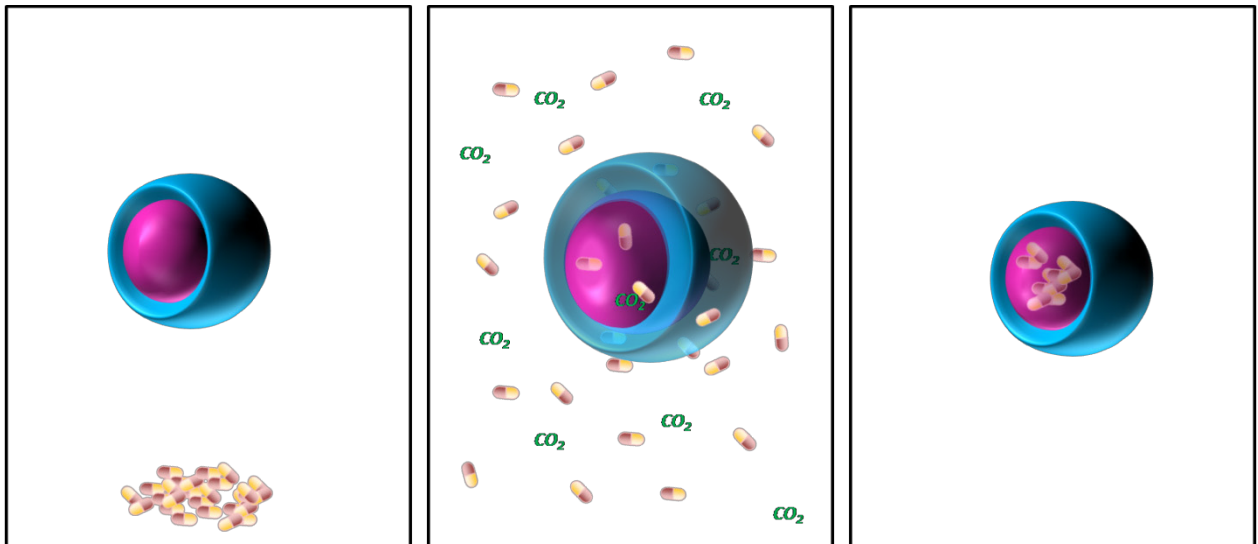
76. Obrecht, W.; Seitz, U.; Funke, W. *Am. Chem. Soc., Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry* **1975**, 16, (1), 149-154.
77. Tobita, H. *Macromolecules* **2002**, 25, (10), 2671-2678.
78. Antonietti, M.; Bremser, W.; Schmidt, M. *Macromolecules* **1990**, 23, (16), 3796-3805.
79. Zheng, L.; Xie, A. F.; Lean, J. T. *Macromolecules* **2004**, 37, (26), 9954-9962.
80. Feng, M.-H.; van der Does, L.; Bantjes, A. *European Polymer Journal* **1994**, 30, (8), 941-947.
81. Kesenci, K.; Tuncel, A.; Piskin, E. *Reactive and Functional Polymers* **1996**, 31, (2), 137-147.
82. Narasimhaswamy, T.; Sumathi, S. C.; Reddy, B. S. R. *Macromolecules* **2002**, 25, (13), 3338-3344.
83. Oguz, O.; Çigdem, G. *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, 46, (3), 401-410.
84. Renil, M.; Pillai, V. N. R. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, 61, (9), 1585-1594.
85. Tuncel, A.; Pi, E.; scedil; kin. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, 62, (5), 789-798.
86. Cao, Z.; Cui, Q.; Shan, G. *Acta Polymerica Sinica* **2007**, (12), 1116-1120.
87. Per, B. Z.; Md. Nur, A.; Hideto, M.; Masayoshi, O. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, 26, (12), 955-960.
88. Wool, R. P. *Industrial Bioprocessing* **2004**, 26, (9), 2-3.
89. Hattori, M.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S. *J. Appl. Polym. Sci.* **1993**, 50, (11), 2027-2034.
90. Li, K.; Stover, H. D. H. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1993**, 31, (10), 2473-2479.
91. Choi, J.; Kwak, S.-Y.; Kang, S.; Lee, S.-S.; Park, M.; Lim, S.; Kim, J.; Choe, C. R.; Hong, S. I. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2002**, 40, 4368-4377.
92. Longley, K.; Schmidhauser US Patent, 5 412 048, 1995.
93. Cho, S. H.; Ryu, J. H.; Jun, J. B.; Suh, K. D. *Colloid Polym. Sci.* **2005**, 284, (3), 266-275.
94. Kim, J. W.; Kim, B. S.; Suh, K. D. *Colloid Polym. Sci.* **2000**, 278, (6), 591-594.
95. Kim, J. W.; Ko, J. Y.; Suh, K. D. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, 22, (4), 257-261.
96. Kim, J. W.; Lee, C. H.; Jun, J. B.; Suh, K. D. *Colloids and Surf., A.* **2001**, 194, (1-3), 57-64.
97. Sheng, X.; Lee, J. K.; Kessler, M. R. *Polymer* **2009**, 50, (5), 1264-1269.
98. Deleuze, H.; Faivre, R.; Héroguez, V. *Chem. Commun.* **2002**, (23), 2822-2823.
99. Devlin, P. A.; Lutz, E. F.; Creek, W.; Patten, R. J. US Patent, **1971**.
100. Kelsey, D. R.; Chuah, H. H.; Ellison, R. H.; Handlin Jr, D. L.; Scardino, B. M. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1997**, 35, (14), 3049-3063.
101. Barrett, A. G. M.; Hopkins, B. T.; Köbberling, J. *Chemical Reviews* **2002**, 102, (10), 3301-3324.
102. Liaw, D. J.; Huang, C. C.; Hong, S. M. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, 44, (21), 6287-6298.
103. Rule, J. D.; Moore, J. S. *Macromolecules* **2002**, 35, (21), 7878-7882.
104. Li, G.; Song, Y.; Yang, X.; Huang, W. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, 104, (2), 1350-1357.
105. Li, G.; Yang, X.; Bai, F.; Huang, W. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 297, 705-710.
106. Li, G.; Yang, X.; Wang, J. *Colloids and Surf., A.* **2007**, 322, (2008), 192-198.
107. Li, H.; Kumacheva, E. *Colloid Polym. Sci.* **2003**, 281, 1-9.
108. Li, R.; Yang, X.; Li, G.; Li, S.; Huang, W. *Langmuir* **2006**, 22, (19), 8127-8133.
109. Kirsch, S.; Landfester, K.; Shaffer, O.; El-Aasser, M. S. *Acta Polymerica* **1999**, 50, (10), 347-362.
110. Okubo, M.; Kanaida, K.; Matsumoto, T. *Colloid Polym. Sci.* **1987**, 265, (10), 876-881.
111. Perro, A.; Reculosa, S.; Bourgeat-Lami, E.; Duguet, E.; Ravaine, S. *Colloids Surf. A.* **2006**, 284, 78-83.
112. Sommer, F.; Duc, T. M.; Pirri, R.; Meunier, G.; Quet, C. *Langmuir* **1995**, 11, 440-8.
113. Tolué, S.; Moghbeli, M. R.; Ghafelebashi, S. M. *European Polymer Journal* **2009**, 45, 714-720.





## Chapitre 3

### Caractérisation du comportement du système polymères- $\text{CO}_2$ supercritique- soluté



**SOMMAIRE**

<b>1</b>	<b>LE CO<sub>2</sub> SUPERCRITIQUE, PROPRIETES ET APPLICATIONS DANS LE BIOMEDICAL</b>	<b>102</b>
1.1	QU'EST-CE QU'UN FLUIDE SUPERCRITIQUE ?	102
1.2	LE CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE POUR DES APPLICATIONS BIOMEDICALES	103
1.2.1	DEVELOPPEMENT DE VECTEURS PHARMACEUTIQUES	104
1.2.2	STERILISATION SOUS CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE	106
<b>2</b>	<b>COMPORTEMENT THERMODYNAMIQUE D'UN SYSTEME POLYMERE-CO<sub>2</sub></b>	<b>107</b>
2.1	SOLUBILITE DU CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE DANS UN POLYMERE ET PHENOMENES DE DIFFUSION	108
2.1.1	SOLUBILITE DU CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE DANS UN POLYMERE	108
2.1.2	PLASTIFICATION DES POLYMERES	109
2.1.3	PHENOMENES DE DIFFUSION DU CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE DANS LES POLYMERES	110
2.1.4	TENSION INTERFACIALE ET FORMATION DE MOUSSES POLYMERES	111
2.2	CARACTERISATION DU COMPORTEMENT DU SYSTEME POLYMERE – CO <sub>2</sub>	112
<b>3</b>	<b>CARACTERISATION DU COMPORTEMENT DU SYSTEME PNB-CO<sub>2</sub> PAR SPECTROSCOPIE IRTF</b>	<b>117</b>
3.1	SPECTROSCOPIE PAR TRANSMISSION IRTF POUR L'ETUDE DU GONFLEMENT D'UN POLYMERE SOUS CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE : PRINCIPE	117
3.2	MISE EN PLACE DE L'EXPERIENCE DE CARACTERISATION	119
3.2.1	MONTAGE DE SUIVI <i>IN SITU</i> PAR INFRAROUGE	119
3.2.2	FORMATION D'UN FILM DE PNB SUR UNE FENETRE EN SILICIUM	120
3.2.3	BANDES CARACTERISTIQUES DU PNB EN IR	123
3.3	GONFLEMENT DU PNB PAR LE CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE	125
3.3.1	PROTOCOLE EXPERIMENTAL	125
3.3.2	RESULTATS	125
3.4	GONFLEMENT DES PARTICULES PNB-POE PAR LE CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE	129
3.4.1	MODE OPERATOIRE	130
3.4.2	GONFLEMENT DE PARTICULES PNB-POE SOUS CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE	130
<b>4</b>	<b>ETUDE DE LA SOLUBILITE DE L'ACIDE SALICYLIQUE DANS LE CO<sub>2</sub> SUPERCRITIQUE</b>	<b>131</b>
4.1	DETERMINATION DU COEFFICIENT D'EXTINCTION MOLAIRE D'UNE BANDE CARACTERISTIQUE DE L'ACIDE SALICYLIQUE DANS LE CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE	131
4.2	DETERMINATION DE LA SOLUBILITE DE L'ACIDE SALICYLIQUE DANS LE CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE	138
4.2.1	PREVISION DE LA SOLUBILITE DE L'ACIDE SALICYLIQUE DANS LE CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE	138
4.2.2	MESURE DE LA SOLUBILITE DE L'ACIDE SALICYLIQUE DANS LE CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE PAR SPECTROSCOPIE IRTF	139
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONS ET BILAN PAR RAPPORT AUX OBJECTIFS</b>	<b>141</b>

Des particules à base de PNB-POE ont été développées afin de vectoriser de manière ciblée un principe actif. Comme il a été vu au chapitre 1, la technique d'encapsulation avec laquelle nous avons choisi de travailler est l'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique. De manière générale, un procédé d'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique se déroule en trois étapes principales :

1. La solubilisation du principe actif dans le CO<sub>2</sub>, si possible saturation du CO<sub>2</sub> en principe actif,
2. La diffusion de la solution CO<sub>2</sub>-principe actif dans le polymère,
3. La dépressurisation du système et la récupération du matériau imprégné.

*Dans le cadre de ce projet, l'acide salicylique a été choisi comme principe actif modèle en raison i) de son innocuité, ii) de son absorbance en IR permettant de suivre in situ son imprégnation (paragraphe 2 du chapitre 4) et iii) de son absorbance en UV-vis permettant de suivre son relargage in vitro (paragraphe 3 du chapitre 4).*

La diffusion d'un principe actif dans un polymère par imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique est possible en raison d'un effet de gonflement des polymères en présence de ce fluide. L'efficacité de ce procédé dépend donc non seulement de la solubilité du soluté dans le CO<sub>2</sub> supercritique mais aussi de la capacité du CO<sub>2</sub> à gonfler le système polymère considéré. Ainsi, la caractérisation du comportement des systèmes polymère-CO<sub>2</sub> et soluté-CO<sub>2</sub> permet d'appréhender l'imprégnation de ce polymère par le soluté.

Après une brève présentation du CO<sub>2</sub> supercritique et de ses applications dans le domaine biomédical, nous verrons dans ce chapitre quelles sont les principales techniques de caractérisation du comportement des systèmes polymère-CO<sub>2</sub> et pourquoi il a été choisi de travailler avec la spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) par transmission pour caractériser le système. Ensuite, les résultats du gonflement du PNB, du POE et des particules PNB-POE par le CO<sub>2</sub> supercritique seront présentés. Finalement, une étude de la solubilité de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> supercritique sera détaillée.

## 1 Le CO<sub>2</sub> supercritique, propriétés et applications dans le biomédical

### 1.1 Qu'est-ce qu'un fluide supercritique ?

Les fluides supercritiques ont été découverts expérimentalement il y a bientôt deux siècles par le baron Charles Cagniard de la Tour (1822). Dans une marmite de Papin, ancêtre de la cocotte minute, il a introduit un liquide, une sphère de silex et a commencé à chauffer. A partir d'une certaine température, il remarqua que le bruit de la sphère était tel que la bille semblait bondir à chaque percussion : il venait de dépasser le point critique. Les deux phases avaient disparu et le fluide était devenu « supercritique ». Ainsi, si l'on suit la courbe de coexistence liquide-gaz dans un diagramme de phase pression-température, on observe qu'elle se termine par le point critique, 31°C et 7,38 MPa pour le CO<sub>2</sub>. Au point critique, la densité des deux phases liquide et gaz est identique et le système devient monophasique.

Un fluide supercritique peut être défini comme un fluide dense, non condensable, dont les variables pression et température sont supérieures à celles des température et pression critiques. Un tel fluide possède des propriétés physico-chimiques (densité, viscosité, diffusivité) intermédiaires et ajustables entre celles des liquides et celles des gaz.

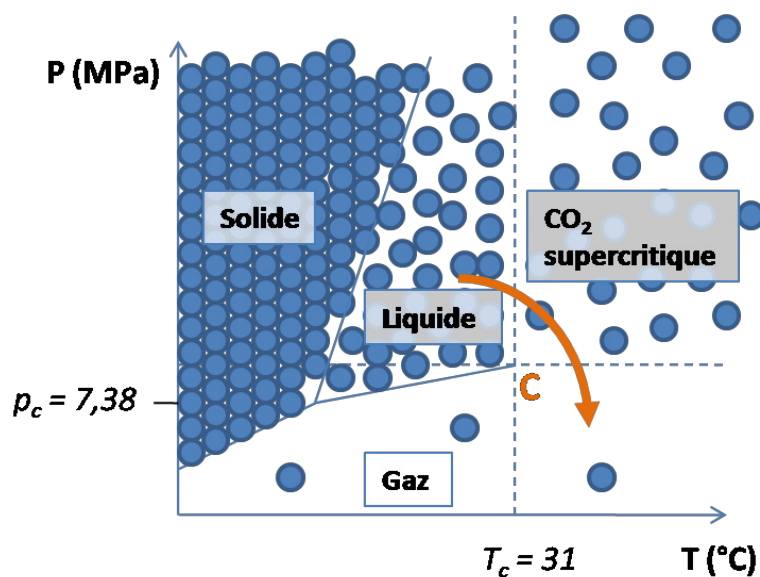


Figure 3. 1 : Diagramme de phase schématisé du CO<sub>2</sub> dans l'espace pression - température (p – T) à volume molaire constant.

Ce phénomène est mis en évidence par la flèche orange de la Figure 3. 1: au-delà du point critique, il y a une continuité entre les propriétés thermophysiques du fluide, du liquide au gaz.

**Tableau 3.1 : Comparaison de quelques propriétés spécifiques des fluides supercritiques avec celles des liquide et gaz.**

	<i>Liquide</i>	<i>Fluide Supercritique</i>	<i>Gaz</i>
<i>Densité. <math>10^3</math> (kg.m<sup>-3</sup>)</i>	1	0,1-0,8	0,001
<i>Viscosité. <math>10^{-3}</math> (Pa.s)</i>	1	0,01-0,1	0,01
<i>Diffusivité. <math>10^{-9}</math> (m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>)</i>	1	10	10000

Comme nous le montre le Tableau 3.1, les propriétés des fluides supercritiques (FSC) sont « hybrides » entre les propriétés usuellement associées aux gaz et aux liquides : la viscosité et la diffusivité d'un FSC sont plus proches de celles des gaz alors que la densité est de l'ordre de grandeur de celle des liquides. Ces propriétés peuvent être ajustées de manière continue depuis les propriétés des liquides jusqu'à celles des gaz par de faibles variations de pression et / ou de température et ce, en contournant le point critique. Ainsi, à partir d'un seul fluide, il est possible d'avoir accès à différentes propriétés de solvants.

En raison de leurs différentes caractéristiques, les FSC et notamment le CO<sub>2</sub> supercritique sont utilisés pour le développement de différents types de matériaux et notamment pour des applications biomédicales. Avant d'étudier plus en détails la caractérisation du système polymère-CO<sub>2</sub>-soluté (dans notre cas avec le PNB, le POE et l'acide salicylique), une présentation non exhaustive de ces applications est réalisée dans le paragraphe suivant.

## **1.2 Le CO<sub>2</sub> supercritique pour des applications biomédicales**

L'un des principaux soucis de l'industrie pharmaceutique pour le développement de vecteurs thérapeutiques à base de polymères est l'utilisation de solvants de synthèse souvent toxiques, susceptibles d'être piégés au cœur du matériau (vecteurs, implants, matériel médical...). Dans ce contexte, les technologies FSC se sont avérées être attrayantes car permettant l'obtention de systèmes de « *Drug Delivery* » purs, de taille, de morphologie, de composition et de structure contrôlées. Plus de 98% des applications sous FSC pour le biomédical utilisent le CO<sub>2</sub> supercritique <sup>[1]</sup>. Ignifuge, non toxique, gazeux à température ambiante et présentant des coordonnées critiques basses, le CO<sub>2</sub> permet d'envisager de nombreux procédés de synthèse de matériaux biomédicaux.

Les paragraphes suivants présentent succinctement les différentes applications pour le développement de systèmes de « *Drug Delivery* » ainsi que leur purification utilisant le CO<sub>2</sub> supercritique.

### 1.2.1 Développement de vecteurs pharmaceutiques

Le principal objectif dans le domaine du « *Drug delivery* » est de contrôler le relargage de la molécule active c'est-à-dire de maîtriser (d'un point de vue cinétique et spatial) la dissolution *in vivo* de celle-ci.

Le contrôle de la cinétique de la dissolution est fonction de l'état de spéciation (ou polymorphisme) de la molécule active. En effet, dans le cas de molécules actives organisées sous forme cristalline, la cinétique de solubilisation est particulièrement lente (applications envisageables pour des systèmes à relargage contrôlé), alors que dans le cas de molécules dispersées de manière amorphe (pas d'organisation des molécules entre elles), la solubilisation du principe actif est généralement rapide<sup>[2]</sup>. Les FSC peuvent être utilisés pour mettre en forme des composés à base de principe actif seul avec un contrôle du polymorphisme et peuvent permettre de ce fait de contrôler la cinétique de solubilisation de la molécule en milieu aqueux. Dans le cas de principes actifs encapsulés dans un vecteur stimuli-sensible, l'imprégnation de formes non cristallines est préférable de manière à assurer la solubilisation du principe actif instantanément suite au stimulus.

Le contrôle spatial de cette dissolution peut être assuré par l'enrobage du principe actif par un additif (polymère par exemple – chapitre 1, paragraphe 3.2). Aujourd'hui, deux techniques principales utilisant les FSC permettent le développement de telles particules. On les différencie suivant que la particule est formée directement sous FSC ou lors d'une étape préalable.

#### 1.2.1.1 Formation de la particule et dispersion du principe actif par co-précipitation

Plusieurs procédés FSC permettent la mise en forme de vecteurs pharmaceutiques. On les classe en quatre catégories que l'on différencie suivant le rôle joué par le CO<sub>2</sub> supercritique<sup>[3]</sup> :

- **un solvant** : RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solutions*) ou expansion rapide d'une solution supercritique et SFEE (*Supercritical Fluid Emulsion Extraction*) ou extraction d'émulsions sous FSC,
- **un co-solvant** : DELOS (*Depressurization of an Expanded Liquid Organic Solution*) ou la dépressurisation d'une solution liquide organique,
- **un anti-solvant** : SAS (*Supercritical Anti Solvent*) ou anti-solvant supercritique et les procédés dérivés, ASES (*Aerosol Solvent Extraction System*), SEDS (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*) et PCA (*Precipitation with a Compressed Antisolvent*)
- **un soluté** : formation de particules à partir d'une solution saturée en gaz ou PGSS (*Particles from Gas-Saturated Solution*).

Si polymère et principe actif sont solubles dans le CO<sub>2</sub> supercritique, il est possible de co-précipiter ces matériaux suite à la dissolution des matériaux dans le CO<sub>2</sub> supercritique (RESS). La solution est rapidement amenée dans une chambre basse pression de manière à induire la précipitation des espèces. Ce procédé est le RESS (Rapid Expansion of supercritical Solution)<sup>[4]</sup>. A titre d'exemple, Debenedetti *et al.* ont ainsi développé des microparticules de lovastatin recouvertes de poly (acide lactique) (PLA). Kim *et al.* ont, eux aussi, utilisé le PLA pour le développement de vecteurs pharmaceutiques co-précipités avec du naproxène<sup>[5]</sup>. Cependant, l'utilisation de procédés de type RESS est limitée, d'une manière générale, par la faible solubilité des polymères dans le CO<sub>2</sub> supercritique (voir paragraphe 2.1.1 de ce chapitre). Mishima *et al.* ont développé une méthode d'encapsulation de principe actif sous FSC applicable à une grande variété de polymères (POE, poly-DL-acide lactique, PMMA...) en utilisant un co-solvant afin de faciliter la solubilisation du polymère dans la solution supercritique<sup>[6-8]</sup>. Dans ce procédé (RESS-N), le co-solvant devient un anti-solvant du polymère lors de la dépressurisation et induit sa précipitation avec le principe actif. Le DELOS est une variante du RESS-N où le CO<sub>2</sub> est utilisé en tant que co-solvant avec une solution organique formant une solution de liquide expansé en conditions sous-critiques (par exemple, p = 10 MPa et T = 25°C)<sup>[9]</sup>.

Les procédés utilisant le CO<sub>2</sub> supercritique en tant qu'anti-solvant (SAS/ ASES/ SEDS/ PCA) tirent profit de la faible solubilité des polymères dans le CO<sub>2</sub> supercritique pour les mettre en forme. Ainsi, si ni le polymère, ni le principe actif ne sont solubles dans le CO<sub>2</sub> supercritique, il est possible de dissoudre les deux solutés dans un solvant organique dans un premier temps puis de mettre en contact cette solution avec du CO<sub>2</sub> supercritique (soit par ajout de CO<sub>2</sub> supercritique directement à la solution, soit par vaporisation de la solution dans une chambre contenant du CO<sub>2</sub>, soit par vaporisation simultanée de la solution et du CO<sub>2</sub> supercritique)<sup>[10-13]</sup>. En utilisant le SAS, Wang *et al.* ont formé des microcapsules d'hydrocortisone recouvertes de PLGA par co-précipitation<sup>[14]</sup>. Reverchon *et al.* sont quant à eux parvenus à disperser de façon homogène de l'ampicilline trihydratée au sein de microparticules d'hydroxypropylméthyl cellulose.

Le PGSS consiste quant à lui à solubiliser le CO<sub>2</sub> supercritique dans une solution principe actif-polymère à l'état fondu. Le tout est co-précipité par vaporisation dans une chambre basse pression. En raison de la grande diminution de température et de pression, la substance se solidifie rapidement et conduit à la formation de particules. En utilisant le PGSS, Kerc *et al.* ont préparé des particules à base de nifédipine ou de féléodipine (molécules hydrophobes) et de POE. Ils ont ainsi pu améliorer la dissolution *in vitro* de ces molécules<sup>[15]</sup>.

*Remarque : Ces différents procédés sont décrits de façon plus détaillée en Annexe 2.*



L'autre façon de mettre en forme des vecteurs pour la « *Drug Delivery* » en utilisant les FSC est l'imprégnation par un principe actif de particules polymères pré-synthétisées.

### 1.2.1.2 Imprégnation de particules polymères par un principe actif

Le CO<sub>2</sub> supercritique a la capacité de gonfler des matrices polymères (paragraphe 2.1.2 de ce chapitre). De ce fait, il peut être utilisé en tant que moyen de transport pour venir imprégner des particules polymères par des principes actifs solubles dans le CO<sub>2</sub> supercritique [16-23]. Comme nous l'avons vu en introduction, le procédé d'imprégnation consiste d'abord en la solubilisation du principe actif dans le CO<sub>2</sub> supercritique, suivie du gonflement du polymère par la solution CO<sub>2</sub> – principe actif et enfin de la dépressurisation [24].

L'ajustement des conditions de travail (température, pression) permet de contrôler le gonflement du polymère ainsi que la quantité de soluté solubilisé. Ainsi, il est facile de contrôler quantitativement l'imprégnation d'un polymère par un soluté solubilisé dans un fluide supercritique [25, 26]. Jusqu'à ce jour, les principaux solutés étudiés pour le développement de procédés d'imprégnation sont : les colorants, les complexes métalliques, les principes actifs et les molécules biologiques. Une bibliographie plus détaillée explicitant les procédés et les mécanismes mis en jeu est réalisée au chapitre 4.

Pour terminer ce paragraphe sur l'utilisation des FSC pour la préparation de matériaux dédiés à des applications dans le domaine biomédical, nous proposons de présenter un effet qui a récemment été mis en œuvre : l'effet stérilisant sous CO<sub>2</sub> supercritique.

### 1.2.2 Stérilisation sous CO<sub>2</sub> supercritique

En raison de leurs nombreux effets secondaires, les procédés de stérilisation usuels (traitement par oxyde d'éthylène, vaporisation, irradiation gamma...) présentent de nombreuses limites aux vues de leurs futures applications biomédicales (risques de détérioration du matériau ou de la molécule active) [27]. L'utilisation de CO<sub>2</sub> condensé est une technique prometteuse pour la stérilisation de liquides et de matériaux solides. En effet, son utilisation dans des conditions de température et de pression modérées permet d'inactiver un grand nombre de systèmes microbiens [28]. L'efficacité de cette inactivation est améliorée sous conditions humides [29]. En matière de stérilisation, cette technique est d'autant plus attractive que le CO<sub>2</sub> est non toxique et ne laisse aucune trace dans la mesure où il est à l'état gazeux à la température ambiante [30]. Initialement, l'inactivation des bactéries par le CO<sub>2</sub> était attribuée à une explosion de la membrane cellulaire des bactéries lors de la dépressurisation [31] mais certains travaux mettent en évidence la conservation de la forme des cellules après traitement sous CO<sub>2</sub> supercritique et tendent à réfuter cette hypothèse [28]. Depuis, même si le mécanisme d'inactivation n'est pas encore totalement identifié, la plupart des résultats convergent vers une inactivation par acidification du milieu [29, 32]. D'après ces travaux, le CO<sub>2</sub> pénètre dans un premier temps à

l'intérieur des membranes cellulaires (provoquant une hausse de leur perméabilité<sup>[32]</sup>) et ensuite induit une acidification de l'environnement de la bactérie (tout particulièrement en présence d'eau). Il s'ensuit alors une modification de l'activité enzymatique de la cellule conduisant à la destruction de son métabolisme.

A ce jour, la stérilisation par le CO<sub>2</sub> n'est pas encore parvenue aux niveaux de stérilisation exigés par l'industrie pharmaceutique (de l'ordre de SAL 10<sup>7</sup> au lieu de SAL 10<sup>6</sup>)<sup>1</sup> [29, 30]. Cependant, les niveaux de stérilisation atteints sont de plus en plus élevés. White *et al.* sont parvenus à développer un procédé rapide de stérilisation par le CO<sub>2</sub> nécessitant peu d'humidité et permettant d'atteindre des niveaux industriels de stérilisation. L'utilisation de cette méthode est tout de même limitée en raison des fortes températures de travail exigées (50-60°C) et de l'addition nécessaire d'acide peracétique<sup>[30]</sup>.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'imprégnation de vecteurs polymères par un principe actif sous CO<sub>2</sub> supercritique. Pour une telle application, l'effet clé du CO<sub>2</sub> supercritique est sa capacité à gonfler les matrices polymères. Ce gonflement est la conséquence de la très bonne solubilité du CO<sub>2</sub> supercritique dans les polymères. Dans le paragraphe suivant, les phénomènes de solubilité et de diffusion du CO<sub>2</sub> dans les polymères sont abordés de manière plus détaillée afin de comprendre, *in fine*, les raisons du gonflement des polymères sous CO<sub>2</sub> supercritique.

## 2 Comportement thermodynamique d'un système polymère-CO<sub>2</sub>

Quatre phénomènes étroitement liés permettent de comprendre le gonflement des polymères sous CO<sub>2</sub> supercritique: la solubilité du CO<sub>2</sub> supercritique dans les polymères, la plastification résultante de la matrice et la diminution de la tension de surface (à l'interface polymère-CO<sub>2</sub>) qui conduisent toutes les deux à une meilleure diffusion du CO<sub>2</sub> supercritique. Le paragraphe suivant reprend et détaille ces concepts avant de présenter les différentes techniques de caractérisation de ces phénomènes. Le Tableau 3.2 rassemble les principaux résultats de caractérisation du comportement thermodynamique de systèmes polymère-CO<sub>2</sub> recensés dans la littérature.

---

<sup>1</sup> Le niveau SAL 10<sup>6</sup> signifie que la probabilité pour qu'un produit donné soit contaminé après soumission à une colonie de bactéries (>10<sup>6</sup> unités de colonies) est d'une chance sur un million.

## 2.1 Solubilité du CO<sub>2</sub> supercritique dans un polymère et phénomènes de diffusion

### 2.1.1 Solubilité du CO<sub>2</sub> supercritique dans un polymère

Alors que le CO<sub>2</sub> est un solvant pour la plupart des molécules non polaires ayant un faible poids moléculaire, c'est au contraire un très mauvais solvant pour la plupart des molécules à fort poids moléculaire. Seuls les polymères de faible énergie de cohésion comme les fluoropolymères, les polymères siliconés, les polypropylènes atactiques et les poly (méthacrylate de méthyl) (PMMA) avec des branches hydrocarbonées présentent une bonne solubilité relative dans le CO<sub>2</sub> [6, 33-35].

En revanche, bien que la solubilité de la plupart des polymères dans le CO<sub>2</sub> supercritique soit extrêmement faible, la solubilité du CO<sub>2</sub> supercritique dans de nombreux polymères est quant à elle importante. **Ce phénomène est d'autant plus prononcé que la pression est élevée.** Il en résulte alors des changements au niveau de la morphologie du polymère mais aussi au niveau de ses principales propriétés : la viscosité, la perméabilité, la tension de surface ou encore la température de transition vitreuse. **Ainsi, l'addition de CO<sub>2</sub> supercritique à un polymère a tendance à provoquer le gonflement de celui-ci.**

Une large gamme de polymères a déjà fait l'objet d'études parmi lesquels on recense le poly (oxyde d'éthylène) (POE), le poly (diméthyl siloxane) (PDMS), le poly (méthacrylate de méthyl) (PMMA), le poly (méthacrylate d'éthyl) (PEMA), le polystyrène (PS), le polycarbonate (PC) ou encore le poly (éthylène téréphtalate) (PTFE) [18, 36-39]. Certaines revues résument quelques unes de ces caractérisations et révèlent que, suivant la nature du polymère mis en jeu, la solubilité du CO<sub>2</sub> supercritique peut aussi bien être négligeable qu'atteindre 40% en masse (les principales techniques de caractérisation donnant accès à ses valeurs sont énoncées au paragraphe 2.2 de ce chapitre) [24, 40]. Il est en règle générale admis que les affinités du CO<sub>2</sub> pour les polymères sont en grande partie dues aux interactions intermoléculaires possibles entre le CO<sub>2</sub> et les groupements caractéristiques des polymères. Il existe cependant des exceptions où la flexibilité et le volume exclu des chaînes semblent avoir un effet plus important sur la solubilité que les interactions polymère-CO<sub>2</sub> proprement dites [41].

La relation entre ces interactions intermoléculaires et l'absorption de CO<sub>2</sub> supercritique par le polymère a été étudiée qualitativement par quelques auteurs en utilisant la spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF). Cependant, aucune caractérisation quantitative du rapport entre la nature et / ou la force de ces interactions et le gonflement d'un polymère par le CO<sub>2</sub> supercritique n'a été trouvée. En effet, l'origine moléculaire du gonflement des polymères en présence de CO<sub>2</sub> supercritique a fait l'objet de très peu d'études (quelques fluoropolymères et le polyéthylène) qui utilisent des méthodes de modélisation moléculaire [42, 43]. Ainsi, considérant qu'un procédé de solvation consiste en une compétition entre le travail requis

pour créer une cavité dans un polymère (réorganisation des chaînes) et les énergies de liaison entre le soluté et le polymère, Van Der Vegt a montré que contrairement aux cas des gaz interagissant faiblement avec les polymères (He, Ne, H<sub>2</sub>) la solubilisation du CO<sub>2</sub> met plus particulièrement en jeu les termes d'interaction CO<sub>2</sub>-polymère que les termes de réorganisation des chaînes <sup>[43]</sup>.

Certains modèles permettent de prédire la solubilité du CO<sub>2</sub> dans les polymères <sup>[44, 45]</sup>. Le plus largement utilisé est celui développé par Sanchez-Lacombe <sup>[46, 47]</sup>. Considérant un mélange fluide-polymère comme un maillage constitué de trous et de segments reliés entre eux (*lattice fluid theory*), ils sont parvenus à établir une équation d'état applicable aux gaz et aux polymères. Ainsi, connaissant les paramètres d'états caractéristiques des composés purs (T\*, P\* et ρ\*) des molécules mises en jeu (gaz-polymère), il est possible de prédire la solubilité d'un gaz dans un polymère.

*Remarque : Ne connaissant pas ces coordonnées pour le PNB, la comparaison de nos expériences à ce modèle n'a pas été réalisée.*

### 2.1.2 Plastification des polymères

L'un des principaux changements d'état des polymères est le passage de l'état vitreux à l'état caoutchoutique. Ce changement d'état a lieu lorsque l'on passe la température de transition vitreuse (T<sub>g</sub>).

Comme nous venons de le voir, de par sa bonne solubilité dans la plupart des polymères, le CO<sub>2</sub> supercritique a tendance à diminuer leur T<sub>g</sub> et à provoquer leur gonflement. D'après le Tableau 3.2 (p 114-115), on constate que suivant le polymère considéré et les conditions expérimentales, le gonflement peut aller jusqu'à 110 %.

La présence de molécules de CO<sub>2</sub> au sein d'une matrice polymère a pour effet de faciliter le mouvement des chaînes polymères les unes par rapport aux autres se traduisant par une diminution de la T<sub>g</sub> du polymère (de 0,05 à 2,8 °C / MPa suivant le système considéré <sup>[24]</sup>). On parle d'effet plastifiant du CO<sub>2</sub> supercritique. Cette diminution de la T<sub>g</sub> ne résulte pas seulement de l'application d'une pression hydrostatique mais aussi d'un effet thermodynamique des interactions intermoléculaires entre le CO<sub>2</sub> et le polymère. Plus ces interactions sont fortes, plus la chute de T<sub>g</sub> est élevée. Ainsi, Handa *et al.* ont trouvé que la chute de la T<sub>g</sub> du PMMA (1,2 °C / atm) était plus importante que la chute de la T<sub>g</sub> du PS (1 °C / atm) dans les mêmes conditions (dans le cas du PMMA, présence de groupements polaires avantageant les interactions avec le CO<sub>2</sub> supercritique) <sup>[48]</sup>. De la même façon, plus la flexibilité des chaînes est élevée, plus la chute de la T<sub>g</sub> est importante (cas de la comparaison entre PEMA et PMMA <sup>[49]</sup>).

Tout comme pour la solubilité, il existe des théories permettant de prédire la diminution de la T<sub>g</sub> d'un polymère en présence de CO<sub>2</sub>. L'analyse de Chow *et al.* est l'une des plus simples

d'utilisation <sup>[50]</sup>. Cette approche permet une estimation théorique de la diminution de la  $T_g$  d'un polymère en présence d'un gaz :

$$\ln\left(\frac{T_g}{T_{g0}}\right) = \beta[(1-\theta). \ln(1-\theta) + \ln(\theta)] \quad \text{Equation 1}$$

où  $T_{g0}$  est la température de transition vitreuse du polymère seul et les paramètres  $\beta$  et  $\theta$  sont donnés par :

$$\beta = \frac{z.R}{\Delta C_p . M_p} \quad \text{et} \quad \theta = \frac{M_p}{z.M_g} \cdot \frac{\omega}{1-\omega} \quad \text{Equation 2}$$

avec  $z$  le nombre de coordination,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $M_p$  la masse molaire d'une unité répétitive du polymère,  $M_g$  la masse molaire du gaz,  $\Delta C_p$  le changement de capacité de chauffe à la transition vitreuse et  $\omega$  la fraction massique du gaz. La plupart de ces paramètres sont disponibles dans la littérature ou peuvent être mesurés séparément (sauf pour  $z$ , arbitrairement fixé à 1 ou 2).

Dans le cas de polymères semi-cristallins une influence du  $\text{CO}_2$  supercritique sur le point de fusion a aussi été constatée. Il a ainsi été montré que, sur une plage de pressions allant de 1 à 20 MPa, le point de fusion d'un POE de  $1500 \text{ g.mol}^{-1}$  passe de  $45^\circ\text{C}$  à  $28^\circ\text{C}$  <sup>[51, 52]</sup> et celui d'un POE de  $4000 \text{ g.mol}^{-1}$  passe de  $57^\circ\text{C}$  à  $42^\circ\text{C}$  <sup>[51]</sup>.

### 2.1.3 Phénomènes de diffusion du $\text{CO}_2$ supercritique dans les polymères

Les effets du  $\text{CO}_2$  supercritique (diminution de la  $T_g$  ou de la  $T_f$ ) incitent l'ensemble des chaînes macromoléculaires à se comporter comme une phase amorphe et facilitent le transport du  $\text{CO}_2$  supercritique. Les mécanismes de transport au sein d'une matrice polymère gonflée par du  $\text{CO}_2$  supercritique sont souvent très compliqués.

Berens *et al.* ont étudié l'absorption du  $\text{CO}_2$  supercritique par de nombreux polymères en phase solide par méthode gravimétrique. Ils ont ainsi montré que dans de tels polymères, la diffusivité du  $\text{CO}_2$  supercritique augmentait avec sa densité ou, autrement dit, augmentait avec la pression appliquée. Sato *et al.* ont quant à eux étudié les phénomènes de diffusion pour des polymères à l'état fondu et ont pu mettre en évidence la relation entre le coefficient de diffusion et le volume libre des polymères. Ils ont ainsi vérifié le modèle de Kulkarni et Stern selon lequel <sup>[53]</sup>:

$$D = R.T.A.\exp\left(\frac{-B}{v}\right) \quad \text{Equation 3}$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion du  $\text{CO}_2$  dans le polymère,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température,  $v$  le volume libre du polymère et  $A$  et  $B$  des constantes caractéristiques du système polymère-gaz. **On comprend donc que plus le volume libre du polymère est grand, plus le coefficient de diffusion du  $\text{CO}_2$  est important.**

#### 2.1.4 Tension interfaciale et formation de mousses polymères

La tension interfaciale entre un gaz pressurisé et un polymère peut, elle aussi, influencer sur les interactions polymère-gaz pressurisé. Notamment, dans le domaine supercritique, les tensions de surface entre un fluide et un polymère ont tendance à diminuer <sup>[19, 24]</sup> et par conséquent, facilitent la pénétration du fluide dans la matrice polymère. Dans le cas de polymères fondus sous haute pression de  $\text{CO}_2$ , Harrison *et al.* ont montré que la tension interfaciale du système polymère- $\text{CO}_2$  a tendance à diminuer avec la pression <sup>[54]</sup>.

De ce fait, les FSC sont de plus en plus utilisés pour des procédés de mélange de polymères ou de formation de mousses.

Dans le domaine de la « *Drug Delivery* », les matériaux polymères poreux sont de plus en plus développés en tant que support de régénération tissulaire. De nombreuses techniques de formation de mousses polymères existent à ce jour permettant la mise en forme de différentes structures tridimensionnelles variant de par leur taille et l'interconnexion des pores <sup>[55-57]</sup>. La plupart de ces techniques nécessitent l'utilisation de solvants organiques qui conduisent à des matériaux présentant un certain niveau, non négligeable, de toxicité. Pour ces raisons, la production de mousses de polymère sous  $\text{CO}_2$  supercritique est devenue un domaine de recherche et développement dans le biomédical de plus en plus actif et prometteur <sup>[58]</sup>.

Un procédé classique de formation de mousses sous  $\text{CO}_2$  supercritique peut être décomposé en trois étapes principales <sup>[24]</sup>:

1. La formation d'une solution homogène polymère fondu- $\text{CO}_2$  supercritique (utilisé ici en tant qu'agent de moussage),
2. La séparation de phase ou nucléation de pores suite à une instabilité thermodynamique (hausse de température ou chute plus ou moins brutale de pression),
3. La croissance des pores / coalescence de par le transfert de masse ou la dynamique des fluides.

Un tel procédé peut être réalisé en mode fermé <sup>[59-62]</sup> ou en continu (par extrusion) <sup>[63, 64]</sup>. Les principaux paramètres dont dépend son contrôle sont la température de moussage, l'amplitude de la chute de pression et la cinétique de dépressurisation. Ainsi, Tsivintzelis *et al.* ont montré que lors de la formation de mousses de PS par du  $\text{CO}_2$  supercritique, la taille des pores était d'autant plus petite et le nombre de pores d'autant plus grand que la pression de travail est élevée, la température faible et la cinétique de dépressurisation rapide <sup>[62]</sup>.

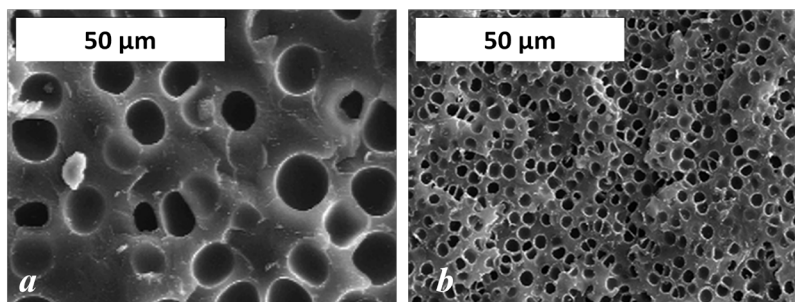


Figure 3. 2 : Mousses de PS préparées sous CO<sub>2</sub> supercritique: a) 80°C et 18 MPa; b) 80°C et 38 MPa [62].

*Remarque : Dans le cadre de notre étude, nous ne souhaitons pas former de mousses de polymères. Ce paragraphe n'a donc pas pour objectif d'introduire une technique développée lors des travaux de thèse mais de révéler le risque de déstructuration des particules lors de l'étape de dépressurisation.*

Nous connaissons maintenant les raisons qui font du CO<sub>2</sub> supercritique un outil très performant pour le traitement des polymères et notamment en matière de mise en forme, d'imprégnation et de stérilisation. D'après le paragraphe précédent les performances acquises pour chacune de ces applications dépendent tout de même du système polymère mis en jeu. Ainsi, la caractérisation du système polymère-CO<sub>2</sub> supercritique est nécessaire avant de passer à l'imprégnation. Le paragraphe suivant reprend les différentes techniques de caractérisation ayant permis à ce jour d'étudier les systèmes polymère-CO<sub>2</sub>.

## 2.2 Caractérisation du comportement du système polymère-CO<sub>2</sub>

Deux grandeurs sont principalement étudiées pour caractériser le comportement thermodynamique du système polymère-CO<sub>2</sub> : la solubilité du CO<sub>2</sub> dans le polymère et le gonflement résultant de la matrice.

Il existe principalement trois types de techniques pour les déterminer :

- Une première catégorie permet uniquement de mesurer la solubilité du CO<sub>2</sub> supercritique dans le polymère : la méthode barométrique [37, 65], la méthode par modulation de fréquence [66], la méthode de séparation de phase [38, 52] et la méthode gravimétrique [67-71],
- Une seconde catégorie permet uniquement de mesurer le volume d'un polymère gonflé par du CO<sub>2</sub> supercritique : la méthode par suivi visuel *in situ* [51, 72-75],
- Une troisième catégorie permet de mesurer ces deux grandeurs simultanément : l'ellipsométrie spectroscopique *in situ* [76], la spectroscopie IRTF (InfraRouge à Transformée de Fourier) [77, 78] et ATR (Réflexion Totale Atténuée) [79, 80].

*Toutes ces techniques sont détaillées en Annexe 3.*

Les trois premières techniques évoquées permettent de remonter à la masse de gaz absorbée par le polymère. Une interprétation rigoureuse de ces résultats requiert la mesure du gonflement du polymère <sup>[79]</sup> de manière à tenir compte de la variation de densité :

$$\rho_{\text{gonflé}} = \frac{\rho_{\text{pol}}}{1+S} \quad \text{Equation 4}$$

où  $\rho_{\text{gonflé}}$  est la densité du polymère gonflé par le FSC,  $\rho_{\text{pol}}$  est la densité du polymère seul et  $S$  est le gonflement du polymère ( $\Delta V/V_0$ ).

Ainsi, il est aussi possible de déterminer le pourcentage massique de gaz absorbé par un polymère accessible par la formule suivante <sup>[79]</sup> :

$$\%massCO_2 = \frac{c_{gCO_2/cm^3}}{c_{gCO_2/cm^3} + \frac{\rho_{\text{pol}}}{1+S}} \quad \text{Equation 5}$$

où  $c_{gCO_2/cm^3}$  est la concentration en CO<sub>2</sub> supercritique absorbé par le polymère ( $g_{CO_2}/cm^3$ ),  $\rho_{\text{pol}}$  la densité du polymère et  $S$  son gonflement.

De la même façon, dans le cadre de l'étude de l'imprégnation d'un soluté A dans un polymère sous FSC, la détermination du taux d'espèce imprégnée ( $\%mass A$ ) nécessite la connaissance du gonflement du polymère :

$$\%massA = \frac{c_{gA/cm^3}}{c_{gA/cm^3} + \frac{\rho_{\text{pol}}}{1+S}} \quad \text{Equation 6}$$

Ce gonflement est donc une donnée indispensable pour calculer le pourcentage massique de gaz et / ou de soluté absorbé. Ce gonflement peut être obtenu par modélisation thermodynamique, par exemple , en utilisant l'équation d'état de Sanchez-Lacombe <sup>[47, 69]</sup> :

$$S_w = \frac{(1+s)v(P,T,S)}{v(P,T,0)} \quad \text{Equation 7}$$

où  $s$  est la solubilité du gaz dans le polymère (g-gaz / g-polymère) et  $v$  le volume spécifique du polymère calculé par l'équation d'état S-LEOS  $v$  ( $cm^3 \cdot g^{-1}$ ) <sup>[69]</sup>.

Certaines hypothèses sont tout de même nécessaires à une telle modélisation susceptible alors d'être entachée d'erreurs. Il est donc préférable de la déterminer expérimentalement.



Les principaux résultats recensés dans la littérature sur la solubilité du CO<sub>2</sub> supercritique dans des polymères et sur le gonflement de polymères par du CO<sub>2</sub> supercritique sont résumés dans le Tableau 3.2.

**Tableau 3.2 : Bilan des principaux résultats de solubilité du CO<sub>2</sub> dans des polymères pour pour différentes méthodes d'analyse. La variation de la mesure du CO<sub>2</sub> supercritique absorbé correspond à la variation obtenue à une température donnée sur la plage de pression étudiée.**

<i>Polymère</i>	<i>Méthode d'analyse</i>	<i>Plage de pression de travail (MPa)</i>	<i>Plage de température de travail (°C)</i>	<i>Gonflement (%vol.)</i>	<i>Absorption de CO<sub>2</sub> (g-gaz/g-pol+gaz) (% mass.)</i>	<i>Réf</i>
<i>POE-400</i>	IRTF	0-25	40-150	40°C : 0-35 150 °C : 0-20	40°C : 0-26 150 °C : 0-13	[78]
<i>POE-400</i>	IRTF	5,3-11,6	40	16-35	11,1-22,6	[77]
<i>POE-400</i>	Gravimétrie	5-24 6-24	40-75	-	40°C : 12-23 75°C : 8-19	[38]
<i>POE-400</i>	Barométrie	1,4-22 (40°C) 2-26,5 (50°C)	40-50	-	40°C : 3-35 50°C : 2-28	[37]
<i>POE-600</i>	Barométrie	1,1-28,4 (40°C) 2-29 (50°C)	40-50	-	40°C : 2-38 50°C : 3-37	[37]
<i>POE-600</i>	Séparation de phase	5,7-26	40-75	-	40°C : 9-22 75°C : 8-20	[38]
<i>POE-1500</i>	ATR-IR	3-20	35, 55	35°C : 10-40 55°C : 10-50	35°C : 5-32 55°C : 14-26	[80]
<i>POE-1500</i>	Séparation de phase	2-30	50-80	-	50°C : 5-23 80°C : 5-20	[52]
<i>POE-1500</i>	Gravimétrie	5-25	50	-	50°C : 11-24	[67]
<i>POE-1500</i>	Clichés photos	0,6-25 (35°C) 0,4-25 (35°C)	35-55	35°C : 19-34 55°C : 7-33	-	[51]
<i>POE-4000</i>	Séparation de phase	4-30	55-100	-	55°C : 9-22 80°C : 5-20 100°C : 4-16	[52]
<i>POE-4000</i>	Gravimétrie	5-25	50	-	50°C : 10-21	[67]
<i>POE-8000</i>	Gravimétrie	2-30	80	-	80°C : 5-20	[52]

<i>PDMS</i>	ATR-IR	2-12	23-50	23°C : 5-110 50°C : 0-60	23°C : 10-50 50°C : 5-30	[79]
<i>PDMS</i>	Ellipso- métrie	1-12 1,5-5	25-50	25°C : 5-110 50°C : 4-16	-	[76]
<i>PDMS</i>	-	0-26	50-100	50°C : 0-75 80°C : 0-25	50°C : 0-0,4 80°C : 0-0,21 100°C : 0-0,2	[81]
<i>PLGA</i>	Clichés photos	5-20	35	25,5-51	14-28	[73]
<i>PVAc</i>	Gravi- métrie	0,2-6,9 (40°C) 2,2-17,5 (100°C)	40-100	40°C : 0,6-39 100°C : 3,7-37	40°C : 0,5-26 100°C : 3-23	[69]
<i>PVC</i>	Gravi- métrie	5-40	40-70	-	40°C : 5-12 70°C : 3-10	[68]
<i>PMMA</i>	Visuel	8-15	35-45	35°C : 15-22 40°C : 11-21 45°C : 9-23	-	[75]
<i>PMMA</i>	Visuel	5-15	80°C	5-15	4,8-13	[74]
<i>PMMA</i>	Gravi- métrie	6,8-20,4	25-70	-	7 MPa/ 25°C : 6,3 20 MPa/70°C : 10,5	[71]
<i>PBHT</i>	IRTF	0-25	40-150	40°C : 0-19 150 °C : 0-11	40°C : 0-15 150 °C : 0-11	[78]
<i>PVDF</i>	Visuel	4,9-18,7	40-80	40°C : 2,5-10 80°C : 3,2-12,4	40°C : 5,6-9,9 80°C : 3,4-9,6	[72]
<i>PTFE</i>	Visuel	2,5-20	50-80	50°C : 1,5-7,3 80°C : 1,1-7,4	50°C : 1,6-6 80°C : 1-5,3	[72]
<i>PTFE</i>	Gravi- métrie	6,8-13,6	-	25-40	0	[70]
<i>PS</i>	Modulation de fréquence	0-9,5	40	-	2,9-11,8	[66]
<i>PS</i>	Barométrie	3,6-19,8	100-180	-	100°C : 2,2-10,4 180°C : 3,4-9,2	[65]
<i>PS</i>	Gravi- métrie	2,4-19,9	100-200	-	100°C : 1,25-10,7 200°C : 0,7-5,9	[69]
<i>Nylon 66</i>	Gravi- métrie	6,8-20,4	25-40	-	1,1-1,3	[70]

Dans l'optique d'imprégner sous CO<sub>2</sub> supercritique les particules de PNB-POE, nous souhaitons caractériser le comportement de ces particules au contact du CO<sub>2</sub> supercritique. D'après le Tableau 3.2, on remarque que le POE a déjà été largement étudié. Notamment, Vitoux *et al.* ont ainsi évalué l'absorption de CO<sub>2</sub> par du PEG 400 ainsi que le gonflement résultant [78]. Les estimations sont en bon accord avec celles des équipes de Kazarian et de Gourgouillon [38, 77] et semblent donc fiables. De plus, Weidner *et al.* ont montré que cette solubilité ne dépend pas de la masse molaire (pour des chaînes de POE allant de 1500 à 8000 g.mol<sup>-1</sup>) [52]. L'écorce des particules développées est à base de POE de 2000, 5000 et 8000 g.mol<sup>-1</sup>. Les résultats de ces travaux s'appliquent donc à notre système POE-CO<sub>2</sub>.

***En revanche, aucune étude sur le PNB n'a été trouvée dans la littérature. Ainsi, afin d'avoir accès à une caractérisation complète du système particules-CO<sub>2</sub>, l'étude du système PNB-CO<sub>2</sub> est tout d'abord nécessaire.***

La technique de caractérisation choisie est la spectroscopie IRTF par transmission car elle permet non seulement de mesurer le gonflement d'un polymère sous FSC mais aussi de quantifier l'imprégnation de celui-ci par un soluté. De plus, cette technique donne accès à des informations à l'échelle moléculaire sur la nature des interactions existantes (polymère-CO<sub>2</sub> ou polymère-soluté) et par conséquent sur la spéciation des espèces imprégnées. Dans le cadre de l'étude d'un procédé d'imprégnation d'un vecteur par un principe actif, cette dernière donnée est très intéressante en vue d'estimer la cinétique de solubilisation de l'espèce après relargage *in vivo* (paragraphe 1.2.1 de ce chapitre). Une telle caractérisation nécessite cependant l'étude au préalable de la solubilisation du principe actif dans le CO<sub>2</sub> supercritique par spectroscopie IRTF de manière, d'une part, à caractériser le système soluté-CO<sub>2</sub> et, d'autre part, à pouvoir *in fine* quantifier l'imprégnation du vecteur polymère par cette molécule.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons tout d'abord caractériser le comportement thermodynamique du système PNB-CO<sub>2</sub> dans le but d'accéder au comportement du système particules (PNB-POE)-CO<sub>2</sub>. Enfin, le dernier paragraphe sera consacré à l'étude de la solubilité de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> supercritique par spectroscopie IRTF à transmission.

### 3 Caractérisation du comportement du système PNB-CO<sub>2</sub> par spectroscopie IRTF



L'étude du comportement des systèmes polymères-CO<sub>2</sub> supercritique a été réalisée en collaboration avec l'Institut des Sciences Moléculaires à l'Université de Bordeaux 1. La spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF) a été utilisée pour déterminer l'absorption du CO<sub>2</sub> par le PNB ainsi que le gonflement en résultant.

#### 3.1 Spectroscopie par transmission IRTF pour l'étude du gonflement d'un polymère sous CO<sub>2</sub> supercritique : principe

De manière générale, le montage consiste en une cellule haute pression constituée d'un corps en acier inoxydable et de deux fenêtres se faisant face afin de permettre le passage et la transmission du faisceau IR. L'échantillon de polymère est soit disposé par remplissage de la cellule au dessus du niveau des fenêtres dans le cas de polymères fluides <sup>[77, 78]</sup>, soit déposé sur l'une des fenêtres sous forme de film dans le cas de polymères solides <sup>[82]</sup>.

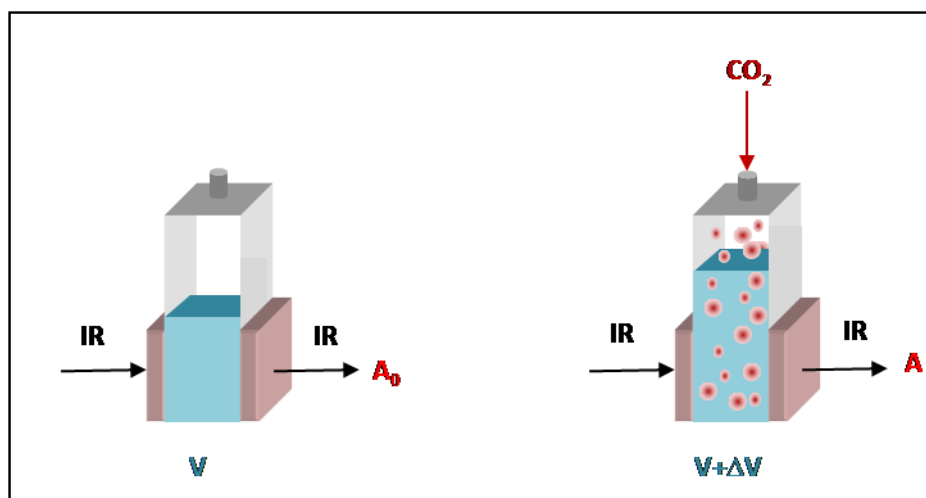


Figure 3.3 : Représentation schématique d'une cellule optique pour l'analyse du gonflement d'un polymère et de son absorption en CO<sub>2</sub> supercritique par spectroscopie IRTF.

Dans le cas de la spectroscopie par transmission, le faisceau IR traverse la totalité de la cellule. Le trajet optique est donc fixe : il correspond soit à la distance entre les deux fenêtres dans le cas d'une cellule remplie par un échantillon fluide, soit à l'épaisseur de l'échantillon dans le cas d'un film déposé sur une fenêtre. Suite à l'ajout du CO<sub>2</sub> supercritique à la cellule, le polymère s'expande et sa concentration à la vue du faisceau IR diminue (Figure 3.3).

Ainsi, d'après la loi de Beer-Lambert, on a :

$$A_0 = \varepsilon \cdot c_0 \cdot l \quad \text{et} \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Equation 8}$$

où  $A_0$  est l'absorbance d'un pic caractéristique du polymère en absence de  $\text{CO}_2$  à un nombre d'onde donnée, et  $A$  l'absorbance de ce même pic caractéristique du polymère en présence de  $\text{CO}_2$  à ce même nombre d'onde,  $\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire caractéristique du polymère à ce même nombre d'onde,  $c$  est la concentration en espèce ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) et  $l$ , le trajet optique parcouru par l'onde au travers du matériau (cm).

Avant l'ajout du  $\text{CO}_2$ , le polymère occupe un volume  $V$ . Après l'ajout du  $\text{CO}_2$ , le polymère occupe un volume  $V+\Delta V$ .

Le gonflement  $S$  du polymère s'exprime alors par :

$$\frac{c_0}{c} = \frac{V_0 + \Delta V}{V_0} = 1 + \frac{\Delta V}{V_0} = 1 + S \quad \text{Equation 9}$$

En combinant les équations 8 et 9, on obtient le gonflement directement à partir des absorbances initiale et finale d'un pic caractéristique du polymère :

$$S = \frac{A_0}{A} - 1 \quad \text{Equation 10}$$

D'autre part, cette technique permet la détermination de la quantité de soluté inséré dans la matrice polymère lors d'un procédé d'imprégnation. Elle est estimée au regard des bandes caractéristiques de l'espèce et de la loi de Beer Lambert :

$$A_{\text{Soluté}} = \varepsilon_{\text{Soluté}} \cdot c_{\text{Soluté}} \cdot l \quad \text{Equation 11}$$

On note alors que, contrairement à la détermination du gonflement du polymère, le calcul de la concentration en soluté imprégné exige la connaissance du coefficient d'extinction molaire du soluté dans le  $\text{CO}_2$  supercritique associé à la bande caractéristique considérée. Par conséquent, avant toute étude de l'imprégnation d'un polymère par un soluté dissous dans du  $\text{CO}_2$  supercritique, il est nécessaire de déterminer ce coefficient. Ce calcul peut être effectué par calcul *ab initio* ou de manière expérimentale (technique utilisée dans le cadre de ce travail de thèse – paragraphe 4.1 de ce chapitre). Une fois cette grandeur connue, la combinaison de la loi de Beer Lambert et de l'Equation 12 permet de calculer le pourcentage de soluté contenu dans l'échantillon de polymère gonflé.

$$\%mass(soluté) = \frac{C_{g(soluté) / cm^3}}{C_{g(soluté) / cm^3} + \frac{\rho_{pol}}{1+S}}$$

Equation 12

Dans le cadre de la caractérisation du système d'imprégnation (particules (PNB-POE)-CO<sub>2</sub>-Acide salicylique), la solubilité de l'acide salicylique en fonction de la pression et de la température a fait l'objet d'une étude permettant, à postériori, de déterminer le coefficient d'extinction molaire et est développée au paragraphe 4 de ce chapitre. Avant de présenter les résultats obtenus sur différentes bandes caractéristiques de l'acide salicylique, la caractérisation du système CO<sub>2</sub>-PNB est présentée.

### 3.2 Mise en place de l'expérience de caractérisation

#### 3.2.1 Montage de suivi *in situ* par infrarouge

Le montage expérimental permettant la détermination du gonflement des polymères en présence de CO<sub>2</sub> supercritique est présenté en Figure 3.4.

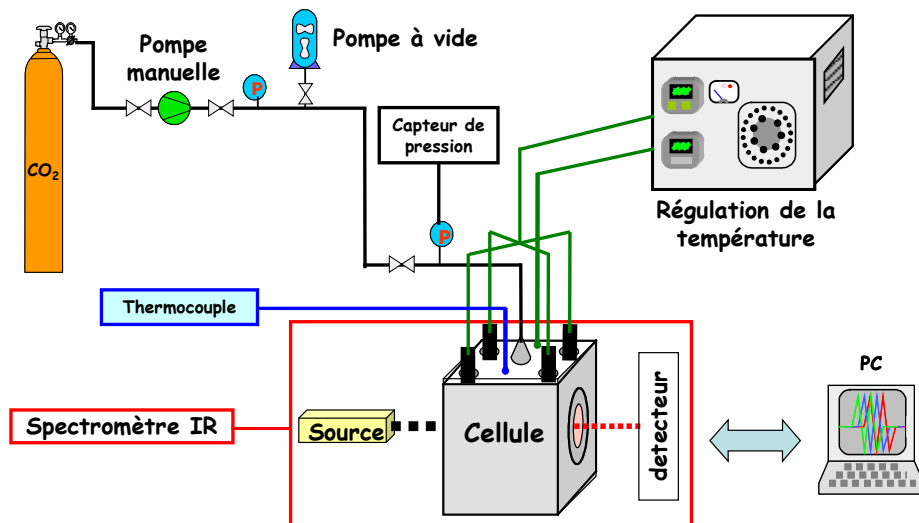


Figure 3.4 : Dispositif expérimental de spectroscopie infrarouge développé à l'ISM.

Les mesures d'absorption IR ont été réalisées en utilisant une cellule optique en acier inox résistant à des pressions allant jusqu'à 35 MPa et à des températures de 250°C (Figure 3.5). Des fenêtres de silicium sont placées sur le chemin optique dont l'espacement peut être ajusté de 0,3 à 2,5 cm. Deux autres fenêtres en saphir, situées perpendiculairement à l'axe optique, permettent une observation visuelle. Le chauffage de la cellule est réalisé à l'aide de cartouches chauffantes disposées à chaque angle du corps de la cellule. Deux thermocouples sont utilisés :

le premier est localisé près d'une cartouche chauffante pour la régulation en température et le second, proche de l'échantillon, permet de mesurer la température de celui-ci avec une précision de 2 K. Le CO<sub>2</sub> sous pression est introduit dans le dispositif par l'intermédiaire d'une pompe manuelle.

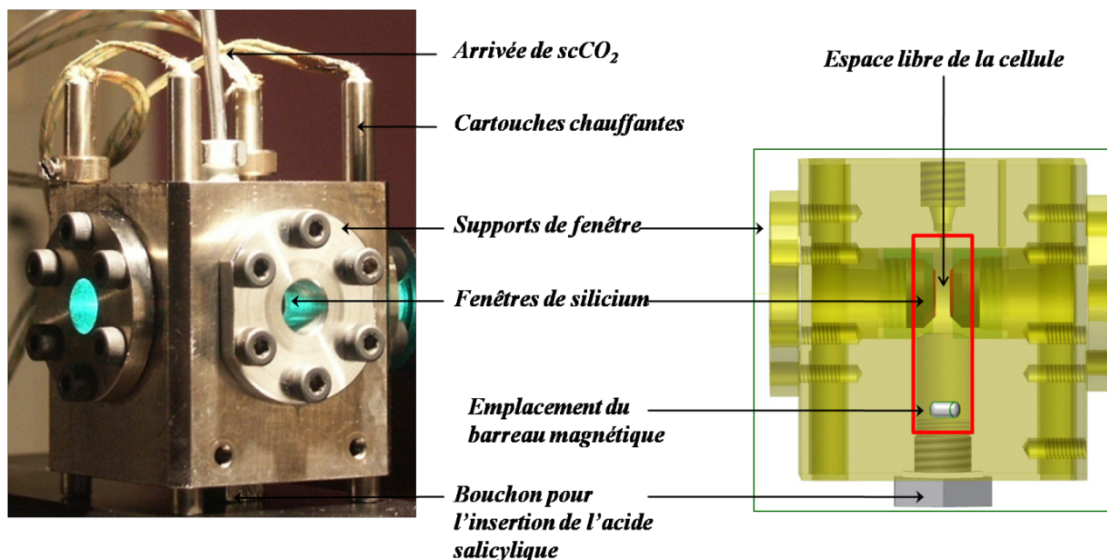


Figure 3.5 : Photo et schéma de la cellule optique haute pression - haute température.

Le PNB est un polymère qui se présente sous forme d'une poudre. D'après la loi de Beer Lambert, l'absorbance d'une espèce est fonction de la concentration en espèce et du trajet optique. Afin d'analyser de manière homogène le comportement d'un polymère soumis à un FSC, il est donc nécessaire d'assurer le recouvrement d'une fenêtre de silicium, autrement dit, il est nécessaire d'une part que, lorsque le rayon IR traverse la cellule, en tout point il rencontre sur son trajet le polymère et, d'autre part, que l'épaisseur sur laquelle il le traverse soit connue. Dans le cas de polymères fluides visqueux, il suffit de remplir la cellule jusqu'au dessus des fenêtres et de considérer le trajet optique comme étant l'espace entre les deux fenêtres. Dans le cas de polymères à l'état solide tels que le PNB (sous forme de poudre après précipitation), le recouvrement rigoureux de la surface d'une fenêtre est difficile à assurer et de ce fait, la longueur du trajet optique n'est pas mesurable. Seul le dépôt d'un film de polymère (d'épaisseur connue) directement sur une fenêtre de silicium permet une analyse rigoureuse de l'absorbance de celui-ci.

Le paragraphe suivant détaille l'étude de formation de films homogènes de PNB et d'épaisseur connue sur une fenêtre de silicium.

### 3.2.2 Formation d'un film de PNB sur une fenêtre en silicium

L'exigence principale d'un film pour une analyse IR est son homogénéité de manière à s'assurer que le trajet optique soit le même en tout point de la tranche de l'échantillon. Les films

de PNB ont été réalisés à partir d'une solution de PNB (synthétisé en laboratoire – **chapitre 5**) dissous dans du dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Différentes techniques de dépôt ont été envisagées :

- **Dépôt par évaporation de solvant** (Figure 3.6, a) : une goutte de solution est déposée directement sur la fenêtre. L'échantillon est laissé sous hotte afin de permettre l'évaporation du solvant. Malheureusement, le PNB filmifie très vite en surface (plus vite que l'évaporation du solvant) et piège des résidus de solvant qui forment alors des bulles. Après une heure de séchage, l'échantillon présente de nombreuses occlusions.
- **« Spin coating »** (Figure 3.6, b) : une goutte déposée sur la fenêtre est lentement passée au spin coater. Le solvant s'évapore encore une fois trop lentement. Une solution visqueuse de PNB est formée et vient s'accumuler sur le pourtour de la fenêtre avant de sécher totalement.
- **Evaporation de solvant en étuve sous vide** (Figure 3.6, c) : dès le dépôt de la goutte effectué, la fenêtre est placée dans une étuve sous vide à 40°C. Au bout de quelques secondes, l'échantillon entre en ébullition. Différentes conditions (temps, température..) ont été testées mais en raison d'une ébullition systématique des échantillons, aucun n'était homogène.
- **« Live spin coating »** (Figure 3.6, d) : durant un essai de « live spin coating », la solution de PNB est déposée goutte à goutte au dessus d'une fenêtre de silicium en rotation très rapide sur le « spin coater ». A chaque dépôt de goutte, une partie de la solution est déposée tandis qu'une autre est rejetée. Le film déposé par une goutte est très fin et ne permet pas d'avoir un signal suffisamment intense en IR. Ainsi, une accumulation de films superposés est réalisée par un ajout au goutte à goutte de quelques millilitres de solution PNB- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

**Tableau 3.3 : Protocole pour la formation d'un film polymère par live spin coating.**

<i>Echantillon</i>	<i>Concentration (% mass.) (<math>m_{\text{polymère}}/m_{\text{solvant}}</math>)</i>	<i>Volume ajouté (mL)</i>	<i>Vitesse spin coater</i>
<i>PNB</i>	2	1,5	1800
<i>POE</i>	$7,5 \cdot 10^{-2}$	2	2500
<i>Particules</i>	Latex	1	2500

Remarque : cette technique a aussi permis de développer des films à base de POE et de particules PNB-POE. Ces films nous seront utiles par la suite.



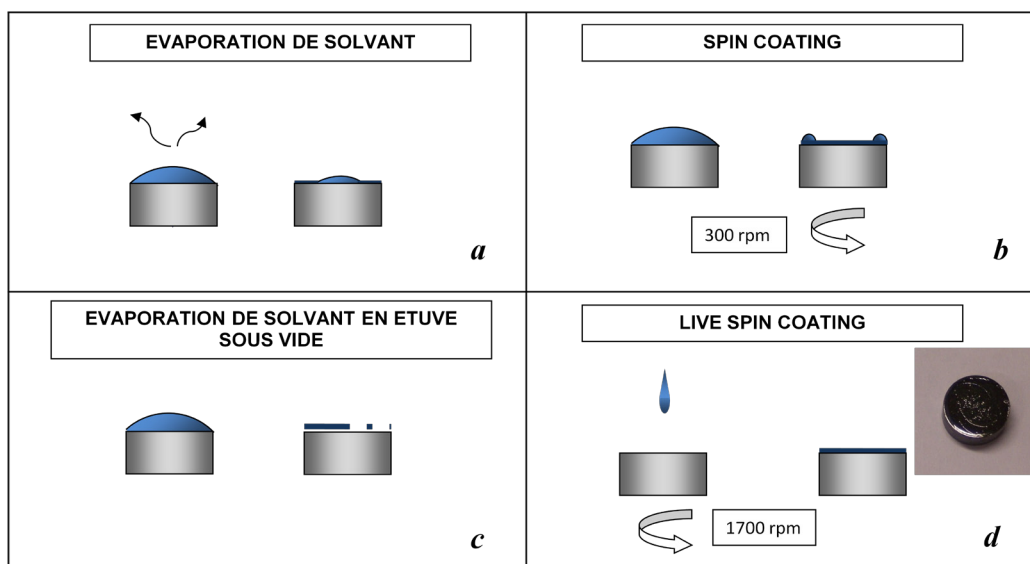


Figure 3.6 : Schéma descriptif des différentes techniques de dépôt de films polymères sur une fenêtre de silicium.

La technique retenue pour le dépôt de films de polymères est le « live spin coating ». Des films de PNB d'environ 40  $\mu\text{m}$  sont réalisés dont l'épaisseur exacte a été déterminée au profilomètre.

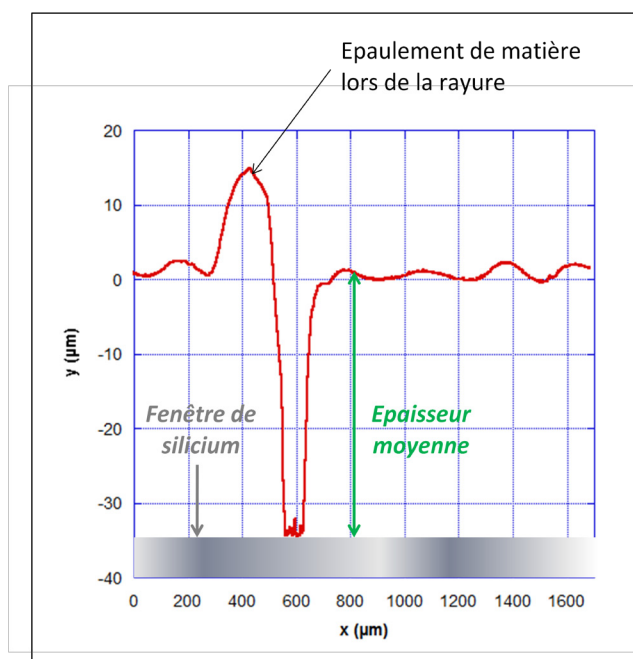


Figure 3.7 : Analyse d'un film de PNB au profilomètre. L'épaisseur est mesurée suite à la réalisation d'une petite rayure en bordure de film.

### 3.2.3 Bandes caractéristiques du PNB en IR

Avant de procéder aux premiers essais de gonflement du PNB par du CO<sub>2</sub> supercritique, l'identification des bandes caractéristiques du PNB a été réalisée en utilisant la méthode d'analyse qualitative proposée par le logiciel « **KNOW IT ALL IR** »<sup>[83]</sup>.

- **Groupements du cycle :**

Les modes de vibration des groupements du cycle d'une unité norbornène sont représentés en Figure 3.8 et attribués dans le Tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Attribution des bandes caractéristiques du PNB aux modes de vibration des liaisons.

Liaison	Bande (cm <sup>-1</sup> )	Mode de vibration	Label
CH <sub>2</sub>	2936 – 2916	Elongation antisymétrique ( <i>antisymmetric stretching</i> )	1
CH <sub>2</sub>	2863 – 2843	Elongation symétrique ( <i>symetric stretching</i> )	2
CH <sub>2</sub>	1485 – 1445	Déformation d'angle dans le plan ( <i>Bending</i> )	3
CC	750 – 720	Vibrations du squelette ( <i>Skeletal vibrations</i> )	4

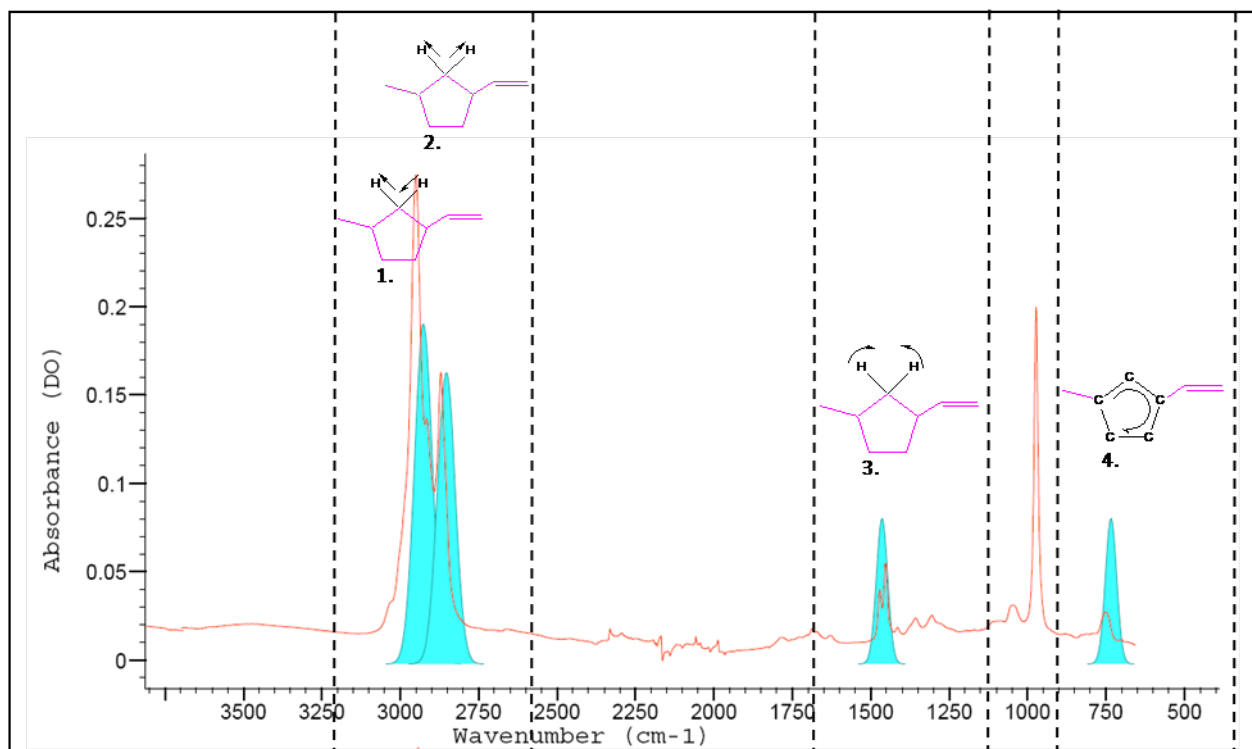


Figure 3.8 : Spectre IR du PNB interprété par le logiciel « *Know It All IR* » : mise en évidence des bandes caractéristiques des modes de vibration des groupements du cycle d'une unité monomère d'une chaîne de PNB.

• **Groupements de la liaison éthylénique :**

Les modes de vibration de la liaison éthylénique sont représentés en Figure 3. 9 et attribués dans le Tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Attribution des bandes caractéristiques du PNB aux modes de vibration de la liaison éthylénique.

Liaison	Bande (cm <sup>-1</sup> )	Mode de vibration	Label
CH	3040 – 3010	Elongation ( <i>stretching</i> )	1
CC	1678 – 1668	Elongation ( <i>stretching</i> )	2
CH	1310 – 1295	CH dans le plan	3
CH	1310 – 1295	Déformation d'angle dans le plan ( <i>Bending</i> )	4
CH	980 – 960	Agitation hors du plan ( <i>wagging</i> )	5
CH	980 – 960	CH hors du plan	6
CH	980 – 960	Torsion ( <i>twisting</i> )	7

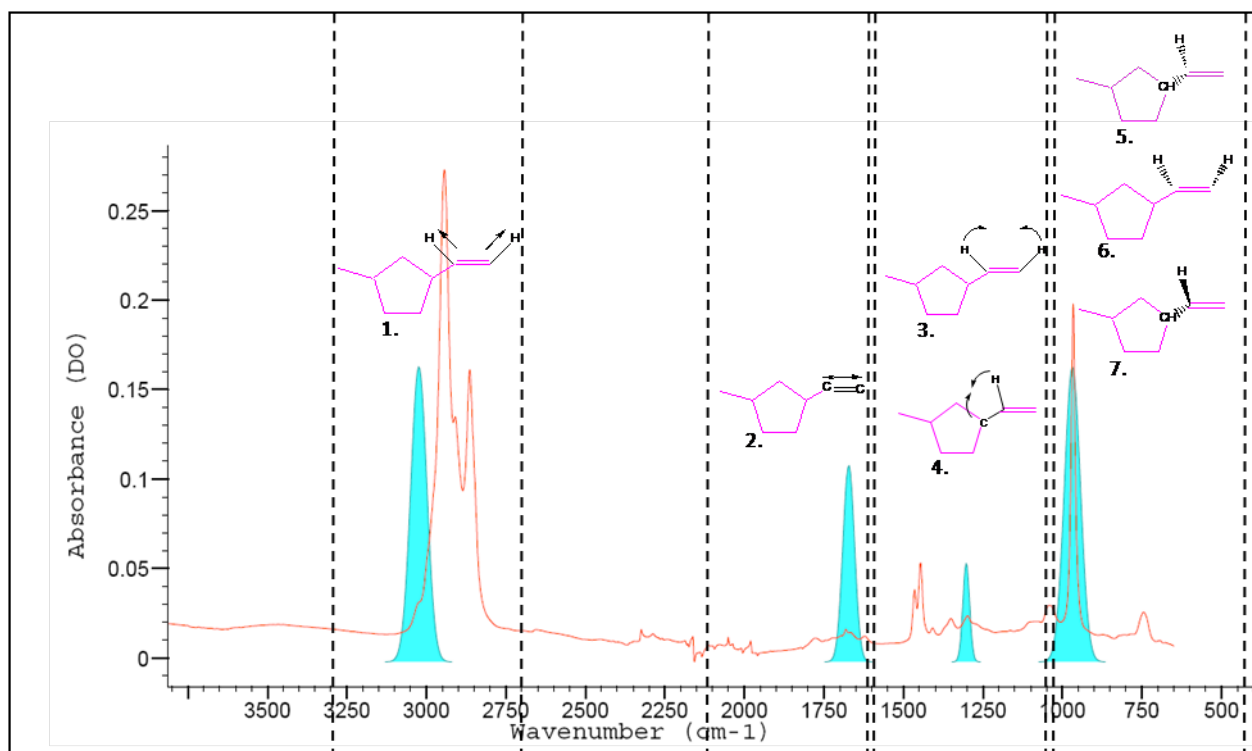


Figure 3. 9 : Spectre IR du PNB interprété par le logiciel « Know It All IR » : mise en évidence des bandes caractéristiques des modes de vibration de la liaison éthylénique reliant deux unités monomère d'une chaîne de PNB.

Dans notre étude, nous avons choisi de travailler avec la bande à 1465 cm<sup>-1</sup> car suffisamment intense et bien distincte des bandes du CO<sub>2</sub> (Figure 3.10). Cette bande correspond aux modes de déformation dans le plan des hydrogènes du cycle d'une unité de norbornène (Tableau 3.4, label 2).

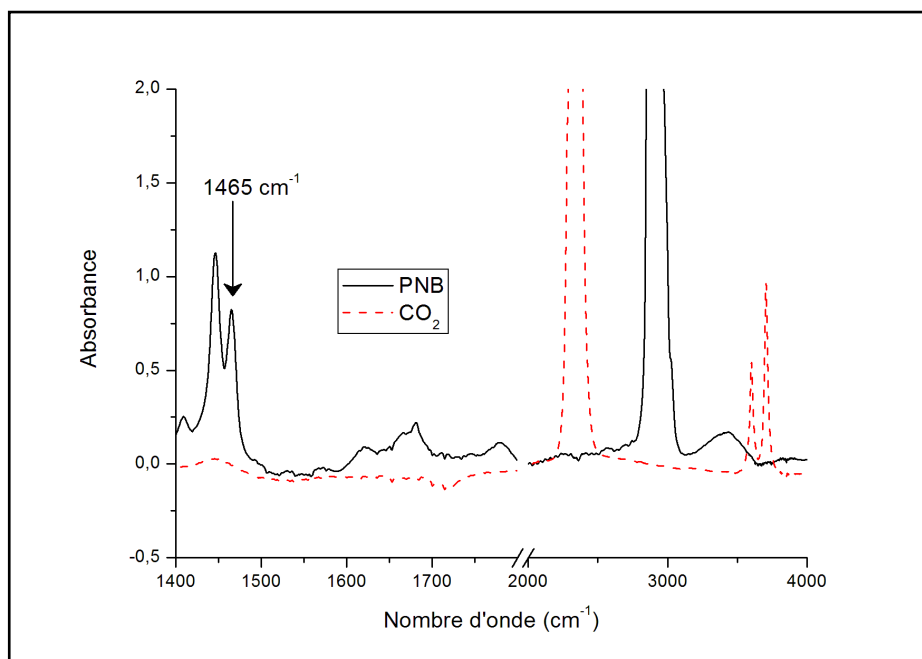


Figure 3.10 : Spectres IR du CO<sub>2</sub> (15MPa, 33°C) seul et du PNB superposés.

Cette étude préliminaire nous permet de passer à l'étude du gonflement du PNB par le CO<sub>2</sub> supercritique.

### 3.3 Gonflement du PNB par le CO<sub>2</sub> supercritique

#### 3.3.1 Protocole expérimental

Un film de polymère est déposé sur une des fenêtres de silicium comme exposé précédemment puis la cellule est fermée et la consigne en température est activée (33°C). La température de l'expérience est choisie de telle façon que l'on ne dépasse pas la T<sub>g</sub> du PNB (35°C) tout en restant dans des conditions supercritiques pour le CO<sub>2</sub> (T<sub>c</sub> = 31 °C). Un premier spectre du polymère seul est alors acquis. Une fois la température stabilisée, le CO<sub>2</sub> est ajouté à la pression désirée. Dès que cette pression est atteinte, un suivi dans le temps du gonflement du polymère est réalisé par l'acquisition, à intervalles réguliers (toutes les 10 minutes), de spectres du film de PNB (utilisation du logiciel *Biorad*). La cellule est ainsi laissée sous pression, à 33°C pendant 48h.

#### 3.3.2 Résultats

Pour cette première expérience, la pression de travail est fixée de façon arbitraire à 15 MPa. Les deux fenêtres de silicium sont placées à 7,8 mm l'une de l'autre de manière à permettre une circulation du CO<sub>2</sub> supercritique autour du film (Figure 3.11). Le trajet optique correspond à l'épaisseur du film déposé. Le gonflement est évalué au regard de l'absorbance de la bande à 1465 cm<sup>-1</sup>. Nous supposons ici que la variation d'épaisseur résultante du

gonflement du PNB par le CO<sub>2</sub> est négligeable. Un retour sur cette hypothèse sera effectué en fin de paragraphe afin de vérifier la faible influence de la variation de l'épaisseur sur le calcul.

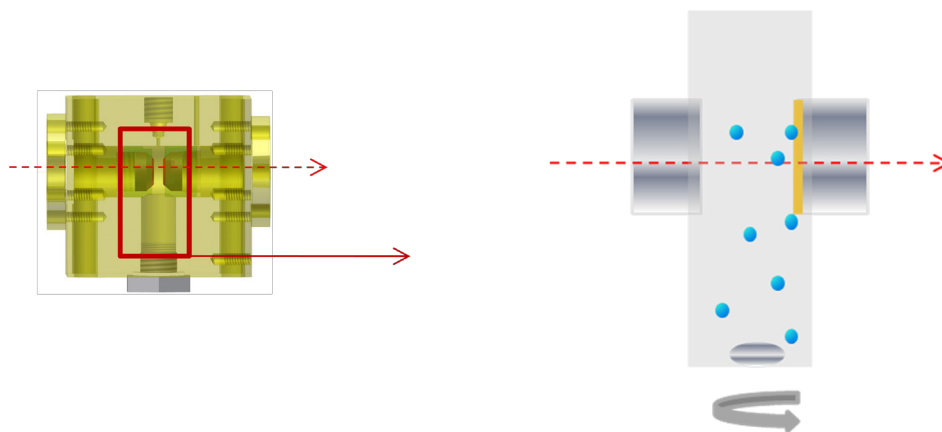


Figure 3.11 : Film de PNB (lamelle jaune) disposé entre les fenêtres de silicium durant son gonflement sous CO<sub>2</sub> supercritique (billes bleues).

La Figure 3.12 représente les différents spectres IR du PNB / CO<sub>2</sub> (15 MPa, 33°C) en fonction du temps. En plus de constater le gonflement du PNB (baisse de la hauteur du pic caractéristique à 1465 cm<sup>-1</sup>), on remarque la croissance d'une bande vers 3400 cm<sup>-1</sup>. Cette bande ne disparaît pas après dépressurisation.

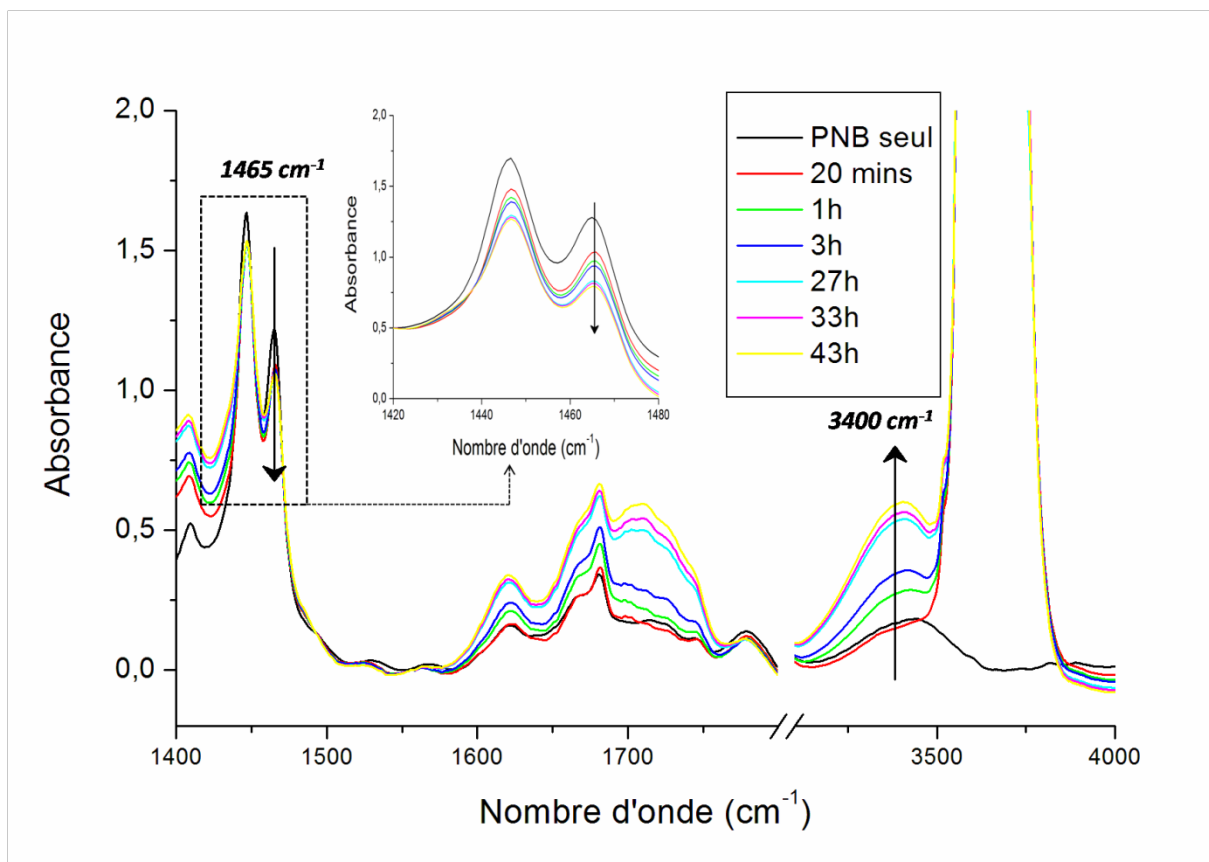


Figure 3.12 : Evolution du spectre IR d'un film de PNB lors de son gonflement par du CO<sub>2</sub> à 15MPa et 33°C. Zoom sur la bande caractéristique du PNB (1465 cm<sup>-1</sup>).

Une première explication possible serait l'absorption d'eau présente dans le CO<sub>2</sub> supercritique par le film de PNB. Ainsi, à la fin de cet essai, le film a été tiré sous vide à 80°C. Après une nuit de « séchage », la bande ne disparaît toujours pas. Il ne s'agit donc probablement pas d'eau. Une autre hypothèse serait la réaction du CO<sub>2</sub> avec le PNB pour former une fonction acide carboxylique (Figure 3.13).

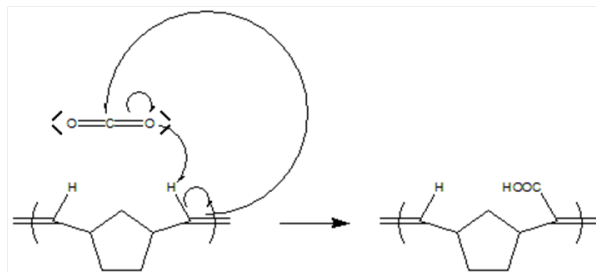


Figure 3.13 : Réaction d'insertion du CO<sub>2</sub> dans une chaîne de PNB.

Des réactions similaires ont été recensées par Sakakura *et al.* mais toujours en présence de catalyseurs <sup>[84]</sup>. Le PNB est synthétisé à partir d'un catalyseur au Ru. Un lavage supplémentaire (chapitre 5 – synthèse de PNB) du lot de PNB utilisé est réalisé afin d'éliminer toute trace éventuelle de catalyseur. L'étude du gonflement de ce nouvel échantillon présente encore une fois l'apparition de la bande à 3400 cm<sup>-1</sup> et ce avec la même intensité. Ni la RMN <sup>1</sup>H, ni la RMN <sup>13</sup>C ne révèlent l'apparition de nouveaux groupements le long de la chaîne PNB (peut-être en quantité trop faible). Nous ne sommes à ce jour pas parvenu à confirmer l'hypothèse selon laquelle nous insérerions du CO<sub>2</sub> dans les chaînes de PNB.

*Remarque : Si l'apparition de cette bande correspond bien à l'insertion d'une nouvelle espèce le long de la chaîne PNB, il se pourrait que l'on modifie les propriétés thermomécaniques du polymère ainsi que sa cytotoxicité. Nous verrons au paragraphe 3.4 que, dans le cas des particules, l'apparition de cette bande est retardée et ne remet donc pas en cause l'applicabilité de l'imprégnation d'un principe actif sous CO<sub>2</sub> supercritique pour des particules de PNB-POE.*

D'après la Figure 3.12, on remarque que l'intensité du pic caractéristique du PNB (1465 cm<sup>-1</sup>) diminue au cours de son gonflement. Cette observation est le résultat de l'expansion du film de PNB qui gonfle en absorbant du CO<sub>2</sub>. Ainsi, aux vues des fenêtres de silicium, la concentration en PNB s'amointrit et, d'après la loi de Beer Lambert, l'absorption du matériau devient elle aussi plus faible.

Le gonflement du film est calculé via la formule rappelée ci-dessous (applicable ici car la variation de l'épaisseur du film est supposée constante) :

$$S = \frac{A_0}{A} - 1$$

Equation 13

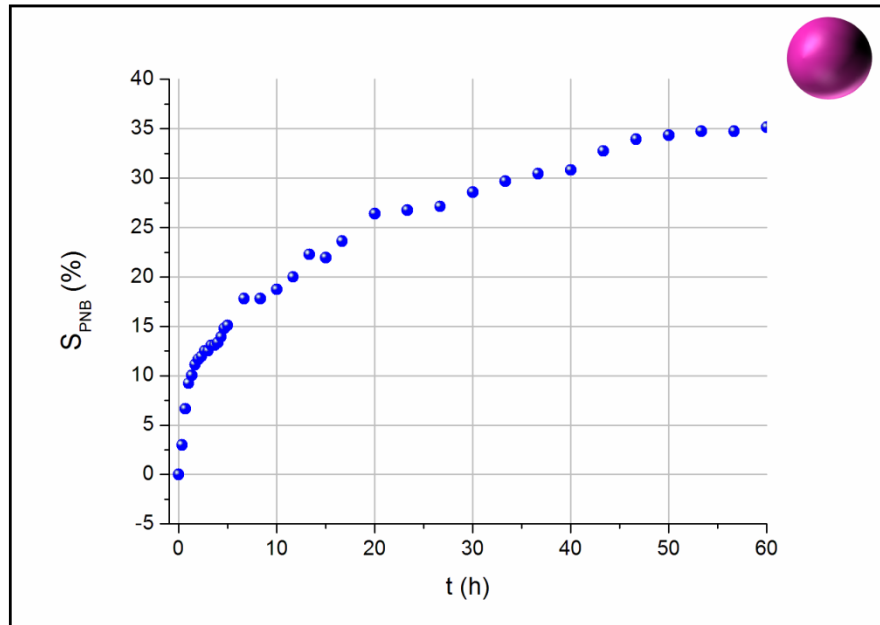


Figure 3.14 : Evolution du gonflement d'un film de PNB par du CO<sub>2</sub> à 33°C, 15 MPa en fonction du temps.

La Figure 3.14 montre l'évolution du gonflement du film de PNB par du CO<sub>2</sub> à 15 MPa et à 33°C. A partir de 50 h, le film semble être saturé en CO<sub>2</sub> et le gonflement maximum atteint est de 35% vol. Il est intéressant de souligner que ce gonflement se déroule en deux temps : un premier gonflement rapide jusqu'à 12 % durant les deux premières heures (5,75% / h) puis un second gonflement beaucoup plus lent (0,35% / h) jusqu'à saturation à 35%.

Le calcul du gonflement nécessite de faire l'hypothèse selon laquelle la variation de l'épaisseur du film est négligeable. Si l'on reprend les résultats obtenus, on peut vérifier cette hypothèse. En effet, pour une variation de 35% du volume du film, on a :

$$\frac{\Delta V}{V} = 0,35$$

Equation 14

Soit *e* l'épaisseur du film et *r* son rayon, si l'on suppose que le gonflement se traduit de façon proportionnelle dans les trois directions de l'espace, on a :

$$\frac{\Delta e}{e} \cdot \frac{\Delta r}{r} \cdot \frac{\Delta r}{r} = \left(\sqrt[3]{0,35}\right)^3 = 0,7 \cdot 0,7 \cdot 0,7$$

Equation 15

Par conséquent, une variation de 35% vol. d'un film de PNB correspond à une variation de 7% au maximum de l'épaisseur. De ce fait, en ne considérant pas cette variation dans la loi de Beer Lambert lors du calcul du gonflement, on réalise au plus une erreur de 7% sur un gonflement total de 35 % (puisqu'on ne néglige pas les variations dans les autres dimensions), soit une erreur de 2,5 % sur le gonflement. Cette erreur étant minime, nous avons continué à considérer la variation de l'épaisseur négligeable dans la suite de nos calculs.

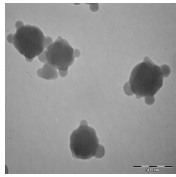
L'influence de la pression sur le gonflement du PNB sera traitée lors de l'étude *in situ* de l'influence de la pression sur l'imprégnation de PNB sous CO<sub>2</sub> supercritique par de l'acide salicylique (paragraphe 2.1.2 du chapitre 4).

**L'étude du comportement du système PNB-CO<sub>2</sub> a été réalisée par spectroscopie IRTF. Nous savons ainsi que, à 15 MPa et à 33 °C, le PNB peut être gonflé jusqu'à 35% par le CO<sub>2</sub> supercritique. Le même résultat a été obtenu par Weidner *et al.* avec le POE pour les masses molaires qui nous intéressent (de 2000 à 8000 g.mol<sup>-1</sup>) [52]. Le cœur et l'écorce des particules PNB-POE semblent ainsi avoir le même comportement vis-à-vis du CO<sub>2</sub> supercritique. Dans le paragraphe suivant, un essai de détermination du gonflement des particules PNB-POE est exposé.**

### 3.4 Gonflement des particules PNB-POE par le CO<sub>2</sub> supercritique

Les particules choisies pour l'étude *in situ* de l'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique sont celles du lot O2 du plan d'expériences (chapitre 2 – 2.3.3.4) et leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 3.6.

**Tableau 3.6 : Caractéristiques des particules choisies pour le suivi *in situ* du gonflement des particules sous CO<sub>2</sub> supercritique.**

<i>Essai</i>	<i>AR</i> % m.	<i>AS</i> % m.	<i>L</i> g/mol	<i>Conv AS</i> % m.	<i>AS<sub>final</sub></i> <sup>1</sup> %m.	<i>Conv AR</i> % m.	<i>TEM</i>	<i>Dn<sub>TEM</sub></i> (nm) <i>PDI<sub>TEM</sub></i>
<b>O2</b>	5	30	5000	53	20	86		382 +/- 45 PDI = 0,055

<sup>1</sup> Pourcentage de NB-POE (AS) par rapport à la masse totale (NB+NB-POE) calculé à partir de la Conv AS.



### 3.4.1 Mode opératoire

Le montage expérimental pour le suivi *in situ* par IRTF du gonflement des particules par du CO<sub>2</sub> est le même que celui utilisé pour les films de PNB (paragraphe 3.2 de ce chapitre). Les films de particules ont été réalisés comme décrit au paragraphe 3.2.2, directement à partir du latex O2, sans dilution complémentaire. Le spectre IR résultant est exposé en Figure 3.15.

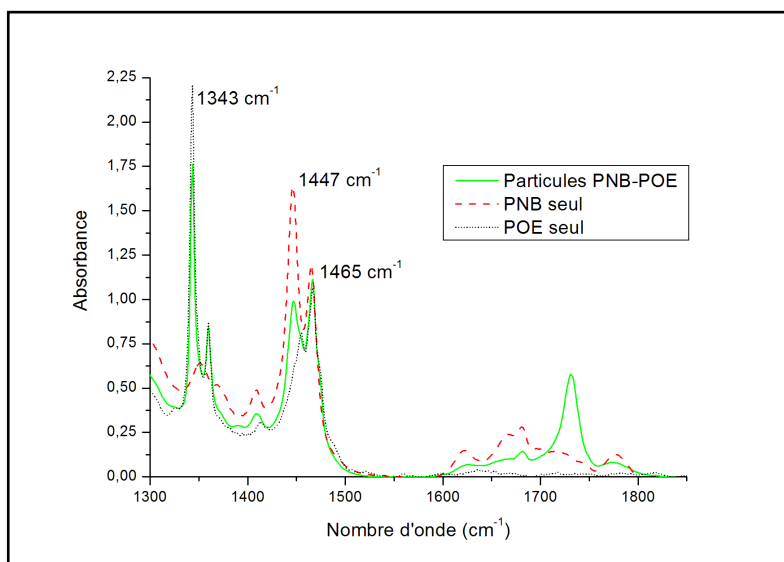


Figure 3.15 : Spectre IR d'un film de particules PNB-POE (O2) superposé aux spectres du PNB seul et du POE seul.

### 3.4.2 Gonflement de particules PNB-POE sous CO<sub>2</sub> supercritique

Le protocole expérimental est exactement le même que celui suivi pour le PNB (paragraphe 3.3.1 de ce chapitre) et les spectres IR obtenus au cours du gonflement des particules est présenté en Figure 3.16.

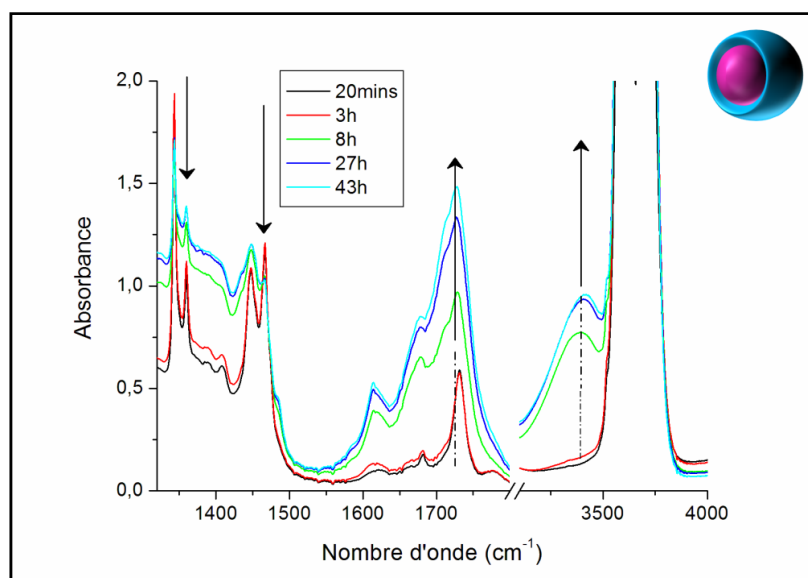


Figure 3.16 : Evolution des spectres IR caractéristiques d'un film de particules PNB-POE au cours de son gonflement par du CO<sub>2</sub> supercritique à 33°C-15MPa.

Le spectre IR des particules PNB-POE / CO<sub>2</sub> est complexe et conduit à un recouvrement des bandes caractéristiques (saturation ou disparition de certains pics). Dans ce cas, la fiabilité de l'interprétation est fortement remise en cause. Nous venons de voir que le PNB, tout comme le POE, peut être gonflé de 35% vol. à 15 MPa – 35°C. Ainsi, pour la suite de cette étude, le gonflement des particules PNB-POE par le CO<sub>2</sub> supercritique sera considéré comme étant égal à 35% vol.

Cette étude permet cependant de remarquer que, comme dans le cas du PNB, une bande large vers 3200-3400 cm<sup>-1</sup> apparaît au cours du temps (on rappelle que des hypothèses quant à l'apparition de cette bande ont été émises au paragraphe 3.3.2 de ce chapitre) (Figure 3.16). Il faut tout de même noter que, dans le cas des particules, ce phénomène est retardé. En effet, cette bande commence à croître au bout de 3 h (au lieu de 40 minutes pour le PNB). Une procédure classique d'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique se déroule de manière générale en moins de 3h. Cette dernière expérience confirme la possibilité de conserver des propriétés de notre matériau de cœur en vue d'une future application pour le biomédical.

Suite à la caractérisation du système polymères-CO<sub>2</sub>, nous nous sommes intéressés à l'étude de la solubilisation de l'acide dans le CO<sub>2</sub> supercritique.

## 4 Etude de la solubilité de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> supercritique



### 4.1 Détermination du coefficient d'extinction molaire d'une bande caractéristique de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> supercritique

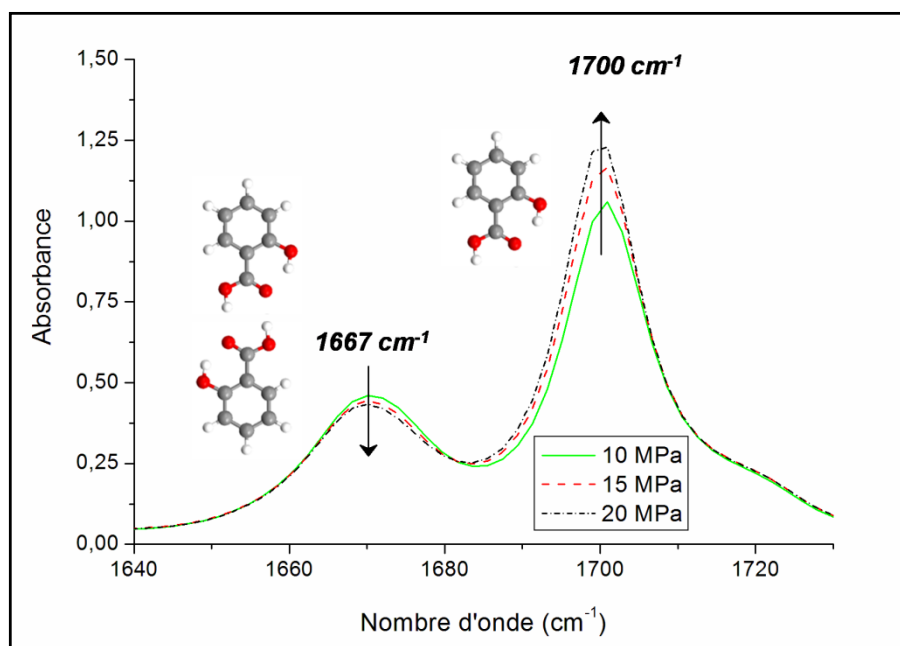
Dans le cadre de l'étude de l'imprégnation des vecteurs PNB-POE par de l'acide salicylique, nous souhaitons déterminer la quantité d'acide salicylique (AcS) imprégné en pourcentage massique. Comme nous l'avons évoqué au paragraphe 3.1 de ce chapitre, il est nécessaire pour cela de connaître le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{AcS}$  d'une bande caractéristique de l'AcS solubilisé dans le CO<sub>2</sub>. Ce coefficient est caractéristique d'un couple solvant-soluté (CO<sub>2</sub> supercritique - AcS) et est fonction de la fréquence IR de travail. Aucune valeur n'a été trouvée dans la littérature. Dans le but de déterminer cette grandeur, l'étude de la solubilisation de différentes concentrations d'AcS dans le CO<sub>2</sub> supercritique a été réalisée.

Le montage expérimental utilisé pour cette série d'expériences est la cellule optique haute pression présentée en Figure 3.5 où les deux fenêtres de silicium sont placées de façon telle que le trajet optique est de 0,743 cm et le volume de la cellule de 4 mL. Pour cette étude, il est

nécessaire que la totalité de l'AcS introduit soit dissous. D'après les données de la littérature sur la solubilité de l'AcS dans le CO<sub>2</sub> supercritique à 10 MPa (pression la moins favorable à la solubilisation) il a été trouvé que la cellule est saturée en AcS à partir de 1,75 mg de poudre introduite (soit  $3,2 \cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>). Ainsi, la solubilisation de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> supercritique, a été étudiée pour quatre concentrations ( $c_1=0,5 \cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> ;  $c_2=0,9 \cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> ;  $c_3=1,4 \cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> et  $c_4=2,4 \cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>) et trois pressions (10, 15 et 20 MPa).

**D'après la Figure 3.17, l'AcS solubilisé dans le CO<sub>2</sub> présente deux pics caractéristiques : un à 1667 cm<sup>-1</sup> et un à 1700 cm<sup>-1</sup>. D'après Ke *et al.*, ces deux pics témoignent de l'existence de l'AcS sous deux états moléculaires différents lorsqu'il est solubilisé dans le CO<sub>2</sub> supercritique <sup>[85]</sup>: une forme monomère et une forme dimère.**

La bande à 1700 cm<sup>-1</sup> correspond au mode d'élongation de la liaison >C=O de l'acide salicylique sous forme monomère et la bande à 1667 cm<sup>-1</sup> est relative à l'association via des liaisons hydrogène de deux molécules d'acide sous forme de dimère <sup>[85]</sup>.



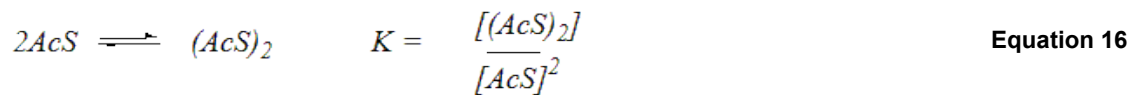
**Figure 3.17 : Spectres IR de  $2,4 \cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> d'AcS solubilisé dans le CO<sub>2</sub> supercritique à 35°C et pour différentes pressions ( $c_4$ ).**

D'après la Figure 3.17, on remarque qu'à concentration constante en AcS, la concentration en monomère a tendance à augmenter avec la pression tandis que celle en dimère a tendance à diminuer. Dans tous les cas, la concentration en dimère est toujours très faible par rapport à la concentration en monomère.

Dans le cas de la solubilisation de l'acide formique dans le CO<sub>2</sub> supercritique, Park *et al.* ont observé un pic à 1731 cm<sup>-1</sup> et un pic à 1759 cm<sup>-1</sup> caractéristiques de l'acide formique

respectivement sous forme dimère et sous forme monomère et ont mesuré les coefficients d'extinction molaire propres à chacune des espèces <sup>[86]</sup>. A partir d'un raisonnement similaire, nous sommes parvenus à déterminer les coefficients d'extinction molaire de l'AcS sous forme dimère et monomère.

La constante de dimérisation de l'acide salicylique est définie de la façon suivante :



Ainsi la concentration en AcS solubilisé dans le CO<sub>2</sub> supercritique en fonction des concentrations en dimère et en monomère est donnée par l'Equation 17 :

$$c(AcS) = [AcS] + 2[(AcS)_2] \quad \text{Equation 17}$$

Soit  $A_m$  l'aire du pic caractéristique du monomère à 1700 cm<sup>-1</sup>,  $A_d$  l'aire du pic caractéristique du dimère à 1667 cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon_m$  le coefficient d'extinction molaire associé au pic du monomère et  $\epsilon_d$  le coefficient d'extinction molaire associé au pic du dimère, on a :

$$A_m = \epsilon_m \cdot l \cdot [AcS] \quad A_d = \epsilon_d \cdot l \cdot [(AcS)_2] \quad \text{Equation 18}$$

En combinant les équations 17 et 18, on trouve que la concentration totale d'acide salicylique est liée aux absorbances du dimère et du monomère d'après l'équation suivante :

$$\frac{c \cdot l}{A_m} = \frac{1}{\epsilon_m} + \left( \frac{2}{\epsilon_d} \right) \left( \frac{A_d}{A_m} \right) \quad \text{Equation 19}$$

Ainsi, la courbe  $\frac{c \cdot l}{A_m} = f\left(\frac{A_d}{A_m}\right)$  doit être une droite d'ordonnée à l'origine  $\frac{1}{\epsilon_m}$  et de coefficient directeur  $\frac{2}{\epsilon_d}$ .

La Figure 3. 18 présente les spectres de l'AcS solubilisé à différentes concentrations dans du CO<sub>2</sub> à 15 MPa et 35°C. On remarque que plus la concentration en AcS est élevée, plus l'aire des pics à 1667 et 1700 cm<sup>-1</sup> est importante.

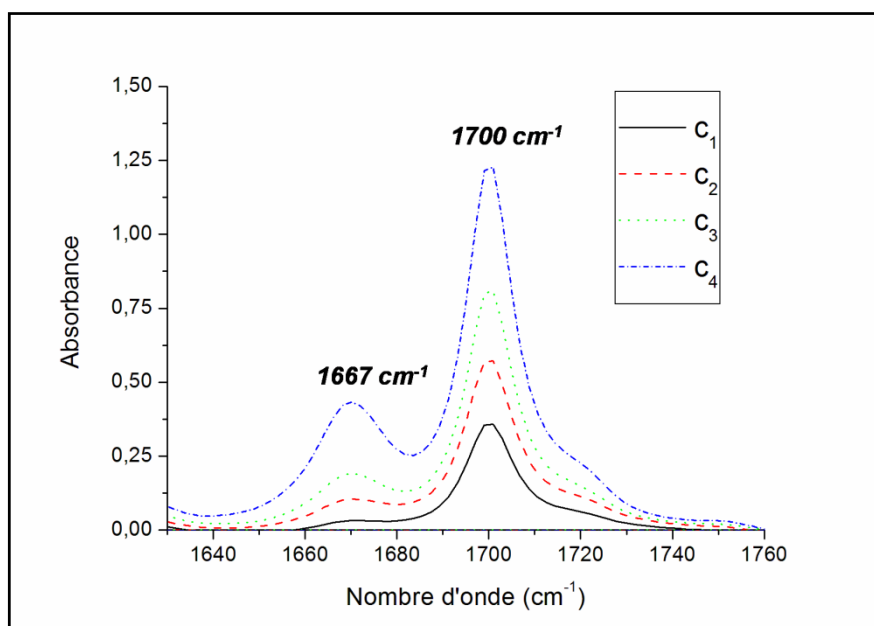


Figure 3. 18 : Spectres IR de l'AcS solubilisé dans le CO<sub>2</sub> supercritique à 35°C et 15 MPa pour différentes concentrations:  $c_1=0,0005 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $c_2=0,0009 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $c_3=0,0014 \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $c_4=0,0024 \text{ mol.L}^{-1}$ .

Après déconvolution des spectres figurant ci-dessus (logiciel *Origins*), les aires  $A_m$  et  $A_d$  ont pu être calculées et la courbe  $c.l/A_m=f(A_m/A_d)$  tracée (Figure 3.19).

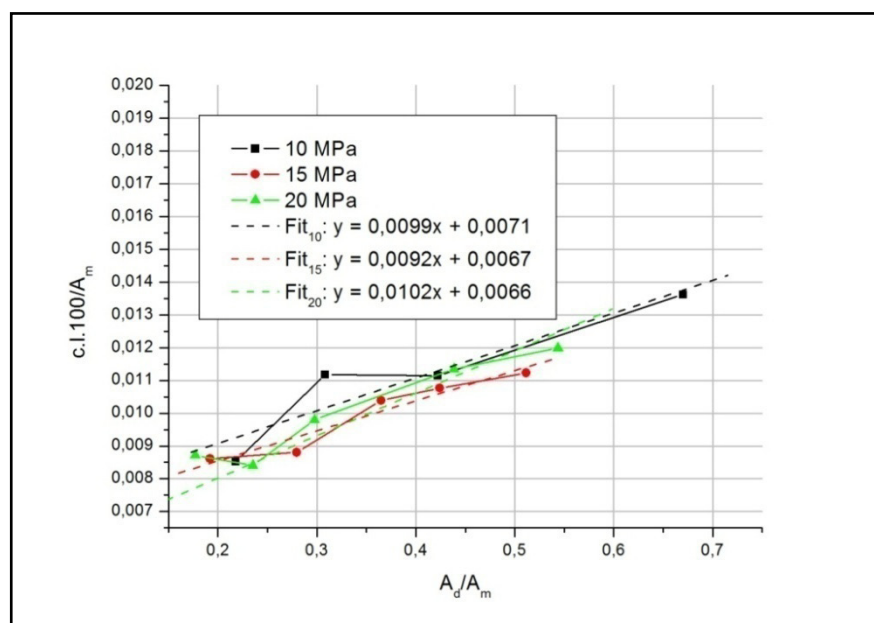


Figure 3.19 : Courbe  $c.l/A_m=f(A_m/A_d)$  et équations des droites correspondantes (ajustement linéaire).

D'après la Figure 3.19, on remarque que la pression n'a pas d'influence significative sur l'équation de la droite  $c./A_m=f(A_m/A_d)$ . Les résultats des calculs de  $\varepsilon_d$  et  $\varepsilon_m$  sont résumés dans le Tableau 3. 7.

**Tableau 3. 7 : Calcul des coefficients d'extinction molaire caractéristiques des couples AcS<sub>monomère</sub>-CO<sub>2</sub> supercritique et AcS<sub>dimère</sub>-CO<sub>2</sub> supercritique à 35°C. Comparaison avec les coefficients caractéristiques de l'acide acétique et palmitique <sup>[87]</sup>.**

Pression (MPa)	10	15	20	Moyenne	Ecart type	Acide acétique (15 MPa)	Acide palmitique (15 MPa)
$\varepsilon_m$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-2</sup> )	14 100	15 000	15 100	14 700	560	10 300	12 000
$\varepsilon_d$ (L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-2</sup> )	20 200	21 700	19 600	20 500	1 100	22 300	20 200

Aucune étude ne donnant accès aux grandeurs  $\varepsilon_d$  et  $\varepsilon_m$  de l'AcS dans le CO<sub>2</sub>, une comparaison est tout de même effectuée avec les valeurs des  $\varepsilon_d$  et  $\varepsilon_m$  des acides acétique et palmitique calculés par l'équipe de Yamamoto *et al.* <sup>[87]</sup>. Les résultats présentés sont proches et semblent cohérents.

*Remarque : L'unité des  $\varepsilon_d$  et  $\varepsilon_m$  des acides palmitique et acétique annoncés par Yamamoto *et al.* est le L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Une telle unité suppose que l'absorbance utilisée dans la loi de Beer Lambert correspond à la hauteur du pic étudié. Yamamoto *et al.* ne donnent aucune indication sur la méthode de détermination de l'absorbance. Dans ces travaux de thèse, l'absorbance mesurée correspond à l'aire du pic étudié et l'unité des coefficients d'extinction molaire est le L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>. Fujii *et al.* ont déterminé les coefficients d'extinction molaire de l'acide acétique dans divers solvants en signalant bien l'utilisation de la hauteur des pics caractéristiques de l'absorbance de l'acide <sup>[88]</sup>. Les grandeurs trouvées sont dix fois plus petites que celles de ces travaux et de ceux de Yamamoto. Cette dernière comparaison tend à montrer que les  $\varepsilon_d$  et  $\varepsilon_m$  calculés par l'équipe de Yamamoto ont un ordre de grandeur correspondant à un calcul utilisant les aires des pics. De ce fait, nous pensons que l'unité des  $\varepsilon_d$  et  $\varepsilon_m$  des acides palmitique et acétique est non pas en L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> mais en L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup> et qu'ils sont donc comparables à nos résultats.*

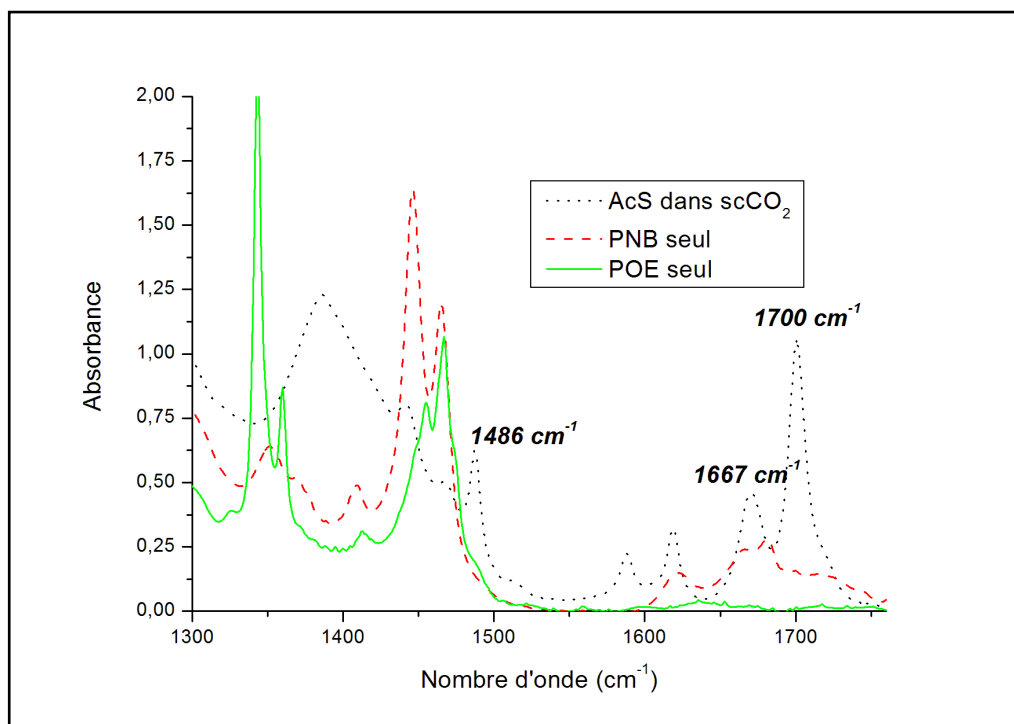


Figure 3. 20 : Spectre IR caractéristique de l'AcS solubilisé dans le CO<sub>2</sub> (15MPa, 33°C) superposé avec les spectres caractéristiques du POE et du PNB.

Connaissant  $\varepsilon_d(\text{AcS})$  et  $\varepsilon_m(\text{AcS})$ , les concentrations en AcS dimère et monomère sont directement calculables à partir des absorbances mesurées  $A_m$  et  $A_d$ . Cependant, les pics caractéristiques du monomère et du dimère de l'AcS sont situés sur des bandes (1650-1750 cm<sup>-1</sup>) où le spectre IR du PNB présente lui aussi un signal (Figure 3. 20). Le calcul nécessitera donc la soustraction au préalable du signal propre au polymère.

**Il existe une bande de l'AcS (1486 cm<sup>-1</sup>) qui quant à elle est bien distincte des signaux IR du PNB et du POE. Cette bande est caractéristique du mode de vibration en élongation des C=C du cycle couplé à la déformation dans le plan des liaisons C-H de l'AcS et est proportionnelle à la quantité totale (dimère et monomère confondus) d'AcS**

[89]

Le coefficient d'extinction molaire caractéristique de l'AcS sur cette bande a été calculé à partir de la hauteur de ce pic. Cette fois-ci on a alors :  $c(\text{AcS}) = A_{1486} \cdot \varepsilon_{1486} \cdot l$ .

Le coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon_{1486}$  est directement proportionnel au coefficient directeur de la droite  $c(\text{AcS}) = f(A_{1486})$ .

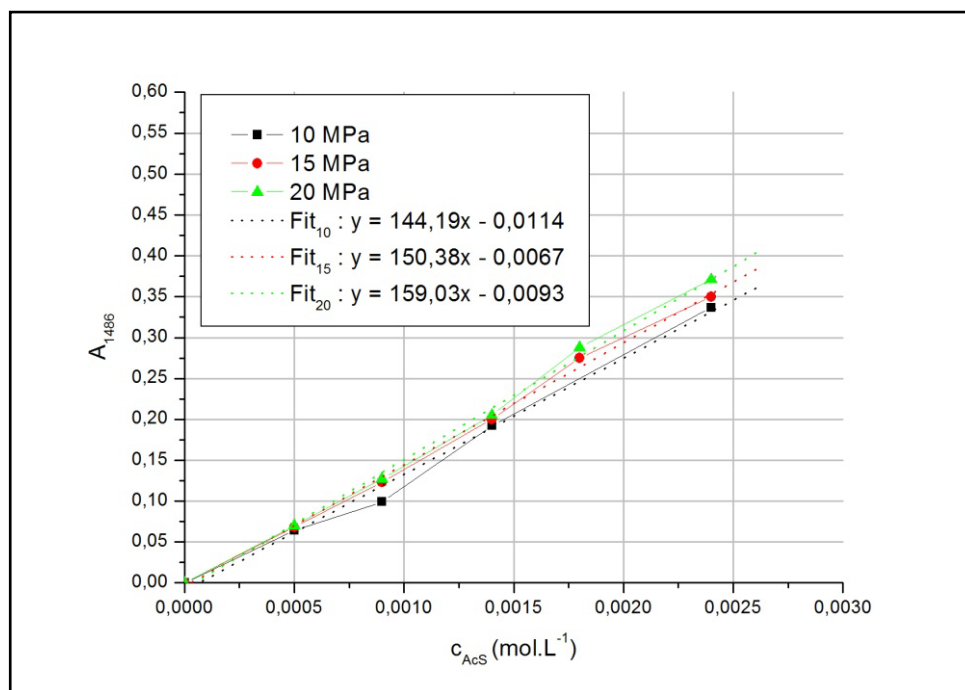


Figure 3. 21 : Courbe  $c(AcS) = \epsilon.l.A_{1486 \text{ cm}^{-1}}$  et équation de la droite correspondante (ajustement linéaire).

D'après la Figure 3. 21 et connaissant le trajet optique de la cellule  $l$  (donnée en début de paragraphe), la valeur trouvée à 35°C et 15 MPa est :  $\epsilon_{1486} = 190,7 \pm 9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

*Remarque : ces coefficients ont été déterminés afin de caractériser l'AcS dissous dans le CO<sub>2</sub> supercritique. Dans la mesure où les bandes caractéristiques de l'AcS imprégné dans le polymère sont les mêmes que celles de l'AcS dissous dans le CO<sub>2</sub> supercritique, nous ferons l'approximation que c'est le même coefficient.*

Dans le paragraphe suivant, une étude de la solubilité de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> supercritique par spectroscopie IRTF en transmission est réalisée dans le but de valider les calculs présentés ci-dessus. Ces résultats seront comparés à la littérature et à une loi théorique de détermination de la solubilité de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> en fonction de la pression et de la température. Cette loi est présentée en introduction de paragraphe.



## 4.2 Détermination de la solubilité de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> supercritique

Comme nous l'avons vu au 1.2.1.2, une des exigences principales lors de l'imprégnation d'un polymère par du CO<sub>2</sub> supercritique est de saturer le flux de CO<sub>2</sub> par le soluté. De ce fait, pour une expérience donnée (à pression et température fixées), il est nécessaire de connaître la solubilité du soluté dans le CO<sub>2</sub>. Cette solubilité peut être prédite en fonction des conditions expérimentales ( $p$  et  $T$ ) à partir de modèles thermodynamiques tels que celui de Chrastil.

### 4.2.1 Prévision de la solubilité de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> supercritique

D'après le modèle de Chrastil, pour un couple gaz-soluté donné, la solubilité du soluté dans le gaz est décrite par la loi suivante <sup>[90]</sup>:

$$\ln(s) = k \cdot \ln(d) + \frac{a}{T} + b \quad \text{Equation 20}$$

où  $s$  est la solubilité du soluté dans le gaz,  $d$  la densité de ce gaz et  $T$  la température.  $k$ ,  $a$  et  $b$  sont des constantes caractéristiques du couple gaz-soluté considéré.

La littérature recense de nombreuses études de la solubilisation de l'AcS dans le CO<sub>2</sub> supercritique à différentes pressions et différentes températures <sup>[91-93]</sup>. A partir de la combinaison de ces résultats et de la loi de Chrastil, les constantes  $k$ ,  $a$  et  $b$  caractéristiques du couple acide salicylique-CO<sub>2</sub> supercritique ont pu être déterminées :

Tableau 3. 8 : Valeurs des constantes du modèle de Chrastil propres au couple AcS-CO<sub>2</sub> supercritique.

$k$ (sans unité)	$a$ (K.mol.g <sup>-1</sup> )	$b$ (sans unité)
4,0	-4953,6	-11,0

La Figure 3. 22 représente les courbes théoriques de la solubilité de l'acide salicylique (AcS) dans le CO<sub>2</sub> supercritique en fonction de la pression et de la température.

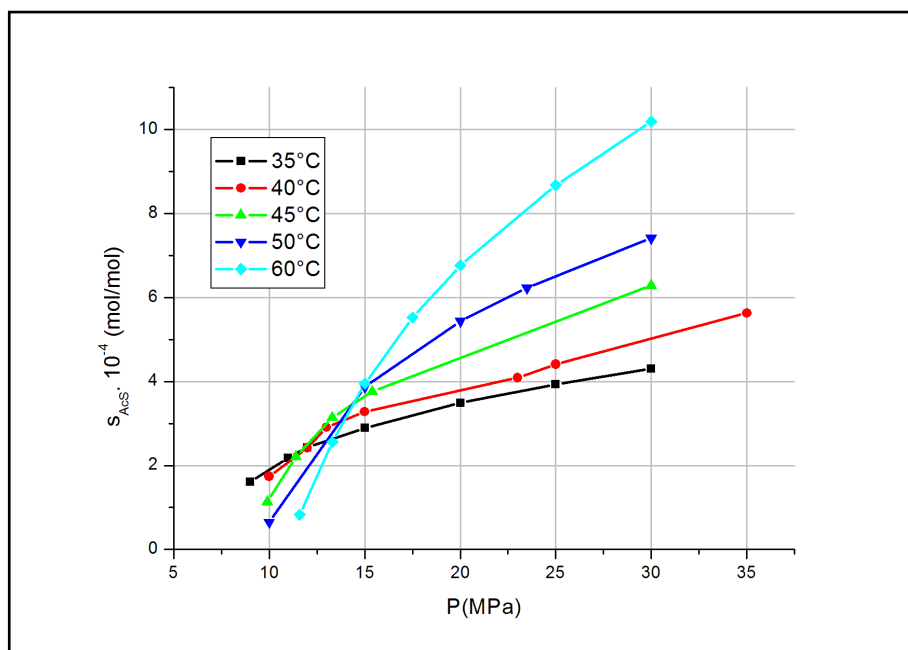


Figure 3. 22 : Courbes théoriques de la solubilité de l'AcS en fonction de la pression et de la température.

Ainsi, pour une expérience donnée (à pression et température fixées) et à partir de l'élaboration de cette loi, il est possible de déterminer la concentration minimale en AcS à insérer dans un réacteur afin de saturer le CO<sub>2</sub> inséré.

#### 4.2.2 Mesure de la solubilité de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> supercritique par spectroscopie IRTF

La littérature recense de nombreux travaux sur la mesure de la solubilité de l'AcS dans le CO<sub>2</sub> supercritique (mesure par gravimétrie, par lecture UV...) [91-93]. Afin de valider les calculs des coefficients d'extinction molaires réalisés au paragraphe 4.1, la mesure de la solubilité de l'AcS dans le CO<sub>2</sub> en fonction de la température et de la pression est réalisée par spectroscopie IRTF à partir des coefficients  $\epsilon_d$  et  $\epsilon_m$  dans un premier temps, puis à partir du coefficient  $\epsilon_{1486}$ . Pour chaque mesure, un excès d'AcS est placé en fond de cellule afin de saturer le CO<sub>2</sub> (3,8 mg au minimum à 20 MPa d'après la loi établie au 4.2.1). Ainsi, la concentration de l'AcS mesurée à une pression et une température données correspond à la solubilité  $s$  de l'AcS dans le CO<sub>2</sub> dans ces conditions. Dans le cas des calculs à partir de  $\epsilon_d$  et  $\epsilon_m$ , l'aire des pics à 1667 cm<sup>-1</sup> et 1700 cm<sup>-1</sup> est respectivement mesurée sur les bandes (1655-1685 cm<sup>-1</sup>) et (1685-1727 cm<sup>-1</sup>). La solubilité obtenue est exposée en Figure 3.23 et comparée aux résultats de la littérature et du calcul par le modèle de Chrastil. Au regard de l'intervalle d'erreur de la mesure par spectroscopie, on remarque que la solubilité ainsi mesurée coïncide relativement bien avec le modèle et reste proche des résultats obtenus par Ke *et al.*

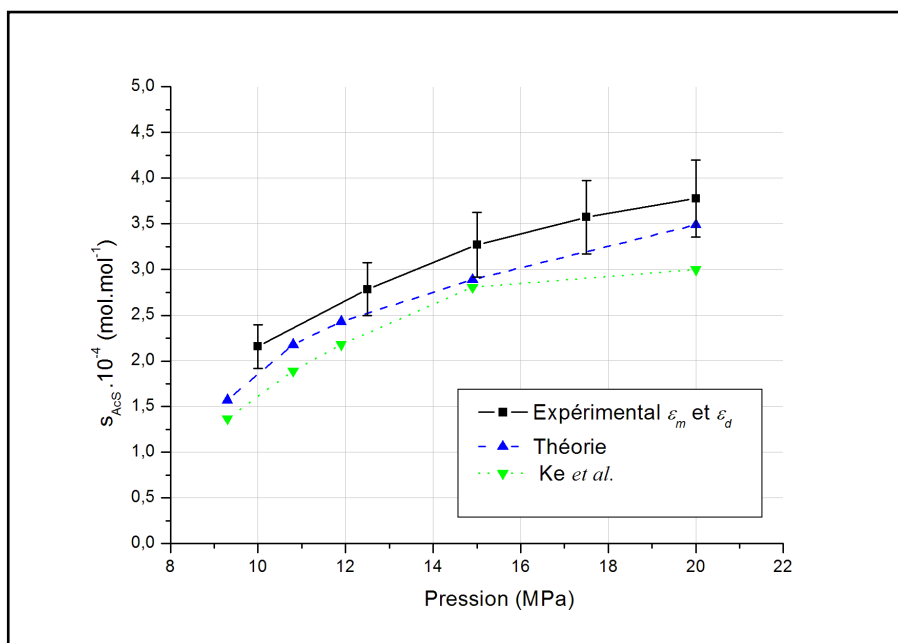


Figure 3.23 : Solubilité de l'AcS dans le CO<sub>2</sub> supercritique à 35°C en fonction de la pression (-: ces travaux d'après  $\varepsilon_d$  et  $\varepsilon_m$  expérimentaux ; ▼ : Ke et al.<sup>[91]</sup>; ▲ : calculs d'après le modèle de Chrastil).

L'analyse des spectres pour déterminer la solubilité de l'AcS a aussi été réalisée à partir du coefficient  $\varepsilon_{1486}$  et comparée aux résultats de la littérature et du modèle (Figure 3.24). On remarque alors que cette méthode de mesure est tout à fait en accord avec le modèle et qu'elle donne des résultats proches de ceux obtenus par Ke et al.

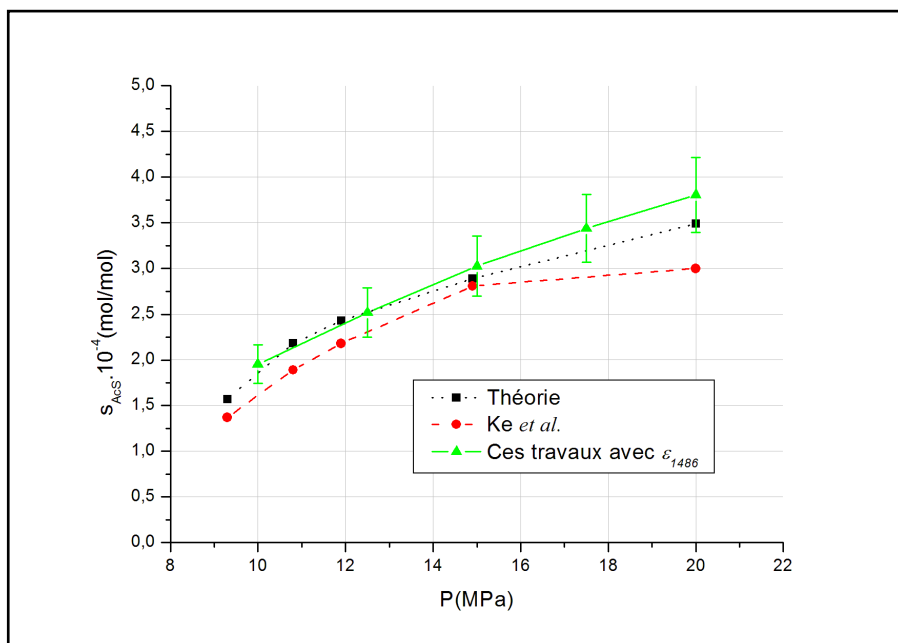


Figure 3.24 : Solubilité de l'acide salicylique dans le CO<sub>2</sub> supercritique à 35°C en fonction de la pression (▲ : ces travaux d'après  $\varepsilon_{1486}$  expérimental; ● : Ke et al.<sup>[91]</sup>; ■ : calculs d'après le modèle de Chrastil<sup>[90]</sup>).

*Remarque : L'intervalle d'erreur est estimé à partir de l'écart type calculé lors de l'estimation de la valeur des différents coefficients d'extinction molaire.*

Cette dernière étude nous a permis : i) de déterminer les coefficients d'extinction molaires de l'acide salicylique nécessaires pour le suivi de l'imprégnation par IRTF du principe actif dans les polymères et ii) d'appliquer la loi de Chrastil au système acide salicylique-CO<sub>2</sub> permettant ainsi de déterminer aisément les quantités d'acide salicylique nécessaires à la saturation d'un volume donné de CO<sub>2</sub>, donnée encore une fois importante pour l'imprégnation des polymères sous CO<sub>2</sub> supercritique.

### **5 Conclusions et bilan par rapport aux objectifs**

Au travers de ce chapitre, la caractérisation du système particules-CO<sub>2</sub> supercritique a pu être appréhendée. L'étude par spectroscopie IRTF *in situ* a permis de caractériser le comportement du système PNB-CO<sub>2</sub> encore jamais étudié à ce jour et a révélé qu'il était possible de gonfler de 35% le PNB sous CO<sub>2</sub> supercritique à 15 MPa et 33°C. Le système POE-CO<sub>2</sub> a quant à lui été largement étudié dans la littérature et son gonflement sous CO<sub>2</sub> supercritique à 15 MPa et 35°C est annoncé de 35%. L'analyse *in situ* par spectroscopie IRTF des particules s'est avérée plus délicate en raison du grand nombre d'informations spectrales générées par l'échantillon. Les polymères constitutifs des particules ayant montré des gonflements similaires de 35% sous CO<sub>2</sub> supercritique à 15 MPa et 35°C, il sera admis par la suite que le gonflement des particules dans les mêmes conditions est de 35%.

Enfin, le système acide salicylique-CO<sub>2</sub> a été caractérisé. Cette analyse a permis, d'une part, de déterminer les coefficients d'extinction molaire caractéristiques de la molécule et nécessaires au suivi de l'imprégnation des polymères sous CO<sub>2</sub> supercritique et, d'autre part, d'établir une loi donnant accès à la solubilité du principe actif dans le CO<sub>2</sub> en fonction de sa pression et de sa température. L'imprégnation d'un polymère sous fluide supercritique étant d'autant plus efficace que le fluide est saturé en soluté, cette donnée est très intéressante pour la suite de ces travaux.

## Bibliographie

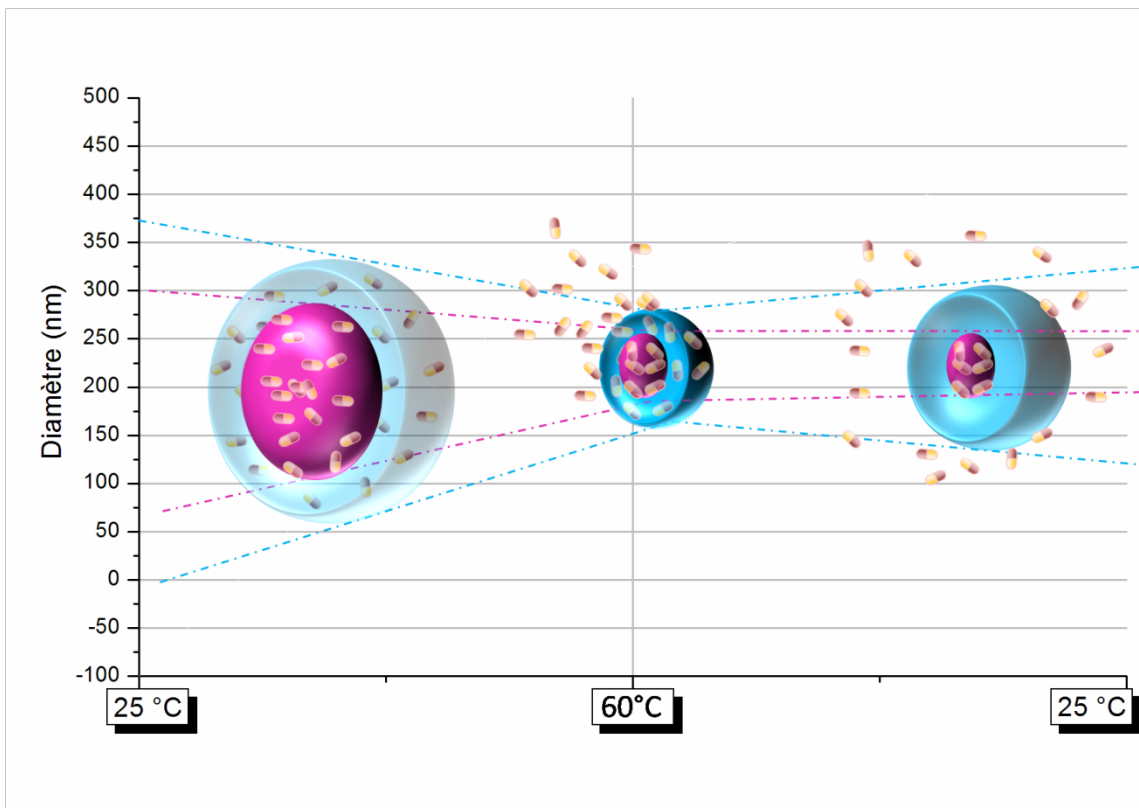
1. Pasquali, I.; Bettini, R.; Giordano, F. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, (3), 399-410.
2. Yeo, S. D.; Kiran, E. *J. Supercrit. Fluids* **2005**, 34, (3), 287-308.
3. Aymonier, C.; Le Meur, A.; Héroguez, V., *A Bridge with Bioapplications in "Nanocomposite particles in bio-technology: synthesis, properties and applications"*.in press: 2009.
4. Debenedetti, P. G.; Tom, J. W.; Yeo, S. D.; Lim, G. B. *J. Controlled Release* **1993**, 24, (1-3), 27-44.
5. Kim, J. H.; Paxton, T. E.; Tomasko, D. L. *Biotechnol. Prog.* **1996**, 12, (5), 650-661.
6. Matsuyama, K.; Mishima, K.; Hayashi, K. I.; Ishikawa, H.; Matsuyama, H.; Harada, T. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, 89, (3), 742-752.
7. Matsuyama, K.; Yamauchi, S.; Hirabaru, T.; Hayashi, K. I.; Hattori, S.; Mishima, K. *Kagaku Kogaku Ronbunshu* **2001**, 27, (6), 712-713.
8. Mirkin, C. A. *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 2258-2272.
9. Muntó, M.; Ventosa, N.; Veciana, J. *J. Supercrit. Fluids* **2008**, 47, (2), 290-295.
10. Reverchon, E.; De Marco, I.; Adami, R.; Caputo, G. *J. Supercrit. Fluids* **2008**, 44, (1), 98-108.
11. Reverchon, E.; Della Porta, G. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, (8), 1293-1297.
12. Türk, M.; Upper, G.; Hils, P. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, 39, (2), 253-263.
13. Yasuji, T.; Haslam, J.; Kajiyama, A.; McIntosh, M. P.; Rajewski, R. A. *J. Pharm. Sci.* **2006**, 95, (3), 581-588.
14. Wang, Y.; Wang, Y.; Yang, J.; Pfeffer, R.; Dave, R.; Michniak, B. *Powder Technol.* **2006**, 164, (2), 94-102.
15. Kerc, J.; Srcic, S.; Knez, Z.; Sencar-Bozic, P. P. *Int. J. Pharm.* **1999**, 182, (1), 33-39.
16. Duarte, A. R. C.; Costa, M. S.; Simplício, A. L.; Cardoso, M. M.; Duarte, C. M. M. *Int. J. Pharm.* **2006**, 308, (1-2), 168-174.
17. Duarte, A. R. C.; Simplício, A. L.; Vega-González, A.; Subra-Paternault, P.; Coimbra, P.; Gil, M. H.; De Sousa, H. C.; Duarte, C. M. M. *Curr. Drug Delivery* **2008**, 5, (2), 102-107.
18. Gong, K.; Rehman, I. U.; Darr, J. A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 48, (4), 1112-1119.
19. Kazarian, S. G. *Polym. Sci. - Series C* **2000**, 42, (1), 78-101.
20. Kazarian, S. G.; Martirosyan, G. G. *Int. J. Pharm.* **2002**, 232, (1-2), 81-90.
21. Kikic, I.; Vecchione, F. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2003**, 7, (4-5), 399-405.
22. Liu, H.; Finn, N.; Yates, M. Z. *Langmuir* **2005**, 21, (1), 379-385.
23. López-Periago, A.; Argemí, A.; Andanson, J. M.; Fernández, V.; García-González, C. A.; Kazarian, S. G.; Saurina, J.; Domingo, C. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, 48, (1), 56-63.
24. Tomasko, D. L.; Li, H.; Liu, D.; Han, X.; Wingert, M. J.; Lee, L. J.; Koelling, K. W. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, 42, (25), 6431-6456.
25. Beltrame, P. L.; Castelli, A.; Selli, E.; Villani, L.; Mossa, A.; Seves, A.; Testa, G. *Dyes and Pigments* **1998**, 39, (1), 35-47.
26. Ozge Guney, A. A. *AIChE Journal* **2002**, 48, (4), 856-866.
27. Zhang, Y. Z.; Bjursten, L. M.; Freij-Larsson, C.; Kober, M.; Wesslén, B. *Biomaterials* **1996**, 17, (23), 2265-2272.
28. Dillow, A. K.; Dehghani, F.; Hrkach, J. S.; Foster, N. R.; Langer, R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, (18), 10344-10348.
29. Spilimbergo, S.; Bertucco, A. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 84, (6), 627-638.
30. White, A.; Burns, D.; Christensen, T. W. *J. Biotechnol.* **2006**, 123, (4), 504-515.
31. Nakamura, K.; Enomoto, A.; Fukushima, H.; Nagai, K.; Hakoda, M. *Biosci., Biotechnol. Biochem.* **1994**, 58, (7), 1297-1301.
32. Hong, S. I.; Pyun, Y. R. *J. Food Sci.* **1999**, 64, (4), 728-733.
33. Beckman, J. *J. Supercrit. Fluids* **2004**, 28, 121-191.
34. Du, L.; Kelly, J. Y.; Roberts, G. W.; DeSimone, J. M. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, 47, (3), 447-457.

35. Kendall, J. L.; Canelas, D. A.; Young, J. L.; DeSimone, J. M. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 543-564.
36. Brantley, N. H.; Kazarian, S. G.; Eckert, C. A. *J. App. Polym. Sci.* **2000**, 77, (4), 764-775.
37. Daneshvar, M.; Kim, S.; Gulari, E. *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, (5), 2124-2128.
38. Gourgouillon, D.; Nunes Da Ponte, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, 1, (23), 5369-5375.
39. Nikitin, L. N.; Gallyamov, M. O.; Vinokur, R. A.; Nikolaec, A. Y.; Said-Galiyev, E. E.; Khokhlov, A. R.; Jespersen, H. T.; Schaumburg, K. *J. Supercrit. Fluids* **2003**, 26, (3), 263-273.
40. Nalawade, S. P.; Picchioni, F.; Janssen, L. P. B. M. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, 31, (1), 19-43.
41. Shah, V. M.; Hardy, B. J.; Stern, S. A. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1993**, 31, (3), 313-317.
42. Fried, J. R.; Hu, N. *Polymer* **2003**, 44, (15), 4363-4372.
43. Van der Vegt, N. F. A. *J. Membr. Sci.* **2002**, 205, (1-2), 125-139.
44. Miller, E. A.; Gubbins, K. E. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2001**, 40, 2193-2211.
45. Vieth, W. R.; Howell, J. M.; Hsieh, J. M. *J. Membr. Sci.* **1976**, 1, (2), 177-220.
46. Sanchez, I. C.; Lacombe, R. H. *J. Phys. Chem.* **1976**, 80, (21), 2352-2362.
47. Sanchez, I. C.; Lacombe, R. H. *Macromolecules* **1978**, 11, (6), 1145-1156.
48. Handa, P. Y.; Kruus, P.; O'Neill, M. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1996**, 34, 2635-2639.
49. P. D. Condo, K. P. J. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1994**, 32, (3), 523-533.
50. Chow, T. S. *Macromolecules* **1980**, 13, (2), 362-364.
51. Pasquali, I.; Comi, L.; Pucciarelli, F.; Bettini, R. *Int. J. Pharm.* **2008**, 356, (1-2), 76-81.
52. Weidner, E.; Wiesmet, V.; Knez, Z.; Skerget, M. *J. Supercrit. Fluids* **1997**, 10, (3), 139-147.
53. Kulkarni, S. S.; Stern, S. A. *J. Polym. Sci., Part A-2, Polym. Phys.* **1983**, 21, (3), 441-465.
54. Harrison, K. L.; da Rocha, S. R. P.; Yates, M. Z.; Johnston, K. P.; Canelas, D.; DeSimone, J. M. *Langmuir* **1998**, 14, (24), 6855-6863.
55. Hutmacher, D. W. *Biomaterials* **2000**, 21, (24), 2529-2543.
56. Ma, P. X. *Materials Today* **2004**, 7, (5), 30-40.
57. Salgado, A. J.; Coutinho, O. P.; Reis, R. L. *Macromol. Biosci.* **2004**, 4, (8), 743-765.
58. Lee, L. J.; Zeng, C.; Cao, X.; Han, X.; Shen, J.; Xu, G. *Composites Science and Technology* **2005**, 65, (15-16 SPEC. ISS.), 2344-2363.
59. Doroudiani, S.; Park, C. B.; Kortschot, M. T. *Polym. Eng. Sci.* **1998**, 38, (7), 1205-1215.
60. Kumar, V.; Weller, J. E. *Int. Polym. Process.* **1993**, 8, (1), 73-80.
61. Kumar, V.; Weller, J. E. *J. Eng. Ind.* **1994**, 116, 413-420.
62. Tsivintzelis, I.; Angelopoulou, A. G.; Panayiotou, C. *Polymer* **2007**, 48, (20), 5928-5939.
63. Han, X.; Koelling, K. W.; Tomasko, D. L.; Lee, L. J. *Polym. Eng. Sci.* **2002**, 42, (11), 2094-2106.
64. Park, C. B.; Suh, N. P.; Baldwin, D. F. US Patent, 5 866 053, **1999**.
65. Sato, Y.; Yurugi, M.; Fujiwara, K.; Takishima, S.; Masuoka, H. *Fluid Phase Equilib.* **1996**, 125, (1-2), 129-138.
66. Aubert, J. H. *J. Supercrit. Fluids* **1998**, 11, (3), 163-172.
67. Aionicesei, E. x.; kergert, M.; Knez, E. *J. Chem. Eng. Data* **2008**, 53, (1), 185-188.
68. Muth, O.; Hirth, T.; Vogel, H. *J. Supercrit. Fluids* **2001**, 19, (3), 299-306.
69. Sato, Y.; Takikawa, T.; Takishima, S.; Masuoka, H. *J. Supercrit. Fluids* **2001**, 19, (2), 187-198.
70. Shieh, Y. T.; Su, J. H.; Manivannan, G.; Lee, P. H. C.; Sawan, S. P.; Spall, W. D. *J. App. Polym. Sci.* **1996**, 59, (4), 695-705.
71. Shieh, Y. T.; Su, J. H.; Manivannan, G.; Lee, P. H. C.; Sawan, S. P.; Spall, W. D. *J. App. Polym. Sci.* **1996**, 59, (4), 707-717.
72. Bonavoglia, B.; Storti, G.; Morbidelli, M.; Rajendran, A.; Mazzotti, M. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2006**, 44, 1531.
73. Pini, R.; Storti, G.; Mazzotti, M.; Tai, H.; Shakesheff, K. M.; Howdle, S. M. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2008**, 46, (5), 483-496.

74. Rajendran, A.; Bonavoglia, B.; Forrer, N.; Storti, G.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, 44, (8), 2549-2560.
75. Üzer, S.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, 38, (1), 119-128.
76. Sirard, S. M.; Green, P. F.; Johnston, K. P. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, (4), 766-772.
77. Guadagno, T.; Kazarian, S. G. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, (37), 13995-13999.
78. Vitoux, P.; Tassaing, T.; Cansell, F.; Marre, S.; Aymonier, C. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, (4), 897-905.
79. Flichy, N. M. B.; Kazarian, S. G.; Lawrence, C. J.; Briscoe, B. J. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, (4), 754-759.
80. Pasquali, I.; Andanson, J.-M.; Kazarian, S. G.; Bettini, R. *J. Supercrit. Fluids* **2008**, 45, 384-390.
81. Garg, A.; Gulari, E.; Manke, C. W. *Macromolecules* **2002**, 27, (20), 5643-5653.
82. Le Meur, A.; Tassaing, T.; Héroguez, V.; Aymonier, C.; Mourgues, M.; Mourgues, F. *Polym. Mater. Sci. Eng.* , 2009, 101, 1764
83. <http://www.jascofrance.fr/logiciels/KnowItAllIR.html>. In.
84. Sakakura, T.; Choi, J. C.; Yasuda, H. *Chem. Rev.* **2007**, 107, (6), 2365-2387.
85. Ke, J.; Jin, S.; Han, B.; Yan, H.; Shen, D. *J. Supercrit. Fluids* **1997**, 11, (1-2), 53-60.
86. Park, Y.; Gupta, R. B.; Curtis, C. W.; Roberts, C. B. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, (37), 9696-9700.
87. Yamamoto, M.; Iwai, Y.; Nakajima, T.; Arai, Y. *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, (18), 3525-3529.
88. Fujii, Y.; Yamada, H.; Mizuta, M. *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, (23), 6768-6772.
89. Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E., *Introduction to infrared and Raman spectroscopy* 2d edition ed.; Academic Press New York 1975
90. Chrastil, J. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, (15), 3016-3021.
91. Ke, J.; Mao, C.; Zhong, M.; Han, B.; Yan, H. *J. Supercrit. Fluids* **1996**, 9, (2), 82-87.
92. Maksudov, R. N.; Novikov, A. E.; Sabirzyanov, A. N.; Gumerov, F. M. *High Temperature* **2005**, 43, (6), 854-858.
93. Reverchon, E.; Donsi, G.; Gorgoglione, D. *J. Supercrit. Fluids* **1993**, 6, (4), 241-248.

# Chapitre 4

## *Imprégnation et relargage des vecteurs*





**SOMMAIRE**

<b>1</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE : IMPREGNATION DE POLYMERES SOUS FSC</b>	<b>148</b>
<b>1.1</b>	<b>PRINCIPE GENERAL DE L'IMPREGNATION</b>	<b>148</b>
1.1.1	LE CO <sub>2</sub> SUPERCRITIQUE, UN BON AGENT DE TRANSFERT	149
1.1.2	PROCEDES D'IMPREGNATION	150
<b>1.2</b>	<b>MECANISMES D'IMPREGNATION</b>	<b>152</b>
1.2.1	MECANISME 1 : COEFFICIENT DE PARTAGE FAVORABLE A LA PHASE CO <sub>2</sub>	153
1.2.2	MECANISME 2 : COEFFICIENT DE PARTAGE FAVORABLE A LA PHASE POLYMERE	154
<b>2</b>	<b>IMPREGNATION DES PARTICULES PNB-POE SOUS CO<sub>2</sub> SUPERCRITIQUE ET MECANISMES ASSOCIES</b>	<b>156</b>
<b>2.1</b>	<b>ETUDE DE L'IMPREGNATION DU CŒUR DU VECTEUR : LE PNB</b>	<b>157</b>
2.1.1	SPECTRE IR DE REFERENCE DU SYSTEME PNB-ACS-CO <sub>2</sub>	157
2.1.2	GONFLEMENT DU PNB LORS DE SON IMPREGNATION PAR DE L'ACIDE SALICYLIQUE	158
2.1.3	IMPREGNATION DU PNB SEUL PAR DE L'ACIDE SALICYLIQUE	159
2.1.4	SPECIATION DE L'ACIDE SALICYLIQUE IMPREGNE DANS UN FILM DE PNB	162
<b>2.2</b>	<b>ETUDE DE L'IMPREGNATION DE L'ECORCE DU VECTEUR : LE POE</b>	<b>166</b>
2.2.1	SPECTRE IR DE REFERENCE DU SYSTEME POE-ACS-CO <sub>2</sub>	167
2.2.2	GONFLEMENT DU POE DURANT SON IMPREGNATION	168
2.2.3	IMPREGNATION DU POE SEUL PAR DE L'ACIDE SALICYLIQUE	169
2.2.4	SPECIATION DE L'ACIDE SALICYLIQUE DANS UN FILM DE POE	171
<b>2.3</b>	<b>ETUDE DE L'IMPREGNATION DES PARTICULES PNB-POE</b>	<b>174</b>
2.3.1	SPECTRE IR DES PARTICULES PNB-POE IMPREGNEES	174
2.3.2	IMPREGNATION DES PARTICULES PNB-POE PAR DE L'ACIDE SALICYLIQUE	175
2.3.3	SPECIATION DE L'ACIDE SALICYLIQUE DANS UN FILM DE PARTICULES PNB-POE	179
<b>3</b>	<b>RELARGAGE DES VECTEURS PNB-POE EN MILIEU PHYSIOLOGIQUE</b>	<b>181</b>
<b>3.1</b>	<b>MONTAGE D'IMPREGNATION DES VECTEURS PNB-POE ET PROTOCOLE EXPERIMENTAL</b>	<b>182</b>
<b>3.2</b>	<b>RELARGAGE <i>IN VITRO</i> DE L'ACS DES VECTEURS PNB-POE</b>	<b>185</b>
3.2.1	RELARGAGE DU CŒUR : LE PNB SEUL	186
3.2.2	RELARGAGE DU POE SEUL	188
3.2.3	RELARGAGE DES PARTICULES PNB-POE	190
3.2.4	MECANISME DE RELARGAGE DES PARTICULES PNB-POE	198
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>201</b>

Dans le chapitre 2, l'élaboration de vecteurs pharmaceutiques pour le relargage ciblé de principes actifs par échauffement local en réponse à un stimulus externe a été décrite. Ceux-ci sont constitués d'une écorce de POE capable de les rendre furtif *in vivo* et d'un cœur à base de PNB plus ou moins réticulé.

Dans le chapitre 3, l'étude par spectroscopie FTIR *in situ* du comportement de ces matériaux sous CO<sub>2</sub> supercritique a montré qu'il était possible de gonfler ces matrices en moyenne de 35% vol. ce qui permet d'envisager leur imprégnation par une espèce active sous CO<sub>2</sub> supercritique.

Conceptuellement, la thermosensibilité de ces vecteurs est basée sur la T<sub>g</sub> du cœur de PNB (35°C) que l'on souhaite modulable suivant le taux d'AR incorporé au cœur. L'objectif de ce dernier chapitre est de déterminer le type de vecteurs compatible avec une action de ciblage par stimulus externe, c'est-à-dire permettant le relargage de principes actifs dans une gamme de température comprise entre 40 et 50°C. Pour ce faire, l'acide salicylique (molécule modèle) a été imprégné dans différents vecteurs et son relargage en fonction de la température a été étudié.

Afin de valider l'applicabilité de l'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique des vecteurs PNB-POE, l'étude *in situ* par spectroscopie FTIR de l'imprégnation des vecteurs PNB-POE sous CO<sub>2</sub> supercritique par de l'acide salicylique (AcS) est présentée dans un premier temps. Ensuite, une série de tests d'imprégnation menée sur différents types de particules est décrite. Pour terminer, l'étude du relargage *in vitro* de l'AcS encapsulé dans ces différents vecteurs est présentée et permet de conclure sur la validité du concept de thermosensibilité qui a fait l'objet de ces travaux de thèse.

Avant de présenter ces différents résultats, un état de l'art est réalisé sur les différents procédés d'imprégnation de polymères sous FSC existant à ce jour.

## 1 Bibliographie : Imprégnation de polymères sous FSC

L'enrobage ou l'encapsulation de principes actifs dans une particule polymère présente un grand intérêt pour les industries de la pharmacie, de la cosmétique ou de l'agroalimentaire. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les techniques conventionnelles d'encapsulation sont limitées de par : i) le contrôle difficile de la dispersion du soluté et ii) le risque de présence de résidus toxiques. Dans ce contexte, les propriétés spécifiques du CO<sub>2</sub> supercritique (gonflement des matrices polymères, faible tension de surface, absence de solvants organiques, effet stérilisant, etc) en ont fait un moyen de choix pour l'imprégnation de solutés dans des matrices polymères. Les faibles coordonnées critiques du CO<sub>2</sub> et son état gazeux à l'ambiante permettent non seulement de récupérer un matériau dépourvu de toute trace de solvants mais aussi d'envisager l'encapsulation de molécules sensibles à de fortes températures (fragrances, certains actifs...). Sand *et al.* furent les premiers à constater que le CO<sub>2</sub> permettait d'imprégner un grand nombre de molécules de faibles poids moléculaires (pesticides, fragrances, agents thérapeutiques) dans des matrices polymères [1]. Ensuite, Berens *et al.* poursuivirent cette étude en élargissant la gamme de solutés à des composés moins CO<sub>2</sub>-philes. Ils introduisirent alors la notion essentielle qui gouverne toute imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique : le coefficient de partage entre la phase riche en CO<sub>2</sub> et la phase riche en polymère [2] (concept détaillé au 1.2 de ce chapitre).

Suite à ces résultats, l'imprégnation de polymères sous FSC a été largement étudiée. La suite de ce paragraphe reprend la plupart de ces travaux en expliquant tout d'abord le principe général du procédé d'imprégnation puis les mécanismes mis en jeu avec un accent sur l'application aux molécules thérapeutiques. Le Tableau 4.1 apparaissant en page 155 reprend les principaux résultats recensés dans la littérature.

### 1.1 Principe général de l'imprégnation

Comme nous l'avons vu au chapitre 3 (1.4.1.2), l'imprégnation sous fluide supercritique se déroule principalement en trois étapes (Figure 4.1):

1. Solubilisation du soluté dans le CO<sub>2</sub> sous pression et en température (si possible saturation du fluide en soluté).
2. Addition de la solution de (CO<sub>2</sub> supercritique – soluté) au polymère permettant le gonflement de la matrice et la diffusion du soluté en son sein.
3. Dépressurisation et récupération du matériau imprégné.

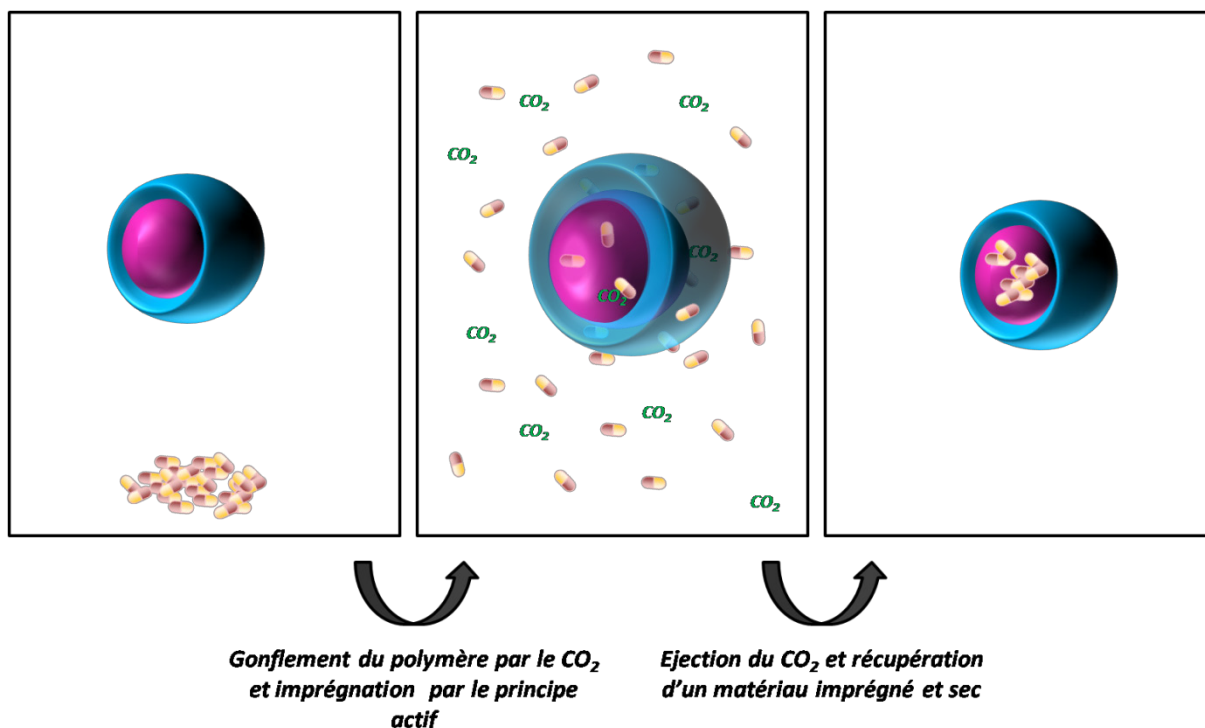


Figure 4.1 : Principales étapes d'un procédé d'imprégnation d'un polymère (symbolisé par une particule) par un principe actif (symbolisé par les gélules bicolores) sous CO<sub>2</sub> supercritique.

L'imprégnation de petites molécules dans un polymère sous CO<sub>2</sub> supercritique est possible en raison des qualités du CO<sub>2</sub> en tant qu'agent plastifiant et agent de transfert.

### 1.1.1 Le CO<sub>2</sub> supercritique, un bon agent de transfert

La principale propriété du CO<sub>2</sub> supercritique utilisée durant l'imprégnation de polymères est sa faculté à les plastifier. Il a cependant été montré que la qualité de diffusion de solutés dans des polymères traités par CO<sub>2</sub> supercritique ne peut être uniquement attribuée à cet effet.

Tout d'abord, lors de l'imprégnation de colorants DR1 (Disperse Red 1), Kazarian *et al.* ont montré que le taux de diffusion de l'espèce dans du PMMA gonflé par du CO<sub>2</sub> supercritique est plus important que dans le cas de la diffusion de l'espèce dans du PMMA chauffé au-delà de sa T<sub>g</sub> [3]. De plus, Vincent *et al.* ont montré que ce n'est pas uniquement l'effet de gonflement de la matrice qui facilite le transfert de masse du soluté [4]. En comparant la diffusion de molécules d'eau au travers de PMMA gonflé par du CO<sub>2</sub> supercritique à la diffusion dans du PMMA gonflé par « lyophilisation »<sup>1</sup>, ils ont constaté

<sup>1</sup> Le gonflement par lyophilisation est le terme utilisé par l'auteur pour désigner le gonflement de PMMA par du méthanol suivi de la lyophilisation de l'échantillon. Cette dernière étape permet d'extraire le solvant sans pour autant perdre l'expansion de la matrice acquis lors de l'ajout de méthanol.

encore une fois une meilleure diffusion du soluté dans le cas du polymère gonflé par le CO<sub>2</sub> supercritique.

Différentes explications ont été émises pour expliquer cette bonne diffusion [5, 6], notamment, Kazarian compare le CO<sub>2</sub> supercritique à un « lubrifiant moléculaire », qui de par sa petite taille par rapport aux molécules de solutés, facilite leur mouvement dans la phase supercritique [6].

### 1.1.2 Procédés d'imprégnation

Le procédé peut se dérouler en circuit ouvert (maintien des conditions pression - température, p-T, grâce à un flux constant de CO<sub>2</sub> supercritique) ou en circuit fermé (CO<sub>2</sub> supercritique-polymère-soluté sous pression dans une cellule fermée). Dans le premier cas, le montage est composé d'une chambre de solubilisation de l'espèce à imprégner et d'une chambre d'imprégnation contenant le polymère (Figure 4.2). Dans une première étape, le CO<sub>2</sub> supercritique est ajouté séparément à chacune de ces chambres de manière à assurer d'une part la saturation du CO<sub>2</sub> supercritique en soluté et d'autre part le gonflement de la matrice. Une fois l'équilibre thermodynamique atteint (estimé en général de une à deux heures), la chambre de solubilisation et la chambre d'imprégnation sont successivement balayées par un flux contrôlé de CO<sub>2</sub> supercritique. Cette technique a été utilisée par Guney *et al.* [7], Duarte *et al.* [8-14] ou encore Kikic *et al.* [15-17].

#### ***Procédé en circuit ouvert***

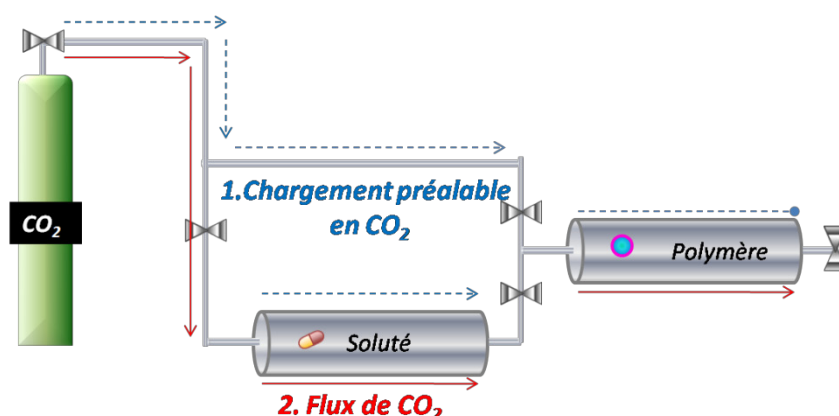
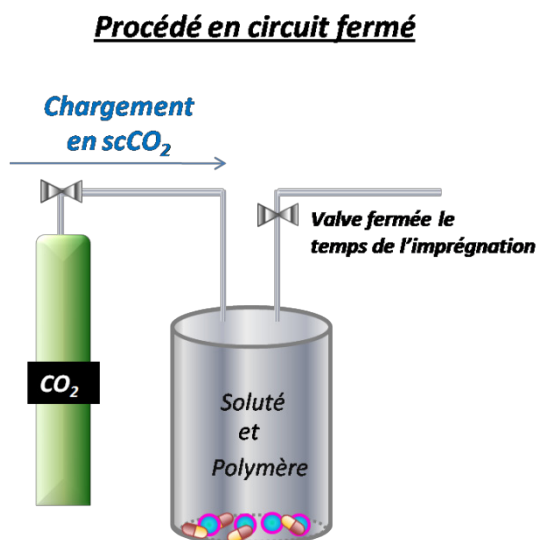


Figure 4.2 : Montage expérimental d'un procédé d'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique en circuit ouvert.

Dans le second cas, soluté et polymère sont placés dans une seule et même chambre (Figure 4.3). Un volume fixe de CO<sub>2</sub> est ajouté à la cellule de manière à atteindre les conditions de pression requises pour l'expérience. Solubilisation de la molécule active et gonflement de la matrice polymère se déroulent alors simultanément. Un des principaux

avantages de cette technique réside dans la possibilité de suivre le procédé *in situ* [3, 18-20]. Ainsi, Martiroyan *et al.* sont parvenus à suivre et caractériser par spectroscopie ATR-IR l'imprégnation d'ibuprofène dans un film de Poly(Vinyl Pyrrolidone) (PVP) [19]. Partant d'un mélange physique soluté-polymère, cette technique présente tout de même le risque de conduire à des matrices présentant le soluté non seulement en son sein mais aussi en surface. Un lavage post imprégnation peut être alors nécessaire.



**Figure 4.3 : Montage expérimental d'un procédé d'imprégnation d'un polymère (particules schématisées sous forme de cœur-écorce) par un principe actif (schématisé par des gélules bicolores) sous CO<sub>2</sub> supercritique en circuit fermé.**

Pour chacun de ces procédés, il est important de contrôler la cinétique de dépressurisation. La morphologie finale de l'échantillon peut être affectée de façon considérable lors de l'évacuation de CO<sub>2</sub>. Considérons un polymère amorphe, durant l'étape d'imprégnation le polymère est à l'état caoutchoutique (cf abaissement de la  $T_g$ )<sup>2</sup>. Lors de la dépressurisation, le CO<sub>2</sub> voit progressivement apparaître un gradient de concentration et cherche donc à s'échapper de la matrice. Le polymère va quant à lui chercher rapidement à revenir à son état vitreux initial. Si le CO<sub>2</sub> se trouve piégé dans le polymère à l'état vitreux, il va nécessairement conduire au moussage de la matrice. Ainsi, plus la cinétique de dépressurisation est lente et contrôlée, plus le CO<sub>2</sub> a des chances de sortir de la matrice avant qu'elle n'ait recouvert son état vitreux et de ce fait, plus la morphologie de la structure est respectée [21].

<sup>2</sup> Dans le cas de polymères semi-cristallins il est possible que l'ajout de CO<sub>2</sub> supercritique provoque une transition vers l'état liquide-visqueux et le risque de déstructuration est tout aussi important.

Dans le cadre de ce projet, nous nous proposons d'imprégner les particules PNB-POE par de l'acide salicylique. La chambre d'imprégnation utilisée pour l'encapsulation des vecteurs s'inspire des deux procédés détaillés dans la littérature [3, 7, 10-20]. La compartimentation des espèces principe actif - polymère est assurée, d'une part, par l'utilisation d'une chambre interne renfermant les particules et autour de laquelle est disposée la poudre d'AcS le tout placé dans une seule et même chambre. D'autre part, les deux « compartiments » constituant une seule et même chambre, gonflement des vecteurs et solubilisation du principe actif peuvent se dérouler simultanément. Le montage est détaillé au paragraphe 3.1 de ce chapitre.

Pour le développement de vecteurs pharmaceutiques, il est préférable d'assurer la dispersion de l'actif sous sa forme amorphe (chapitre 3 (1.3.3)). En fonction des affinités du principe actif avec le polymère ou le CO<sub>2</sub>, l'état de spéciation de celui-ci peut être contrôlé. Les paragraphes suivants détaillent les mécanismes mis en jeu lors de son imprégnation sous FSC susceptibles de gouverner l'agencement du principe actif.

## 1.2 Mécanismes d'imprégnation

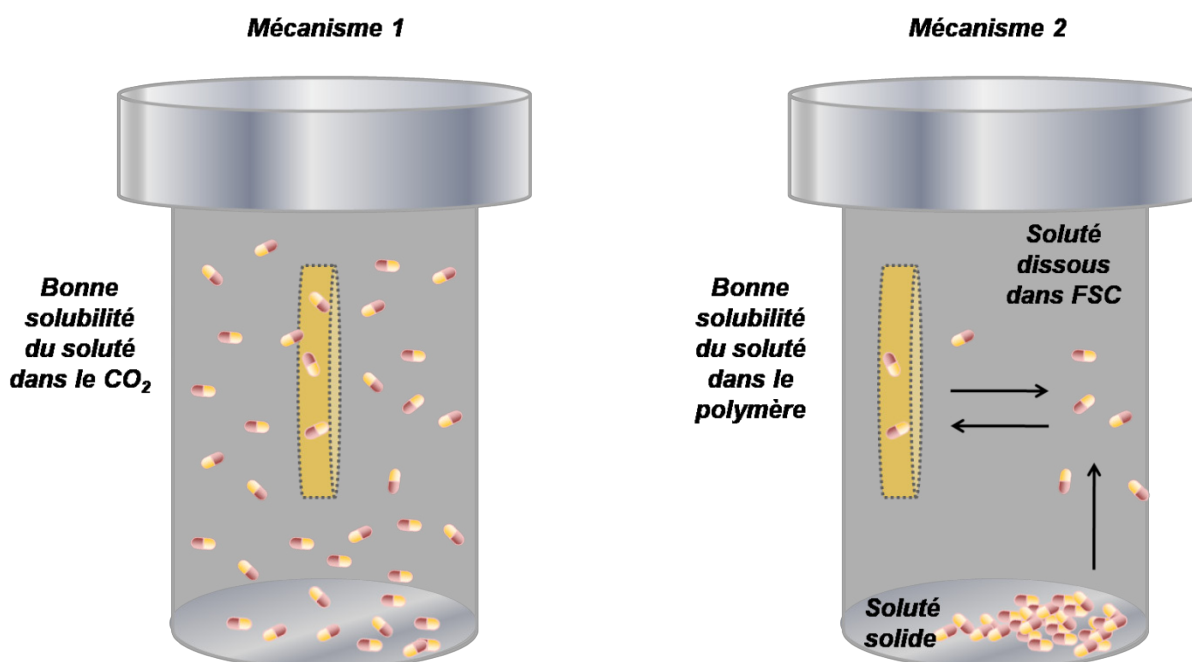


Figure 4.4 : Mécanismes d'imprégnation envisageables suivant le couple soluté polymère.

La répartition du principe actif dans le polymère et le CO<sub>2</sub> supercritique est caractérisée par le coefficient de partage entre les deux phases. Ce coefficient est noté K et est défini comme suit :

$$K = \frac{C_{sat_{pol}}}{C_{sat_{CO_2}}} \quad \text{Equation 1}$$

où  $C_{sat_{pol}}$  est la concentration à saturation du soluté dans le polymère et  $C_{sat_{CO_2}}$ , la concentration à saturation du soluté dans le CO<sub>2</sub>. Suivant sa valeur, deux types de mécanismes permettent d'expliquer les phénomènes d'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique.

### 1.2.1 Mécanisme 1 : Coefficient de partage favorable à la phase CO<sub>2</sub>

Dans ce premier cas, on considère un principe actif soluble dans le CO<sub>2</sub> supercritique et un coefficient de partage favorable à la phase supercritique (K de l'ordre de 1 à 10<sup>2</sup>)<sup>3</sup> (Figure 4.4- gauche). Le moteur de l'imprégnation est, d'une part, la diffusion du principe actif au sein de la matrice polymère lors de son gonflement et, d'autre part, la dépressurisation, étape durant laquelle on diminue la solubilité du soluté dans le CO<sub>2</sub> supercritique induisant ainsi la précipitation de l'actif directement dans la matrice. Dans ce cas de figure, tout type de matrice polymère peut être imprégné (l'absence d'affinités avec le principe actif est ici sans importance). L'inconvénient de cette technique est le risque de non-contrôle de la recristallisation de l'actif au sein de la matrice polymère et donc d'augmenter son temps de solubilisation suite à sa libération *in vivo*.

Dans le cas de l'ibuprofène, Charoentchaitrakool *et al.* ont montré que cette recristallisation n'est pas systématique. En effet, alors que l'expansion rapide d'une solution supercritique d'ibuprofène conduit à la forme cristalline du soluté [22], son imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique dans de la méthyl-β-cyclodextrine permet d'obtenir la molécule dispersée sous forme amorphe dans le polymère [23].

Avec ce mécanisme, une des limitations pour l'imprégnation de solutés sous CO<sub>2</sub> supercritique est leur solubilité dans le fluide. Des procédés alternatifs ont été développés afin d'outrepasser la faible solubilité de certains composés dans le CO<sub>2</sub> supercritique. En règle générale, une augmentation de la température du procédé est déconseillée dans la mesure où de nombreux composés (notamment pharmaceutiques) sont sensibles aux fortes températures. Il est par contre possible de jouer sur la pression ou alors d'ajouter un co-solvant. Les co-solvants les plus répertoriés en matière d'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique sont l'acétone et le dichlorométhane. L'efficacité de ceux-ci a été mise en avant

<sup>3</sup> Les ordres de grandeurs ont été estimés d'après les valeurs généralement trouvées dans la littérature.



entre autres par Cortesi *et al.* durant l'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique de PMMA, de PVP et d'éthyle cellulose par de l'acétate de mégéstérole [16]. La solubilité de certains solutés peut aussi être améliorée par ajout d'agents tensioactifs. Ainsi, à partir d'un procédé d'imprégnation en continu, Alessi *et al.* ont utilisé une pré-colonne de solubilisation disposée en amont de la colonne du soluté et dans laquelle des agents de surface de PDMS sont disposés [15]. Grâce à la dissolution au préalable de PDMS dans le CO<sub>2</sub> supercritique, ils sont parvenus à améliorer la solubilisation de nimésulide dans le CO<sub>2</sub> supercritique et par conséquent à augmenter la quantité imprégnée dans des matrices de PVP.

### 1.2.2 Mécanisme 2 : Coefficient de partage favorable à la phase polymère

Dans ce mécanisme, le soluté présente des affinités avec le polymère et le coefficient de partage est favorable à la phase polymère (de l'ordre de 10<sup>2</sup> à 10<sup>6</sup>). Au départ, le soluté disposé en fond de cellule se dissout (plus ou moins bien) dans le CO<sub>2</sub> supercritique et va progressivement pénétrer dans le polymère. Présentant des affinités pour celui-ci, le soluté va avoir tendance à se complexer avec le polymère et la phase CO<sub>2</sub> se retrouve appauvrie en soluté. Il en résulte alors la solubilisation de nouvelles molécules de soluté dans le CO<sub>2</sub> présentes en excès en fond de cellule. Ce processus peut alors se poursuivre jusqu'à saturation du polymère. Pour ce type de mécanisme, même des molécules faiblement solubles dans le CO<sub>2</sub> supercritique peuvent être imprégnées (Figure 4.4). Ainsi des travaux sur l'imprégnation de protéines dans des matrices de poly(acide lactique) (PLA) ont été publiés [24] mais l'essentiel des travaux sur des molécules faiblement solubles en milieu CO<sub>2</sub> supercritique est paru dans le domaine des colorants. Notamment, West *et al.* ont montré que l'imprégnation de PMMA par des colorants faiblement solubles dans le CO<sub>2</sub> supercritique (DR1) était possible en raison des affinités entre le polymère et le soluté (formation de liaisons hydrogène avec le groupement carbonyle des unités de MMA) [25].

Pour certains couples polymère-soluté, la combinaison des particularités propres aux deux mécanismes est possible et permet d'atteindre des résultats optimaux. Utilisant la spectroscopie par ATR-IR, Kazarian et Martiroyan sont parvenus à suivre et caractériser l'imprégnation de PVP par de l'ibuprofène (soluble dans le CO<sub>2</sub> supercritique) [19]. Ils ont ainsi remarqué que, en plus de solubiliser une bonne quantité d'ibuprofène dans le CO<sub>2</sub> supercritique (10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>), il est possible d'en incorporer une grande quantité dans le PVP en raison d'interactions hydrogène se manifestant entre le groupement hydroxyle du principe actif et les groupements carbonyle du polymère. Ils ont aussi montré que, de par ces interactions, le PVP imprégné avait un taux d'eau moins important que l'équivalent non imprégné, l'ibuprofène ayant tendance à chasser les molécules d'eau durant l'imprégnation. Gong *et al.* sont quant à eux parvenus à imprégner 20% en masse d'indométhacine dans du

chitosan et ont utilisé la spectroscopie FTIR pour mettre en avant des interactions spécifiques existantes entre les groupements carbonyle du chitosan et le groupement amine de l'indométhacine. Dans les deux cas, le principe actif est imprégné sous sa forme amorphe et permet d'envisager une meilleure cinétique de relargage de la molécule *in vivo* [26].

De nombreux couples polymère-principe actif ont fait l'objet d'études pour des procédés d'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique. Le Tableau 4.1 reprend les principaux exemples de la littérature. Pour chacun d'entre eux, le taux d'imprégnation ainsi que le probable mécanisme associé est rapporté.

**Tableau 4.1 : Quelques exemples de polymères imprégnés par un principe actif sous CO<sub>2</sub> supercritique.**

Polymère	Principe actif	Pression de travail (MPa)	Température de travail (°C)	Taux <sub>imp</sub> (%) ( $\frac{g_{pa}}{g_{pol+pa}}$ ) <sup>1</sup>	Méca-nisme	Réf
PLGA	5-fluorouracil	10-22	35-55	0,05	1	[7]
PLGA	β-oestradiol	10-22	55	1,03-2,61	1	[7]
PLA	Protéine (avidine marquée par rhodamine)	20	35		2	[24]
PDEGDMA	Acide salicylique	20	40	2,7	1	[10]
PDEGDMA	Acide acétylsalicylique	20	40	3,8	1	[10]
Méthyl-β-cyclodextrine	Ibuprofène	13-22	35	4,8-10,8	1 et 2	[23]
Chitosan	Indométhacine	20,7	70	20	1 et 2	[26]
Ethylcellulose	Naproxène		35	1-4	1	[11]
PMMA	Acide hydroxybenzoïque	12-20	40	1,96-2,9	1 et 2	[9]
PMMA	Triflusal	20	35	20-25	1	[27]
PMMA	Triflusal	15-20	35-40	3,6-12 (48 à 96h)	1 et 2	[28]
PMMA	Kétoprofène	10-19	40	8,22-7,43	1	[16]
PMMA	Triflusal	20	35	20	1 et 2	[29]
PVP	Mégéstérole	13	40	0,08	1	[16]
PVP	PDMS/ Nimésulide	16-19	40	8,98-12,75	1	[15]
PVP	Nimésulide	16-19	40	6,48-9,69	1	[16]
PVP	Ibuprofène	8-22	35-45	10-30	1 et 2	[19]

<sup>1</sup>Taux<sub>imp</sub>(%) est le pourcentage massique de principe actif imprégné par rapport à la masse totale (polymère+principe actif)

D'après ces travaux, les variations de pression et de température permettent de contrôler la quantité de principe actif imprégné. De manière générale, les travaux impliquant à la fois un mécanisme de type 1 et un mécanisme de type 2 ont tendance à présenter des taux d'imprégnation plus élevés que dans les cas impliquant soit le mécanisme de type 1, soit le mécanisme de type 2. Cette dernière constatation est assez naturelle dans la mesure où deux effets moteurs de l'imprégnation interviennent.

Comme nous l'avons vu au premier chapitre, l'un des objectifs de ce travail de thèse est l'imprégnation des vecteurs pharmaceutiques sous CO<sub>2</sub> supercritique par un principe actif modèle en l'occurrence, l'acide salicylique (AcS). Le procédé d'imprégnation développé pour ce système s'inspire des deux procédés décrits précédemment (ouvert / fermé). Avant de détailler cette technique, l'étude *in situ* par spectroscopie FTIR de l'imprégnation des vecteurs par l'AcS sous CO<sub>2</sub> supercritique est présentée. Cette étude permettra, d'une part, d'identifier le type de mécanisme d'imprégnation impliqué et, d'autre part, de caractériser la spéciation de l'AcS imprégné (toujours dans le but d'évaluer la solubilisation de l'AcS après relargage).

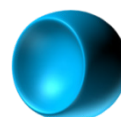
## 2 Imprégnation des particules PNB-POE sous CO<sub>2</sub> supercritique et mécanismes associés

Les vecteurs développés au chapitre 2 sont constitués d'un cœur de PNB et d'une écorce de POE. De même que pour le gonflement sous CO<sub>2</sub> supercritique, l'imprégnation du PNB sous CO<sub>2</sub> supercritique n'a encore jamais été étudiée dans la littérature. Le système POE-CO<sub>2</sub> supercritique a quant à lui été largement rapporté dans la littérature cependant aucune étude sur son imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique n'a été publiée à notre connaissance. Dans le but de caractériser de manière complète l'imprégnation des particules sous CO<sub>2</sub> supercritique, leur étude s'est donc déroulée en trois étapes principales :

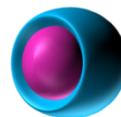
**1. L'imprégnation du PNB seul.**



**2. L'imprégnation du POE seul.**



**3. L'imprégnation des particules PNB-POE.**



Le paragraphe suivant détaille ces trois études.

## 2.1 Etude de l'imprégnation du cœur du vecteur : le PNB



### 2.1.1 Spectre IR de référence du système PNB-AcS-CO<sub>2</sub>

Le montage expérimental est le même que celui décrit dans le chapitre 3 (3.2.1). Un film de PNB est déposé sur une fenêtre de silicium (chapitre 3 – 3.2.2) et cette fois-ci, un excès d'AcS est placé en fond de cellule (20 mg - soit  $5 \text{ g.L}^{-1}$  pour une concentration à saturation de  $0,734 \text{ g.L}^{-1}$ )<sup>4</sup>. D'après le chapitre 3 (4.2.2), la solubilité de l'AcS à température constante est fonction de la pression. De ce fait, les études ont été menées à température constante de  $33^\circ\text{C}$  (température imposée par le vecteur polymère) et pour trois pressions différentes ; 10, 15 et 20 MPa. Dans ces conditions, la densité du  $\text{CO}_2$  est respectivement  $0,632$ ,  $0,814$  et  $0,866 \text{ g.L}^{-1}$  et la solubilité de l'AcS dans le  $\text{CO}_2$  est respectivement de  $2,01$ ,  $2,9$  et  $3,52 \text{ mol.mol}^{-1}$  (soit  $0,268$ ,  $0,734$  et  $0,94 \text{ g.L}^{-1}$ ). La dépressurisation constituant une étape critique vis-à-vis de la structure du matériau polymère (problématique abordée lors de la formation de mousses polymères au chapitre 3), une attention particulière est portée à la vitesse de détente en fin d'expérience : en moyenne  $0,5 \text{ MPa/min}$ .

A titre d'illustration, nous avons reporté sur la Figure 4.5 l'évolution des spectres d'absorption IR d'un film de PNB lors de son imprégnation par l'AcS à  $33^\circ\text{C}$  et 10 MPa.

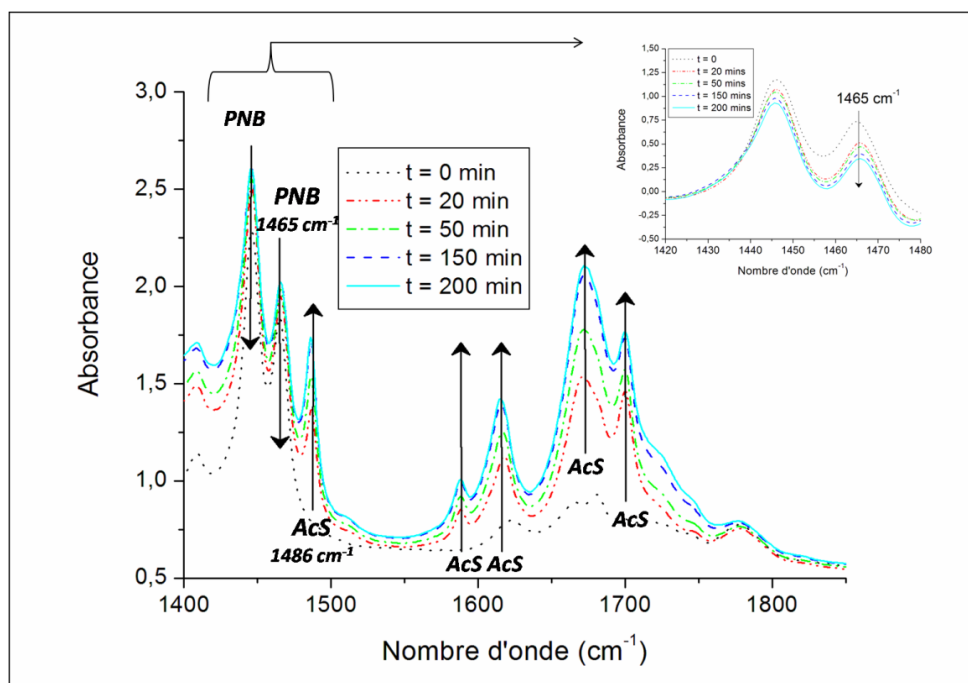


Figure 4.5 : Evolution des spectres IR en fonction du temps d'un film de PNB lors de son imprégnation sous  $\text{CO}_2$  supercritique par de l'AcS à 10 MPa et  $33^\circ\text{C}$ . Zoom sur le pic caractéristique du PNB ( $1465 \text{ cm}^{-1}$ ).

<sup>4</sup> La concentration de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  correspond à la masse d'AcS déposée en fond de cellule sur le volume du réacteur.

Pour chaque expérience, le gonflement du PNB ainsi que son imprégnation par de l'AcS sont respectivement suivis à partir des bandes à  $1465\text{ cm}^{-1}$  et à  $1486\text{ cm}^{-1}$ . On rappelle ici que la bande à  $1486\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique des molécules d'acide salicylique sous forme dimère et monomère confondues et que la bande à  $1465\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique des modes de déformation dans le plan des carbones du cycle d'une unité norbornényle. D'après la Figure 4.5, il est possible d'observer, d'une part, la croissance de la hauteur des pics associés à l'AcS et, d'autre part, la diminution des pics caractéristiques du PNB.

### 2.1.2 Gonflement du PNB lors de son imprégnation par de l'acide salicylique

L'imprégnation de l'AcS dans le film de PNB est possible grâce au gonflement de la matrice polymère par le  $\text{CO}_2$  supercritique (Figure 4.5, zoom en haut à droite). La détermination du gonflement se fait à partir de la formule rappelée ci-dessous :

$$S = \frac{A_0}{A} - 1 \quad \text{Equation 2}$$

où  $A_0$  et  $A$  sont respectivement les hauteurs des pic à  $1465\text{ cm}^{-1}$  avant et après injection de  $\text{CO}_2$ .

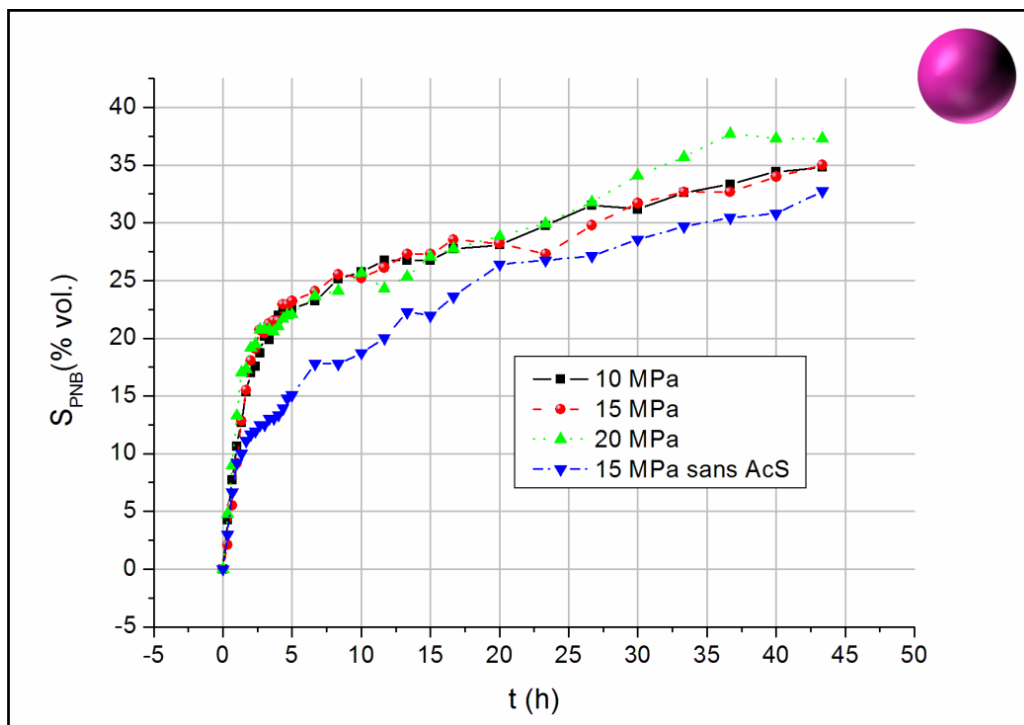


Figure 4.6 : Gonflement de films de PNB lors de leur imprégnation sous  $\text{CO}_2$  supercritique par de l'AcS : 10 MPa, 15 MPa et 20 MPa à  $33^\circ\text{C}$ . Comparaison au gonflement sans AcS.

D'après la Figure 4.6, on remarque que lors de son imprégnation par de l'acide salicylique, le gonflement du PNB suit le même profil qu'en absence d'acide salicylique à

savoir suivant deux cinétiques : une première avec un gonflement rapide durant les trois premières heures où il atteint environ 20% suivie d'une seconde avec un gonflement beaucoup plus lent où il atteint environ 35% au bout de deux jours. Il semblerait que plus la pression augmente, plus le gonflement est important. Cette influence reste cependant minimale dans la mesure où l'expérience réalisée à 20MPa conduit à un gonflement final de l'ordre de 37% alors qu'à 10 et 15 MPa le gonflement atteint est de l'ordre de 35%.

En revanche, il est important de souligner que l'AcS a une influence importante sur le gonflement du PNB et tout particulièrement durant les 10 premières heures de l'imprégnation. En effet, alors que le gonflement de PNB en absence d'AcS n'est que de 15% au bout de 5h, les essais d'imprégnation conduisent à un gonflement du PNB de 25% au bout du même temps. Il est fort probable que l'AcS joue le rôle de plastifiant vis-à-vis des chaînes de PNB et de ce fait accentue le phénomène de gonflement initialement provoqué par la présence de CO<sub>2</sub>. Un phénomène similaire a été observé par López-Periago *et al.* lors de l'imprégnation de PMMA par du triflusal [29]. L'analyse par calorimétrie différentielle à balayage (*Differential Scanning Calorimetry* ou DSC) des échantillons avant et après imprégnation montre une diminution remarquable de la T<sub>g</sub> de l'ordre de 70K attribuée à un effet plastifiant des molécules de triflusal dispersées dans la matrice de PMMA.

Suite à la détermination du gonflement du PNB lors de son imprégnation par de l'AcS, le taux de principe actif imprégné a été déterminé. Ces résultats sont présentés au paragraphe suivant.

### 2.1.3 Imprégnation du PNB seul par de l'acide salicylique

Au regard de la Figure 4.5, on remarque clairement que la hauteur des pics caractéristiques de l'AcS augmente au cours du temps. L'estimation de la quantité d'AcS imprégnée a été évaluée au regard de la bande à 1486 cm<sup>-1</sup> à partir de la loi de Beer Lambert et de l'Equation 3 :

$$x_{AcS} (\%mass.) = \frac{c_{gAcS/cm^3}}{c_{gAcS/cm^3} + \frac{\rho_{PNB}}{1+S}} \quad \text{Equation 3}$$

où  $c$  est la concentration en g d'AcS par cm<sup>3</sup> de PNB,  $\rho_{PNB}$  est la densité du PNB à  $T_{amb}$  et  $P_{amb}$  (0,95 g/cm<sup>3</sup>)<sup>[30]</sup> et  $S$  est son gonflement (Figure 4.7). On rappelle que le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{1486}$  utilisé a été calculé au chapitre 3 – 4.1 et est évalué à 190,7 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

Tout comme pour le gonflement du PNB sous  $\text{CO}_2$  supercritique, l'imprégnation de PNB sous  $\text{CO}_2$  supercritique présente deux régimes. Suite à l'imprégnation rapide du PNB durant les 3 premières heures (à raison de 0,1 % massique d'AcS/ min), l'insertion d'acide salicylique continue très lentement (0,001 % massique d'AcS/ min). Ainsi, il est possible d'imprégner 15% massique d'acide salicylique dans un film de PNB après 43 heures sous  $\text{CO}_2$  supercritique. La poursuite de l'expérience pendant 47 heures supplémentaires (~ 4 jours au total) permet d'atteindre 19% en masse (Figure 4.7, courbe à 15 MPa).

Il est aussi important de noter que le taux d'AcS imprégné ne dépend pas de la pression. Il semblerait alors que la solubilisation de l'AcS dans le  $\text{CO}_2$  supercritique ne soit pas le paramètre déterminant de l'imprégnation du PNB. Des hypothèses sur le mécanisme d'imprégnation seront développées au paragraphe 2.1.4 de ce chapitre.

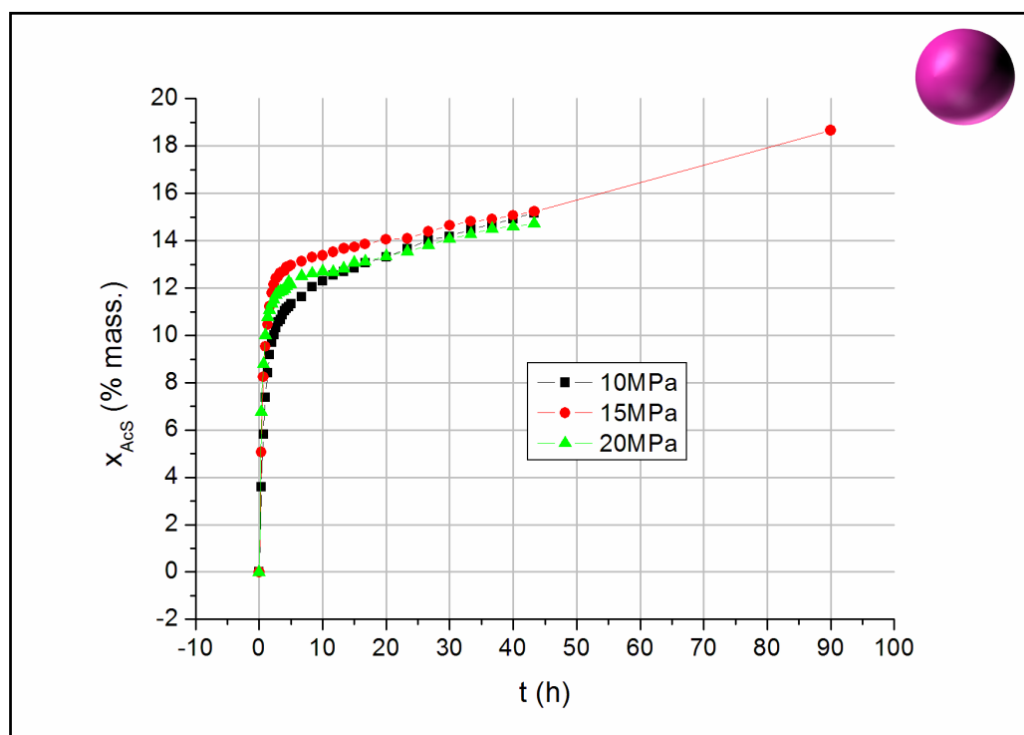


Figure 4.7 : Profils d'imprégnation d'acide salicylique sous  $\text{CO}_2$  supercritique dans un film de PNB à 33 °C et 10 MPa, 15 MPa et 20 MPa.

Le  $\text{CO}_2$  supercritique peut être utilisé comme solvant d'extraction pour purifier certains polymères (de résidus de solvants, de monomères, de catalyseurs...) [6, 31]. Les propriétés du  $\text{CO}_2$  supercritique utilisées pour ce type de procédés sont les mêmes que pour l'imprégnation : la possibilité de gonfler des matrices polymères, de solubiliser certains composés et de les faire diffuser au travers des matrices... Il apparaît donc possible que lors de l'étape de dépressurisation, on puisse désorber les espèces initialement imprégnées.

La Figure 4.8 présente ainsi la comparaison des spectres IR d'un film de PNB imprégné par de l'AcS sous CO<sub>2</sub> supercritique à 15MPa et 33°C avant et après dépressurisation.

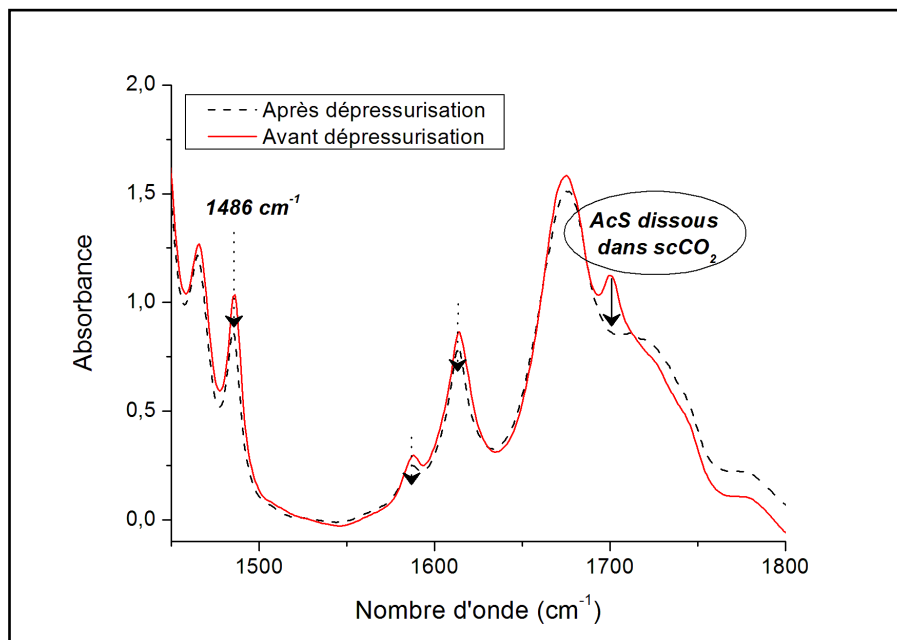


Figure 4.8 : Spectres IR d'un film de PNB avant et après dépressurisation.

La comparaison de ces spectres permet de remarquer que peu d'acide salicylique est extrait du PNB durant l'étape de dépressurisation. En effet, les pics associés à l'AcS imprégné voient leur intensité diminuer faiblement après dépressurisation. Nous avons ainsi estimé le rendement d'extraction à environ 3 % massique d'acide salicylique imprégné. Dans le cas du film traité à 15 MPa et 33°C durant 90h on trouve alors qu'après dépressurisation le film de PNB est plus exactement imprégné de 15% en masse d'AcS. Les films ainsi dépressurisés ont ensuite été analysés par Analyse Thermo Gravimétrique (ATG) (Figure 4.9). Cette dernière analyse a permis de confirmer les premiers résultats obtenus par spectroscopie FTIR. En effet, si l'on considère de nouveau le cas du film traité à 15 MPa et 33°C pendant 90h, on retrouve bien les 15% d'AcS imprégnés.



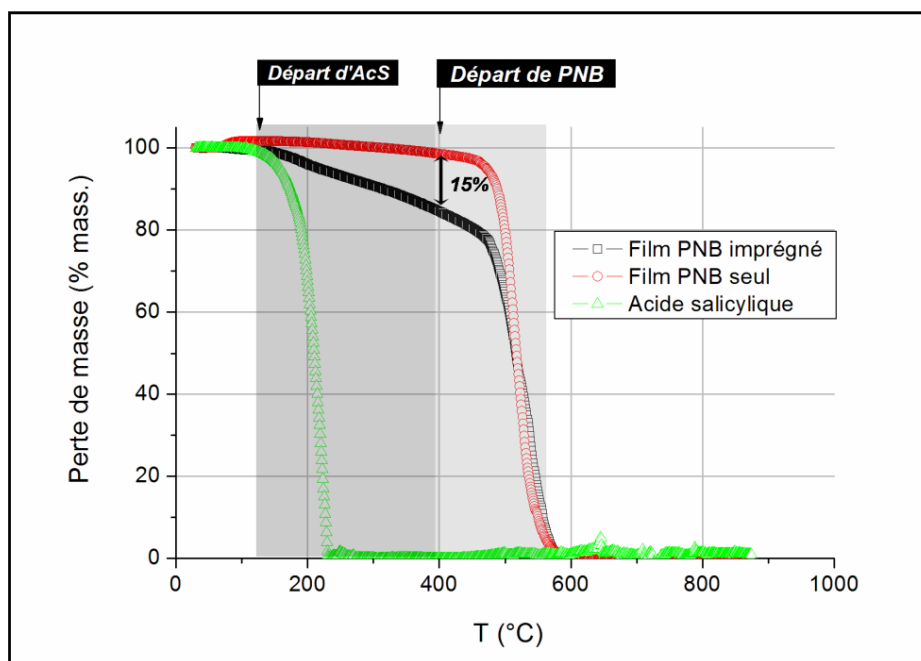


Figure 4.9 : ATG du film de PNB imprégné (15 MPa - 33°C - 90 h).

Cette première étude du PNB seul a, d'une part, révélé qu'il était possible d'imprégner le PNB avec 15% massique d'acide salicylique et, d'autre part, que ce taux d'imprégnation ne dépend pas de manière significative de la pression de travail. De ce fait, toutes les études suivantes ont été menées à 15MPa.

Dans le but de maîtriser la cinétique de solubilisation *in vivo* de l'AcS, une étude de la spéciation de l'AcS lors de son imprégnation dans le PNB a été menée et est exposée ci-dessous.

#### 2.1.4 Spéciation de l'acide salicylique imprégné dans un film de PNB

Lors du suivi *in situ* de l'imprégnation d'un film de PNB, le faisceau IR traverse la cellule haute pression. Sur le trajet optique, il rencontre le film de PNB, l'AcS imprégné dans le film, le CO<sub>2</sub> supercritique et l'AcS dissous dans le CO<sub>2</sub>. Afin d'éliminer les signaux du polymère gonflé et de l'acide salicylique dissous dans le fluide, à chaque spectre expérimental (Figure 4.5) est successivement soustrait le spectre du CO<sub>2</sub> supercritique saturé par de l'acide salicylique seul et le spectre du PNB gonflé par le CO<sub>2</sub> supercritique seul. Les spectres résultants sont exposés en Figure 4.10.

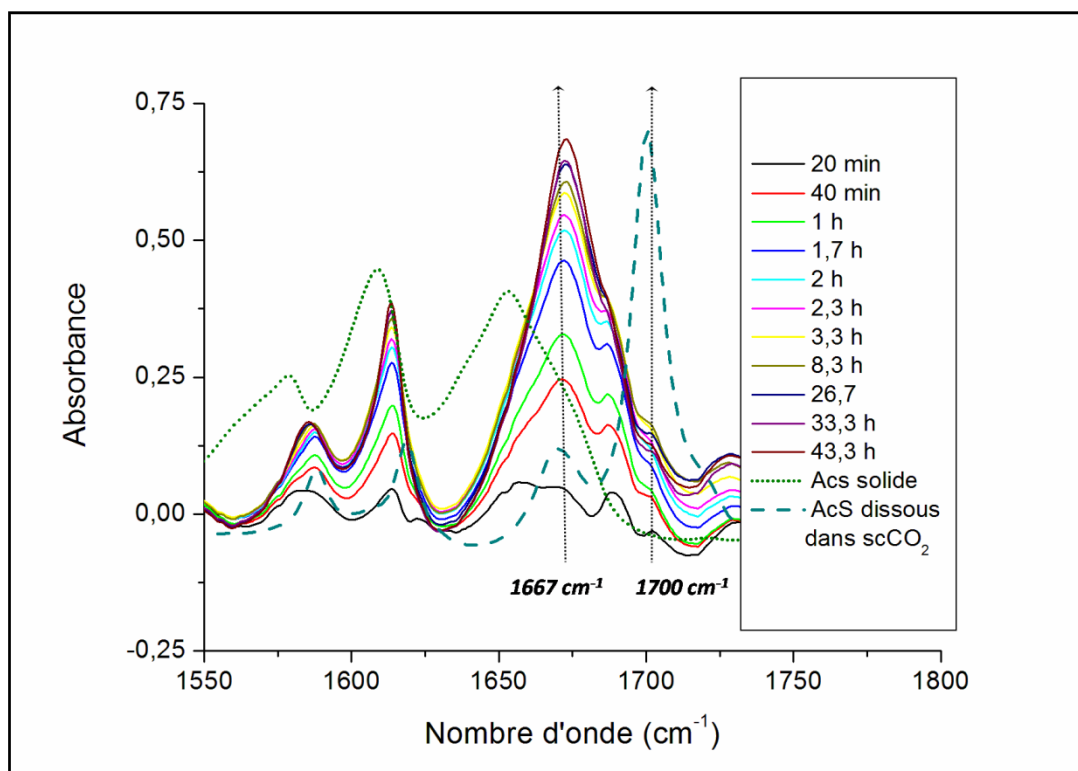


Figure 4.10 : Spectres IR : spectre du PNB imprégné - spectre du PNB gonflé - spectre du CO<sub>2</sub> saturé en AcS. Superposition avec les spectres de l'AcS seul dissous dans le CO<sub>2</sub> supercritique et de l'AcS solide.

La comparaison de l'ensemble des spectres de l'AcS imprégné dans le PNB, de l'AcS solide et de l'AcS seul dissous dans le CO<sub>2</sub> supercritique permet d'appréhender l'organisation moléculaire de l'AcS. D'une part, il apparaît clairement que l'AcS imprégné ne s'organise pas de la même façon que l'AcS solide cristallin. D'autre part, alors que l'AcS dissous dans le CO<sub>2</sub> supercritique présente deux pics (1700 cm<sup>-1</sup> et 1667 cm<sup>-1</sup>) respectivement caractéristiques des espèces monomère et dimère, on remarque que la bande principale de l'AcS imprégné dans le PNB est centrée vers 1667 cm<sup>-1</sup> montrant ainsi que l'AcS imprégné se trouve principalement sous la forme de dimère cyclique. Cependant, la largeur de cette bande est plus importante que celle observée pour les dimères solubilisés dans le CO<sub>2</sub> supercritique. Plus particulièrement, en zoomant sur la bande (1600-1720 cm<sup>-1</sup>), on aperçoit l'apparition d'un nouveau pic à 1688 cm<sup>-1</sup> (Figure 4.12). Lors de la solubilisation de l'acide acétique dans le CO<sub>2</sub> supercritique, Fujii *et al.* ont observé une bande intermédiaire (1722 cm<sup>-1</sup>) entre la bande caractéristique de l'acide acétique monomère (1767 cm<sup>-1</sup>) et celle de l'acide acétique dimère (1715 cm<sup>-1</sup>) [32, 33]. Cette bande est attribuée à l'agencement de molécules d'acide acétique sous forme de dimères associées par une liaison hydrogène. Ils sont appelés dimères linéaires en opposition aux dimères cycliques correspondant à l'association des molécules par deux liaisons hydrogène (Figure 4.11).

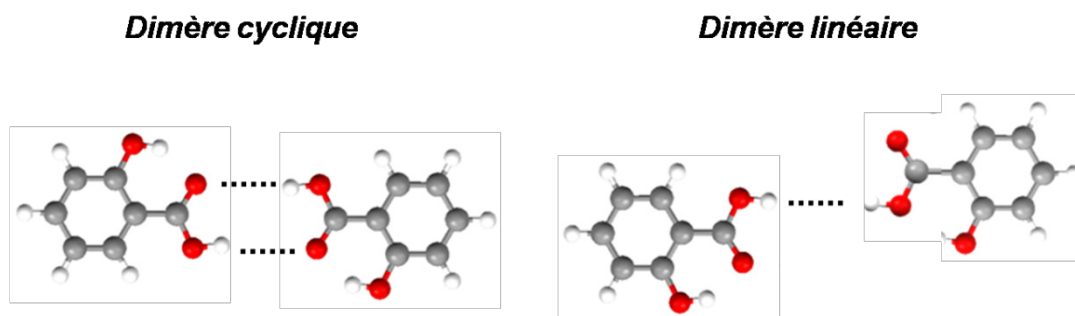


Figure 4.11 : Représentation de l'association par liaisons hydrogène de molécules d'acide salicylique sous forme de dimères cycliques ou linéaires.

Le décalage entre la bande à  $1688\text{ cm}^{-1}$  et la bande caractéristique du dimère de l'AcS est du même ordre de grandeur que celui observé entre les bandes de l'acide acétique caractéristiques des dimères cycliques et linéaires. Par conséquent, il est fort probable que le pic à  $1688\text{ cm}^{-1}$  corresponde à l'agencement de molécules d'AcS sous forme de dimères linéaires.

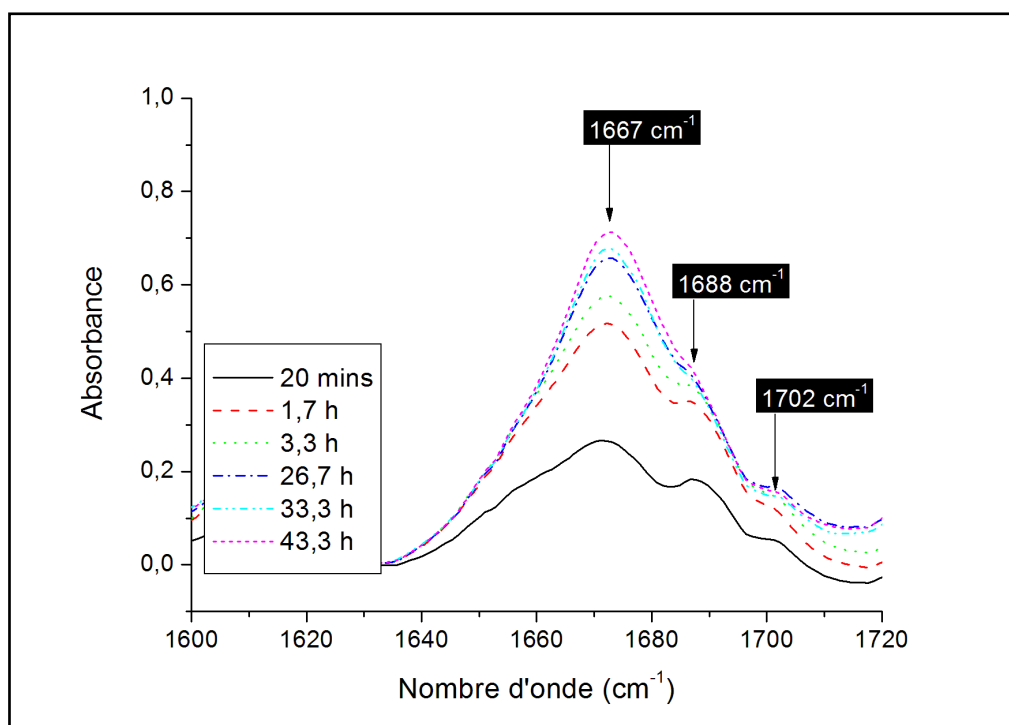


Figure 4.12 : Spectres IR : spectre du PNB imprégné - spectre du PNB gonflé - spectre du  $\text{CO}_2$  supercritique saturé en AcS. Zoom sur le domaine spectral  $1600\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ .

Suite à la déconvolution des spectres résultant de la soustraction, l'aire des pics (AcS monomère, AcS dimère) a pu être déterminée et de ce fait, la quantité d'AcS propre à chacune de ces espèces a pu être évaluée (Figure 4.13).

Les formules permettant ce calcul sont rappelées ci-dessous :

$$A_m = \varepsilon_m . I . [AcS] \quad A_d = \varepsilon_d . I . [(AcS)_2] \quad \text{Equation 4}$$

$$c(AcS) = [AcS] + 2[(AcS)_2] \quad \text{Equation 5}$$

*Remarque 1: on rappelle que les coefficients  $\varepsilon_m$  et  $\varepsilon_d$  ont été déterminés au chapitre 3 (4.1) et sont respectivement évalués à 15000 et 21700 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>.*

*Remarque 2: l'aire du pic caractéristique du dimère linéaire étant très faible, elle a été négligée et seul le dimère cyclique a été pris en compte dans le calcul.*

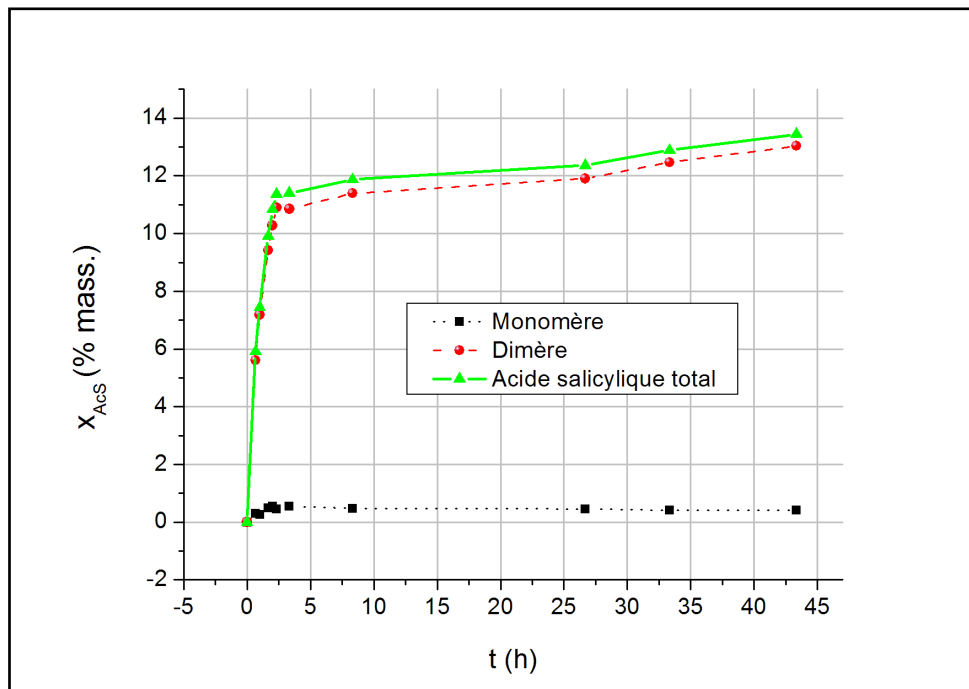


Figure 4.13 : Profil d'imprégnation d'acide salicylique sous CO<sub>2</sub> supercritique dans un film de PNB à 15 MPa et 33°C: AcS monomère, AcS dimère et AcS total.

Cette étude confirme les résultats obtenus à partir de la bande à 1486 cm<sup>-1</sup> selon laquelle le PNB peut être imprégné sous CO<sub>2</sub> supercritique par environ 15% en masse d'AcS au bout de 43 heures. Au regard de la Figure 4.13 on remarque que l'AcS est imprégné presque uniquement sous forme dimère. Il apparaît donc ici clairement que l'AcS ne s'imprègne pas dans le PNB en raison d'interactions avec celui-ci et que le mécanisme d'imprégnation impliqué est plutôt de type 1. Plus précisément, lors du gonflement du PNB par le CO<sub>2</sub>, l'AcS diffuse au sein de la matrice et va petit à petit s'accumuler dans le PNB.

Cependant, n'ayant pas d'affinités particulières avec le polymère, il va préférer s'associer sous forme de dimère. Comme nous l'avons vu au chapitre 3 lors de l'étude de la solubilisation de l'AcS dans le CO<sub>2</sub> supercritique, l'espèce dimère de l'AcS est peu soluble (pic du dimère moins intense que celui du monomère). De ce fait, le dimère formé dans le PNB n'est pas extrait de la matrice lors de l'étape de dépressurisation expliquant ainsi la faible perte d'AcS au cours de cette dernière étape.

**En résumé, d'après l'étude de l'imprégnation de PNB seul sous CO<sub>2</sub> supercritique il est possible d'insérer jusqu'à 15% en masse d'acide salicylique dans le matériau de cœur des particules et ce, indépendamment de la pression appliquée (calcul tenant compte de la dépressurisation). L'analyse de l'état de spéciation de l'AcS dans le PNB révèle la présence d'espèces imprégnées uniquement sous forme de dimère et permet de conclure sur un mécanisme d'imprégnation de type 1. Cette dernière information présage une solubilisation aisée du principe actif dans le sang suite à sa libération par le vecteur.**

## 2.2 Etude de l'imprégnation de l'écorce du vecteur : le POE



Les particules sont constituées d'un cœur de PNB et d'une écorce de POE. Nous venons de voir qu'il est possible d'imprégner le cœur de PNB avec 15% massique d'AcS sous forme de dimère. Contrairement au PNB, le comportement du POE dans le CO<sub>2</sub> supercritique a fait l'objet de nombreuses études. On sait ainsi qu'à 15MPa et 35°C, le CO<sub>2</sub> peut gonfler le POE de 35% (pour des masses molaires allant de 1500 à 8000 g.mol<sup>-1</sup>). Comme nous l'avons vu au chapitre 1, le POE est un polymère largement utilisé dans le domaine du biomédical pour deux raisons : d'une part, il permet de par son hydrophilicité d'améliorer la solubilité de certains principes actifs dans les milieux physiologiques et, d'autre part, il est difficilement reconnu par le système immunitaire. De ce fait, il est principalement utilisé en tant que matériau d'écorce et est intégré au système (principe actif ou vecteur) soit par greffage, soit par adsorption. De ce fait, les principaux travaux mettant en œuvre le POE sous FSC pour des applications biomédicales reposent sur des procédés de co-précipitation<sup>[34]</sup> et, à notre connaissance, aucune étude de l'imprégnation du POE par de l'AcS n'a été recensée. Il est ainsi intéressant d'évaluer comment s'imprègne l'AcS dans le POE seul sous CO<sub>2</sub> supercritique avant d'étudier l'imprégnation des particules.

### 2.2.1 Spectre IR de référence du système POE-AcS-CO<sub>2</sub>

Les premiers films de POE ont été réalisés à partir d'un POE commercial de 5000 g.mol<sup>-1</sup>. Lorsque le film est mis en contact avec du CO<sub>2</sub> à 15 MPa et 33°C, le film fond et disparaît du faisceau. D'après Weidner *et al.*, le CO<sub>2</sub> supercritique a tendance à abaisser la température de fusion d'un polymère (T<sub>f</sub>): T<sub>f</sub> (POE<sub>1500 g/mol</sub>) passe de 45°C à 36°C lorsqu'il est soumis à 23,5 MPa de CO<sub>2</sub> [35]. Il est donc fort probable que dans les conditions expérimentales que nous avons fixées (15 MPa, 33°C), le POE ait déjà commencé à fondre.

La température de fusion d'un POE augmentant avec sa masse molaire, de nouveaux films ont été réalisés à partir de POE de différentes masses molaires (5000-35000-1000000 g.mol<sup>-1</sup>). Seuls les films de POE<sub>1 000 000g/mol</sub> n'ont pas fondu sous CO<sub>2</sub> supercritique (15 MPa – 33°C). Les particules développées au chapitre 2 sont synthétisées à partir de POE de masses molaires allant de 2000 g.mol<sup>-1</sup> à 8000 g.mol<sup>-1</sup>. Weidner *et al.* ont montré que la masse molaire d'un POE n'influait pas le gonflement de ce polymère sous CO<sub>2</sub> supercritique pour des masses molaires allant de 1500 à 8000 g.mol<sup>-1</sup> [35]. Le POE<sub>1000000</sub> est bien au-dessus de ces masses molaires. Cependant, les interactions susceptibles d'exister entre l'AcS et un POE<sub>5000</sub> ou un POE<sub>1000000</sub> sont probablement les mêmes et l'étude de ce film peut permettre alors d'appréhender la spéciation de l'acide salicylique imprégné dans le POE. Ainsi, pour l'étude de l'imprégnation du POE par de l'AcS, un film de POE de masse molaire 1 000 000 g.mol<sup>-1</sup> est déposé sur une fenêtre en silicium (chapitre 3 – 3.2.2) et un excès d'acide salicylique est placé en fond de cellule (20 mg).

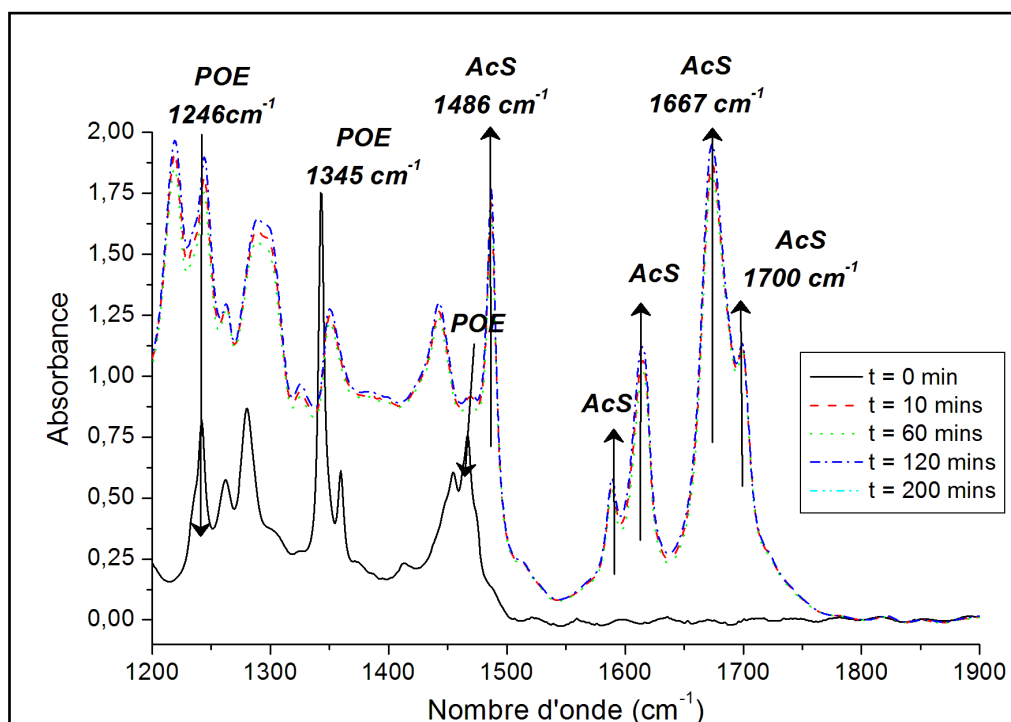


Figure 4.14 : Evolution des spectres IR en fonction du temps d'un film de POE<sub>1 000 000</sub> lors de son imprégnation par de l'AcS sous CO<sub>2</sub> supercritique à 15MPa et 33°C.

Pour chaque expérience, le gonflement du POE est évalué au regard de la bande  $1246\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques du POE et l'imprégnation par l'acide salicylique est quantifiée au regard de la bande à  $1486\text{ cm}^{-1}$  (Figure 4.14). Chaque expérience est réalisée à 15 MPa et  $33^\circ\text{C}$ .

L'étude de ces spectres IR a permis de déterminer le gonflement du POE lors de son imprégnation par l'AcS, le taux d'AcS imprégné ainsi que son état de spéciation.

### 2.2.2 Gonflement du POE durant son imprégnation

D'après la Figure 4.14, on voit que l'imprégnation d'un film de POE atteint un équilibre dès les 10 premières minutes. Tout d'abord, au regard des bandes caractéristiques du POE, on remarque que leur absorbance diminue durant les dix premières minutes puis, se stabilise. A partir de la hauteur du pic à  $1246\text{ cm}^{-1}$ , l'évaluation du gonflement du POE en fonction du temps a pu être effectuée (Figure 4.15) et montre qu'à 15 MPa et  $33^\circ\text{C}$ , le  $\text{POE}_{1000000}$  peut être gonflé jusqu'à environ 38%. Ce résultat est très proche des évaluations de la littérature sur le gonflement du POE seul dans le  $\text{CO}_2$  supercritique dans les mêmes conditions (35%) et tend à montrer que les résultats de Weidner selon lesquels la gonflement du POE ne varie pas avec la masse molaire peuvent être appliqués pour des masses molaires de POE allant jusqu'à  $1000000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

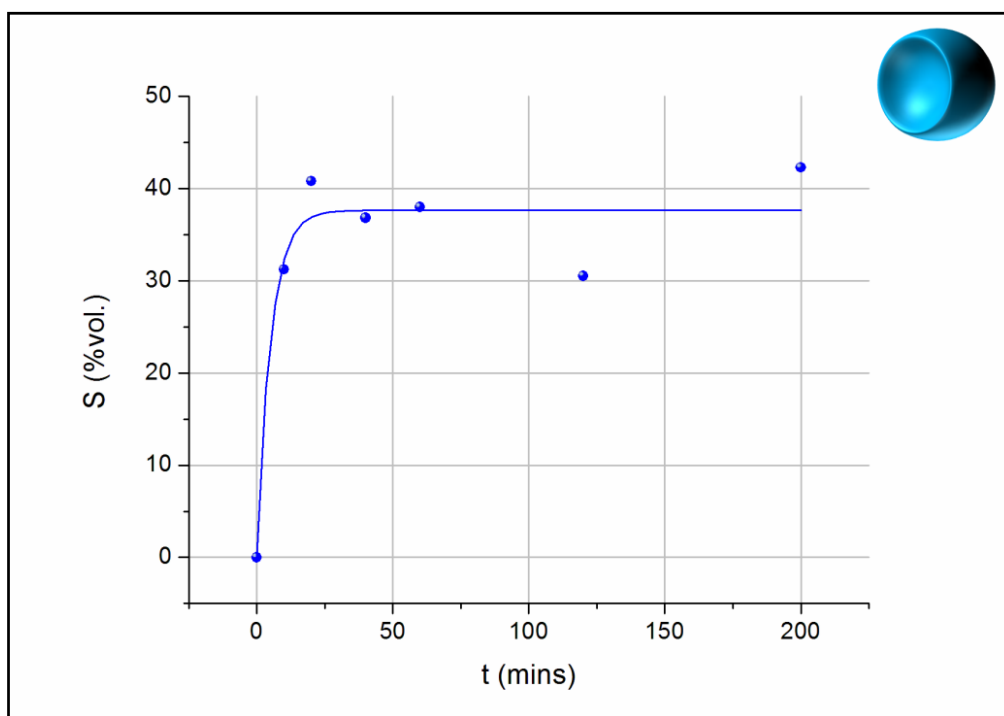


Figure 4.15 : Profil du gonflement d'un film de POE lors de son imprégnation sous  $\text{CO}_2$  supercritique (15MPa –  $33^\circ\text{C}$ ) par de l'AcS. Mesure à partir des bandes à  $1242\text{ cm}^{-1}$ .

Il est aussi à noter que le pic à  $1345\text{ cm}^{-1}$  caractéristique du POE disparaît complètement. Le POE étant un polymère semi-cristallin, son traitement sous  $\text{CO}_2$  supercritique à  $33^\circ\text{C}$  peut conduire à une transition d'un état cristallin vers un état liquide-

visqueux pouvant justifier la disparition de certains pics caractéristiques (voir remarque ci-dessous).

*Remarque : Le PNB ( $T_g \sim 35^\circ\text{C}$ ) étant un polymère amorphe, l'application de  $\text{CO}_2$  supercritique induit un abaissement de sa température de transition vitreuse c'est-à-dire, octroie aux chaînes polymères plus de mobilité entre elles pour des températures plus faibles. Malgré tout, à l'état caoutchoutique comme à l'état amorphe, les chaînes polymères sont en interaction. Dans le cas du POE ( $T_g \sim 37^\circ\text{C}$ ,  $T_f \sim 65^\circ\text{C}$ ), l'application de  $\text{CO}_2$  supercritique a tendance à abaisser la température de fluidification ( $T_f$ ). En d'autres termes, le POE est susceptible de passer à l'état liquide-visqueux pour des températures plus basses. Le passage à l'état fluide apparaissant lorsque les chaînes deviennent statistiquement indépendantes, on comprend donc que dans le premier cas il n'y ait pas de déplacement des bandes caractéristiques alors que dans le second, certaines sont amenées à disparaître.*

### 2.2.3 Imprégnation du POE seul par de l'acide salicylique

De la même façon que pour le PNB, le taux d'acide salicylique imprégné dans la matrice de POE a été déterminé au regard de la bande de l'AcS à  $1486\text{ cm}^{-1}$  (formes monomère et dimère).

$$x_{AcS}(\%mass.) = \frac{c_{gAcS/cm^3}}{c_{gAcS/cm^3} + \frac{\rho_{POE}}{1+S}} \quad \text{Equation 6}$$

où  $c$  est la concentration en gramme d'AcS par  $\text{cm}^3$  de POE,  $\rho_{POE}$  est la densité du POE à  $T_{amb}$  et  $p_{amb}$  ( $1,2\text{ g.cm}^{-3}$ ) (données Sigma Aldrich) et  $S$  est son gonflement.

Les résultats sont présentés en (Figure 4.16). Là encore, on remarque que l'imprégnation du film de  $\text{POE}_{1000000}$  est quasiment instantanée. Ainsi, dès les premières minutes qui suivent l'ajout de  $\text{CO}_2$  supercritique, 45% en masse d'acide salicylique ont été imprégnés dans le film de POE.



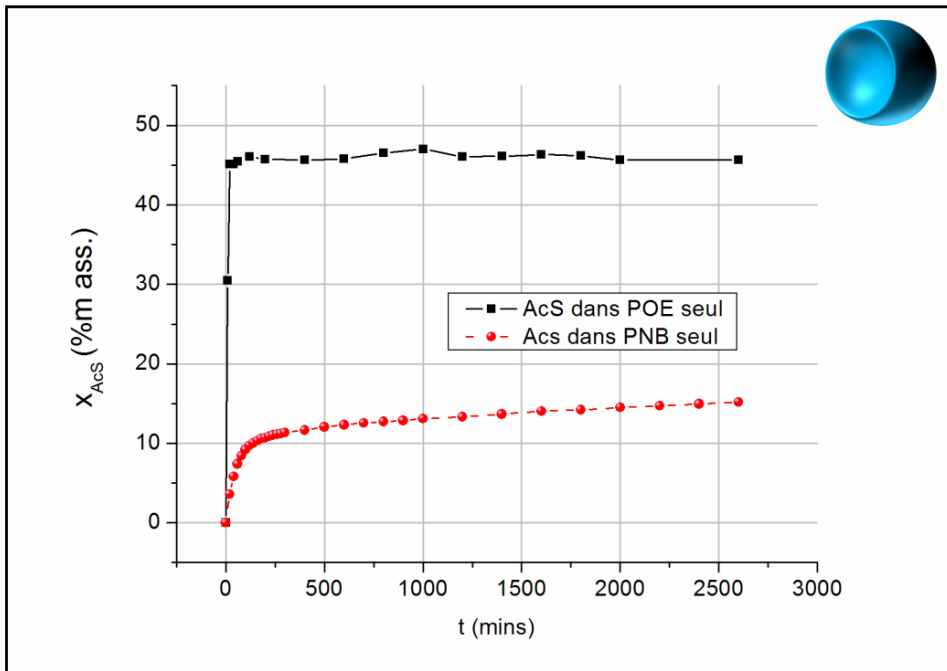


Figure 4.16 : Profil d'imprégnation d'AcS sous  $CO_2$  supercritique dans un film de POE à 15 MPa et 33°C. Comparaison avec l'imprégnation d'un film de PNB à 15 MPa et 33°C.

La comparaison des spectres IR juste avant et juste après dépressurisation témoigne (tout comme il a avait été observé dans le cas du PNB) d'une légère extraction d'AcS lors de la détente. En effet, les pics associés à l'AcS imprégné voient leur intensité diminuer faiblement après dépressurisation (Figure 4.17). Nous avons ainsi estimé le rendement d'extraction à environ 7 % massique d'acide salicylique imprégné.

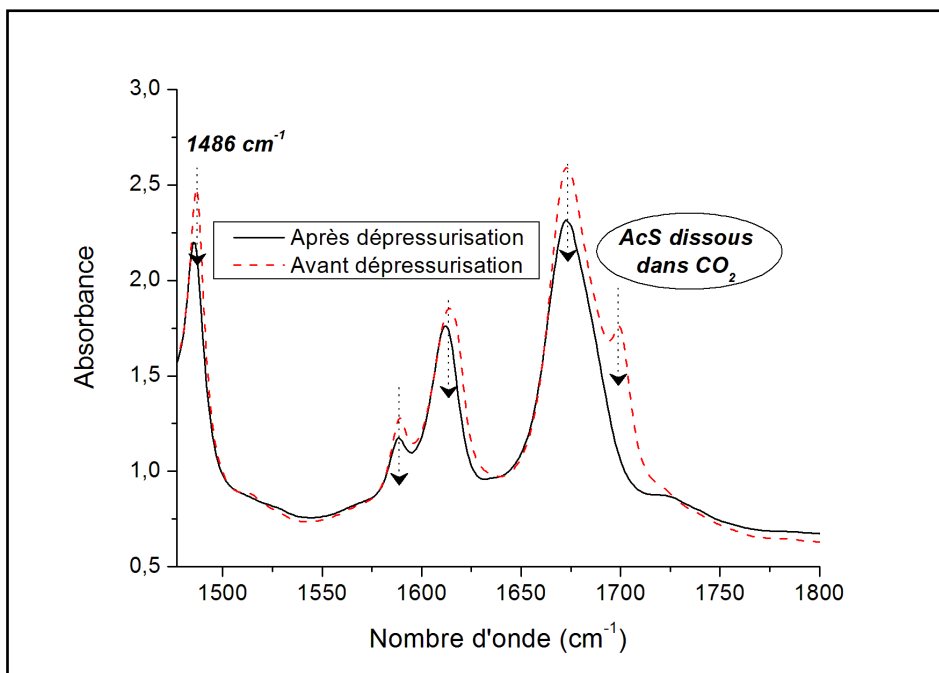


Figure 4.17 : Spectres IR d'un film de POE avant et après dépressurisation.

Ainsi, après dépressurisation, on récupère un film de POE imprégné avec environ 40 % d'AcS.

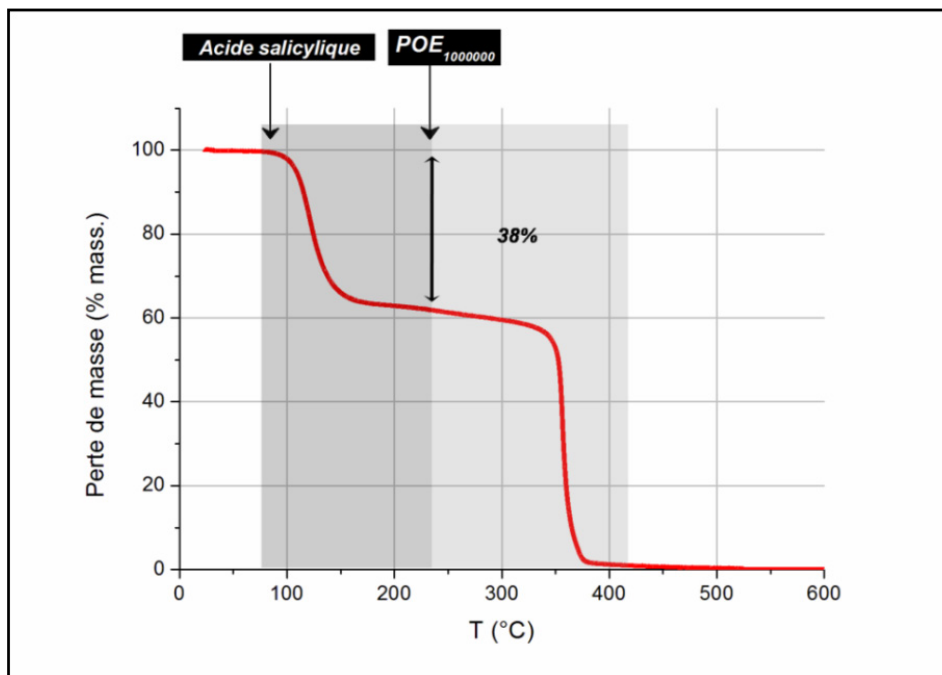


Figure 4.18 : Courbe ATG d'un film de POE imprégné par de l'acide salicylique sous  $\text{CO}_2$  supercritique à 15 MPa-33°C.

Ces résultats sont confirmés par l'analyse par ATG qui détecte environ 38 % en masse d'AcS dans ce film (Figure 4.18). Cette valeur est largement supérieure à celle atteinte avec un film de PNB.

**D'après cette première étude du POE seul sous  $\text{CO}_2$  supercritique, il est possible d'imprégner 38% en masse d'acide salicylique à 15 MPa et 33°C.**

Toujours dans le but de maîtriser la cinétique de solubilisation *in vivo* de l'AcS, une étude plus poussée de la spéciation de l'AcS lors de son imprégnation dans le POE a été menée.

#### 2.2.4 Spéciation de l'acide salicylique dans un film de POE

Tout comme dans le cas du PNB, lorsque le faisceau IR traverse la cellule haute pression, il rencontre sur son trajet optique le polymère gonflé, l'AcS imprégné dans le film, le  $\text{CO}_2$  et l'AcS dissous dans le  $\text{CO}_2$ . Afin d'évaluer la signature spectrale de l'AcS seul imprégné dans le POE, la soustraction de ces signaux doit être effectuée. On note tout de même que le spectre du POE seul ne présente pas de bandes caractéristiques dans la zone spectrale des formes dimère et monomère de l'AcS (Figure 4.14,  $t=0\text{min}$ ) et qu'il n'est donc

pas nécessaire de le soustraire au spectre du POE imprégné. La soustraction des spectres de POE à différents temps d'imprégnation par le spectre d'AcS dissous à 15 MPa et 33°C est présentée en (Figure 4.19).

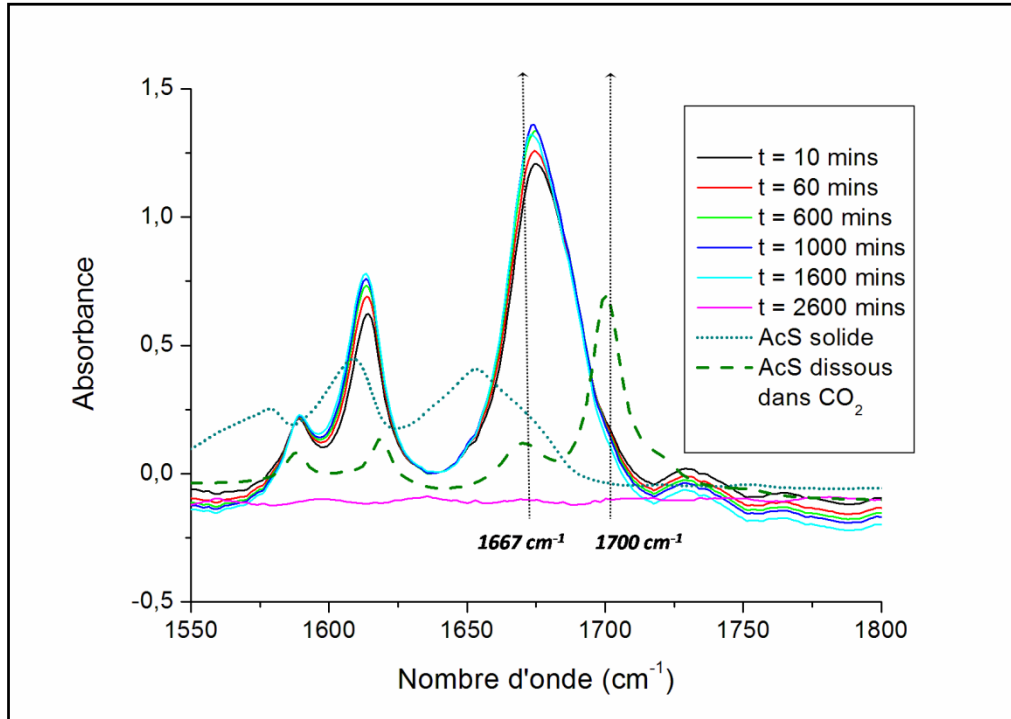


Figure 4.19 : Spectres IR: spectre du POE imprégné - spectre du CO<sub>2</sub> saturé en AcS. Zoom sur la fenêtre 1600-1720 cm<sup>-1</sup>.

D'après la comparaison de l'ensemble des spectres de l'AcS imprégné dans le POE avec les spectres de l'AcS solide et dissous dans le CO<sub>2</sub> supercritique, l'AcS imprégné dans le POE est uniquement présent sous forme de dimère. Le mécanisme d'imprégnation impliqué est donc probablement de type 1.

Suite à l'évaluation du pic caractéristique de l'AcS et par l'intermédiaire des formules rappelées ci-dessous, la quantité d'AcS a pu être de nouveau évaluée (Figure 4.20):

$$A_m = \varepsilon_m \cdot l \cdot [AcS] \quad A_d = \varepsilon_d \cdot l \cdot [(AcS)_2] \quad \text{Equation 7}$$

$$c(AcS) = [AcS] + 2[(AcS)_2] \quad \text{Equation 8}$$

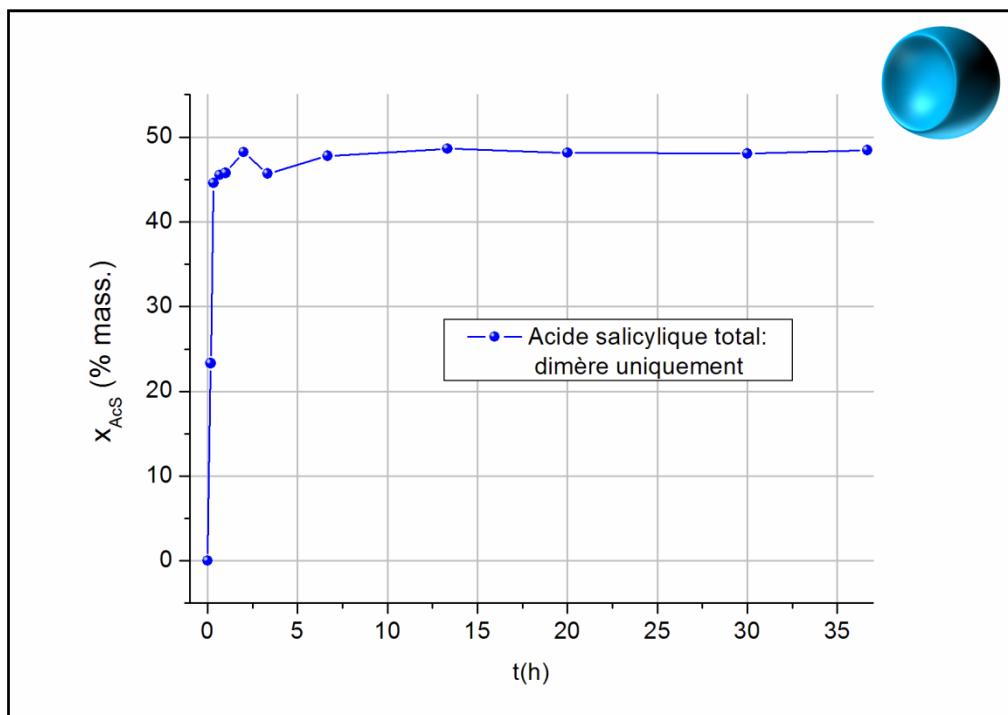


Figure 4.20 : Profil d'imprégnation de l'acide salicylique dans le POE sous  $CO_2$  supercritique à 15 MPa et 33°C: l'AcS est uniquement sous forme dimère.

Ici encore on remarque que lors de l'imprégnation du film de POE par l'AcS, le taux d'AcS imprégné au cours du temps atteint un palier très rapidement. Cette étude confirme les résultats obtenus à partir de la bande à  $1486\text{ cm}^{-1}$  selon laquelle le POE peut être imprégné sous  $CO_2$  supercritique par environ 45% d'AcS, soit environ 38% après dépressurisation.

**Lors de son imprégnation par de l'AcS sous  $CO_2$  supercritique, le  $POE_{1000000}$  seul gonfle d'environ 37% et peut encapsuler jusqu'à 38% massique d'acide salicylique (calcul tenant compte de la dépressurisation). Cette imprégnation est très rapide (maximum atteint au bout de 10 minutes) et conduit comme dans le cas du PNB à l'organisation des molécules d'AcS sous forme de dimère. Cette dernière information nous permet de conclure sur un mécanisme d'imprégnation de type 1.**

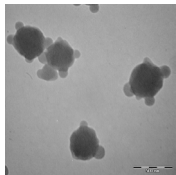
Les profils d'imprégnation par de l'acide salicylique sous  $CO_2$  supercritique des polymères constitutifs des particules ont été déterminés. Le paragraphe suivant s'intéresse au cas général des particules et détaille le suivi *in situ* par spectroscopie FTIR de leur imprégnation.

## 2.3 Etude de l'imprégnation des particules PNB-POE



Les particules choisies pour l'étude *in situ* de l'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique sont celles du lot O2, point au centre du plan d'expériences (chapitre 2 – 2.3.3.4), et leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 4.2.

**Tableau 4.2 : Caractéristiques des particules choisies pour le suivi *in situ* de l'imprégnation par de l'AcS sous CO<sub>2</sub> supercritique.**

<i>Essai</i>	<i>AR</i> % m.	<i>AS</i> % m.	<i>L</i> g/mol	<i>Conv AS</i> % m.	<i>AS<sub>final</sub></i> <sup>1</sup> %m.	<i>Conv AR</i> % m.	<i>TEM</i>	<i>Dn<sub>TEM</sub></i> (nm) <i>PDI<sub>TEM</sub></i>
<b>O2</b>	5	30	5000	53	20	86		382 +/- 45 PDI = 0,055

<sup>1</sup> Pourcentage de NB-POE (AS) par rapport à la masse totale (NB+NB-POE) calculé à partir de la Conv AS.

Comme dans le cas des polymères, un film de particules est déposé sur une fenêtre de silicium. Ce film est préparé par « live spin coating » (chapitre 3 – 3.2.2) directement à partir du latex (sans dissolution supplémentaire). Pour chaque expérience, ce film est placé dans la cellule haute pression avec un excès d'acide salicylique (20 mg).

### 2.3.1 Spectre IR des particules PNB-POE imprégnées

Le gonflement des particules avait été appréhendé au chapitre 3. En raison d'un trop grand nombre de pics dans les zones spectrales caractéristiques des polymères (POE et PNB), il n'avait pas pu être déterminé. Les particules O2 sont constituées d'une écorce de POE de 5000 g.mol<sup>-1</sup>. D'après les données de la littérature, tout POE dont la masse molaire est comprise entre 1500 et 8000 g.mol<sup>-1</sup> peut être gonflé de 35% par le CO<sub>2</sub> supercritique à 15 MPa et 33°C. Cette valeur a encore une fois été confirmée lors de l'étude de l'imprégnation du POE<sub>1000000</sub>. De même, dans le chapitre 3 le gonflement du PNB dans les mêmes conditions a été étudié et évalué de l'ordre de 35% aussi. Ainsi, nous avons fait l'hypothèse que le gonflement des particules sous CO<sub>2</sub> supercritique est de 35%. Le taux d'AcS imprégné au cours du temps a été déterminé à partir de la bande à 1486 cm<sup>-1</sup> (Figure 4.21).

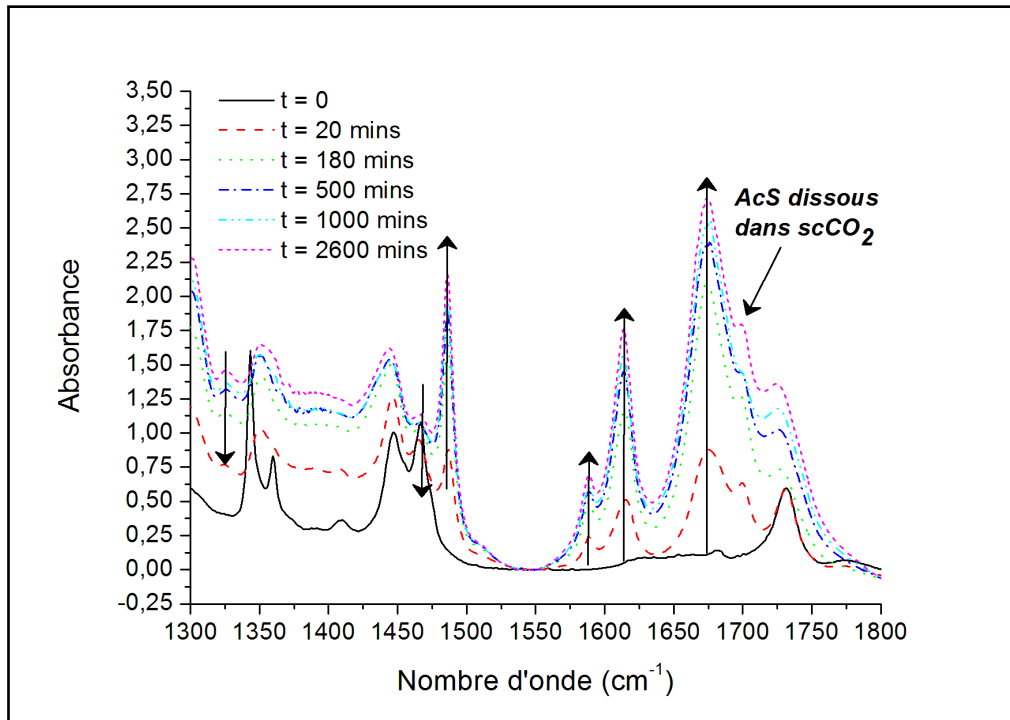


Figure 4.21 : Spectres expérimentaux d'un film de particules de O<sub>2</sub> lors de son imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique par de l'acide salicylique.

### 2.3.2 Imprégnation des particules PNB-POE par de l'acide salicylique

A partir de l'estimation du gonflement et des formules rappelées ci-dessous, le taux d'acide salicylique imprégné au cours du temps a pu être déterminé :

$$A_{1486} = \varepsilon_{1486} \cdot l \cdot [AcS] \quad \text{Equation 9}$$

$$x_{AcS} (\%mass.) = \frac{c_{gAcS/cm^3}}{c_{gAcS/cm^3} + \frac{\rho_{particules}}{1+S}} \quad \text{Equation 10}$$

Remarque :  $\rho_{particules}$  n'étant pas connu il a été pris comme étant égal au rapport des densités d'après le calcul suivant <sup>[36]</sup> :

$$\rho_{particules} = [PNB] * \rho_{PNB} + [POE] * \rho_{POE} = 1$$

Où  $[PNB]$  est le pourcentage massique de PNB par particules,  $[POE]$  est le pourcentage massique de POE par particule,  $\rho_{PNB}$  et  $\rho_{POE}$  sont les densités respectives du PNB et du POE.

Il est important de noter que les polymères étant sous forme particulaire cette valeur ne tient pas compte de la porosité du vecteur et nous permet seulement une approximation du taux d'AcS imprégné dans les particules.

Les résultats sont présentés en Figure 4.22.

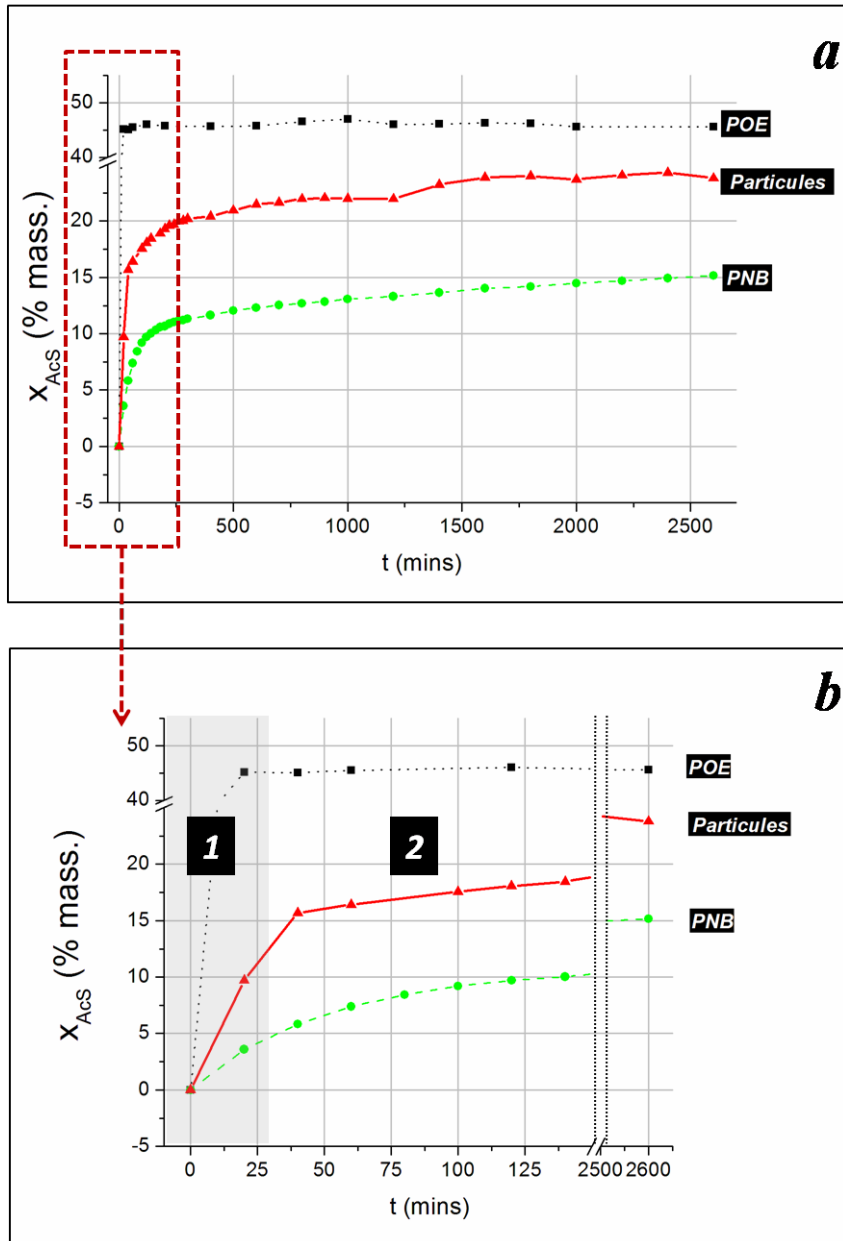


Figure 4.22 : Suivi *in situ* de la cinétique d'imprégnation des particules O<sub>2</sub> sous CO<sub>2</sub> supercritique par de l'AcS. Comparaison avec les cas du PNB et du POE : vue globale (a) et zoom sur les 150 premières minutes (b).

Au regard de la Figure 4.22, on voit que la cinétique d'imprégnation de l'AcS dans les particules est directement corrélée aux cinétiques d'imprégnation de chacun des matériaux (POE et PNB) et peut se détailler en trois temps.

Tout d'abord, de la même façon que pour le POE, un premier saut d'imprégnation est observé durant les vingt premières minutes de l'expérience et conduit à l'imprégnation de 15% en masse d'AcS. Ensuite, contrairement au POE, l'imprégnation se poursuit, tout d'abord rapidement, puis de plus en plus lentement jusqu'à atteindre un palier correspondant à l'imprégnation de 22,5% d'AcS. On reconnaît ici le profil d'imprégnation du PNB en deux temps.

La comparaison des spectres IR juste avant et juste après dépressurisation témoigne (tout comme il a été observé dans le cas du PNB et du POE) d'une légère extraction d'AcS lors de la détente. Ainsi, les pics associés à l'AcS imprégné voient leur intensité diminuer faiblement après dépressurisation et permettent d'estimer un rendement d'extraction de 3 % massique de l'acide salicylique imprégné (Figure 4.23).

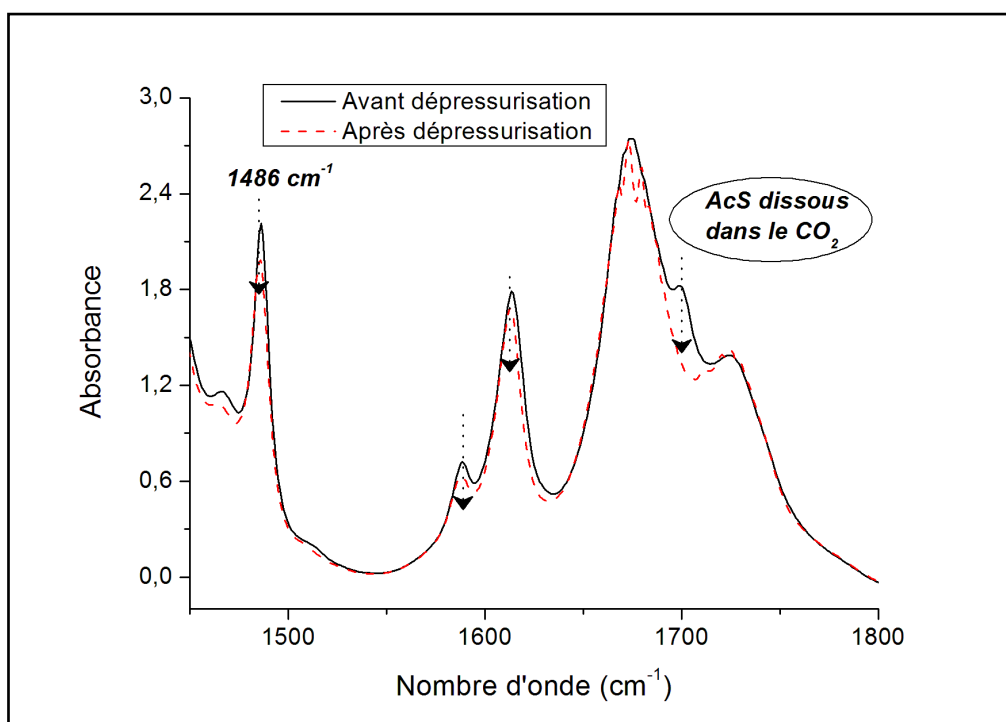


Figure 4.23 : Spectres IR d'un film de particules PNB-POE (O2) avant et après dépressurisation.

Ainsi, après dépressurisation, on récupère un film de particules imprégnées avec environ 19 % d'AcS. Ces résultats sont confirmés par l'analyse par ATG (Figure 4. 24). Cette valeur est tout à fait cohérente avec les rapports PNB/POE des particules. En effet, d'après les conversions en POE, ces particules possèdent 20% en masse de POE et 80% en masse de PNB. Sachant que à 15 MPa et 33°C le PNB peut être imprégné avec 15% en masse d'AcS et le POE 40 % en masse, le taux « théorique » d'AcS imprégné dans les particules est :



$$x_{\text{Particules}}(\text{AcS})(\% \text{mass.}) = [\text{POE}] \cdot x_{\text{POE}}(\text{AcS}) + [\text{PNB}] \cdot x_{\text{PNB}}(\text{AcS}) = 20$$

où  $[\text{POE}]$  et  $[\text{PNB}]$  sont les pourcentages massiques respectivement de POE et de PNB dans les particules et  $x_{\text{POE}}(\text{AcS})$  et  $x_{\text{PNB}}(\text{AcS})$  sont les taux d'AcS imprégné respectivement dans du POE seul et dans du PNB seul.

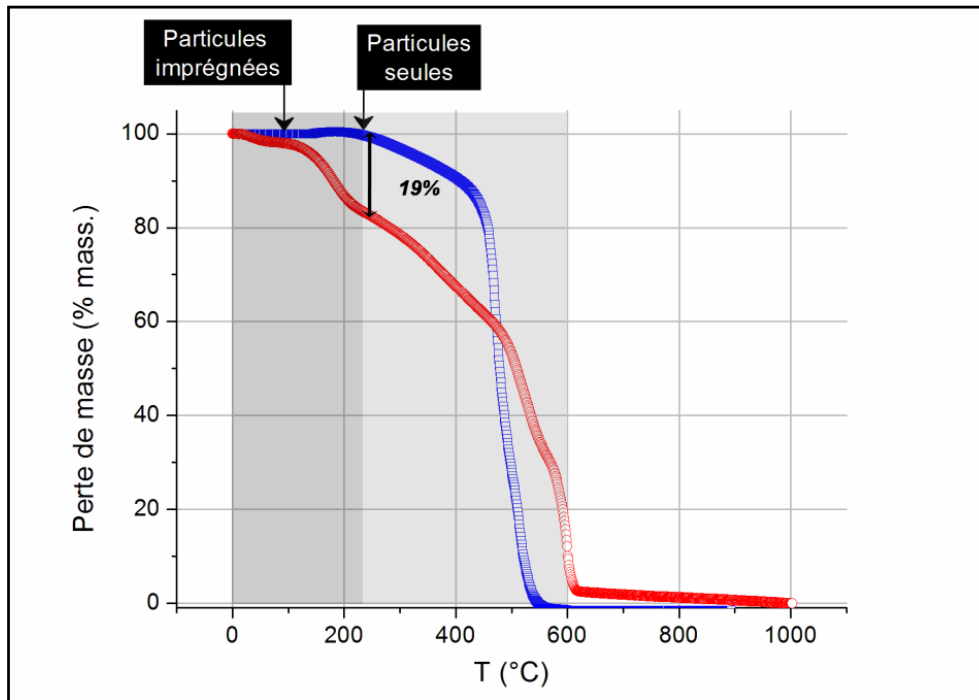


Figure 4. 24 : Courbe ATG d'un film de particules PNB-POE (O2) imprégnées par de l'acide salicylique sous CO<sub>2</sub> supercritique à 15 MPa et 33°C : comparaison avec l'ATG de particules non imprégnées.

Cette étude montre qu'il est possible d'imprégner les particules PNB-POE sous CO<sub>2</sub> à 15 MPa et 33°C par environ 20% en masse d'AcS. Le profil d'imprégnation se caractérise par deux étapes principales : une première rapide, caractéristique du profil d'imprégnation dans le POE et une seconde plus lente, caractéristique du profil d'imprégnation du PNB. La valeur de la masse d'AcS imprégné (20 % en masse) est en accord avec la valeur théorique attendue de par la composition des particules.

Toujours dans le but de maîtriser la cinétique de solubilisation *in vivo* de l'AcS, une étude plus poussée de la spéciation de l'AcS lors de l'imprégnation des particules a été menée.

### 2.3.3 Spéciation de l'acide salicylique dans un film de particules PNB-POE

Comme précédemment, la signature spectrale de l'AcS seul imprégné dans les particules a été évaluée suite à la soustraction des spectres de particules à différents temps d'imprégnation par le spectre d'AcS dissous et le spectre des particules gonflées sous CO<sub>2</sub> à 15 MPa et 33°C (Figure 4.25).

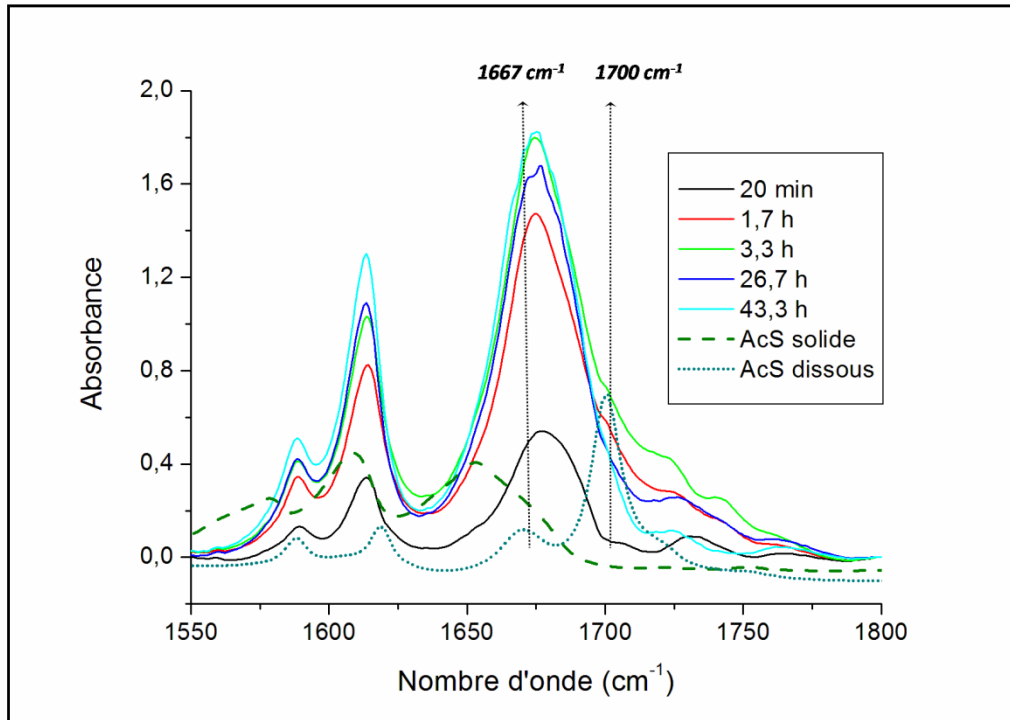


Figure 4.25 : Spectres IR: spectre des particules PNB-POE (O2) imprégnées - spectre des particules gonflées - spectre du CO<sub>2</sub> saturé en AcS. Zoom sur la bande 1600-1720 cm<sup>-1</sup>.

D'après la Figure 4.25, on remarque que les molécules d'AcS s'organisent sous forme de dimères dans les particules. L'AcS imprégné dans le POE ou dans le PNB étant sous forme de dimère, ce résultat est tout à fait logique. Encore une fois cette association privilégiée entre molécules d'AcS témoigne d'un mécanisme de type 1 où l'imprégnation est le résultat de la dissolution de l'AcS dans le CO<sub>2</sub> suivie de la précipitation de l'AcS dans les polymères.

Suite à l'évaluation de l'aire du pic caractéristique de l'AcS dimère et par l'intermédiaire des formules rappelées ci-dessous, la quantité d'AcS a pu être de nouveau évaluée (Figure 4.26):

$$A_m = \varepsilon_m \cdot l \cdot [AcS] \quad A_d = \varepsilon_d \cdot l \cdot [(AcS)_2] \quad \text{Equation 11}$$

$$c(AcS) = [AcS] + 2[(AcS)_2] \quad \text{Equation 12}$$

Cette étude confirme les résultats obtenus à partir de la bande à  $1486\text{ cm}^{-1}$  selon laquelle les particules PNB-POE (O2) peuvent être imprégnées sous  $\text{CO}_2$  supercritique par environ 22% d'AcS soit environ 19% après dépressurisation (Figure 4.26).

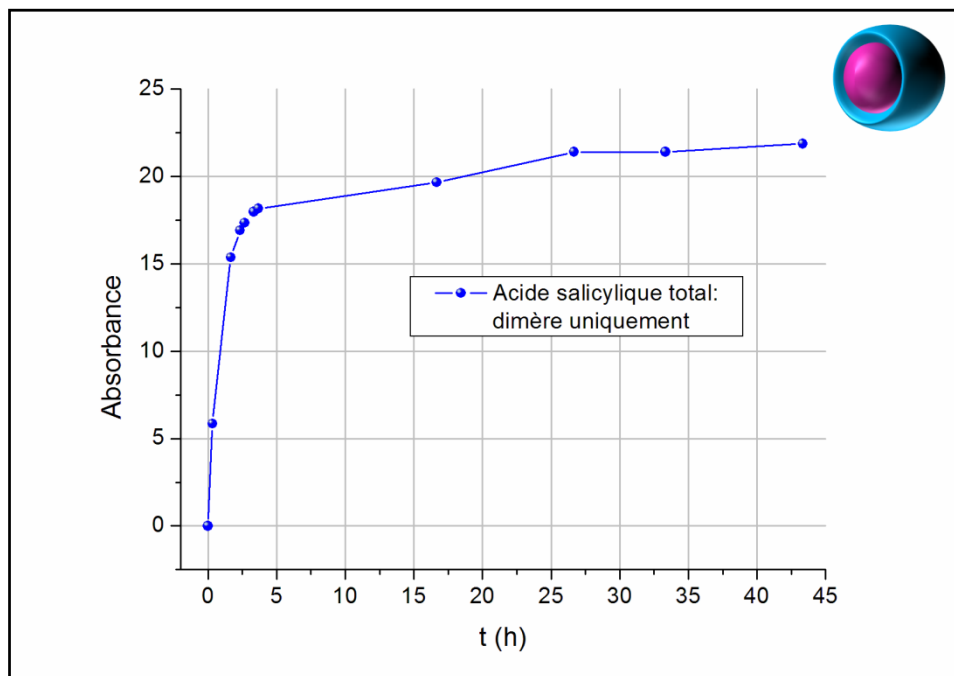


Figure 4.26 : Profil d'imprégnation de l'acide salicylique dans un film de particules PNB-POE (O2) sous  $\text{CO}_2$  supercritique à 15 MPa et  $33^\circ\text{C}$ : l'AcS est uniquement sous forme dimère.

Du fait de la bonne concordance entre les résultats obtenus sur le film de PNB seul non réticulé, de POE seul et des particules PNB-POE réticulées, l'ajout d'un agent réticulant (au moins jusqu'à 5% en masse) ne semble pas influencer significativement le processus d'imprégnation.

Il est important de noter que les résultats d'imprégnation dans les systèmes PNB-POE obtenus avec l'acide salicylique peuvent être complètement différents suivant la molécule imprégnée.

**Conclusion générale sur l'imprégnation par l'AcS des systèmes PNB-POE-particules :**

L'étude *in situ* par spectroscopie FTIR nous a permis de caractériser les profils d'imprégnation des particules de PNB-POE par de l'AcS sous  $\text{CO}_2$  à 15 MPa et  $33^\circ\text{C}$  de même que pour ces polymères constitutifs. Ainsi, il a été montré que l'écorce de POE est très rapidement imprégnée jusqu'à 40% en masse d'AcS alors que le cœur de PNB est imprégné plus lentement et atteint une concentration à saturation de 15% en masse.

**Le profil d'imprégnation des particules se déroule en deux temps principaux : un premier très rapide qui correspond à l'imprégnation de l'écorce et un second, beaucoup plus lent, caractéristique de l'imprégnation du cœur. Pour des particules à base de 20/80 en rapport massique de POE/PNB, le taux d'AcS imprégné est de 20%, valeur tout à fait cohérente avec le calcul théorique à partir des polymères seuls.**

**La spéciation de l'AcS imprégné dans chacun de ces matériaux a été étudiée et a révélé que dans le PNB comme dans le POE et naturellement, comme dans les particules, le principe actif s'associe sous forme de dimères. Cette observation témoigne de l'absence d'interactions entre le principe actif et les particules et tend à prouver que le mécanisme d'imprégnation des particules est de type 1.**

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, l'objet de ce travail de thèse est le développement de vecteurs pharmaceutiques thermosensibles réactifs à un stimulus externe. Pour ce faire, ce vecteur doit être capable de retenir le principe actif lorsqu'il circule dans le corps humain et de le relarguer lorsque la température est élevée dans des gammes de températures tolérables par le vivant. Le vecteur développé à cet effet est de type cœur-écorce avec un cœur de PNB plus ou moins réticulé et une écorce de POE. Comme nous venons de le voir, l'encapsulation d'AcS en tant que molécule modèle a été réalisée par imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique. La thermosensibilité du système est basée sur la T<sub>g</sub> du cœur de PNB que l'on espère contrôler suivant la quantité d'agent réticulant ajoutée au cœur de la particule. Afin de valider ce concept et l'influence de l'agent réticulant sur la thermosensibilité des vecteurs PNB-POE ce dernier paragraphe détaille l'étude du relargage en fonction de la température des différentes particules PNB-POE synthétisées puis imprégnées.

### **3 Relargage des vecteurs PNB-POE en milieu physiologique**

L'étude *in situ* de l'imprégnation de particules sous CO<sub>2</sub> supercritique nécessite premièrement de mettre en forme un film de particules et deuxièmement, ne permet l'imprégnation que d'un petit échantillon (~0,3 mg) de particules, insuffisant pour une étude en relargage. Ainsi, afin d'étudier le profil de relargage des principaux types de particules de PNB-POE développées au cours de cette thèse, un montage expérimental permettant l'imprégnation d'une plus grande quantité de particules a été mis au point. Dans ce paragraphe, le montage ainsi que la procédure d'imprégnation utilisés pour préparer en moyenne 500 mg de particules sont dans un premier temps présentés. L'étude du relargage des particules ainsi imprégnées fait l'objet de la deuxième partie du paragraphe et enfin, une

interprétation des phénomènes observés est avancée et permet de positionner le comportement des particules PNB-POE par rapport au concept initialement proposé.

### 3.1 Montage d'imprégnation des vecteurs PNB-POE et protocole expérimental

Avant d'être imprégnées, les particules sont séchées sous CO<sub>2</sub> supercritique. Le même montage est utilisé pour le séchage et l'imprégnation des particules (Figure 4.27, seule la chambre 6 change). La source de CO<sub>2</sub> est constituée d'une bouteille de type tube plongeur (Air Liquide, 5 MPa) (1) qui alimente le montage via une pompe à membrane haute pression (3). Afin de pouvoir être pompé, le CO<sub>2</sub> supercritique est refroidi préalablement à 0°C dans un cryostat (2). A la sortie de la pompe, le CO<sub>2</sub> supercritique est pré-chauffé pour atteindre les conditions supercritiques. La chambre de séchage-imprégnation se compose d'un réacteur haute pression / haute température de volume interne 50 cm<sup>3</sup> et dont les conditions maximales d'utilisation sont 250°C – 30 MPa (6). La température est régulée grâce à un enroulement chauffant qui entoure le réacteur, couplé à un régulateur de température (5). Un thermocouple ainsi qu'un capteur de pression permettent de connaître les conditions au sein du réacteur. Un fritté est placé en sortie du réacteur de manière à éviter la perte de particules lors de l'étape de dépressurisation (7).

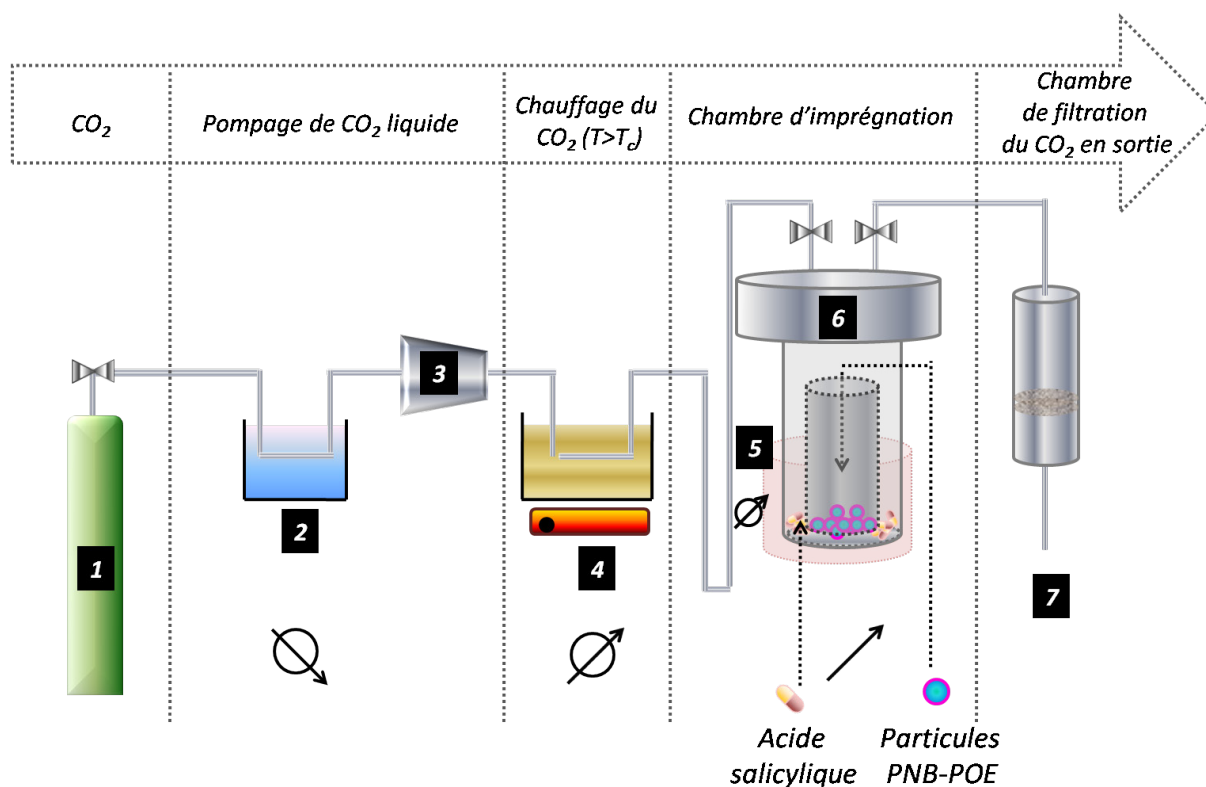


Figure 4.27 : Schéma du montage de séchage-imprégnation des vecteurs PNB-POE sous CO<sub>2</sub> supercritique développé à l'ICMCB.

Le latex résultant de la synthèse par Dispersion est séché par passage d'un courant de CO<sub>2</sub> supercritique au travers du réacteur. Lors de la mise en contact du latex avec le CO<sub>2</sub> supercritique, celui-ci se dissout dans la phase solvant du latex (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - EtOH). Le maintien d'un courant constant de CO<sub>2</sub> supercritique permet de chasser les solvants et de récupérer les vecteurs à l'état de poudre sèche. Durant la totalité du processus, la température de la chambre est maintenue à 30-33°C par l'intermédiaire de l'enroulement chauffant.

La chambre d'imprégnation utilisée pour l'encapsulation des vecteurs s'inspire des deux procédés détaillés dans la littérature [3, 7, 10-20]. D'une part, la compartimentation des espèces principe actif - polymère est assurée par l'utilisation d'une chambre interne renfermant les particules et autour de laquelle est disposée la poudre d'AcS. D'autre part, les deux « compartiments » constituant une seule et même chambre, gonflement des vecteurs et solubilisation du principe actif peuvent se dérouler simultanément.

De manière générale, 500 mg de particules sèches est placé dans le compartiment interne de la chambre et 15 % en masse d'acide salicylique (soit dans un réacteur de 50 mL, une concentration de 1,76 g.L<sup>-1</sup> pour une concentration à saturation de 0,734 g.L<sup>-1</sup>) est placé autour de ce compartiment. A l'issue de 3h d'imprégnation, la chambre est progressivement dépressurisée à 0,5 MPa /min en moyenne. La morphologie des particules semble conservée (Figure 4.28).

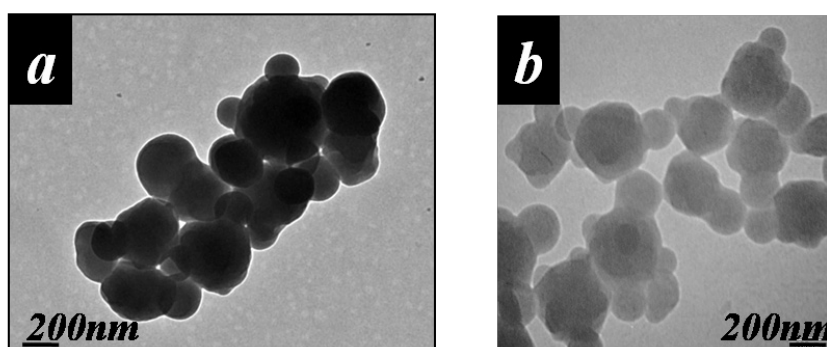


Figure 4.28 : Image TEM d'un échantillon de particules PNB-POE séchées puis imprégnées par de l'AcS sous CO<sub>2</sub> supercritique (a). Comparaison avec les mêmes particules avant imprégnation (b).

Une sélection de particules du plan d'expériences a ainsi été traitée (Chapitre 2 - 2.3.3.4). Le taux d'acide salicylique imprégné est mesuré par ATG (Figure 4.29). En moyenne, on trouve un taux de 7 % en masse (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 : Taux d'AcS imprégné pour différents lots de particules et différents essais.

Echantillon	%AS <sup>1</sup>	Taux d'AcS <sup>2</sup>
E3	12,4	7,2
E1 – 1 <sup>er</sup> essai	15	6,7
E1 – 2 <sup>ème</sup> essai	15	7,8
EO2	20	5,94
EO2	20	5,8
EO2	20	7,9
E6	37	9,4

<sup>1</sup> Pourcentage massique de POE par particule tenant compte de la conversion du NB-POE lors de la Dispersion.

<sup>2</sup> Pourcentage massique de principe actif imprégné par rapport à la masse totale (polymère+principe actif).

D'après le Tableau 4.3, on remarque que les particules présentant un fort pourcentage massique de POE (E6) semblent être imprégnées par un plus fort taux d'AcS. L'étude *in situ* de l'imprégnation des différents polymères ayant montré que le POE peut être imprégné en moyenne avec 40% en masse d'AcS alors que l'imprégnation du PNB conduit à un taux de 15% en masse d'AcS, il semble logique que le taux d'imprégnation global des particules plus concentrées en POE soit plus élevé.

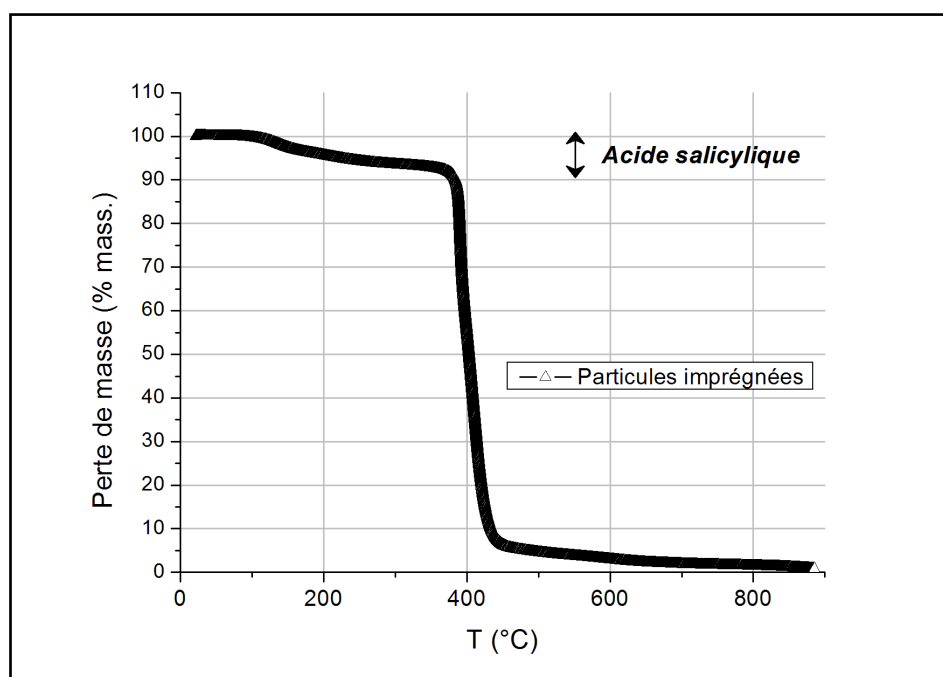


Figure 4.29 : ATG de particules imprégnées (E1 – 1<sup>er</sup> essai) sous CO<sub>2</sub> supercritique.

Le taux d'imprégnation obtenu en suivant ce protocole est plus bas que lors de l'étude *in situ* et s'explique par les quantités d'espèces introduites et le volume des réacteurs. Dans un cas comme dans l'autre, les conditions de travail sont 15 MPa et 33°C et la solubilité de

l'AcS dans le CO<sub>2</sub> est de 0,7 g.L<sup>-1</sup>. Dans une expérience *in situ*, le volume du réacteur est de 4 mL et la saturation du CO<sub>2</sub> en AcS nécessite la solubilisation de 2,8 mg (0,7\*4) d'AcS. De manière générale, les films réalisés pour les suivis *in situ* pèsent 7mg. La saturation du film en AcS (15% en masse) correspond à 1,05 mg d'AcS ce qui est bien en dessous de la masse nécessaire à la saturation du CO<sub>2</sub>. Dans le second procédé d'imprégnation, le volume du réacteur est de 50 mL et la saturation du CO<sub>2</sub> en AcS nécessite la solubilisation de 35 mg d'AcS (50\*0,7). Etant donné que 500 mg de poudre est placé en fond de cellule, la saturation du polymère suppose l'insertion de 75 mg d'AcS (0,15\*500). Cette dernière valeur étant supérieure à la masse d'AcS nécessaire à la saturation du CO<sub>2</sub> supercritique, l'imprégnation du PNB est limitée par la masse d'AcS solubilisé dans le CO<sub>2</sub>. On retrouve d'ailleurs que le taux d'AcS imprégné (7%) correspond en moyenne à la masse d'AcS solubilisé dans le CO<sub>2</sub> (35 mg) sur la masse de l'échantillon à imprégner (500 mg). Ce résultat confirme définitivement l'hypothèse selon laquelle le mécanisme d'imprégnation est de type 1 et révèle la possibilité de contrôler le taux d'imprégnation des particules simplement par le rapport entre la quantité d'espèces traitées et la quantité de CO<sub>2</sub> (directement liée au volume du réacteur).

**Le nouveau montage d'imprégnation a permis de montrer que le contrôle du taux d'imprégnation est possible en fonction du rapport entre la concentration des espèces insérées et le volume du réacteur utilisé (ou encore le volume de CO<sub>2</sub> ajouté). Différents lots de particules ont été imprégnés et la conservation de leur morphologie a pu être vérifiée. La comparaison des essais sur différents types de particules semble montrer que plus l'écorce de POE est importante, plus le taux d'imprégnation est important.**

L'évaluation du profil de relargage des vecteurs développés dans le cadre de ces travaux de thèse a été réalisée à partir des particules imprégnées durant cette dernière étude. Le paragraphe suivant reprend les différents résultats obtenus.

### **3.2 Relargage *in vitro* de l'AcS des vecteurs PNB-POE**

L'analyse du relargage des vecteurs a été réalisée en collaboration avec l'entreprise IDPS (Institut de Développement de Produits pour la Santé) de Artigues.

Le comportement thermosensible des particules PNB-POE est évalué *in vitro* dans une solution physiologique à base de phosphate de sodium préparée de telle façon que le pH est de 7,4. De manière générale, 30 mg de particules imprégnées est additionné à 50 mL de



cette solution, le tout placé sous un léger vide<sup>5</sup>. La température de la solution est régulée via un bain d'huile. Des prélèvements de 2 mL sont réalisés et filtrés (0,2 µm) avant d'être analysés par spectroscopie UV-vis. La bande d'absorption de l'acide salicylique considérée est celle à 296 nm (maximum d'absorption de l'AcS). Une courbe de calibration permettant le calcul de la concentration en acide salicylique en fonction de son absorbance a été réalisée et est présentée en Figure 4.30.

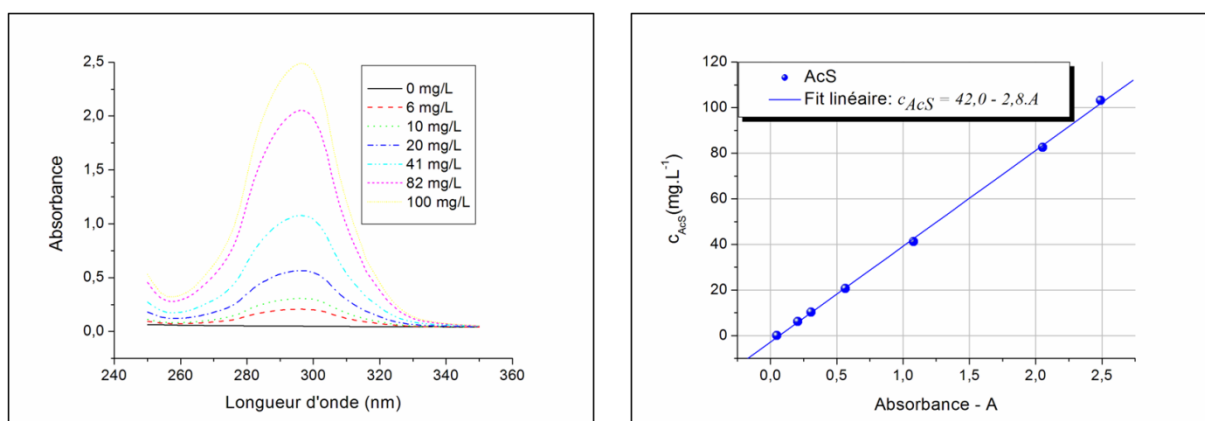


Figure 4.30 : Spectres UV-vis de l'AcS dissous dans un milieu physiologique à différentes concentrations. Courbe de calibration résultante.

De la même façon que pour l'étude de l'imprégnation des particules, l'étude du relargage des vecteurs a été décomposée en trois étapes principales :

1. le relargage du cœur de PNB seul,
2. le relargage de l'écorce de POE seul,
3. le relargage du système complet : les particules.

### 3.2.1 Relargage du cœur : le PNB seul

Suivant le même protocole d'imprégnation que pour les particules (3.1 de ce chapitre), 30 mg de PNB non réticulé (poudre dont la synthèse est détaillée au chapitre 5) a été imprégné par de l'acide salicylique (taux d'imprégnation de 7% en masse d'AcS). Le relargage de l'échantillon de PNB a été étudié en fonction de la température et du temps. Pour ce faire, chaque fois que la concentration en AcS semble se stabiliser, la température est augmentée de 5°C. La concentration en AcS à chaque instant est calculée à partir de la courbe de calibration détaillée Figure 4.30.

<sup>5</sup> Les essais de relargage du PNB ont été réalisés sous vide afin d'éviter toute oxydation du PNB avec l'oxygène surmontant le ballon.

Le taux d'AcS relargué ( $r_{AcS}$ ) est calculé comme suit :

$$r_{AcS} = \frac{c_{AcS} \cdot V_{disso}}{x_{AcS} \cdot m_{polimp}} \quad \text{Equation 13}$$

où  $c_{AcS}$  est la concentration d'AcS relargué,  $V_{disso}$  est le volume de dissolution (50 mL),  $x_{AcS}$  est le taux d'AcS imprégné dans l'échantillon de polymère et  $m_{polimp}$  est la masse de polymère imprégné additionnée à la solution physiologique.

Le profil de relargage du PNB seul révèle clairement le comportement thermosensible de ce polymère (Figure 4.31). Tout d'abord, à 25°C on observe un léger relargage de 3% d'AcS provenant probablement de résidus adsorbés à la surface de la poudre. Ainsi, jusqu'à 30°C, ce taux relargué reste constant. A partir de 35°C un léger relargage supplémentaire peut être observé qui devient plus prononcé à partir de 45°C où on passe de 5,7% d'AcS (40°C) relargué à 14%. Le relargage du principe actif peut être accéléré en augmentant la température. A 55°C, 29% du principe actif imprégné est relargué. Cependant, il semblerait que cette libération se bloque avec le temps. Une dernière hausse de température à 60°C ne permet pas d'améliorer la libération.

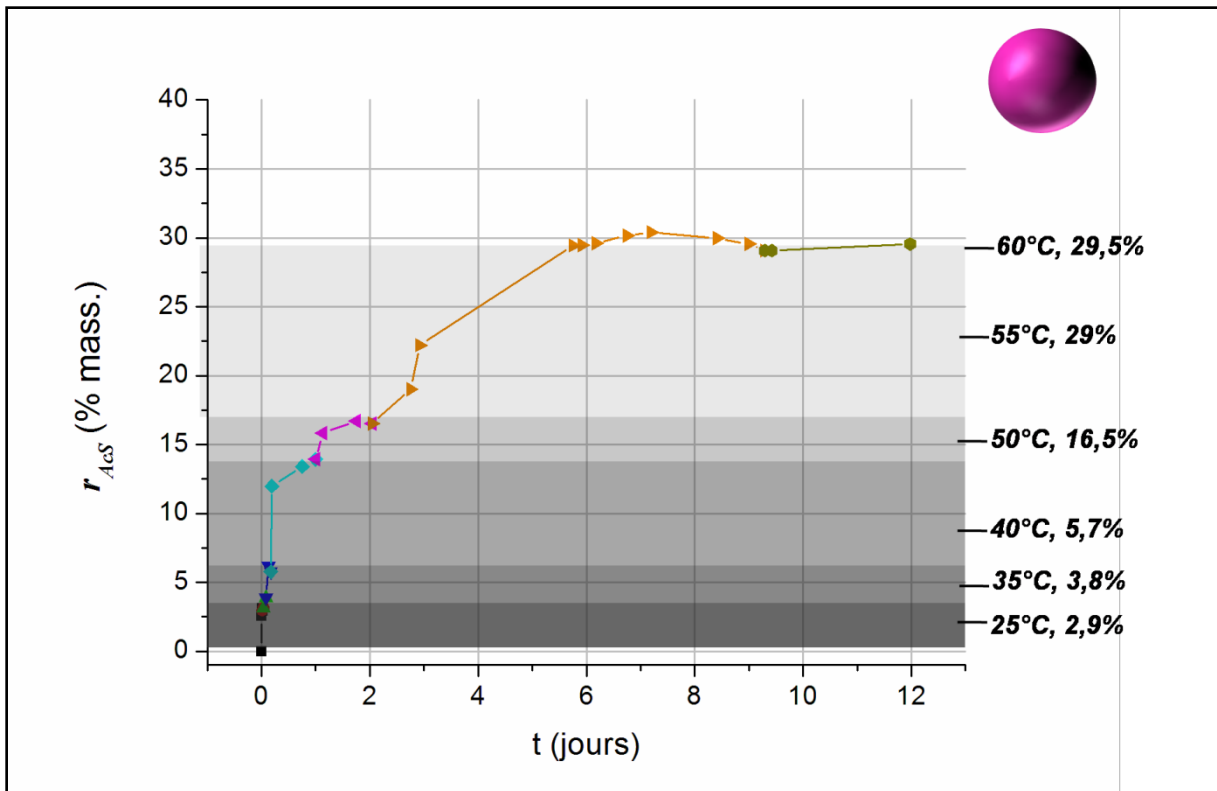


Figure 4.31 : Profil de relargage d'acide salicylique par du PNB seul en fonction de la température et du temps.

Le PNB a été choisi pour sa  $T_g$  proche de la température corporelle. Il était attendu que, à température supérieure à la  $T_g$ , la mobilité des chaînes augmente et permette la diffusion du principe actif dans le milieu physiologique par expansion de la matrice. L'apparition d'un palier de relargage (29,5% à 60°C) témoigne du piégeage d'une certaine partie de l'AcS imprégné et suggère que le PNB est capable de relarguer l'AcS par un mécanisme d'expulsion suite à une contraction du réseau polymère et non pas par une expansion comme attendue. En effet, une fois la  $T_g$  du PNB (35°C) dépassée, les chaînes de polymère ont plus de mobilité.

Le PNB étant un polymère hydrophobe, lorsque la température augmente au-delà de sa  $T_g$ , il va chercher à minimiser son contact avec l'eau et de ce fait se contracter. Cette contraction permet alors la diffusion du principe actif par éjection hors de la matrice. En revanche, une fois le resserrement maximal du réseau de PNB atteint, la diffusion du principe actif est bloquée (Figure 4.32).

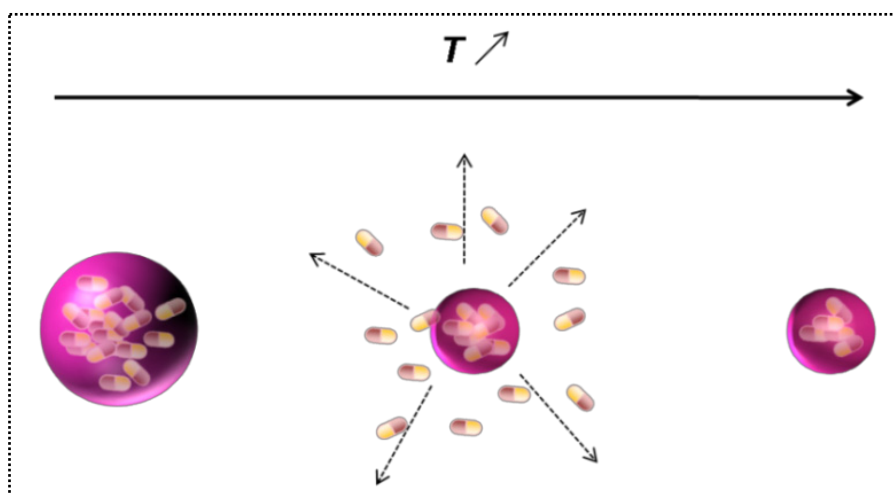


Figure 4.32 : Mécanisme de relargage d'AcS (gélules) par du PNB seul (symbolisé par une sphère rose pour rappeler le cœur des particules) en fonction de la température.

### 3.2.2 Relargage du POE seul

Le relargage du POE a été étudié à partir d'un échantillon commercial de  $6000 \text{ g.mol}^{-1}$  (poudre de polymère) <sup>6</sup>. Le POE a été imprégné d'après le même protocole que les particules PNB-POE (paragraphe 3.1 de ce chapitre) par de l'AcS (taux de 8 % en masse). Les résultats de l'étude du relargage de cet échantillon sont présentés en Figure 4.33.

<sup>6</sup> Cette masse molaire a été choisie en raison de sa valeur proche de la masse molaire du NB-POE utilisé pour la synthèse des particules ( $2000\text{-}5000\text{-}8000 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

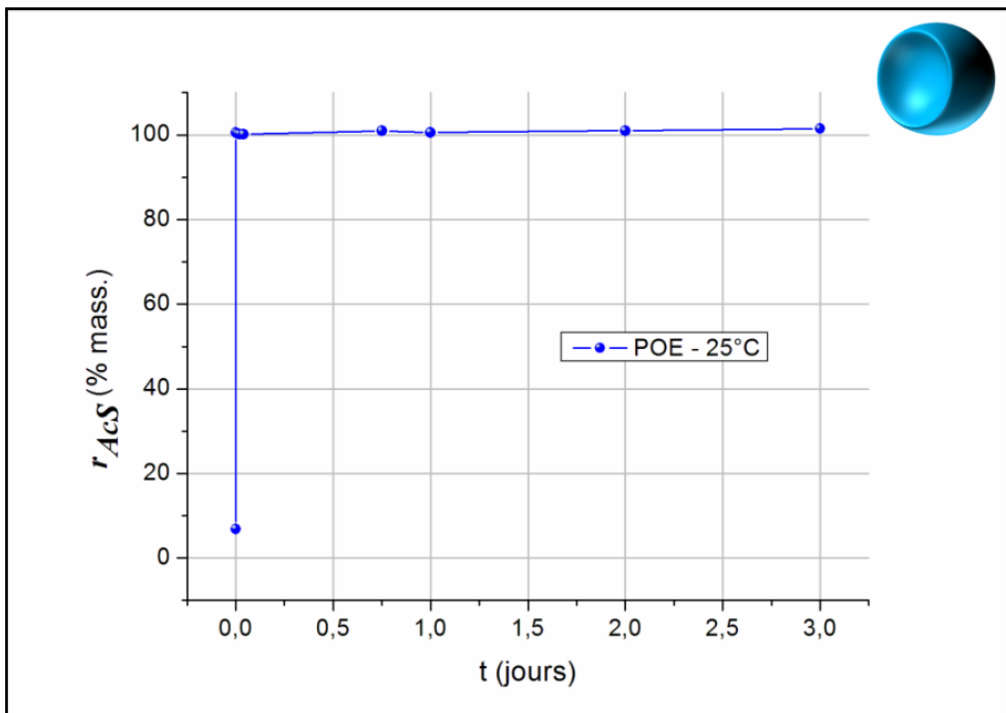


Figure 4.33 : Profil de relargage d'acide salicylique par du POE seul à 25°C.

Le relargage de l'AcS par le POE est quasiment instantané. Le POE est soluble dans l'eau à température ambiante ( $T_{amb}$ ). Ainsi, durant les cinq minutes suivant l'ajout de l'échantillon imprégné à la solution physiologique à  $T_{amb}$ , le POE se solubilise et la totalité de l'AcS imprégné est relarguée (Figure 4.34).

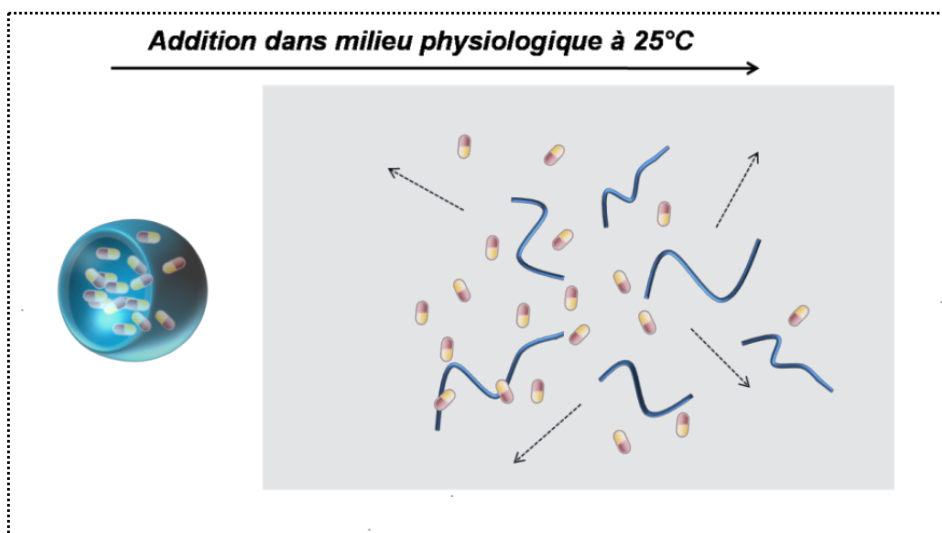


Figure 4.34 : Mécanisme de relargage d'AcS (gélules) par du POE<sub>6000</sub> (symbolisé par une demi-sphère bleue pour rappeler l'écorce des particules) en fonction de la température.

L'étude du relargage du PNB seul révèle clairement son comportement thermosensible. Le relargage d'AcS par le PNB commence faiblement à partir de 35°C. La libération d'AcS peut être accélérée en augmentant la température puis elle atteint un palier. Ainsi, 30% en masse de l'AcS imprégné peut être au total relargué. Ni la température, ni le temps ne permettent d'augmenter le taux d'AcS délivré. Il semblerait que lorsque l'on dépasse sa  $T_g$ , le PNB relargue l'AcS par expulsion suite à une contraction du réseau du matériau et conduise au piégeage d'une certaine partie de l'AcS encapsulé.

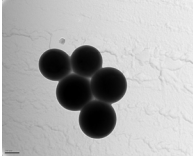
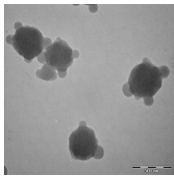
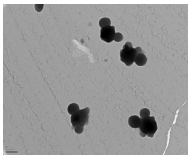
Le POE quant à lui relargue la totalité de l'AcS imprégné à température ambiante en raison de la solubilisation de ses chaînes dans ces conditions.

Suite à l'étude du POE et du PNB, le relargage de différents lots de particules a été évalué et comparé aux deux études précédentes.

### 3.2.3 Relargage des particules PNB-POE

Différents lots de particules ont été étudiés (chapitre 2 – 2.3.3.4) dont les caractéristiques sont rappelées dans le Tableau 4.4. Ces particules diffèrent par leur quantité d'agent réticulant et ont été choisies en raison de la qualité de leur dispersion (faible polydispersité). Elles ont été imprégnées d'après le protocole décrit au 3.1, seul le mode de dépressurisation change pour certaines expériences.

Tableau 4.4 : Caractéristiques des particules choisies pour l'étude du relargage des vecteurs développés dans le cadre de ce travail de thèse.

Essai	AR % m.	AS % m.	L g/mol	Conv AS % m.	AS <sub>final</sub> <sup>1</sup> % m.	Conv AR % m.	TEM	Dn <sub>TEM</sub> (nm) PDI <sub>TEM</sub>	x <sub>AcS</sub> (%) <sup>2</sup>
E1	0	15	8000	100	15	100		500 +/- 38 PDI = 0,023	6,7
EO3	5	30	5000	60	20	86		382 +/- 45 PDI = 0,055	6
E6	10	45	8000	73	37	77		340 +/- 50 PDI = 0,0865	9,4

<sup>1</sup> Pourcentage de NB-POE (AS) par particules par rapport à la masse totale (NB+NB-POE) calculé à partir de Conv AS

<sup>2</sup> Pourcentage massique de principe actif imprégné par rapport à la masse totale (polymère+principe actif).

De manière générale, tout profil de relargage des particules à 25°C présente un premier saut de relargage (appelé par la suite effet flash) correspondant à la libération de l'AcS encapsulé dans l'écorce. Suite à cette première libération, un palier est atteint et le reste de l'acide salicylique encapsulé reste piégé par le cœur de PNB (Figure 4.35).

### 3.2.3.1 Influence du mode de dépressurisation sur le relargage des particules

Le premier effet flash peut être diminué par un balayage des particules par le CO<sub>2</sub> supercritique. La Figure 4.35 compare les profils de relargage à 25°C obtenus avec une dépressurisation à 0,5 MPa/min et un balayage en CO<sub>2</sub> supercritique pendant 30 minutes. On remarque alors qu'un balayage de 30 minutes de CO<sub>2</sub> supercritique permet de diminuer légèrement la quantité d'AcS relarguée par effet flash.

Comme il a été vu au chapitre 3 (paragraphe 4.1), la solubilité du dimère d'AcS dans le CO<sub>2</sub> supercritique est très faible par rapport à la solubilité du monomère. L'acide salicylique imprégné se présentant essentiellement sous la forme de dimère (quasiment insoluble), le balayage de CO<sub>2</sub> supercritique doit permettre de chasser uniquement l'acide salicylique non imprégné.

**La quantité d'AcS perdue étant faible durant le balayage de CO<sub>2</sub>, cet essai démontre clairement que l'AcS de l'écorce n'est pas adsorbé à la surface mais bien imprégné dans le POE.**

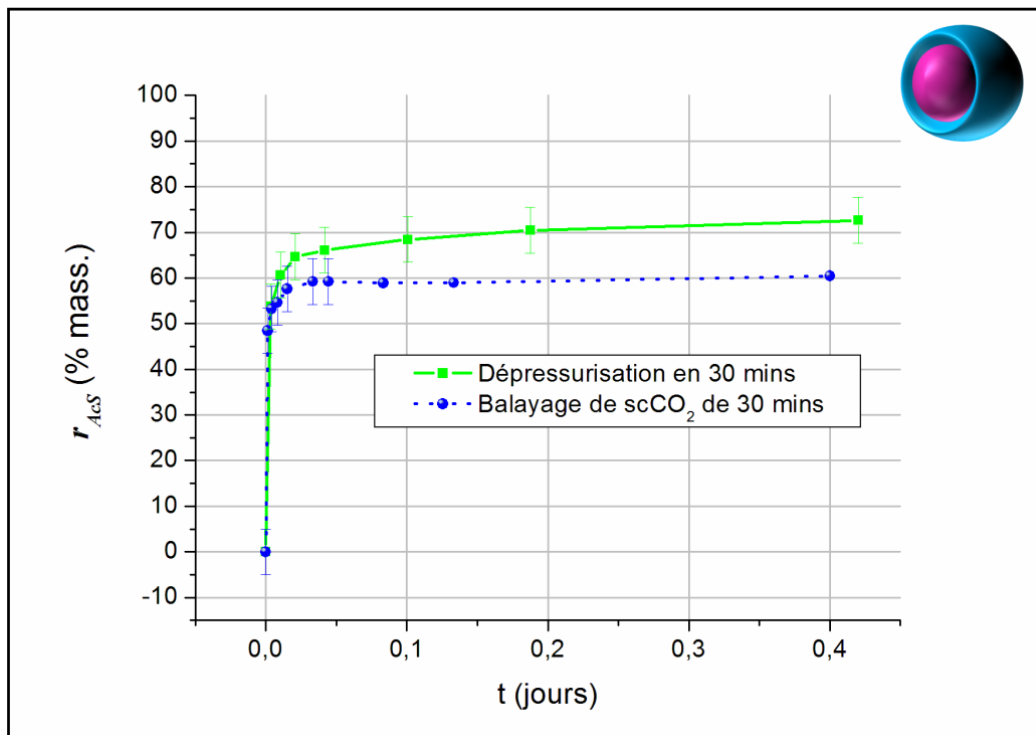


Figure 4.35 : Profil de relargage des vecteurs (EO3) à 25°C: influence du mode de dépressurisation.

Concernant l'influence de la vitesse de dépressurisation, une observation similaire a déjà été faite par Alessi *et al.* sur un procédé en continu. Lors de l'imprégnation de nimésulide en présence de PDMS, ils ont constaté que la quantité de principe actif imprégnée était d'autant plus élevée que le flux de CO<sub>2</sub> supercritique est lent <sup>[15]</sup>.

Une solution pour contrôler la quantité d'AcS dans l'écorce serait de balayer les particules PNB-POE avec un mélange CO<sub>2</sub>-éthanol qui permettrait certainement une re-solubilisation des dimères de l'écorce de POE. Le caractère hydrophile de l'éthanol permettrait de ne pas extraire l'AcS du cœur du PNB.

### 3.2.3.2 Influence de la couronne de POE sur le relargage des particules PNB-POE

La comparaison du relargage des trois lots de particules à 25°C est présentée en Figure 4. 36. Comme il était attendu, plus l'écorce de POE (AS) est importante, plus le premier saut de relargage est important. Le premier effet flash peut donc aussi être contrôlé par la quantité de NB-POE incorporée lors de la Dispersion : il est possible de relarguer initialement de 50 à 70% d'AcS suivant que la particule est constituée de 15 à 37% d'AS.

Le premier effet flash étant proportionnel à la quantité de POE présente en écorce des particules, ces derniers essais montrent encore une fois que cet effet provient bien du relargage d'AcS imprégné dans l'écorce et non pas adsorbé à la surface.

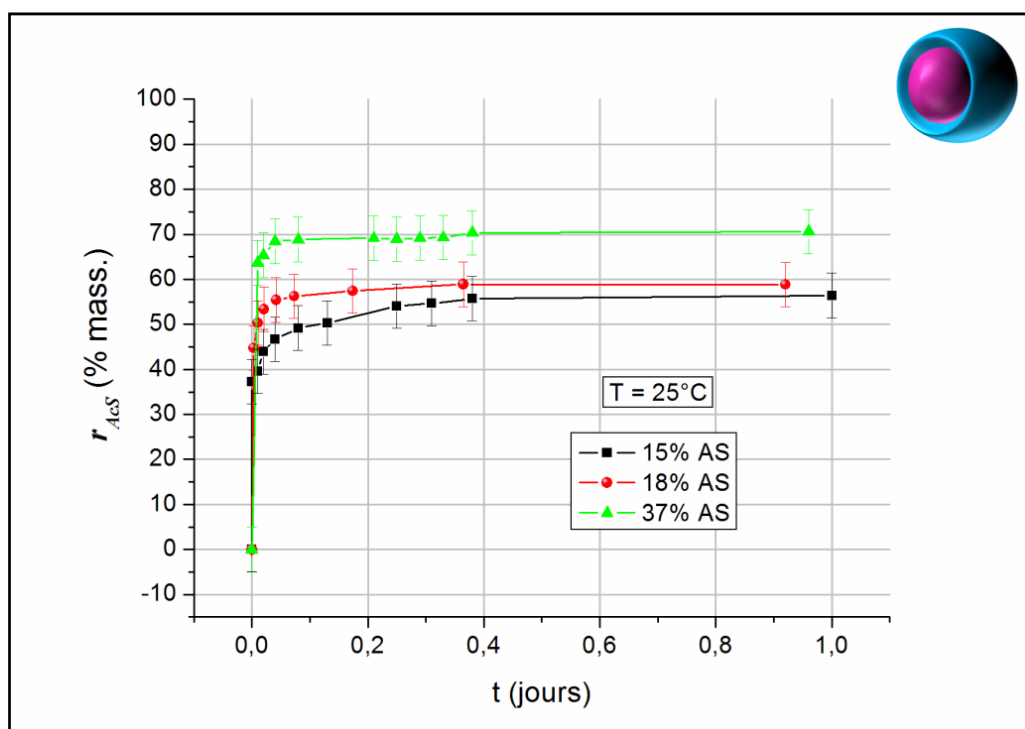


Figure 4. 36 : Profil de relargage des vecteurs à 25°C: influence de la taille de l'écorce (comparaison de E1-15% AS, EO3-20% AS et E6-37% AS).

Remarque : L'incertitude calculée tient compte de l'erreur possible lors de la mesure du taux d'AcS imprégné (ATG) de l'échantillon et de la reproductibilité du relargage de chaque essai.

### 3.2.3.3 Relargage en température des vecteurs PNB-POE

Afin de s'affranchir de la contribution d'une éventuelle oxydation du PNB lors de la montée en température, pour chaque étude de relargage, deux solutions physiologiques sont préparées. L'une permet le suivi du relargage de particules imprégnées d'AcS et l'autre permet de suivre l'évolution de particules non imprégnées et constitue une référence. A chaque spectre de relargage des particules imprégnées est soustrait le spectre des particules non imprégnées. Les résultats de relargage en solution présentés dans le paragraphe suivant correspondent au résultat de cette soustraction.

Dans le paragraphe 3.2.1 nous avons pu observer que le PNB est un matériau thermosensible dans une gamme de températures proches de l'*in vivo*. Notamment, il a été constaté qu'à partir de 35°C ce matériau commence légèrement à relarguer de l'AcS et qu'à partir de 45°C cette libération s'accélère. L'application visée pour ces vecteurs exige une absence de relargage dans le corps sans stimulus externe. La température du corps pouvant relativement varier jusqu'à 40°C, il serait préférable que le matériau opère une transition pour des températures légèrement plus élevées. L'ajout de l'agent réticulant NB-pentanoate-NB (AR) a été opéré dans le but d'augmenter la  $T_g$  du cœur. Une première étude de l'influence de 10% d'AR sur le comportement thermosensible des particules est présentée dans le paragraphe suivant.

#### 3.2.3.3.1 Relargage des vecteurs E6 (10% AR) en fonction de la température

Le profil de relargage en température est présenté sur la Figure 4.37.

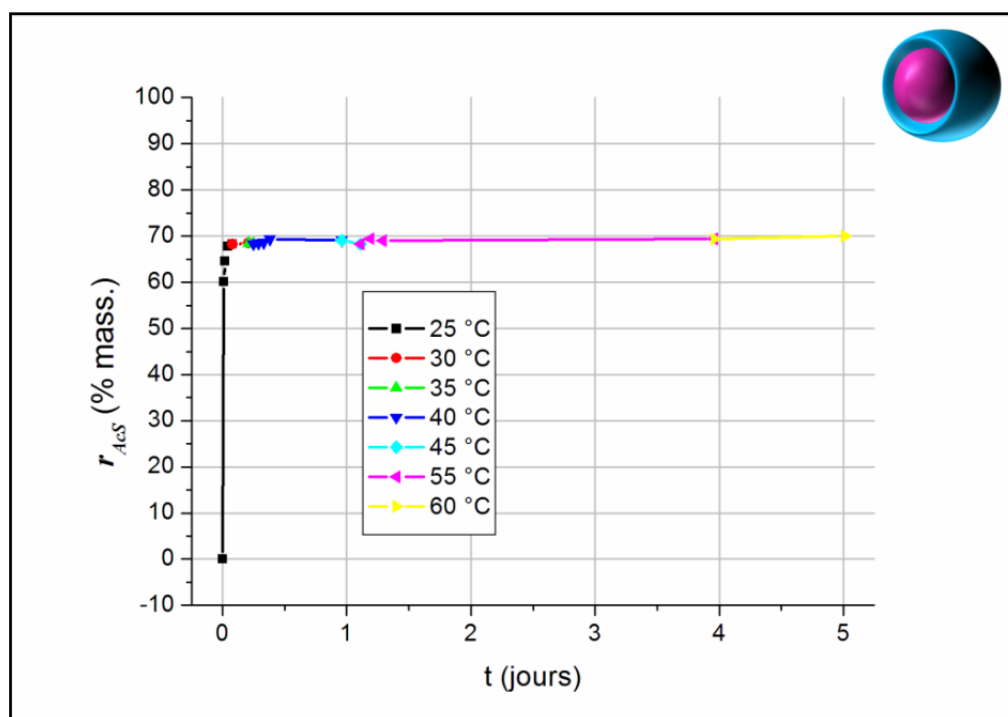


Figure 4.37 : Profil de relargage de vecteurs réticulés (10% AR): influence de la température.



Les particules E6 ont un cœur de PNB fortement réticulé. Comme dans tous les autres cas, le profil de relargage présente un premier saut à  $T_{amb}$  lors de l'addition des particules à la solution physiologique correspondant à la libération de l'AcS de l'écorce. Une fois le palier atteint, la température du bain a été progressivement augmentée. Contrairement au cas du PNB seul, aucun relargage d'AcS n'a été constaté.

**L'ajout de 10% d'AR conduit à un matériau dont le cœur n'est pas thermosensible entre 25°C et 60°C. Le cœur est probablement trop réticulé et aucun phénomène de contraction n'est opéré empêchant toute expulsion de principe actif.**

Le paragraphe suivant traite le cas des particules réticulées avec 5% en masse d'AR.

### 3.2.3.3.2 Relargage des vecteurs EO3 (5% AR) en fonction de la température

Dans le cas de particules portant 5 % en masse d'AR, on remarque que le passage à 45 °C provoque la libération d'AcS (3 % de la totalité de l'AcS encapsulé en moins de 9h, Figure 4.38).

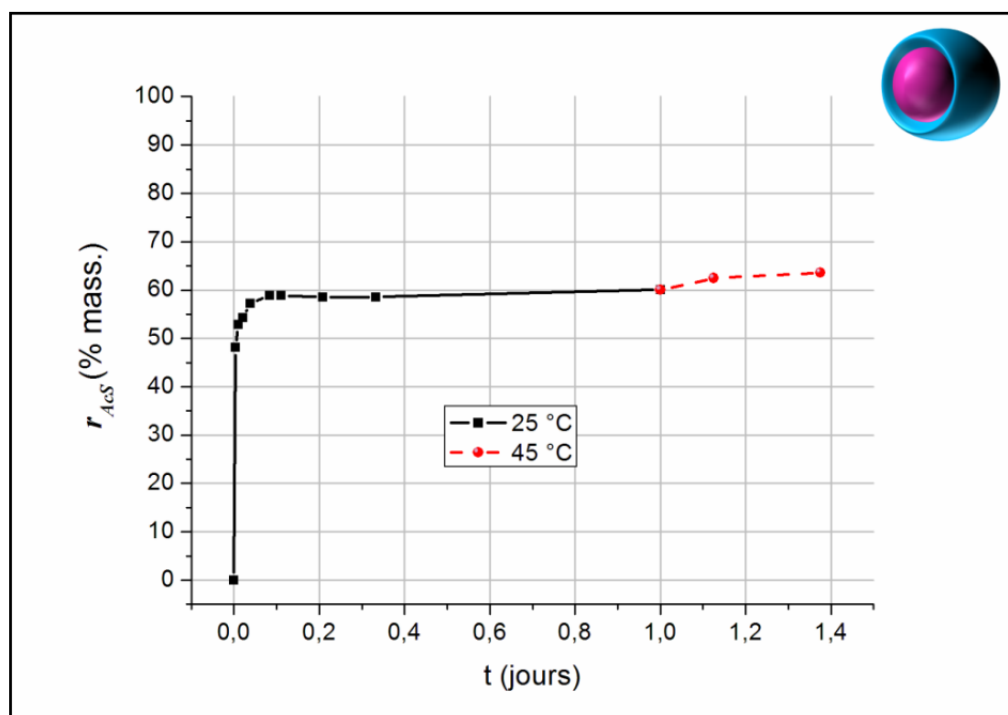


Figure 4.38 : Profil de relargage de particules réticulées à 5 % en masse (EO3).

La comparaison du relargage des particules EO3 avec les particules E6 démontre clairement l'influence de la présence de l'agent réticulant sur le comportement thermosensible du matériau. Dans le but d'obtenir la marge de contrôle en terme de

température de stimulus, le cas extrême du relargage des particules sans agent réticulant est étudié et est détaillé dans le paragraphe suivant.

### 3.2.3.3.3 Relargage des vecteurs E1 (0% AR) en fonction de la température

Dans le cas de particules non réticulées, la température de la solution physiologique a une influence notable sur la libération d'AcS (Figure 4.39). Suite au premier saut de relargage on constate que tant que la température est inférieure à 35°C, aucune libération supplémentaire d'AcS ne se produit. A partir de 35°C, le taux d'AcS relargué dans le milieu augmente très légèrement et la libération est d'autant plus rapide que la température est élevée. Finalement, environ 65% en masse du total de l'AcS encapsulé dans les particules est libéré : environ 55 % provenant du relargage de l'écorce à 25°C et 10 % provenant du relargage du cœur en fonction de la température.

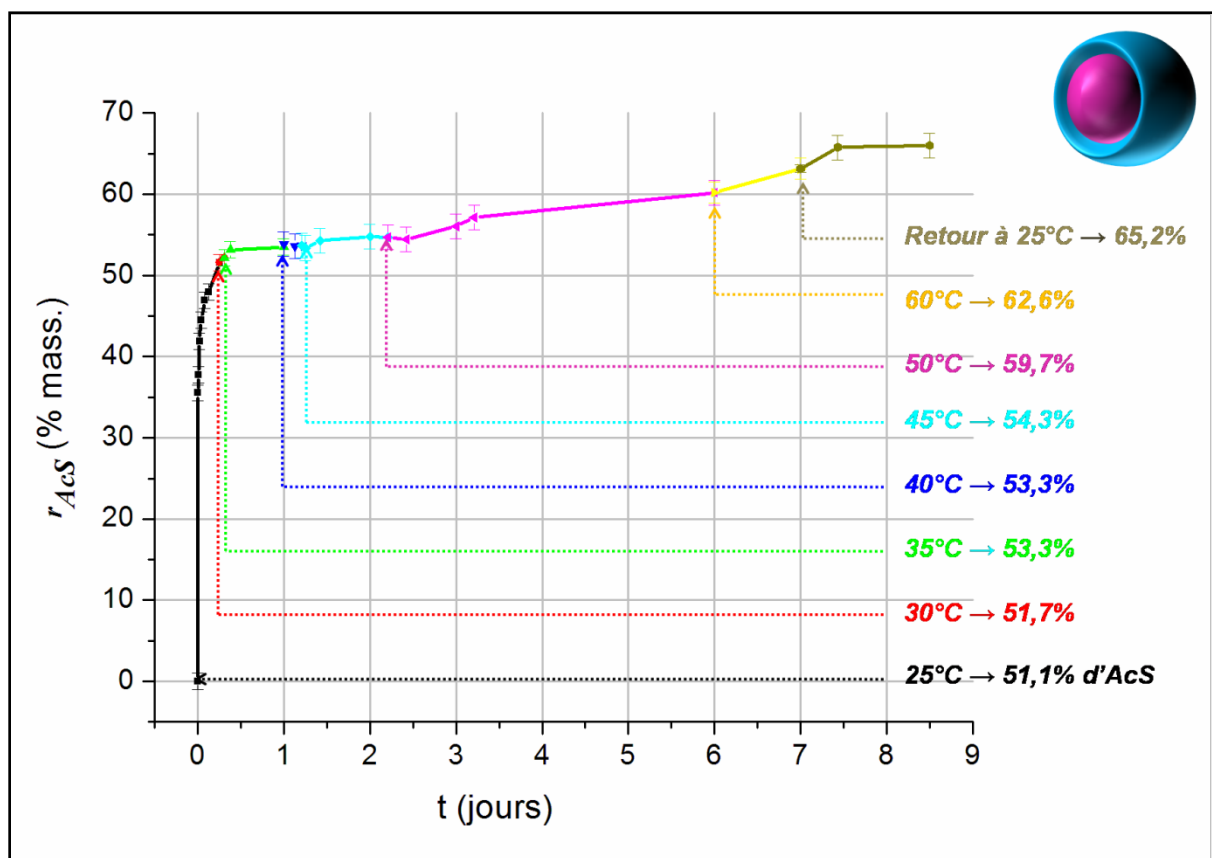


Figure 4.39 : Profil de relargage de particules non réticulées (E1): influence de la température. Les pourcentages associés à une température correspondent aux taux d'acide salicylique relargué à cette température et atteints avant d'augmenter de nouveau la température.

*Remarque : Les barres d'erreur de cette expérience sont calculées pour un lot de particules imprégnées donné et correspondent à l'erreur de la mesure UV-vis couplée à la reproductibilité de l'expérience de relargage. Contrairement aux courbes précédentes où l'on*

comparait des protocoles d'imprégnation entre eux, ces expériences ne tiennent pas compte de l'erreur fonction de la reproductibilité de l'étape d'imprégnation (le taux d'AcS pouvant varier d'une imprégnation à une autre).

Dans le but de comparer la thermosensibilité des particules non réticulées E1 à celle du PNB seul non réticulé, la contribution de l'AcS de l'écorce est soustraite au profil global et le relargage du cœur seul des particules est évalué d'après la formule suivant (Figure 4.40) :

$$r_{AcS}(PNB) = \frac{c'_{AcS} \cdot V_{diss}}{x_{AcS} \cdot m_{polimp} - r_{AcS}(POE) \cdot m_{polimp}} \quad \text{Equation 14}$$

où  $r_{AcS}(PNB)$  est le taux d'AcS relargué par le cœur de PNB de la particule,  $c'_{AcS}$  est la concentration d'AcS relarguée après l'effet flash,  $x_{AcS}$  est le taux d'AcS imprégné,  $m_{polimp}$  est la masse de polymère imprégné ajouté au milieu de dissolution et  $r_{AcS}(POE)$  est le taux d'AcS relargué par l'écorce de POE des particules (effet flash).

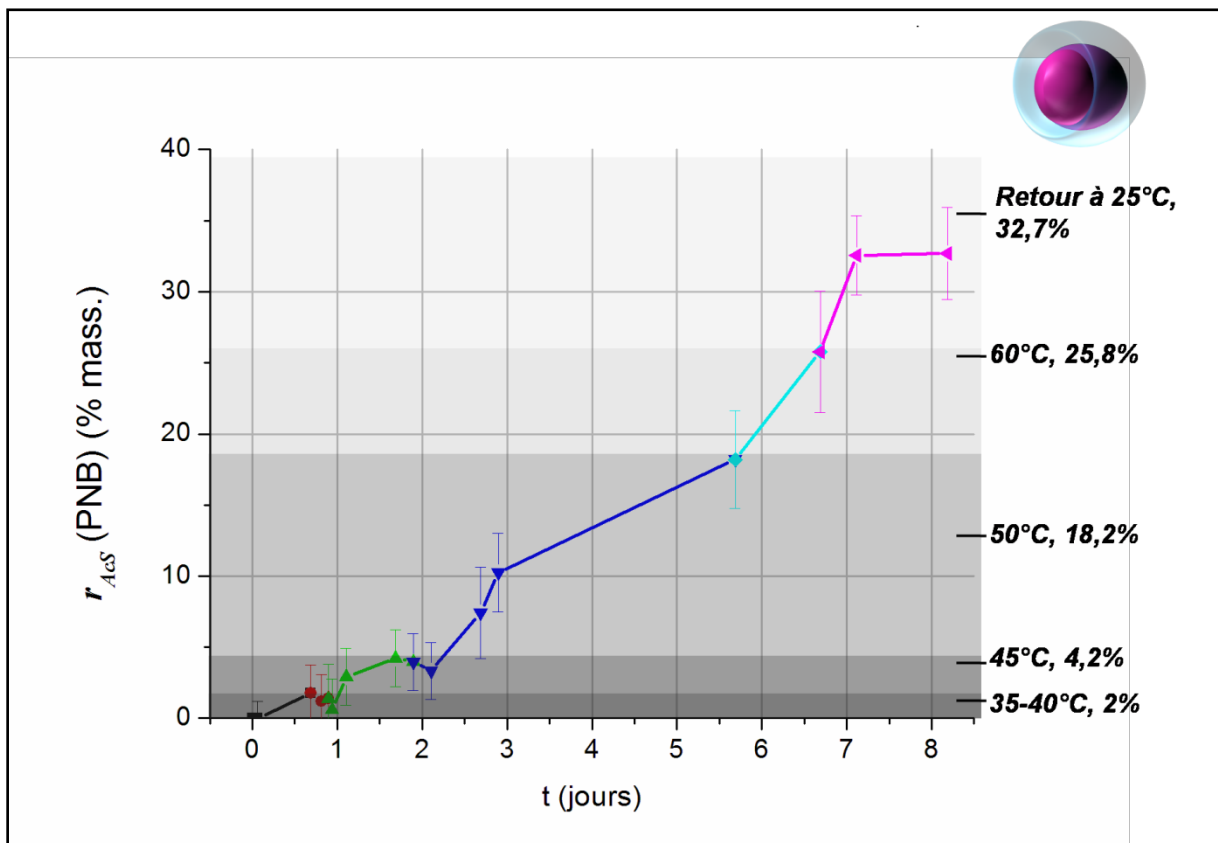


Figure 4.40 : Profil de relargage du cœur des particules: influence de la température. Les pourcentages associés à une température correspondent aux taux d'acide salicylique relargué à cette température et atteints avant d'augmenter de nouveau la température.

Il apparaît alors clairement que de même que le PNB seul, le PNB du cœur des particules a un comportement thermosensible. En effet, dans un cas comme dans l'autre, un

léger relargage commence vers 35°C et est accéléré à partir de 45°C. Au delà de cette température, dans un cas comme dans l'autre, environ 25% de la totalité de l'AcS encapsulé est relargué. Il apparaît donc clairement que le deuxième profil de relargage des particules témoigne du relargage du cœur de PNB.

A la fin de l'étude, le milieu est ramené à  $T_{amb}$ . L'analyse après stabilisation révèle un dernier saut rapide de relargage : environ 8% supplémentaires sont relargués en moins d'une heure (ellipse Figure 4.40).

La comparaison du profil de relargage du PNB au cœur des particules avec le profil de relargage du PNB seul est reportée en Figure 4.41. On remarque que le taux d'AcS relargué dans le PNB au cœur des particules est plus lent et plus faible que dans le cas du PNB seul.

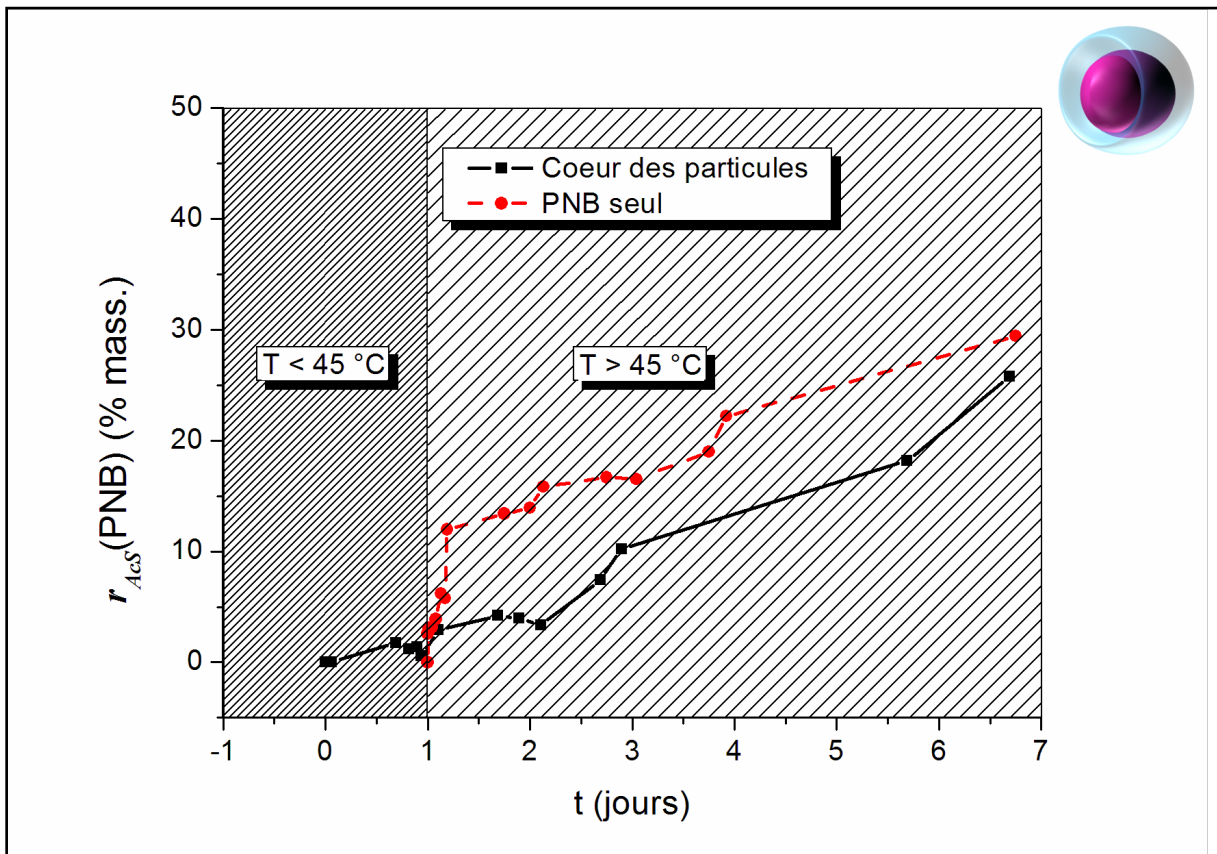


Figure 4.41 : Profil de relargage du cœur des particules en fonction de la température: comparaison avec le PNB seul.

Sur la base de ces résultats et à l'aide d'études complémentaires, le mécanisme de relargage des particules PNB-POE a été compris et est décrit dans le paragraphe suivant.

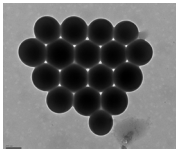
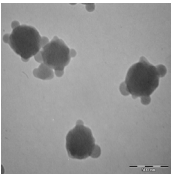
### 3.2.4 Mécanisme de relargage des particules PNB-POE

L'étude de la libération *in vitro* d'AcS par les particules PNB-POE non réticulées imprégnées a mis en évidence un mécanisme de relargage original en trois temps :

- une première libération flash où l'on relargue environ 50 % de l'AcS imprégné,
- une seconde libération sensible à une hausse de température, particulièrement au-delà de 45°C,
- une troisième libération lors du retour à  $T_{amb}$ .

Pour comprendre ce mécanisme de relargage, le suivi par DLS de l'évolution du diamètre des particules en fonction de la température a été étudié. Les particules utilisées dans cette étude sont les vecteurs EO3 et leurs homologues sans agent réticulant. Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 4.5.

**Tableau 4.5 : Caractéristiques des particules choisies pour le suivi par DLS de l'évolution du diamètre des vecteurs PNB-POE développés dans le cadre de ce travail de thèse.**

<i>Essai</i>	<i>AR</i> % m.	<i>AS</i> % m.	<i>L</i> g/mol	<i>Conv AS</i> % m.	<i>AS<sub>final</sub></i> <sup>1</sup> %m.	<i>Conv AR</i> % m.	<i>TEM</i>	<i>Dn<sub>TEM</sub></i> (nm) <i>PDI<sub>TEM</sub></i>
<b>EO3'</b>	0	30	5000	86%	27%	0		347 +/- 35 PDI = 0,03
<b>EO3</b>	5	30	5000	53	20	86		382 +/- 45 PDI = 0,055

<sup>1</sup> Pourcentage de NB-POE (AS) par particule par rapport à la masse totale (NB+NB-POE).

Les résultats de l'étude par DLS des particules EO3 et EO3' sont présentés en Figure 4.42. Dans les deux cas, le diamètre de la particule diminue avec la température et augmente de nouveau lorsque la température est ramenée à 25°C. Ce phénomène est partiellement réversible car, en effet, lorsque la température est ramenée à  $T_{amb}$ , la taille de la particule augmente de nouveau mais ne recouvre pas sa taille initiale. Il est à noter que l'écart entre la taille initiale et la taille finale est plus petit dans le cas des particules réticulées.

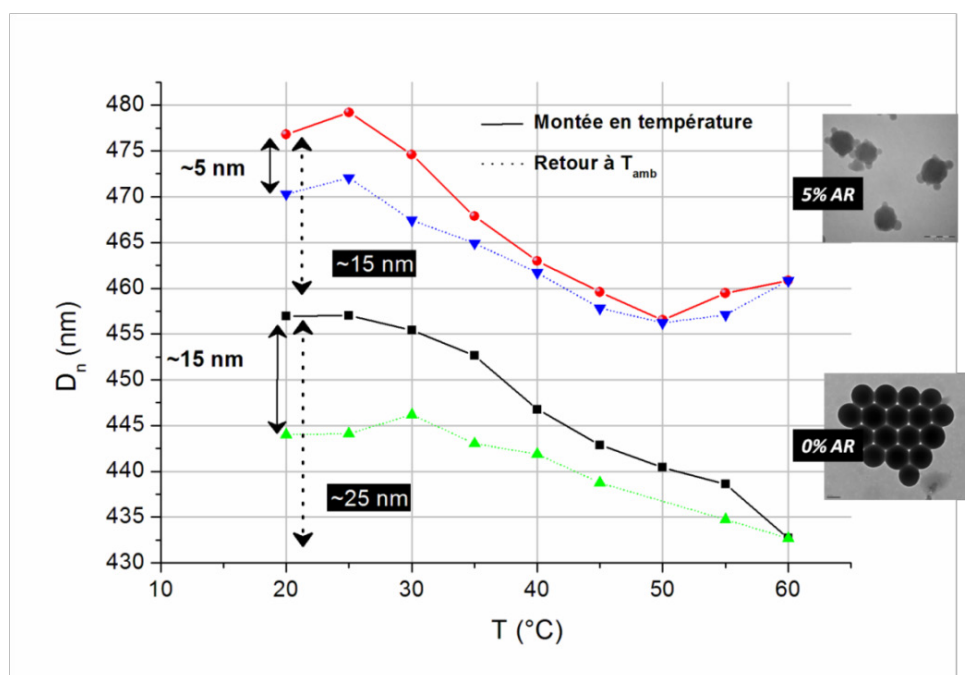


Figure 4.42 : Evolution du diamètre des particules PNB-POE en fonction de la température : réticulées-EO3 (●montée en température, ▼ retour à  $T_{amb}$ ) et non réticulées-EO3' (▪ montée en température, ▲ retour à  $T_{amb}$ ).

La confrontation de l'étude par DLS avec les profils de relargage des polymères seuls a permis d'identifier le mécanisme de libération de l'AcS par les particules PNB-POE. Celui-ci est explicité ci-dessous et un schéma descriptif est présenté en Figure 4.43.

D'après l'étude du relargage du POE seul imprégné, il apparaît clairement que le premier effet flash observé à  $T_{amb}$  provient de la solubilisation des chaînes POE de l'écorce et donc du relargage de l'AcS encapsulé dans l'écorce. Lorsque la température du milieu de dissolution est amenée au-delà de  $35^{\circ}\text{C}$ , la  $T_g$  du PNB ( $35^{\circ}\text{C}$ ) est dépassée et les chaînes de polymères gagnent en mobilité. Le PNB étant un matériau hydrophobe, il va chercher à minimiser sa surface de contact avec l'eau et se contracter (le diamètre de la particule diminue). Le POE quant à lui possède une LCST de  $90^{\circ}\text{C}$  (cf travaux West et Saunders [37, 38]). Dans notre cas, le POE est directement greffé sur une particule de nature hydrophobe. Par conséquent, il se pourrait que la LCST des chaînes POE de l'écorce (greffées sur du PNB) soit plus basse que celle d'un homopolymère de POE sous forme de chaîne libre et qu'elle soit bien en deçà de  $90^{\circ}\text{C}$  [39, 40]. Ainsi, lorsque la température du milieu de dissolution est augmentée, tout comme le cœur de PNB, les chaînes de POE cherchent à diminuer leur surface de contact avec l'eau (le diamètre de la particule diminue de nouveau). Petit à petit, les chaînes de POE ont tendance à collapser et forment une cage autour du cœur du vecteur qui bloque tout relargage supplémentaire d'AcS. En revanche, lorsque l'on revient à

température ambiante les chaînes de POE recouvrent leur bonne solubilité dans l'eau et se déploient libérant alors l'AcS bloqué.

Cette dernière remarque permet aussi d'expliquer les différences observées entre le profil de relargage du PNB seul et le profil de relargage du PNB au cœur des particules (Figure 4.41). En effet, le POE se collapsant progressivement sur la particule, il limite le relargage du cœur de la particule.

Bergbreiter *et al.* ont eux aussi constaté le même type de phénomène à partir de films de polyéthylène greffés par du POE [41]. Ainsi, en immergeant ces films dans de l'eau et en les soumettant à des cycles de températures allant de 5°C à 65°C, ils ont pu constater que leur gonflement diminue avec la température en raison d'une désolvatation des chaînes de POE.

Après retour à la température ambiante, le diamètre de la particule ne revient pas à sa taille initiale. Ce phénomène correspond à la contraction irréversible du PNB. En effet, une fois le cœur de PNB contracté, il est parvenu à minimiser sa surface de contact avec l'eau et n'a plus aucune raison de se déployer de nouveau. Ainsi, lors du retour à 25 °C, la structure de cœur est figée dans cet état contracté et il est impossible pour le vecteur de retrouver sa taille initiale. Dans le cas des particules EO3', la présence d'agent réticulant a tendance à figer la structure des chaînes de PNB et par conséquent, la contraction du réseau de cœur est plus limitée.

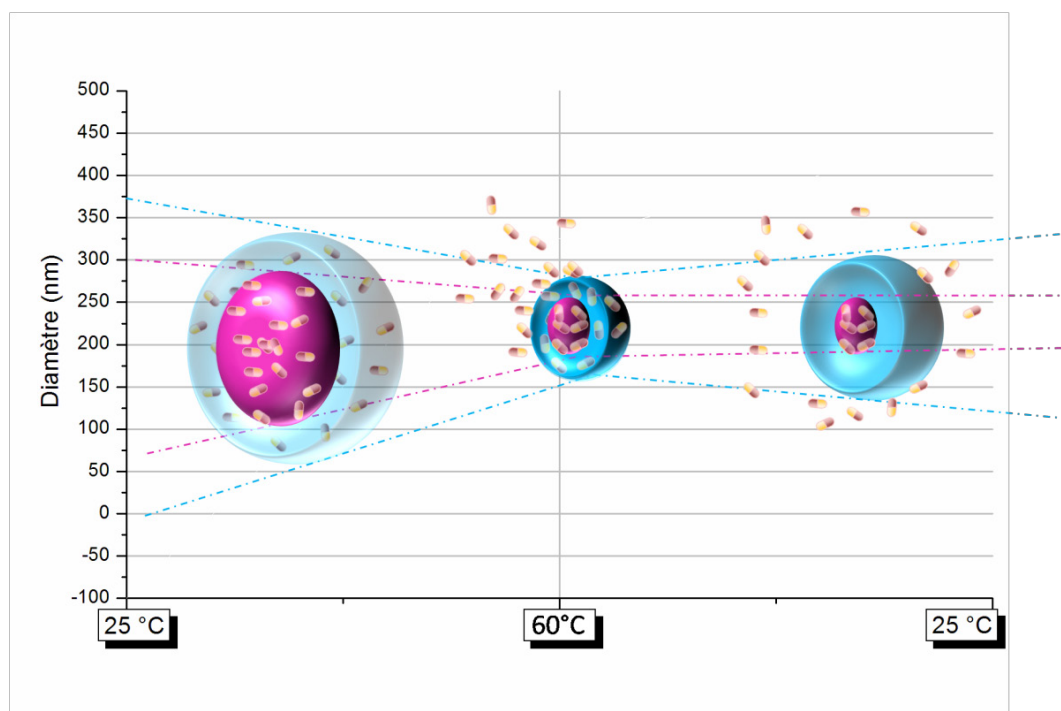


Figure 4.43 : Comportement physico-chimique de la particule de PNB-POE en milieu physiologique en fonction de la température.

Le mécanisme de relargage des particules PNB-POE mis en évidence dans le cadre de cette thèse propose un nouveau concept de libération de principe actif. L'imprégnation d'AcS dans ces particules suivie de l'étude de leur relargage a mis en évidence une libération en trois temps. Tout d'abord, l'AcS de l'écorce est libéré à température ambiante en raison de la solubilisation des chaînes de POE. Ce premier effet peut être contrôlé en fonction de la quantité de POE incorporée dans la particule et probablement par un balayage de CO<sub>2</sub>-éthanol. Ensuite, une élévation de température au-delà de 35°C permet de contracter le cœur de PNB et d'en expulser l'AcS. Parallèlement à cette contraction, l'élévation de température entraîne une perte de solubilité des chaînes de POE qui collapent à la surface de la particule et bloquent la libération du reste de l'AcS du cœur. Enfin, le retour à température ambiante permet de libérer dans un troisième temps l'AcS du cœur précédemment bloqué à l'interface PNB-POE.

Il est important de noter que le profil de relargage du vecteur dépend :

- i) du principe actif encapsulé et notamment, le premier effet flash est fonction du caractère hydrophile-hydrophobe de la molécule active ainsi que de ces interactions avec l'écorce de POE,
- ii) du taux d'agent réticulant incorporé, l'expulsion par contraction du cœur de PNB étant fonction de la quantité d'agent réticulant incorporée dans la particule.

#### 4 Conclusions

Le projet de ce travail de thèse est le développement de vecteurs pharmaceutiques thermosensibles pour le relargage ciblé de principes actifs et est original sur deux points.

Tout d'abord, la technique d'encapsulation du principe actif choisie est l'imprégnation sous CO<sub>2</sub> supercritique et n'a jamais été étudiée ni dans le cas du PNB, ni dans le cas du POE et ni dans le cas de particules cœur-écorce.

Ensuite, les vecteurs développés dans le cadre de ce projet ont une thermosensibilité basée sur la T<sub>g</sub> du PNB, à la fois supérieure et proche de la température du corps humain. A notre connaissance, ce concept est à ce jour tout nouveau.

Dans la première partie de ce dernier chapitre, la caractérisation complète de l'imprégnation des vecteurs PNB-POE sous CO<sub>2</sub> supercritique a été réalisée. L'AcS a été choisi en tant que molécule modèle pour cette étude. Il a été observé qu'à saturation à 15 MPa et 33°C, le PNB peut être imprégné avec 15% d'AcS, le POE avec 38% et des particules PNB/POE (80/20) avec environ 20 % d'AcS. Dans chacun des cas, l'AcS



s'imprègne sous forme de dimère. L'étude complète du système a permis de conclure à un mécanisme d'imprégnation de type 1 pour lequel l'imprégnation est contrôlée par la quantité d'AcS solubilisée dans le CO<sub>2</sub> et la cinétique de dépressurisation.

Dans la seconde partie de ce chapitre, l'étude du relargage *in vitro* des vecteurs a été réalisée et le mécanisme de libération de l'AcS a été compris. L'addition des vecteurs PNB-POE *in vitro* à T<sub>amb</sub> conduit à un premier relargage de l'AcS imprégné dans l'écorce en raison de la solubilisation des chaînes de POE greffées en surface. Lorsque la température est augmentée au-delà de 40°C, la T<sub>g</sub> du PNB est dépassée et le cœur du matériau tend à se contracter provoquant l'expulsion d'une nouvelle partie d'AcS. En parallèle, le POE greffé à la surface est de moins en moins soluble et collapse sur la particule bloquant ainsi le relargage d'une partie de l'AcS. Le retour à T<sub>amb</sub> permet de solubiliser à nouveau les chaînes de POE greffées et entraîne la libération de l'AcS piégé à la surface. En revanche, le PNB restant à l'état contracté, l'AcS encore présent au cœur est définitivement piégé. Enfin, il a été montré que l'ajout d'un agent réticulant (NB-pentanoate-NB) au cœur du matériau permet de moduler la température à laquelle le vecteur est thermosensible.

## Bibliographie

1. Sand, M. L.; Wilmington, D. Method for impregnating a thermoplastic polymer. US Patent, 4,598,006, Jul. 1, , **1986**.
2. Berens, A. R.; Huvard, G. S.; Korsmeyer, R. W.; Kunig, F. W. *J. App. Polym. Sci.* **1992**, 46, (2), 231-242.
3. Kazarian, S. G.; Brantley, N. H.; West, B. L.; Vincent, M. F.; Eckert, C. A. *App. Spectrosc.* **1997**, 51, (4), 491-494.
4. Vincent, M. F.; Kazarian, S. G.; Eckert, C. A. *AIChE Journal* **1997**, 43, (7), 1838-1848.
5. Alsoy, S.; Duda, J. L. *Chem. Eng. Technol.* **1999**, 22, (11), 971-973.
6. Kazarian, S. G. *Polym. Sci. - Series C* **2000**, 42, (1), 78-101.
7. Guney, O.; Akgerman, A. *AIChE Journal* **2002**, 48, (4), 856-866.
8. Braga, M. E. M.; Pato, M. T. V.; Silva, H. S. R. C.; Ferreira, E. I.; Gil, M. H.; Duarte, C. M. M.; de Sousa, H. C. *J. Supercrit. Fluids* **2008**, 44, (2), 245-257.
9. Diankov, S.; Barth, D.; Vega-Gonzalez, A.; Pentchev, I.; Subra-Paternault, P. *J. Supercrit. Fluids* **2007**, 41, (1), 164-172.
10. Duarte, A. R. C.; Casimiro, T.; Aguiar-Ricardo, A.; Simplício, A. L.; Duarte, C. M. M. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, 39, (1), 102-106.
11. Duarte, A. R. C.; Costa, M. S.; Simplício, A. L.; Cardoso, M. M.; Duarte, C. M. M. *Int. J. Pharm.* **2006**, 308, (1-2), 168-174.
12. Duarte, A. R. C.; Mano, J. F.; Reis, R. L. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2009**, 24, (4), 385-400.
13. Duarte, A. R. C.; Simplício, A. L.; Vega-Gonzalez, A.; Subra-Paternault, P.; Coimbra, P.; Gil, M. H.; de Sousa, H. C.; Duarte, C. M. M. *J. Supercrit. Fluids* **2007**, 42, (3 SPEC. ISS.), 373-377.
14. Duarte, A. R. C.; Simplício, A. L.; Vega-González, A.; Subra-Paternault, P.; Coimbra, P.; Gil, M. H.; De Sousa, H. C.; Duarte, C. M. M. *Curr. Drug Delivery* **2008**, 5, (2), 102-107.
15. Alessi, P.; Ireneo, K.; Angelo, C.; Alessia, F.; Mariarosa, M. *J. Supercrit. Fluids* **2003**, 27, (3), 309-315.
16. Cortesi, A.; Alessi, P.; Kikic, I.; Kirchmayer, S.; Vecchione, F. *J. Supercrit. Fluids* **2000**, 19, (1), 61-68.
17. Kikic, I.; Vecchione, F. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2003**, 7, (4-5), 399-405.
18. Kazarian, S. G. *App. Spectrosc. Rev.* **1997**, 32, (4), 301-348.
19. Kazarian, S. G.; Martirosyan, G. G. *Int. J. Pharm.* **2002**, 232, (1-2), 81-90.
20. Le Meur, A.; Tassaing, T.; Héroguez, V.; Aymonier, C.; Mourgues, M.; Mourgues, F.; *Polym. Mater. Sci. Eng.*, **2009**, 101, 1764.
21. Tomasko, D. L.; Li, H.; Liu, D.; Han, X.; Wingert, M. J.; Lee, L. J.; Koelling, K. W. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, 42, (25), 6431-6456.
22. Charoenchaitrakool, M.; Dehghani, F.; Foster, N. R.; Chan, H. K. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, 39, (12), 4794-4802.
23. Charoenchaitrakool, M.; Dehghani, F.; Foster, N. R. *Int. J. Pharm.* **2002**, 239, (1-2), 103-112.
24. Watson, M. S.; Whitaker, M. J.; Howdle, S. M.; Shakesheff, K. M. *Adv. Mater.* **2002**, 14, (24), 1802-1804.
25. West, B. L.; Kazarian, S. G.; Vincent, M. F.; Brantley, N. H.; Eckert, C. A. *J. App. Polym. Sci.* **1998**, 69, (5), 911-919.
26. Gong, K.; Darr, J. A.; Rehman, I. U. *Int. J. Pharm.* **2006**, 315, (1-2), 93-98.
27. Andanson, J. M.; López-Periago, A.; García-González, C. A.; Domingo, C.; Kazarian, S. G. *Vib. Spectrosc.* **2009**, 49, (2), 183-189.
28. Argemí, A.; López-Periago, A.; Domingo, C.; Saurina, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 46, (3), 456-462.

29. López-Periago, A.; Argemí, A.; Andanson, J. M.; Fernández, V.; García-González, C. A.; Kazarian, S. G.; Saurina, J.; Domingo, C. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, 48, (1), 56-63.
30. Dorkendoo, K., D.; Pfromm, P., H.; Rezac, M., E. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1998**, 36, 797-803.
31. Yeo, S. D.; Kiran, E. *J. Supercrit. Fluids* **2005**, 34, (3), 287-308.
32. Bulmer, J. T.; Shurvell, H. F. *J. Phys. Chem.* **1973**, 77, (2), 256-262.
33. Fujii, Y.; Yamada, H.; Mizuta, M. *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, (23), 6768-6772.
34. Kercić, J.; Srcić, S.; Knez, Z.; Sencar-Božić, P. *Int. J. Pharm.* **1999**, 182, (1), 33-39.
35. Weidner, E.; Wiesmet, V.; Knez, Z.; Skerget, M. *J. Supercrit. Fluids* **1997**, 10, (3), 139-147.
36. <http://mat-comp.com/CompoCal/DensRho.htm>.
37. Rackaitis, M.; Strawhecker, K.; Manias, E. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2002**, 40, (19), 2339-2342.
38. Yen, D. R.; Raghavan, S.; Merrill, E. W. *Macromolecules* **1996**, 29, (27), 8977-8978.
39. Bikram, M.; West, J. L. *Expert Opin. Drug Delivery* **2008**, 5, (10), 1077-1091.
40. Liu, R.; Fraylich, M.; Saunders, B. R. *Coll. Polym. Sci.* **2009**, 287, (6), 627-643.
41. Bergbreiter, D. E.; Ponder, B. C.; Aguilar, G.; Srinivas, B. *Chem. Mater.* **1997**, 9, (2), 472-477.

## *Chapitre 5*

### *Partie expérimentale*

## 1 Techniques de synthèses et mises en forme

L'oxyde d'éthylène est séché sur sodium métallique pendant trois heures avant d'être cryo-distillé.

Le tétrahydrofurane (THF) est distillé sur hydrure de calcium puis séché sur benzophénone/sodium, et enfin cryo-distillé avant utilisation.

Le dichlorométhane et l'éthanol sont utilisés après dégazage.

Les autres composés sont utilisés tels quels, éventuellement après désoxygénation sous vide (dégazage) : le norbornène, l'acide 5-norbornényl-2 carboxylique, le chlorure d'oxalyle, le dichlorométhane, l'éthanol, l'hexadécane, le dodécane, le pentane-1,5-diol, le POE 400 diol et l'éthyl vinyl éther.

Le complexe de Grubbs est utilisé sans purification supplémentaire après être mis sous argon en boîte à gants.

La triéthylamine, le méthnaol, la célite et l'alumine sont utilisés sans purification supplémentaire.

La solution de diphenylméthyl potassium (DPMK) a été synthétisée en utilisant un protocole mis en place précédemment<sup>1</sup>.

### 1.1 Synthèse du macromonomère NB-POE

$Mn$ théorique (g.mol <sup>-1</sup> )	2000	5000	8000
$Mn$ expérimental (g.mol <sup>-1</sup> )	1947 <sup>1</sup>	5256 <sup>2</sup>	7660 <sup>2</sup>
$PD_{SEC} = M_w/M_n$	1,10	1,17	1,02
Rendement (% mass.)	80	70	99
Ratio exo (%)	35,24	34,5	35
Fonctionnalité	6	17	3

<sup>1</sup>  $Mn_{\text{expérimental}}$  déterminé par SEC (Mesure donnée à partir d'un étalonnage équivalent POE).

<sup>2</sup>  $Mn_{\text{expérimental}}$  déterminé par Maldi Tof.

<sup>3</sup>  $Mn_{\text{théorique}}$  déterminé à partir des masses de réactif ajoutées.

Prenons l'exemple de la synthèse du macromonomère de masse molaire théorique de 8000 g.mol<sup>-1</sup>.

Environ 30 g d'oxyde d'éthylène sont successivement prélevés, séchés sur sodium métallique puis collectés dans une burette graduée par cryodistillation. Durant le

<sup>1</sup> J.-L. Six, Thèse – Université Bordeaux 1, 1996

prélèvement, la burette est placée dans un bain d'éthanol à  $-30^{\circ}\text{C}$ . Le volume d'oxyde d'éthylène est alors mesuré : 25 mL ( $5,1 \times 10^{-2}$  mol).

Les quantités des autres constituants sont ensuite calculées en utilisant cette mesure, par rapport à la masse ciblée et en visant une déprotonation de la fonction alcool du 2-hydroxyméthyl-5-norbornène de 80%.

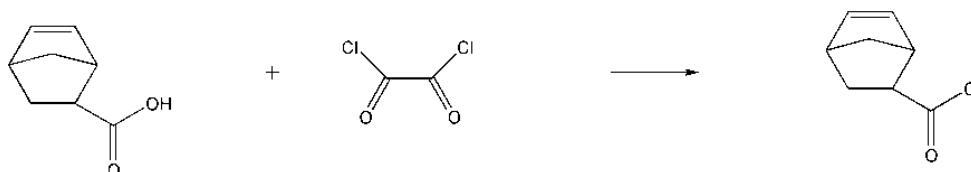
Dans des conditions anhydres et anaérobies drastiques, le 2-hydroxyméthyl-5-norbornène ( $2,85 \times 10^{-4}$ ) est dilué dans 200 mL de THF. Lorsque le milieu est homogène (30 minutes), le diphenylméthyl potassium (DPMK, concentration :  $0,68 \text{ mol.L}^{-1}$ , 4 mL) est ajouté goutte-à-goutte. Après une heure d'homogénéisation, la solution est refroidie à l'aide d'un bain éthanolique à  $-60^{\circ}\text{C}$ , puis, l'oxyde d'éthylène est ajouté. Après quelques heures, le bain est enlevé, et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 48h.

En fin de réaction, les oxanions sont désactivés par l'ajout d'1 mL de méthanol dégazé. Le polymère est récupéré par précipitation dans l'éther de diéthyle, séché sous vide, puis purifié par reprécipitation dans l'éther de diéthyle. Enfin, après trois lyophilisations successives dans le dioxane, le polymère est stocké sous argon en boîte à gants.

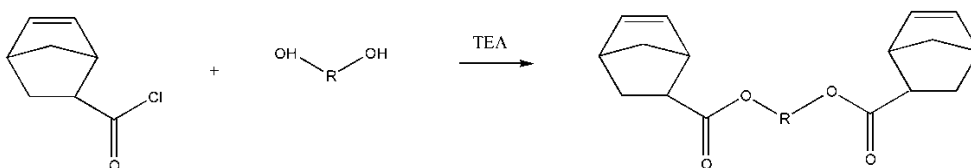
## 1.2 Synthèse de l'agent réticulant

Cette synthèse se réalise en deux étapes principales :

### **Etape 1 :**



### **Etape 2 :**



### **Etape 1 :**

La réaction se fait dans un ballon tricol de 200 mL.

Le dichlorométhane a été séché plusieurs jours sur hydrure de calcium et cryodistillé avant d'être utilisé. L'acide 5-norbornényl-2 carboxylique (0,15 mol, 20,2 g) est dissous sous vide et sous agitation dans 50 mL de dichlorométhane préalablement préparé.

Sous courant d'azote, un réfrigérant est placé en tête de ballon et connecté à un bulleur. Le ballon est ensuite placé dans un bain éthanolique à  $5^{\circ}\text{C}$ . Le chlorure d'oxalyle (0,3 mol, 24mL) est ajouté au goutte-à-goutte via un septum et une aiguille. Une fois cet ajout terminé, quatre petites gouttes de DMF sont ajoutées à la seringue. Une fumée grise doit alors se dégager. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation toute une nuit.

A la fin de la réaction, le dichlorométhane et le chlorure d'oxalyle sont tirés sous vide pendant 5h00 ( $T_v(\text{CH}_2\text{Cl}_2) = 40^\circ\text{C}$ ,  $T_v(\text{chlorure d'oxalyle}) = 62^\circ\text{C}$ ). Il en résulte un liquide visqueux de couleur orange-marron analysé par RMN du  $^1\text{H}$  afin de vérifier que le bon produit a été obtenu.

#### Étape 2 :

La réaction se fait dans un ballon tricol de 200 mL.

Le produit de l'étape précédente (0,07 mol, 10,74 g) est dilué dans 150 mL de dichlorométhane préalablement cryo-distillé. Encore une fois, un réfrigérant est placé en tête de ballon. Dans un premier temps, la triéthylamine (19,23 mL, 0,14 mol) est ajoutée à cette dernière solution sous courant d'azote. La solution passe de orange clair à orange foncé et une fumée blanche se dégage. Le ballon est placé dans un bain éthanolique à  $5^\circ\text{C}$  et le pentane-1,5-diol (3,6 mL, 0,034 mol) est ajouté au goutte à goutte. Un léger dégagement gazeux doit être observé. La réaction est laissée sous agitation pendant 17h.

#### Lavage :

Le produit est lavé six fois avec 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (2M). Cette solution est ensuite séchée sur sulfate de magnésium (4 à 5 cuillérées). Le tout est filtré sur papier filtre puis évaporé sous rotavapor. La fin de l'évaporation est terminée sous vide dynamique pendant une nuit puis, le produit est placé sous argon en boîte à gants.

Le produit résultant est un liquide visqueux marron-orange foncé.

### **1.3 Synthèse de PNB**

La synthèse est décrite pour l'obtention d'un poly(norbornène) de masse molaire  $24400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

La réaction se fait dans un ballon tricol de 500 mL.

Le dichlorométhane a été séché plusieurs jours sur hydrure de calcium et cryo-distillé avant d'être utilisé.

Le NB (0,04 mol, 3,55 g) est pesé puis placé dans un ballon de 100 mL pour être dégazé seul à froid. Le tout est introduit en boîte à gants sous argon. Le ruthénium ( $1,46 \cdot 10^{-4}$  mol, 0,12 g) est dissous dans 25 mL de dichlorométhane. Le reste du solvant est ajouté au NB. La solution de NB est ensuite lentement ajoutée à la solution de catalyseur. Le mélange est laissé sous agitation 24h puis est désactivé avec 0,5 mL d'éthyl vinyl éther.

Le mélange est ensuite passé sur colonne de célite puis sur colonne d'alumine. Le tout est concentré au rotavapor. La solution est ensuite précipitée à froid dans du méthanol puis filtré sur fritté. Le tout est séché sous vide primaire pendant une nuit.

## 1.4 Polymérisation du norbornène en dispersion

La polymérisation décrite est le cas particulier du point au centre. Le protocole suivi est le même pour toutes les réactions, seuls les proportions changent.

Les polymérisations en dispersion ont été réalisées à température ambiante dans un ballon de 100 mL sous atmosphère inerte et sous agitation. Le NB (0,975 g, 0,01 mol), l'étalon interne PS et/ou dodécane (0,1g) sont dissous dans un mélange dichlorométhane/éthanol (35/65 % vol). Ce mélange est ensuite dégazé.

Le ruthénium (20 mg,  $2,4 \times 10^{-5}$  mol) est dissous en boîte à gants dans 10 mL d'un mélange dichlorométhane/éthanol (50/50 % vol).

L'agent réticulant (0,075 g,  $2,2 \times 10^{-4}$  mol) et le NB-POE (0,45 g,  $9 \times 10^{-5}$  mol) sont dissous dans la solution de NB.

La solution de monomères est additionnée très rapidement à la solution de catalyseur sous agitation. Le mélange devient laiteux au bout d'une dizaine de secondes et reste rosé pendant plusieurs heures.

La désactivation du milieu réactionnel s'effectue par addition de 0,1 mL d'éthyl vinyl éther après au minimum 20 h de réaction.

## 2 Techniques d'analyses

### 2.1 Chromatographie en phase gazeuse ( GC, Gas chromatography)

Les cinétiques de conversion du norbornène durant la polymérisation en dispersion ont été suivies par GC en présence d'un étalon interne (le undécane). Pour ce faire, 2 mL supplémentaires de solution (norbornène, macromonomère, agent réticulant, étalon interne) sont préparés et sont injectés en tant que temps initial.

L'appareil (**Varian 33650**) utilise une colonne capillaire apolaire (**BP1-30m**) comme phase stationnaire et le diazote comme gaz vecteur. La détection est assurée par un détecteur à ionisation de flamme alimenté par un mélange air/ dihydrogène. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées respectivement à 250°C et 280°C. Le programme d'analyse se décompose en un palier de 2 min à 50°C suivi d'une montée en température à raison de 10°C. min<sup>-1</sup> jusqu'à 250°C.

### 2.2 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC, size exclusion chromatography)

Les distributions des masses molaires des chaînes, leurs moyennes en nombre et en masse et les dispersités correspondantes ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant le THF comme phase mobile (1 mL.min<sup>-1</sup>).



L'appareillage est constitué d'une pompe (**JASCO HPLC 880-PV**), de colonnes **Tosohaas TSK Gel**, et deux détecteurs en série : un détecteur par réfractométrie (Varian) et un détecteur par absorbance UV (**JASCO 1575 UV/vis**).

### 2.3 RMN

Les analyses par RMN du proton  $^1\text{H}$  ont été réalisées en utilisant un spectroscope **Bruker 400 MHz**, dans le  $\text{CDCl}_3$ , à  $25^\circ\text{C}$ .

### 2.4 Microscopie électronique à transmission (TEM, Transmission Electron Microscopy)

La plupart des clichés a été effectuée par nos soins au SERCOMI (Service commun de microscopie de Bordeaux 2, en collaboration avec Sabrina Lacomme) sur un microscope **Hitachi H7650** fonctionnant à 80 kV. Après dilution au 1/200 dans de l'éthanol absolu, 60  $\mu\text{L}$  de ce mélange est déposé sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone. L'échantillon est laissé sécher à l'air libre le temps que les solvants s'évaporent.

Les clichés sont analysés via le logiciel *Image J*. La polydispersité d'un échantillon est calculée à partir de la valeur moyenne du diamètre ( $D_n$ ) et de l'écart type ( $ET$ ).

La polydispersité est ici la variance qui est elle-même calculée à partir de l'évaluation de la moyenne et de l'écart type par *Image J*.

$$P = \left( \frac{2 \cdot ET}{D_n} \right)^2$$

### 2.5 Microscopie à force atomique (AFM, Atomic Force Microscopy)

L'étude morphologique de certaines particules s'est appuyée sur l'AFM, de façon à obtenir des informations sur leur état de surface.

Ces expériences ont été effectuées en collaboration avec Emmanuel Ibarboure (Ingénieur d'étude au LCPO).

Les images AFM ont été réalisées à l'aide d'un microscope Digital Instruments Nanoscope IIIa en mode « intermittent » (tapping mode en Anglais). Les sondes utilisées sont des cantilevers de silicone avec une constante de raideur de  $42 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ , une fréquence de résonance de 285 kHz et un rayon de courbure compris entre 10 et 12 nm. Les images de « hauteur » (topographie de la surface) et de « phase » ont été enregistrées avec une résolution de  $512 \times 512$  pixels. Les échantillons ont été préparés en déposant quelques gouttes du latex (dilué 10 fois) sur un substrat de mica. Les solvants sont alors éliminés par spin coating.

## 2.6 Spectroscopie UV-visible

Le relargage d'acide salicylique par les polymères a été suivi par spectroscopie UV-visible. Les mesures d'absorbance des solutions aqueuses des polymères imprégnés ont été réalisées par un spectromètre **SpectraMAX Molecular Devices** à une longueur d'onde fixe (296 nm). Le pH des solutions est de 7,4.

## 2.7 Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Le gonflement et l'imprégnation des polymères sous dioxyde de carbone supercritique ont été caractérisés par des mesures *in situ* par spectroscopie IRTF. Ces mesures ont été réalisées par l'intermédiaire d'un interféromètre Biorad et d'une cellule en acier équipée de deux fenêtres cylindriques en silicium. L'une des deux fenêtres est recouverte d'un film de polymère par spin coating. L'épaisseur de chaque film est mesurée au profilomètre et est environ de 45µm pour des films de PNB et de particules et de 10 µm pour un film de POE. La température de la cellule est déterminée avec une précision de 2 K et sa pression avec une précision de 1 bar.



# -CONCLUSION GENERALE-

Le couplage des techniques IRM et US avec un vecteur polymère thermosensible est un concept très prometteur en matière de ciblage dans le domaine de la « *Drug delivery* ». L'idée est de pouvoir guider le vecteur jusqu'à une zone cible puis de provoquer le relargage de la molécule active via un échauffement local de température par un stimulus externe. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous proposons de développer un vecteur polymère répondant à la fois aux considérations pharmacocinétiques et aux exigences des technologies IRM et US à savoir, d'opérer des changements morphologiques à des températures légèrement supérieures aux températures du corps humain.

Comme nous avons pu le voir au cours de ce manuscrit, différents vecteurs à base de PNB ( $T_g \sim 35^\circ\text{C}$ ) et d'un macromonomère de POE ont été développés pour élaborer des particules PNB-POE d'architecture cœur-écorce. La technique de polymérisation mise en œuvre pour élaborer ces vecteurs a été la ROMP en Dispersion. Dans le but d'étudier l'influence des principaux paramètres (POE, agent réticulant) sur les caractéristiques des particules, un plan d'expériences a été réalisé.

Nous avons montré qu'il est possible de contrôler la taille des particules dans la gamme - 280 à 600 nm - en fonction de la quantité de macromonomère POE incorporée. La masse molaire du macromonomère POE (dans la gamme 2000 – 8000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) a quant à elle peu d'influence sur le contrôle de la taille. Un apport significatif pour la communauté scientifique de la ROMP en milieu dispersé concerne l'ajout d'un agent réticulant. Deux agents réticulants ont été synthétisés présentant chacun deux entités norbornényles reliées soit par une chaîne hydrophile (POE de masse molaire 400  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) soit par une chaîne hydrophobe (pentane). La ROMP en Dispersion en présence du premier conduit à la déstabilisation du latex ou à la formation de particules non réticulées. Quant au second, il peut permettre l'élaboration de particules de PNB réticulées.

La présence de cet agent réticulant conduit à la formation de particules avec des morphologies originales de type framboise. Cette morphologie est le résultat d'une double nucléation. Norbornène et agent réticulant sont consommés majoritairement dès les premiers instants de la polymérisation et conduisent à la nucléation d'une première catégorie de particules très réticulées et non gonflables. La consommation plus lente du macromonomère en présence de l'agent réticulant restant conduit ensuite à l'apparition d'une nouvelle population de particules qui s'associent dans un troisième temps aux premiers nucléi. Il a été montré que l'agent réticulant réticule le cœur comme les nodules présageant ainsi la hausse de la  $T_g$  du matériau, non mesurable en DSC en raison de la présence du pic de recristallisation du POE. Cette dernière considération est importante car elle valide l'incorporation de l'agent réticulant de manière homogène au sein du matériau et de ce fait la possibilité d'avoir une action sur la thermosensibilité du vecteur PNB-POE.

Les différents vecteurs ainsi synthétisés ont ensuite été imprégnés sous  $\text{CO}_2$  supercritique par de l'acide salicylique, principe actif choisi en tant que molécule modèle. L'imprégnation sous  $\text{CO}_2$  supercritique a été utilisée en raison de la possibilité de récupérer un matériau imprégné à l'état sec et dépourvu de résidus toxiques et de la possibilité d'imprégner simultanément un principe actif (dans le cadre de cette thèse) et une particule inorganique (pour les perspectives du projet).

Une étude *in situ* approfondie du système PNB- $\text{CO}_2$  par spectroscopie IRTF a montré que le PNB peut être gonflé de 35% volumique en présence de  $\text{CO}_2$  supercritique (15 MPa, 33°C). Le même taux de gonflement a été observé pour le POE dans la gamme (2000-8000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) à 15 MPa et 33°C dans la littérature. Ainsi nous avons estimé un taux de gonflement des particules PNB-POE par le  $\text{CO}_2$  supercritique à 35% volumique. Liés à ces taux de gonflement, il est possible d'imprégner au maximum environ 40% en masse d'acide salicylique dans le POE et 15 % en masse dans le PNB. A titre d'exemple pour des vecteurs avec un rapport PNB-POE de 20/80 en masse, l'imprégnation sous  $\text{CO}_2$  supercritique permet l'encapsulation d'environ 20% en masse d'acide salicylique. Ce taux d'imprégnation est en accord avec celui calculé théoriquement à partir de la composition de la particule et du taux d'imprégnation du PNB seul et du POE seul.

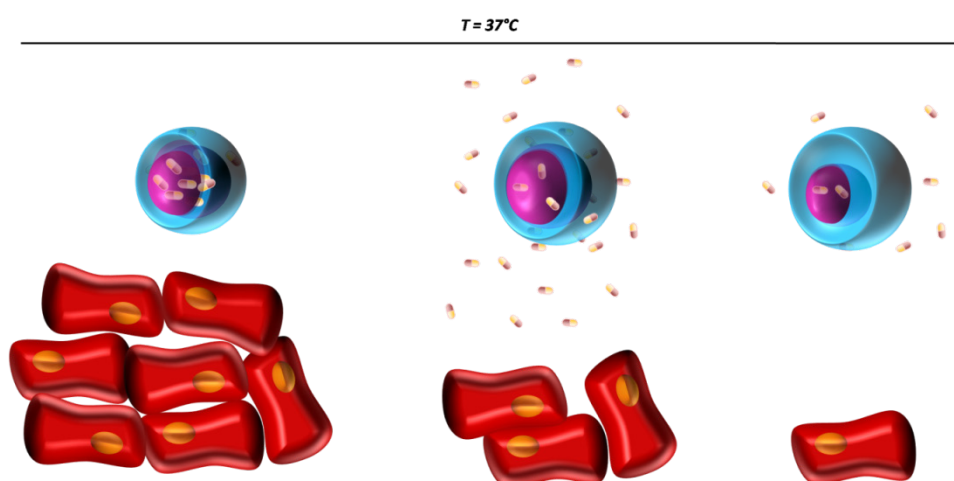
L'étude *in situ* par spectroscopie IRTF de l'imprégnation des vecteurs PNB-POE par de l'acide salicylique sous  $\text{CO}_2$  supercritique a permis de déterminer le mécanisme d'imprégnation à partir du suivi de l'état de spéciation de ce principe actif sous forme monomère ou dimère. Etant principalement présent sous la forme dimère dans les particules au niveau du PNB et du POE, il s'avère que l'acide salicylique n'interagit pas avec les polymères constitutifs du vecteur et que l'imprégnation résulte uniquement de la solubilisation de l'acide salicylique dans le  $\text{CO}_2$ . Ainsi le taux d'imprégnation peut être contrôlé facilement à partir du rapport  $\text{CO}_2$ /quantité des espèces introduites.

Enfin, une étude approfondie de la thermosensibilité des vecteurs PNB-POE imprégnés par de l'acide salicylique a permis de mettre en avant un nouveau concept de relargage avec trois modes d'action. Ces particules sont capables de relarguer à température corporelle l'acide salicylique contenu dans l'écorce de POE suivant un premier effet flash résultant de la solubilisation des chaînes de POE. Tant que la température reste inférieure à 35°C, aucun relargage supplémentaire n'est observé et l'acide salicylique présent au cœur du PNB reste piégé. Dans le cas de particules non réticulées, le cœur de PNB est capable de relarguer une partie de l'acide salicylique imprégnée par contraction lorsque l'on dépasse sa  $T_g$  c'est-à-dire à partir de 35°C. Ce relargage peut être accéléré en fonction de la température et atteint systématiquement un palier correspondant à la contraction maximale du PNB. Il a été montré que parallèlement à la contraction du PNB, les

chaînes de POE ont tendance à collapser sur la particule lorsque la température dépasse 35°C. Ce phénomène s'accompagne du piégeage de l'acide salicylique en relargage du cœur de PNB. Ainsi, le retour à des températures plus faibles permet un relargage dans un troisième temps correspondant au redéploiement des chaînes de POE libérant l'acide salicylique piégé. Pour finir, il a été montré que la présence d'agent réticulant peut moduler le profil de relargage des particules.

**Ces travaux de thèse ont permis de mettre en avant un nouveau concept de relargage thermosensible en trois temps : un premier effet de relargage rapide, un second effet sensible à la hausse de température et un troisième effet sensible à la diminution de la température.**

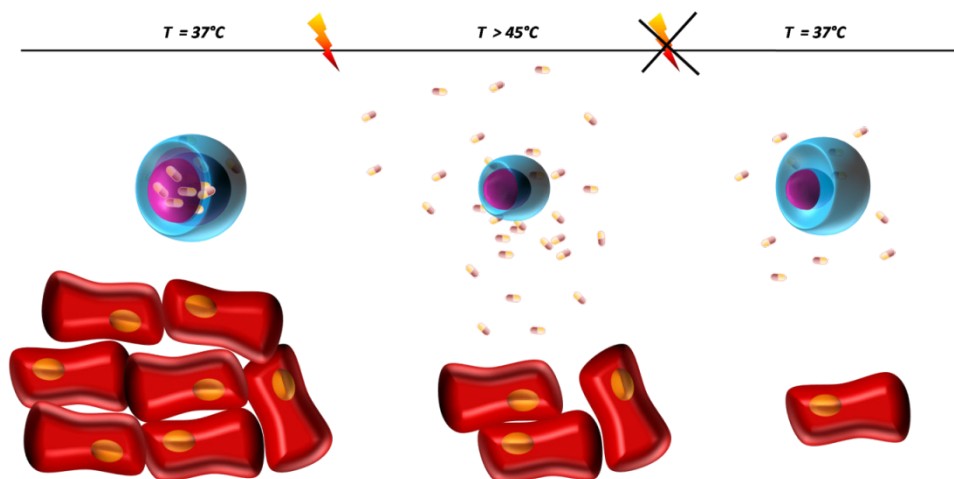
Suivant le type de vecteur choisi, différentes stratégies de libération de principe actif sont envisageables. Tout d'abord, considérons une nanoparticule non réticulée. Un tel vecteur injecté au niveau d'une zone tumorale permet un premier relargage flash dès l'injection et une action rapide au niveau des cellules malades. Ensuite, la simple présence de la particule au niveau de la zone tumorale (température de l'ordre de 39-42°C) permet le relargage progressif du principe actif. Ainsi, suite à une destruction en masse des cellules malades, une action thérapeutique peut être maintenue sur du plus long terme. Ce premier concept ne s'inscrit pas nécessairement dans une stratégie de ciblage par stimulus externe mais répond tout à fait aux souhaits des stratégies de relargage prolongé dans le temps ciblant les tissus tumoraux (Figure 1).



**Figure 1 : Mécanisme de relargage de particules non réticulées: application pour le relargage prolongé de principes actifs au niveau de cellules tumorales.**

Enfin, dans le cas des vecteurs réticulés, le relargage de principe actif présent au cœur du vecteur est possible suite à une élévation de température au-delà de 45°C. L'arrêt

de l'échauffement conduit alors aussi à un dernier relargage de principe actif et permet de prolonger l'action thérapeutique. On répond alors ici aux exigences des technologies de type IRM ou US où le relargage du vecteur n'est effectif que dans une gamme de températures supérieures à 45°C. Dans ce dernier cas, le souhait principal étant de ne relarguer que suite à un stimulus, le lavage préalable de l'écorce POE peut être souhaitable (Figure 2).



**Figure 2 : Mécanisme de relargage de particules PNB-POE réticulées dont l'écorce a été préalablement lavée : application pour le relargage contrôlé via un stimulus externe (échauffement local) de principes actifs au niveau de cellules tumorales.**

Ainsi, ce travail de thèse a permis de développer des vecteurs qui suivant leur composition répondent aux attentes de différentes stratégies de relargage parmi lesquelles se trouvent le relargage prolongé de principes actifs et le relargage thermosensible de principes actifs. Cette dernière stratégie permet de répondre aux attentes des technologies IRM ou US, objectif principal de ces travaux. Ces travaux ouvrent des perspectives à la fois prometteuses et simples à énoncer : le passage de l'*in vitro* à l'*in vivo*. Du point de vue de l'élaboration du vecteur, il ne manque que l'incorporation de particules inorganiques dans les vecteurs polymères réalisable à partir de l'imprégnation et de la réactivité chimique dans les milieux fluides supercritiques.

*« La mise en place des techniques de traitement de tumeurs par ultrasons focalisés en tant que nouvelle thérapie contre les cancers se concrétise. Cette technique particulièrement innovante est utilisée avec succès depuis un an au sein du service d'imagerie de l'hôpital Saint-André pour le traitement ambulatoire non invasif des fibromes utérins, tumeur non cancéreuse la plus fréquente chez les femmes en âge de procréer. « Depuis novembre 2008, 7 patientes atteintes de fibromes utérins ont bénéficié de ce nouveau traitement. La procédure s'est déroulée dans de très bonnes conditions, sans anesthésie et avec une très faible quantité d'antalgiques. Les patientes ainsi traitées ont pu*



*rentrer chez elles le jour même et reprendre une activité normale dans les jours qui suivent » raconte le Pr Hervé Trillaud, chef du service d'imagerie diagnostique et thérapeutique du Groupe Hospitalier Saint-André au CHU de Bordeaux. » Communiqué de presse du 4 mai 2009 par Philips et le CHU des Hôpitaux de Bordeaux.*

De même, à l'hôpital Edouard-Herriot de Lyon, le même type d'essais ont été réalisés sur des cancers localisés de la prostate.

Associée à des vecteurs tels que les particules PNB-POE réticulées, cette technologie pourrait allier ablation de tissus tumoraux et thérapie de cellules cancéreuses résiduelles. Nous ne sommes peut être qu'à un pas de la concrétisation du couplage de la thermoablation avec une action thérapeutique...

**-ANNEXES-**



## Annexe 1 : Exploitation des résultats du plan d'expériences

Les résultats du plan d'expériences ont été exploités à l'aide du logiciel **Modde**. Après avoir indiqué les paramètres et les réponses définis dans le cadre de ce plan d'expériences, une analyse de la matrice de réponse est réalisée. Les résultats obtenus sont les suivants :

- Cas de la taille des particules :

**Tableau 1 : Matrice des essais avec réponse correspondante (le diamètre) avec AR, l'Agent Réticulant, AS, l'Agent stabilisant, L, la masse molaire de l'AS et  $D_n$ , le diamètre moyen des particules mesurées en TEM.**

AR (% mass.)	AS (% mass.)	L (g/mol)	$D_n$ (nm)
0	15	8000	500
0	45	8000	316
0	15	2000	573
0	45	2000	230
10	15	8000	535
10	45	8000	340
10	15	2000	600
10	45	2000	273
5	30	5000	420
5	30	5000	382
5	30	5000	464

**Tableau 2 : Résultats de l'analyse de la matrice d'expériences sur la réponse diamètre. Les  $D_i$  sont les coefficients de l'équation du modèle qui caractérise les effets de chacun des paramètres.  $P_{ns}$  est la probabilité que l'effet considéré ne soit pas significatif, IC est l'intervalle de confiance et R2 est le coefficient de régression linéaire.**

	Effets	Ecart type	$P_{ns}$ (%)	IC ( $\pm$ )
$D_0$	413	12,8132		
AR ( $D_R$ )	4,36033	13,4386	75,51	31,7775
AS ( $D_M$ )	-127,344	13,4385	3,05.E-03	31,7775
L ( $D_L$ )	-8,38525	13,4386	55,243	31,7775
R2	0,928			

Le coefficient de régression renseigne sur la fiabilité du modèle et est très bon dans ce premier cas. D'après le Tableau 2, seul le facteur « masse en agent stabilisant » (AS) a un effet significatif. En effet, sa probabilité de ne pas être significatif ( $P_{ns}$ ) est très faible et la valeur de son intervalle de confiance est bien inférieure à la valeur de son effet ( $D_M$ ). Le  $P_{ns}$  relatif à la longueur de l'agent stabilisant est non négligeable mais la comparaison entre la valeur de l'effet et l'intervalle de confiance correspondant montre que considérer ce facteur n'est pas pertinent.

- Cas de la polydispersité des particules :

**Tableau 3 : Matrice des essais avec réponse correspondante avec AR, l'Agent Réticulant, AS, l'Agent stabilisant, L, la masse molaire de l'AS et P, la polydispersité déterminée à partir des clichés TEM.**

AR (% mass.)	AS (% mass.)	L (g/mol)	P
0	15	2000	0,051
10	15	2000	0,147
0	45	2000	0,14
10	45	2000	0,145
0	15	8000	0,023
10	15	8000	0,131
0	45	8000	0,036
10	45	8000	0,0865
5	30	5000	0,052
5	30	5000	0,055
5	30	5000	0,083

**Tableau 4 : Résultats de l'analyse de la matrice d'expériences sur la réponse polydispersité. Les  $P_i$  sont les coefficients de l'équation du modèle qui caractérise les effets de chacun des paramètres sur P.  $P_b$  est la probabilité que l'effet considéré ne soit pas significatif, IC est l'intervalle de confiance et  $R^2$  est le coefficient de régression linéaire.**

	Effets	Ecart type	$P_b$ (%)	IC ( $\pm$ )
$P_0$	0,086	0,0101		
AR ( $P_R$ )	0,029	0,0106	2,88	0,025
AS ( $P_M$ )	0,006	0,0106	57,58	0,025
L ( $P_L$ )	-0,023	0,0106	6,53	0,025
$R^2$	0,644			

Le coefficient de régression étant cette fois-ci moins bon, le modèle est à utiliser avec précaution. Afin d'avoir une tendance quant aux facteurs influant sur la polydispersité, l'analyse des résultats est tout de même pris en compte. D'après le Tableau 4, il semblerait que le facteurs « masse en agent réticulant » (AR) ait un faible  $P_{ns}$  et soit influant. Encore une fois, au regard des intervalles de confiance et des valeurs des coefficients de ces effets, ces résultats sont à utiliser avec beaucoup de réserve.

## Annexe 2 : Procédés de mise en forme de particules sous FSC

### Procédés utilisant les fluides supercritiques comme solvant

- **RESS**

Le procédé RESS, qui consiste en une dissolution-recristallisation, est couramment utilisé afin d'obtenir des poudres micro- ou nanométriques. Le solide à mettre en forme est tout d'abord dissous dans le milieu supercritique, puis recristallisé grâce à une brusque détente vers une chambre à basse pression. La forte chute de pression accompagnée d'une chute de température provoque la diminution de la densité ainsi que du pouvoir solvant du fluide supercritique entraînant une sursaturation et la précipitation du soluté. On peut alors former de très petites particules, des fibres ou des films.

Bien que les premières recherches utilisant ce procédé concernent l'obtention de petites particules, les publications les plus récentes traitent de l'obtention de microcapsules qui enrobent une substance active, en mélangeant les composés au cours du procédé. Néanmoins, le procédé RESS présente un inconvénient majeur puisque de nombreuses molécules n'ont qu'une faible solubilité dans les fluides supercritiques. Pour pallier cela, la solution la plus courante est d'adjoindre un co-solvant en faible proportion (1-5%) au milieu supercritique. Ainsi il a été possible d'élargir le nombre de polymères pouvant faire l'objet d'un traitement par RESS. Parmi les co-solvants étudiés, on trouve l'acétone <sup>[1]</sup>, CHCl<sub>3</sub> <sup>[2]</sup> et certains alcools <sup>[3, 4]</sup>. Par exemple, les copolymères PS-*b*-(PMMA-*co*-PGMA) qui sont presque insolubles dans le CO<sub>2</sub> ou l'éthanol pur ont pu être dissous dans un mélange des deux jusqu'à 20% en masse. Une méthode dérivée de la RESS, la RESS-N (RESS-nonsolvant) a été développée pour l'enrobage de protéines. Une suspension de protéines dans un mélange CO<sub>2</sub>-polymère dissous dans un cosolvant est vaporisée au travers d'une buse dans une chambre à pression atmosphérique. Cette rapide dépressurisation conduit à la micro-encapsulation des protéines dans des particules polymériques <sup>[4]</sup>.

- **RESOLV**

Une variante intéressante du procédé RESS consiste à réaliser la pulvérisation rapide d'une solution supercritique dans un liquide. Ce procédé nommé RESOLV permet notamment de coupler les avantages du RESS à des méthodes chimiques pour obtenir des matériaux inorganiques.

### Procédés utilisant les fluides supercritiques comme antisolvant

Quand le soluté est peu soluble voire insoluble dans le milieu supercritique, celui-ci peut jouer le rôle d'anti-solvant. Ce type de procédés est particulièrement adapté pour des

molécules connues pour leur très faible solubilité dans les milieux supercritiques (polymères mais aussi sucres, protéines...). Outre le composé à étudier et le fluide supercritique, un troisième composé intervient : le solvant. Ce dernier doit avoir les caractéristiques suivantes :

- être un bon solvant du composé,
- avoir une bonne compatibilité avec l'anti-solvant (idéalement, ils doivent être complètement miscibles),
- persister le moins possible dans le solide mis en forme en fin de procédé.

Lors de la mise en contact de la solution (solvant + soluté), avec l'antisolvant supercritique, celui-ci se dissout dans la phase, diminuant sa densité et son pouvoir de solvation. Simultanément, le solvant s'évapore dans la phase supercritique, augmentant la concentration du soluté. Ce processus entraîne la sursaturation du soluté qui conduit à sa précipitation. Dans la pratique, deux modes opératoires sont rencontrés : un mode discontinu (mode fermé) et un mode semi-continu. Les principaux sont exposés ci-dessous.

- **GAS (*Gaseous Anti Solvent*)**

GAS est une technique en batch de mode discontinu. Le CO<sub>2</sub> est introduit de manière progressive à l'intérieur d'une chambre dans laquelle se trouve la solution de soluté. Le CO<sub>2</sub> est alors pompé jusqu'à ce que la pression souhaitée soit atteinte au sein de la chambre. Cette technique a pour principal avantage la garantie d'un très bon mélange entre l'antisolvant et la solution de soluté <sup>[5]</sup>.

- **PCA (*Particles by Compressed Antisolvent*), SAS (*Supercritical Antisolvent*), ASES (*Aerosol Extraction System*)**

Pour ces trois procédés, le CO<sub>2</sub> (supercritique pour le SAS ou souscritique pour le PCA) est tout d'abord amené dans les conditions de pression et température souhaitées à l'intérieur d'une cellule haute pression. Ensuite, la solution organique est vaporisée au travers d'une buse à l'intérieur de la chambre entraînant la formation de particules.

Lors d'un procédé ASES, l'anti-solvant et la solution organique sont simultanément vaporisés dans la cellule haute pression en conditions. Cette technique permet le « recyclage » du fluide supercritique ainsi que du solvant. FSC et antisolvant peuvent ainsi circuler en continu au travers montage.

- **SEDS (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*)**

SEDS est une technique innovante développée par Hanna et York <sup>[6]</sup>. Dans ce procédé, le fluide supercritique est utilisé à la fois pour ces propriétés chimiques, mais également en tant que produit améliorant la pulvérisation via un effet mécanique. Une buse coaxiale à double entrée permet d'introduire ensemble le fluide supercritique et la solution dans une chambre où se forment les particules et dans laquelle on peut contrôler la pression et la température. La géométrie de la buse permet de travailler à de forts nombres de

Reynolds (bon mélange) et faibles nombres de Weber (gouttelettes de petite taille) en accroissant la vitesse du fluide. Cette technique a, entre autre, permis d'élaborer des procédés de formation de particules de principe actif. La solution de principe actif et le fluide supercritique sont simultanément introduits par la buse dans la chambre entraînant la formation des particules. Il est alors imaginable de diluer à la fois le principe actif et un polymère dans une même solution et donc de former des particules de polymère imprégnées de principe actif.

- **PGSS (*Particles from Gas Saturated Solutions*)**

La solubilité des gaz dans les liquides et les solides est beaucoup plus grande que celle des liquides et solides dans les gaz. C'est à partir de cette notion qu'a été développé le procédé PGSS dans lequel le fluide joue cette fois le rôle de soluté. Le procédé consiste à solubiliser une quantité importante de fluide supercritique dans une substance fondue ou dissoute dans un solvant entraînant la formation d'une solution saturée en gaz. Cette dernière est alors expansée au travers d'une buse dans une chambre de pulvérisation, ce qui forme des gouttelettes ou des particules solides. L'effet conjugué du refroidissement du mélange ainsi que l'expansion du volume du gaz fait précipiter la substance. Les particules sont alors collectées dans le réacteur après dépressurisation et le fluide supercritique peut être réutilisé. Ce procédé reposant sur la solubilité du fluide supercritique dans le soluté, il permet la mise en forme de nombreux composés peu solubles dans les fluides supercritiques et est donc particulièrement adapté aux polymères.

### **Procédés utilisant les fluides supercritiques comme cosolvant**

- **DELOS (*Depressurization of an Expanded Liquid Organic Solution*):**

Le « DELOS » (en français, dépressurisation d'une solution organique expansée) est une nouvelle méthode de mise en forme de particules. Ce procédé diffère des précédents de par l'action du fluide, ici utilisé en tant que co-solvant totalement miscible (à la température de travail  $T_t$  et la pression de travail  $P_t$ ) avec la solution soluté-solvant organique. Ici, le rôle du fluide est de produire, lors de sa vaporisation, un refroidissement rapide et homogène de la solution s'accompagnant de la précipitation de particules solides.

Dans une première étape, le soluté est dissous dans un solvant organique à pression atmosphérique ( $P_{atm}$ ) et à  $T_t$  afin de former une solution avec un taux de supersaturation initial  $\beta=C_l/C_s$  où  $C_l$  est la concentration du soluté dans la solution initiale et  $C_s$  est la concentration limite à saturation du soluté dans le mélange solvant organique-fluide à  $T_t$ . Dans une seconde étape, le gaz condensé (par exemple le  $CO_2$ ) est ajouté à la phase organique dans le but d'obtenir une solution liquide expansée à  $T_t$  et  $P_t$ , contenant une fraction molaire en fluide  $X_t$ . La concentration en soluté dans la solution expansée à cette



étape doit rester en dessous de la limite de saturation. Dans une dernière étape, la dépressurisation rapide de la solution de  $P_t$  à  $P_{atm}$  produit une ample, rapide et homogène diminution de la température. Il en résulte une hausse importante et homogène du taux de supersaturation de la solution s'accompagnant de la précipitation et de la nucléation de particules de taille allant du nanomètre au micromètre et présentant une faible polydispersité [7].

Le « DELOS » est un procédé prometteur de mise en forme de particules qui peut être une alternative plus facile à mettre en œuvre à l'échelle industrielle que les procédés GAS ou PCA.

#### Bibliographie

1. R. G. Wissinger, M. E. P. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1991**, 29, (5), 631-633.
2. Tom, J. W.; Debenedetti, P. G.; Jerome, R. *J. Supercrit. Fluids* **1994**, 7, (1), 9-29.
3. Matsuyama, K.; Mishima, K.; Umemoto, H.; Yamaguchi, S. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, (20), 4149-4155.
4. Kenji Mishima, K. M. D. T. S. Y. T. J. Y. K. P. *J. AIChE Journal* **2000**, 46, (4), 857-865.
5. Pasquali, I.; Comi, L.; Pucciarelli, F.; Bettini, R. *Int. J. Pharm.* **2008**, 356, (1-2), 76-81.
6. Maze, H.; Peter, Y. Method and apparatus for the formation of particles patent, 1995.
7. Ventosa, N.; Sala, S.; Veciana, J. *J. Supercrit. Fluids* **2003**, 26, 33-45.

### **Annexe 3 : Techniques de caractérisation du système polymères – CO<sub>2</sub>**

#### **1. La méthode barométrique (*pressure decay*)**

La masse de gaz absorbée par un échantillon de polymère est obtenue en mesurant la différence entre la pression initiale (à la fin de l'ajout du gaz) et la pression après stabilisation. La quantité absorbée est calculée à partir des mesures de température, de pression et d'une équation d'état du gaz étudié <sup>[1]</sup>. Il est alors nécessaire de connaître avec précision le volume du montage.

#### **2. La méthode gravimétrique**

Cette méthode permet de suivre la cinétique de désorption/absorption du CO<sub>2</sub> contenu dans un polymère. La variation de la masse de l'échantillon peut être mesurée soit après retrait de l'échantillon de la cellule haute pression (méthode peu précise) <sup>[2-6]</sup>, soit *in situ* <sup>[7]</sup>.

#### **3. La méthode par modulation de fréquence**

Cette méthode utilise une microbalance de quartz. Un fin cristal de quartz est recouvert d'un film de polymère. Le tout est positionné entre deux électrodes métalliques capables d'établir un courant alternatif à travers le cristal. Il en résulte l'apparition d'une onde vibrationnelle dont la fréquence de résonance varie linéairement avec la masse de l'échantillon <sup>[8]</sup>. Le challenge de cette méthode est la préparation de films de polymères présentant une bonne adhésion au cristal. Ceci est d'autant plus difficile qu'il limite le nombre de polymères analysables <sup>[9]</sup>.

#### **4. La méthode par séparation de phase**

Le polymère est exposé à du CO<sub>2</sub> supercritique dans un autoclave. Après établissement de l'équilibre thermodynamique, des échantillons sont prélevés dans les deux phases : la phase riche en polymère et la phase riche en gaz. La quantité de CO<sub>2</sub> dans la phase riche en polymère détermine la solubilité du CO<sub>2</sub> dans le polymère. Cette valeur peut être obtenue suite au dégazage du POE dont la quantité peut être déterminée soit par chromatographie soit par gravimétrie.

#### **5. La méthode par suivi visuel *In Situ***

Cette technique nécessite une cellule haute pression constituée de deux fenêtres (saphir <sup>[10][11]</sup>, borosilicate <sup>[12]</sup>), qui se font face afin de visualiser le comportement du polymère en présence de CO<sub>2</sub> en fonction de la température et de la pression. Pendant l'expérience, des images de l'échantillon en gonflement sont prises à intervalles réguliers. L'analyse des images est ensuite faite au moyen d'un logiciel adapté (*Image J...*).

La plupart de ces études ont été complétées par une analyse (non simultanée) de l'absorption de CO<sub>2</sub> supercritique par gravimétrie.

## 6. Ellipsométrie spectroscopique *in situ*

L'ellipsométrie spectroscopique permet l'analyse de films fins de polymères. Au moyen de cette technique, Sirard *et al.* ont mesuré l'absorption de CO<sub>2</sub> supercritique et le gonflement pour des films de poly(diméthylsiloxane) (PDMS). Le gonflement est déterminé à partir de la mesure de l'épaisseur et l'absorption en CO<sub>2</sub> supercritique, à partir de celle de l'indice de réfraction du film. L'ellipsométrie est l'une des rares techniques à permettre la mesure simultanée de l'absorption de FSC et du gonflement d'un polymère <sup>[13]</sup>.

## 7. La spectroscopie par ATR (Attenuated Total Reflectance Infra Red)

Le montage d'analyse appelé « Golden Gate » ATR permet de mesurer simultanément l'absorption du CO<sub>2</sub> supercritique et le gonflement résultant du polymère. Il consiste en un cristal (à base de diamant ou de germanium) sur lequel est fixée une cellule haute pression (Figure 1). Le film de polymère est dans un premier temps élaboré à la surface du cristal, puis le tout est enserré dans la cellule et mis sous conditions supercritiques.

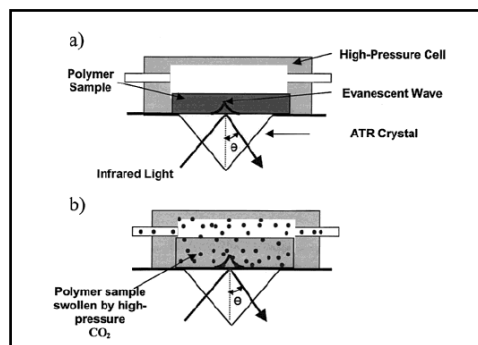


Figure 1 : Représentation schématique d'un film de polymère déposé sur le cristal d'ATR-IR <sup>[63]</sup>.

La spectroscopie par ATR ne tient pas compte de l'absorbance du gaz seul diffus dans la cellule. En effet, l'onde IR incidente génère une onde évanescente qui ne parvient pas à pénétrer au-delà du film de polymère. Ainsi, les seules bandes du CO<sub>2</sub> supercritique détectées sont celle du fluide dissous dans le polymère et la concentration en CO<sub>2</sub> supercritique dissous peut être obtenue en mesurant l'absorbance des bandes Infra Rouge correspondantes du gaz. En transmission, il est plus difficile de s'affranchir du CO<sub>2</sub> supercritique diffus dans la cellule.

Simultanément, les mesures de l'absorption de CO<sub>2</sub> supercritique par un polymère et de son gonflement résultant sont possibles au regard de leurs bandes caractéristiques <sup>[82]</sup>.

Les échantillons utilisés pour la spectroscopie par ATR étant des films fins, la caractérisation d'un polymère lors de son gonflement sous CO<sub>2</sub> supercritique est rapide. Cependant, cette technique présente quelques limites. D'une part, le dispositif d'ATR ne permet la caractérisation qu'en surface du polymère (pénétration de l'onde sur une faible épaisseur) et ne donne donc pas d'informations sur l'homogénéité des phénomènes

observés. D'autre part, l'indice de réfraction du polymère change lors de son gonflement et par conséquent la longueur de pénétration de l'onde électromagnétique (et le trajet optique  $l$ ) varient. La mesure du gonflement exige alors la connaissance de la variation de l'indice de réfraction de l'échantillon. Cette grandeur est accessible en analysant le polymère pressurisé lors de deux expériences distinctes utilisant deux cristaux à ATR différents <sup>[63]</sup>.

### Bibliographie

1. Davis, P. K.; Lundy, G. D.; Palamara, J. E.; Duda, J. L.; Danner, R. P. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2004**, 43, (6), 1537-1542.
2. Aionicesei, E. x.; kerget, M.; Knez, E. *J. Chem. Eng. Data* **2008**, 53, (1), 185-188.
3. Berens, A. R.; Huvard, G. S. *Supercritical Fluid Science and Technology (ACS Symposium Series 406)* **1989**, 207.
4. Muth, O.; Hirth, T.; Vogel, H. *J. Supercrit. Fluids* **2001**, 19, (3), 299-306.
5. Tomasko, D. L.; Li, H.; Liu, D.; Han, X.; Wingert, M. J.; Lee, L. J.; Koelling, K. W. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, 42, (25), 6431-6456.
6. Weidner, E.; Wiesmet, V.; Knez, Z.; Skerget, M. *J. Supercrit. Fluids* **1997**, 10, (3), 139-147.
7. Sato, Y.; Takikawa, T.; Takishima, S.; Masuoka, H. *J. Supercrit. Fluids* **2001**, 19, (2), 187-198.
8. Buttry, D. A.; Ward, M. D. *Chem. Rev.* **1992**, 92, (6), 1355-1379.
9. Aubert, J. H. *J. Supercrit. Fluids* **1998**, 11, (3), 163-172.
10. Pasquali, I.; Comi, L.; Pucciarelli, F.; Bettini, R. *Int. J. Pharm.* **2008**, 356, (1-2), 76-81.
11. Ronny Pini, G. S. M. M. H. T. K. M. S. S. M. H. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2008**, 46, (5), 483-496.
12. Üzer, S.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, 38, (1), 119-128.
13. Sirard, S. M.; Green, P. F.; Johnston, K. P. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, (4), 766-772.



- “Synthesis of Hybrids Metal-based / Polymer Nanoparticles using Supercritical Fluids. A Bridge with Bioapplications” in “Nanocomposites particles in bio-technology: synthesis, properties and applications”, C Aymonier, A.C. Le Meur, V. Héroguez, in press.
- “Impregnation of core-shell submicronic polymer particles particles using supercritical fluids for biomedical applications”, A. C. Le Meur, T. Tassaing, V. Héroguez, C. Aymonier, M. Mourgues, Polym. Mater. Sci. Eng., 2009, 101, 1764.
- “Synthesis of crosslinked polynorbornene particles by dispersion ring opening metathesis polymerization”, A. C. Le Meur, C. Aymonier, V. Héroguez, Macromolecules, *manuscript en préparation*.
- “Supercritical fluid impregnation of PNB-POE biocompatible vectors for the controlled delivery of drugs”, A. C. Le Meur, T. Tassaing, V. Héroguez, C. Aymonier, Journal of Physical Chemistry Part B, *manuscript en préparation*.
- “New concept for the controlled delivery of drugs: three times, three actions”, A. C. Le Meur, C. Aymonier, V. Héroguez, Angewandte Chemie, *manuscript en préparation*.
- “New thermosensitive vectors for the controlled delivery of drugs in three times : combination of LCST and glass transition concepts”, A. C. Le Meur, C. Aymonier, V. Héroguez, Journal of Controlled Release, *manuscript en préparation*.

