



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

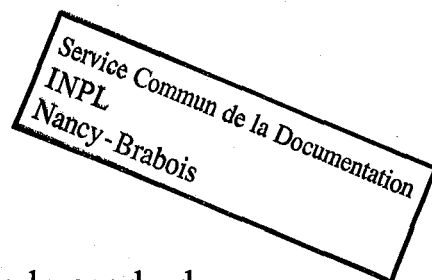
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

[M] 2002 NOUVEL C.

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES CHIMIQUES

THESE

Présentée publiquement pour obtenir le grade de

DOCTEUR**DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

Spécialité : Génie des procédés

par

Cécile NOUVEL

*« Synthèse contrôlée de copolymères
dextrane-g-poly lactide : de leur utilisation comme
surfactifs biodégradables à la mise en oeuvre de
systèmes de vectorisation particuliers. »*

Soutenue publiquement le 19 Décembre 2002 devant la Commission
d'Examen

MEMBRES DU JURY

Président :	Pr. Philippe Dumas
Rapporteurs :	Pr. Philippe Dubois Dr. Michel Vert
Examineurs :	Pr. Edith Dellacherie Dr. Jean-Luc Six

*A mes parents,
A Laurence et Alexi,*

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'équipe Polymères et Biosystèmes du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (UMR CNRS-INPL 7568, Groupe ENSIC, Nancy). Je remercie Madame Edith Dellacherie, Directeur de ce laboratoire et Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC) pour m'y avoir accueillie. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour avoir suivi ce travail durant ces trois années, et je lui adresse tous mes remerciements pour la confiance, les encouragements et les conseils scientifiques qu'elle m'a apportés.

~~*Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur Jean-Luc Six, Maître de conférence à l'Ecole Européenne d'Ingénieurs en Génie des Matériaux (EEIGM), pour avoir encadré ce travail. Il m'est particulièrement difficile de lui exprimer en quelques mots toute ma gratitude. Mais je lui adresse mes plus sincères remerciements pour sa patience, sa disponibilité, ses nombreux conseils, sa formation scientifique et son soutien inconditionnel aussi bien scientifique que personnel qui m'ont permis d'aboutir à la réalisation de ce travail.*~~

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une collaboration avec le Service des Matériaux Polymères et Composites (SMPC, Université de Mons-Hainaut). Je remercie Monsieur Philippe Dubois, Directeur de ce service et Professeur à l'Université de Mons-Hainaut, de m'avoir accueillie à plusieurs reprises dans son Laboratoire. Je suis particulièrement touchée qu'il ait accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Que Monsieur Michel Vert, Directeur de Recherche au CNRS et Directeur du Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels (UMR 5473, Université de Montpellier I, Faculté de Pharmacie), trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail et d'en être rapporteur.

Je remercie Monsieur Philippe Dumas, Professeur à L'ENSC-Mu (Ecole Nationale Supérieure de Chimie-Mulhouse), pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Une partie de ces travaux de recherche a été réalisée au Département de Chimie-Physique des Réactions (DCPR, UMR CNRS-INPL 7630) de l'ENSIC. Je voudrais remercier Madame Marie-Laure Viriot, Directeur de ce laboratoire et Directeur de Recherche au CNRS, pour m'y avoir accueillie.

Mes plus grands remerciements vont également à Céline Frochot, Chargée de recherche au CNRS, pour son encadrement et ses précieux conseils durant toute l'étude par spectroscopie de fluorescence. Qu'elle soit remerciée pour ces nombreux encouragements.

Je tiens également à remercier vivement Véronique Sadtler, Maître de Conférence à l'ENSIC pour ses conseils concernant l'étude des propriétés tensioactives des copolymères et pour sa gentillesse.

Je remercie Marie-Christine Petit, Chargée de Recherche au CNRS, et l'équipe Biostructures pour leurs conseils en RMN. Merci à toi, Marie-Christine, pour ton soutien moral et ta bonne humeur constante.

Merci également à toutes les personnes du SMPC, pour leur accueil chaleureux. Je voudrais tout particulièrement remercier Isabelle Ydens, pour les échanges et le travail que nous avons pu effectuer en coopération.

Je ne saurai également oublier tous les membres du laboratoire qui ont, de près ou de loin, contribué à l'accomplissement de ces travaux. C'est pourquoi je voudrais remercier plus particulièrement les membres de l'équipe Polymères et Biosystèmes, (Michèle Léonard, Alain Durand, Patrick Hubert, Hanna Mouaziz) pour leur soutien et les discussions que nous avons pu partager. A cet égard, je désirerais remercier Maude Save pour les discussions fructueuses que nous avons pu avoir, aussi bien scientifiques que personnelles, lors de son passage au laboratoire.

J'adresse aussi mes remerciements à Madame Marie-Christine Grassiot, Monsieur Jean-Marie Grosse, Monsieur André Vicherat, Monsieur Henri Lenda et Monsieur Jean-François Rémy pour leur appui technique. Je remercie Mesdames Jeanine Fourier et Dominique Storck pour leur aide administrative et leur gentillesse.

Enfin, un très grand merci à mes collègues du laboratoire, présents et passés : Merci à David, Céline, Cécile, Elise, Marie, Anne, Elise... et aux autres pour votre soutien constant et inconditionnel, mais surtout pour votre bonne humeur.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

Partie I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. INTRODUCTION.....	4
II. GENERALITES	5
II.1. Les polysaccharides.....	5
II.2. Le dextrane.....	7
II.3. Notion de « glycopolymère ».....	10
II.4. Polysaccharides modifiés.....	11
III. COPOLYMERES DIBLOC A BASE DE POLYSACCHARIDES.....	12
III.1. Généralités.....	12
III.2. Méthodes utilisant la protection des fonctions hydroxyle.....	12
III.3. Méthodes utilisant la réactivité particulière de l'alcool anomérique terminal.....	14
III.3.2. Amination réductrice.....	15
IV. GENERALITES SUR LES COPOLYMERES GREFFES A BASE DE POLYSACCHARIDES.....	16
V. SYNTHÈSE DE COPOLYMERES A BASE DE POLYSACCHARIDES PAR LA METHODE « GRAFTING THROUGH ».....	17
VI. SYNTHÈSE DE COPOLYMERES A BASE DE POLYSACCHARIDES PAR LA METHODE « GRAFTING ONTO ».....	19
VI.1. Copolymères à greffons polysaccharide.....	19
VI.2. Copolymères à dorsale polysaccharide.....	20
VI.3. Conclusions sur la méthode « grafting onto ».....	31
VII. SYNTHÈSE DE COPOLYMERES A BASE DE POLYSACCHARIDES PAR LA METHODE « GRAFTING FROM ».....	32
VII.1. Copolymères à greffons polysaccharide.....	32
VII.2. Copolymères à dorsale polysaccharide.....	33
VII.3. Conclusions sur la méthode « grafting from ».....	43
VIII. CONCLUSIONS GENERALES SUR LES STRATEGIES DE SYNTHÈSES DES GLYCOPOLYMERES GREFFES	44
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45

Partie II

SYNTHESE DES COPOLYMERES DEXTRANE-G-POLYLACTIDE

Chapitre I : Silylation

I. METHODES DE PROTECTION DES FONCTIONS ALCOOL	61
I.1. Choix de la méthode de protection	62
I.2. Choix du groupement silylé	63
II. SILYLATION DES POLYSACCHARIDES : CONDITIONS ET DISCUSSION	64
II.1. Antécédents / Différences de réactivités des polysaccharides	64
II.2. Nature des agents silylants employés	65
II.3. Nature du milieu réactionnel	66
II.4. Conclusions / Choix des conditions réactionnelles	67
III. DETERMINATION DES TAUX DE SILYLATION	68
III.1. Définitions	68
III.2. Méthodes d'analyse	68
IV. RESULTATS AVEC HMDS SEUL	69
IV.1. Mécanisme	69
IV.2. Paramètres d'influence	69
V. EFFETS DE L'AJOUT D'UN CATALYSEUR A HMDS	72
VI. AUTRE AGENT SILYLANT : LA N,O-BIS(TRIMETHYLSILYL)ACETAMIDE (BSA)	74
VII. ANALYSES STRUCTURALES DES DEXTRANES SILYLES ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	77
VII.1. Analyse IRTF	77
VII.2. Propriétés Thermiques	77
VII.3. Analyse RMN	78
VIII. CONCLUSIONS	86
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	87

Chapitre II : Polymérisation du D,L-Lactide à partir du macroamorceur dextrane silylé

I. GENERALITE SUR LES POLYESTERS	94
I.1. Présentation	94
I.2. Synthèse des polylactides- Généralités	96
I.3. POC du lactide	97
II. MISE AU POINT DES CONDITIONS DE POLYMERISATION	106
II.1. Conditions opératoires	106
II.2. Analyse RMN ¹ H	108
II.3. Synthèses préliminaires	110
II.4. Influence de la quantité d'amorceur	112
II.5. Cinétiques de polymérisation sur un dextrane silylé	113
III. BILAN DES POLYMERISATIONS AVEC R=0,03	113
III.1. Analyses RMN ¹ H et SEC	113
III.2. Analyse Infra-Rouge	116
III.3. MDSC	117
III.4. RMN ¹³ C & HMQC	117
IV. CONCLUSION	119
V. BIBLIOGRAPHIE	121

Chapitre III : Déprotection & Dégradation

I. DEPROTECTION	130
I.1. Mise au point des conditions sur le dextrane silylé	130
I.2. Déprotection des copolymères (dextrane silylé-g-polylactide)	135
II. STABILITE DU DEXTRANE AU COURS DES DEUX PREMIERES ETAPES DE LA SYNTHESE	136
II.1. Méthodes d'analyse	137
II.2. Première méthode (« Blancs »)	137
II.3. Etude la dégradation lors de l'étape de silylation	138
II.4. Conclusion et conditions à retenir pour la silylation	140
III. CONCLUSION	140
IV. BIBLIOGRAPHIE	141

Conclusions 143

Partie III :
DE L'ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES AUX APPLICATIONS BIOMEDICALES POTENTIELLES

**Chapitre I : Propriétés en solution diluée -
Etude des propriétés tensioactives**

I. TENSIOMETRIE.....	147
I.1. Généralités.....	147
I.2. Application à notre étude.....	149
I.3. Copolymères « hydrosolubles »-Mesure des tensions superficielles.....	149
I.4. Copolymères « Organosolubles » - Mesure des tensions interfaciales eau/phase organique.....	153
I.5. Conclusions.....	154
II. SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE.....	154
II.1. Généralités.....	155
II.2. Principe d'étude en présence d'une sonde extrinsèque.....	155
II.3. Etude des copolymères dextrane-g-poly lactide hydrosolubles.....	156
II.4. Etudes des copolymères dextrane-g-PLA « organosolubles ».....	162
III. CONCLUSION - PERSPECTIVES.....	167
IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	168

**Chapitre II : Potentiel des dex-g-PLA dans la
formation de nanosphères**

I. LA VECTORISATION DES MEDICAMENTS.....	172
I.1. Les différents types de vecteurs.....	173
I.2. Intérêts de la vectorisation.....	174
I.3. Processus de libération et de dégradation.....	175
II. PROCEDES DE FABRICATION DES NANOSPHERES.....	176
II.1. Nature des polymères utilisés.....	176
II.2. Réticulation de macromolécules naturelles amphiphiles.....	176
II.3. Polymérisation de monomères.....	177
II.4. Précipitation de polymères synthétiques.....	177
III. LES NANOPARTICULES DANS L'ADMINISTRATION INTRA VEINEUSE.....	179
III.1. Devenir « in vivo ».....	180

III.2. Processus de phagocytose.....	180
III.3. Particules furtives.....	180
IV. OBJECTIFS DE NOTRE ETUDE.....	182
IV.1. Intérêt de l'utilisation du dextrane à la place des POE.....	182
IV.2. Intérêts respectifs des recouvrements par du dextrane et du POE.....	183
IV.3. Taille des particules.....	185
V. RESULTATS OBTENUS AVEC LES COPOLYMERES DEX-G-PLA HYDROSOLUBLES.....	185
V.1. Influence des conditions opératoires sur la taille des nanosphères.....	186
V.2. Propriétés de surface des nanosphères.....	188
VI. CONCLUSIONS.....	191
VII. BIBLIOGRAPHIE.....	192

Partie IV : ***PARTIE EXPERIMENTALE***

I. PROTOCOLES OPERATOIRES DE SYNTHESSES.....	197
I.1. Matériels.....	197
I.2. Silylation du dextrane.....	198
I.3. Polymérisation du lactide.....	198
I.4. Déprotections.....	199
I.5. Test de stabilité du dextrane.....	200
II. ANALYSES INFRA-ROUGE (IRTF).....	201
III. CALORIMERIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE MODULE (MSDC).....	201
III.1. Principe.....	201
III.2. Mesure de la température de transition vitreuse (Tg).....	202
III.3. Spécificité de la MDSC.....	202
III.4. Appareillage et conditions expérimentales :.....	203
IV. DETERMINATION DES MASSES MOLAIRES MOYENNES par Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).....	204
IV.1.1. SEC-MALLS Phase aqueuse.....	204
IV.1.2. SEC -Phase organique.....	205
V. SPECTROSCOPIE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE, RMN.....	205
V.1. Conditions.....	205
VI. MESURE DES TENSIONS SUPERFICIELLES ET INTERFACIALES.....	207
VI.1. Tension superficielle.....	207
VI.2. Mesure des tensions interfaciales eau/dichlorométhane.....	208

VII. SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE.....	209
VII.1. Appareillage	209
VII.2. Protocole expérimental :	210
VIII. PREPARATION DES PARTICULES ET ETUDE DE LEURS CARACTERISTIQUES.....	213
VIII.1. Protocole de préparation des particules par le procédé « émulsion/évaporation » de solvant.....	213
VIII.2. Caractérisation des particules	214
VIII.3. Détermination du taux de recouvrement des particules (Γ):	219
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	222

<i>Conclusion générale</i> <i>Perspectives</i>

ABREVIATIONS et SYMBOLES

Polymères:

MPEG	monométhoxypoly(éthylène glycol)
MPOE	monométhoxypoly(oxyde d'éthylène)
PEG	poly(éthylène glycol)
POE	poly(oxyde d'éthylène)
PACA	poly(cyanoacrylate d'alkyle)
PDMS	polydiméthylsiloxane
PCL	poly(ϵ -caprolactone)
PVL	poly(δ -valérolactone)
PLA	polylactide
PLGA	poly(acide lactique-co-glycolique)
PHA	polyhydroxyalkanoate
PHB	polyhydroxybutyrate
PMMA	poly(méthacrylate de méthyle)

Réactifs et solvants :

TMS	groupelement triméthylsilyle (-SiMe ₃)
HMDS	hexaméthylidisilazane
TMSCl	chlorure de triméthylsilyle
BSA	N,O-Bis(triméthylsilyl)acétamide
BSTFA	N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DMF	N,N-diméthylformamide
THF	tétrahydrofuranne
CDI	carbodiimide
HEMA	méthacrylate de 2-hydroxyéthyle
HMPA	hexaméthylphosphorique triamide
NMP	N-méthylpyrrolidinone
NMI	N-méthylimidazole
NCA	cycle d'anhydride de Leuchs

Divers

ADN	acide désoxyribonucléique
ATRP	polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atomes
POC	polymérisation par ouverture de cycle

Appareils et techniques utilisés:

MDSC	calorimétrie différentielle à balayage modulée en température
IRTF	Infra-rouge à transformée de fourrier
PCS	spectroscopie à corrélation de photons
RMN	résonance magnétique nucléaire
SEC	chromatographie d'exclusion stérique
SEC-MALLS	système de chromatographie d'exclusion stérique couplé à un diffusiomètre laser multiangle

Caractérisation des polymères:

Conv	taux de conversion en monomère (exprimé en %)
$\overline{DP}_{n\text{ DEX}}$	degré de polymérisation moyen en nombre de la dorsale dextrane
$\overline{DP}_{n\text{ DEX}}^{\text{PLA}}$	degré de polymérisation moyen en nombre d'un greffon PLA
DS	degré de substitution : nombre de groupements protecteurs présents par unité glucose (3 au maximum)
F_w^{PLA}	Fraction massique en polylactide dans un copolymère DexSi-g-PLA
F^{PLA}	Fraction massique en polylactide dans un copolymère Dex-g-PLA
$\overline{M}_n$	masse molaire moyenne en nombre (g/mol)
$\overline{M}_{n\text{ GREF}}$	masse molaire moyenne en nombre d'un greffon de PLA (g/mol)
$\overline{M}_w$	masse molaire moyenne en masse (g/mol)
I	indice de polymolécularité ($= \overline{M}_w / \overline{M}_n$)
$\overline{N}_{\text{GREF}}$	nombre moyen de greffons PLA par unité glucose
$\overline{N}_{\text{OH}}$	nombre moyen de fonctions hydroxyle résiduelles portées par la chaîne de dextrane

T_g température de transition vitreuse

Propriétés physico-chimiques des polymères

tensiométrie

C_{AC} concentration d'agrégation critique (mol/L)
 C_{crit} concentration critique (mol/L)
 pC_x efficacité d'un tensioactif
 Π_{crit} effectivité (mN/m)
 σ tension superficielle ou interfaciale d'un polymère en solution aqueuse (mN/m)

fluorescence

DO densité optique - Absorbance mesurée par spectroscopie UV-visible
 ε_{max} coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde λ_{max} (L.mol⁻¹.cm⁻¹)
 I_x Intensité de la bande n° x
 λ_{max} longueur d'onde maximale d'absorption (nm)
 φ_f/φ₀ rendement quantique de fluorescence
 DMAC 4-(N,N-diméthylamino)-cinnamylidène
 E_T paramètre de polarité de Reichart

Recouvrement des particules par les polymères:

FDA Food and Drug Administration
 MPS système des phagocytes mononucléés
 PMN polymorphonucléaires
 d densité de la couche interfaciale
 d_H diamètre hydrodynamique des particules mesuré par le PCS (nm)
 Δ_H épaisseur de la couche interfaciale de polymère calculée à partir des mesures de PCS (nm)
 Δ_{PZ} épaisseur de la couche interfaciale de polymère calculée à partir des mesures de potentiel zeta à différentes forces ioniques (nm)
 Γ taux de polymère immobilisé sur les particules (mg/m² de PLA)
 k_B constante de Boltzmann (1,3805.10⁻²³ J.K⁻¹)
 k_H paramètre de Debye-Hückel (nm⁻¹)

ψ_0	potentiel de surface des particules colloïdales (mV)
ψ_s	potentiel de Stern des particules colloïdales (mV)
R	rayon des particules, déterminé à partir de d_H (nm)
T_g	température de transition vitreuse (°C)
ζ	potentiel mesuré au niveau du plan de cisaillement des particules colloïdales (mV)

INTRODUCTION GENERALE

Récemment, l'Homme a pris conscience du problème du devenir de la Terre. De nombreuses manifestations mondiales ont alors été organisées (Conférences sur l'Environnement et le Développement – Rio, 03/06/92 → 14/06/92 ; Sommet Mondial sur le Développement Durable – Johannesburg, 26/08/02 → 04/09/02) et des traités internationaux, portant sur l'environnement, ont été adoptés. De nombreux débats ont été tenus au cours de ces manifestations et notamment sur les thématiques « pollutions et déchets ».

L'utilisation croissante des matériaux polymères synthétiques dans les applications courantes telles que la construction, le transport, l'emballage... pose de nombreux problèmes d'environnement, et notamment celui de leur élimination après usage. Ces matériaux polymères, pour la plupart issus du pétrole, présentent généralement une durée de vie très longue par rapport à ceux produits par la nature. Leur recyclage, leur incinération ou des techniques de dépolymérisation sont employés pour réduire leurs déchets et, pour un certain temps, limiter le problème de pollution. De plus, en considérant le développement des pays actuellement émergents, les estimations les plus sérieuses montrent qu'à partir de 2040 la production de l'industrie pétrolière ne sera probablement plus suffisante pour couvrir nos besoins. Fort de ces données, l'Homme cherche à contourner ces problèmes, tout en essayant de répondre aux politiques de Développement Durable et de conserver les acquis obtenus grâce à l'emploi des matériaux polymères. L'utilisation de matériaux naturels ou biodégradables (c'est-à-dire pour lesquels la perte des propriétés mécaniques est due à une altération des macromolécules qui peut se faire par coupure des chaînes par voie hydrolytique, enzymatique ou par l'intermédiaire de microorganismes), sont quelques solutions à envisager.

Aussi les recherches portant sur les matériaux issus des ressources renouvelables, tels que les polysaccharides ou certains polyesters aliphatiques, sont nombreuses. Ces deux familles de polymères peuvent être obtenues avec des coûts de production raisonnables, et peuvent être incorporées aux matériaux synthétiques afin d'accélérer leur fragmentation (altération des propriétés mécaniques du matériau par délitage par exemple). Cependant, le simple mélange polysaccharide/polymère de synthèse est généralement hétérogène, en raison de la non-miscibilité des deux composants (mauvaise dispersion du polysaccharide dans la matrice synthétique ou inversement). La synthèse de glycopolymères (polysaccharides modifiés chimiquement) apparaît alors comme une voie particulièrement intéressante afin soit de produire des compatibilisants nécessaires à ces mélanges, soit d'obtenir de nouvelles molécules aptes à remplacer les produits de synthèse. Citons par exemple, certains

glycopolymères présentant des propriétés amphiphiles qui peuvent alors être substitués aux tensioactifs simples souvent toxiques vis à vis de l'environnement et employés couramment dans de nombreuses formulations. Mais l'utilisation de tels produits à base de polysaccharide ne se limite pas à résoudre uniquement les problèmes de pollution et ils peuvent, par exemple, être utilisés dans des applications biomédicales, sous réserve qu'ils présentent une certaine biocompatibilité. Les glycopolymères ont ainsi suscité un vif intérêt pour la fabrication de biomatériaux biodégradables ou biorésorbables, destinés soit à la réparation de lésions (organes ou de tissus endommagés) et à l'ingénierie tissulaire, ou à la vectorisation de principes actifs, ou encore pour modifier et rendre compatible une surface hydrophobe.

Depuis plusieurs années, certaines recherches menées au Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire portent sur des polymères destinés à être au contact des biosystèmes, et plus particulièrement sur des polysaccharides modifiés. Dans le cadre de ces recherches, nous nous sommes attachés à développer la synthèse de nouveaux copolymères susceptibles d'être biocompatibles de type polysaccharide-g-polyester, et plus particulièrement les copolymères dextrane-g-poly lactide. L'association de ces deux polymères entièrement biodégradables semble particulièrement attractive pour des applications dans le domaine biomédical. Le poly(D,L-lactide) est l'un des constituants les plus utilisés dans les matrices de vecteurs particulières de principes actifs et certains dérivés du dextrane sont employés ou proposés pour de nombreuses applications *in vivo*.

L'objectif des travaux de cette thèse était de synthétiser, de manière contrôlée, des copolymères dextrane-g-poly lactide. L'étude de leurs propriétés physico-chimiques, et notamment leurs propriétés tensioactives, a été menée dans un deuxième temps et des expériences préliminaires de nanosphères à cœur PLA et à couronne de dextrane ont été réalisées.

Ce manuscrit est composé de quatre parties :

Une présentation rapide des polysaccharides, et plus particulièrement du dextrane, sera effectuée dans la première partie. Nous ferons ensuite le bilan des glycopolymères déjà décrits dans la littérature, en les classant selon leurs méthodes d'obtention.

Dans la seconde partie, après avoir explicité notre stratégie de synthèse pour obtenir les copolymères désirés, chaque étape de la synthèse sera successivement examinée en détail,

avec le souci du contrôle et de la connaissance de l'architecture. La stabilité de la dorsale dextrane, au cours des différentes étapes de la synthèse, a également été étudiée.

Nous présentons les résultats de l'étude des propriétés tensioactives des copolymères synthétisés dans la troisième partie. Ces propriétés tensioactives ont été mises à profit pour estimer le potentiel de ces copolymères dans la réalisation de systèmes particuliers, vecteurs de principe actif, et nous rapportons dans cette partie les résultats des expériences préliminaires que nous avons effectuées.

La description des conditions expérimentales, utilisées au cours de ces travaux de recherches, sera présentée dans la dernière partie.

Partie I

Etude bibliographique

Partie I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. INTRODUCTION	4
II. GENERALITES	5
II.1. Les polysaccharides	5
II.2. Le dextrane	7
II.2.1. Structure et obtention.....	7
II.2.2. Propriétés du dextrane	8
II.2.3. Bioapplications	9
II.3. Notion de « glycopolymère »	10
II.4. Polysaccharides modifiés	11
III. COPOLYMERES DIBLOC A BASE DE POLYSACCHARIDES	12
III.1. Généralités.....	12
III.2. Méthodes utilisant la protection des fonctions hydroxyle.....	12
III.2.1. Couplage d'un polysaccharide protégé et d'un polymère de synthèse	12
III.2.2. Polymérisation à partir d'un polysaccharide modifié	13
III.3. Méthodes utilisant la réactivité particulière de l'alcool anomérique terminal	14
III.3.1. Aminolyse d'une lactone terminale.....	14
III.3.2. Amination réductrice.....	15
IV. GENERALITES SUR LES COPOLYMERES GREFFES A BASE DE POLYSACCHARIDES.....	16
V. SYNTHÈSE DE COPOLYMERES A BASE DE POLYSACCHARIDES PAR LA METHODE « GRAFTING THROUGH ».....	17
VI. SYNTHÈSE DE COPOLYMERES A BASE DE POLYSACCHARIDES PAR LA METHODE « GRAFTING ONTO »	19
VI.1. Copolymères à greffons polysaccharide	19
VI.1.1. Couplage par aminolyse d'une lactone :	19
VI.1.2. Couplage par amination réductrice	19
VI.2. Copolymères à dorsale polysaccharide	20
VI.2.1. Couplage par « estérification »	20
VI.2.2. Couplage par amidification.....	23
VI.2.3. Formation de liaison uréthane.....	26
VI.2.4. Autres réactions de couplage	28
VI.2.5. Couplage par désactivation de précurseurs ioniques par un polysaccharide	29
VI.3. Conclusions sur la méthode « grafting onto ».....	31
VII. SYNTHÈSE DE COPOLYMERES A BASE DE POLYSACCHARIDES PAR LA METHODE « GRAFTING FROM ».....	32
VII.1. Copolymères à greffons polysaccharide	32
VII.2. Copolymères à dorsale polysaccharide.....	33
VII.2.1. Polysaccharide-g-polyvinylique	33
VII.2.2. Polysaccharide-g-poly(éthylène imide)	38
VII.2.3. Chitine-g-polypeptide	39
VII.2.4. Polysaccharide-g-polyester :	39
VII.3. Conclusions sur la méthode « grafting from ».....	43
VIII. CONCLUSIONS GENERALES SUR LES STRATEGIES DE SYNTHÈSES DES GLYCOPOLYMERES GREFFES	44
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	45

PARTIE I :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. INTRODUCTION

Tout comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques, les carbohydrates font partie des constituants de la matière biologique. L'intérêt des scientifiques s'est très naturellement porté sur des carbohydrates macromoléculaires abondants à l'état naturel tels que l'amidon, la cellulose... Certains polysaccharides ont tout d'abord été employés pour leurs propriétés thérapeutiques ou pour leur aptitude à former spontanément des hydrogels en milieu salin. Mais très rapidement la recherche s'est orientée vers leur modification chimique, puis vers la synthèse de copolymères à base de polysaccharide (glycopolymères). Les produits ainsi formés diffèrent selon leur composition (nature des composants ou proportion) mais également selon leur architecture [1]. Cela leur procure des propriétés physico-chimiques très diverses, ce qui permet d'envisager de nombreuses applications.

Cette première partie de ce manuscrit vise, après une présentation rapide des polysaccharides et plus particulièrement du dextrane, à énumérer les différentes voies de synthèse des copolymères à base de polysaccharide. Le classement des glycopolymères sera effectué selon leurs méthodes d'obtention. Les avantages et les inconvénients de chacune de ces méthodes seront argumentés.

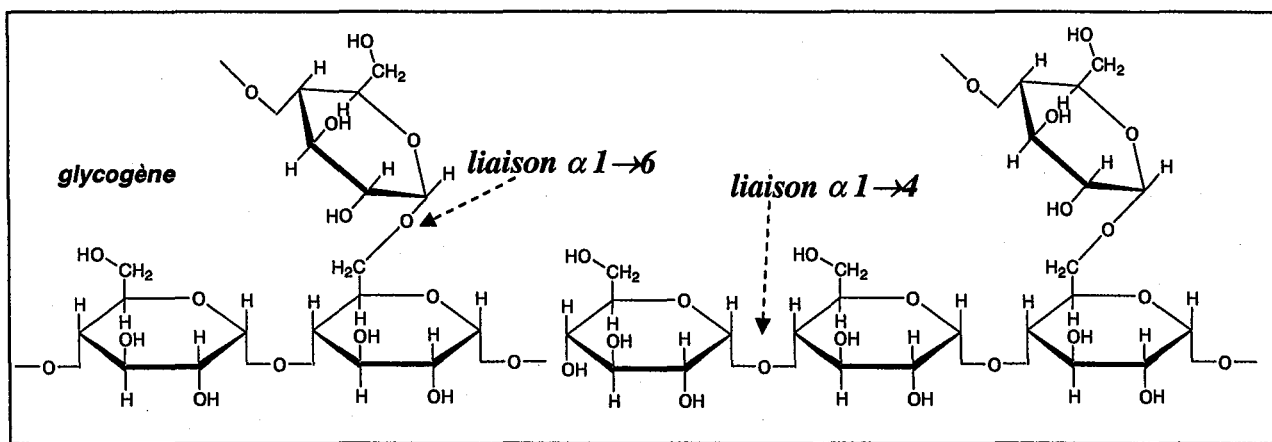
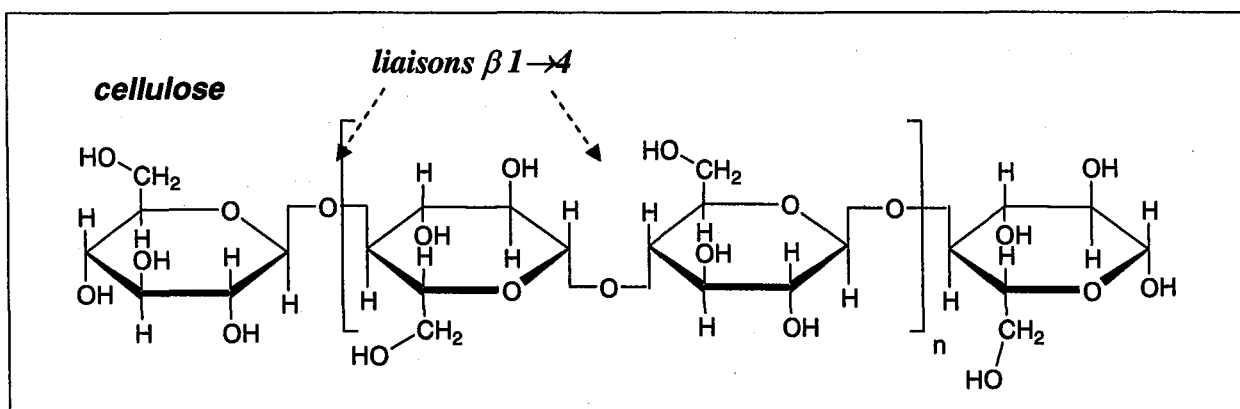
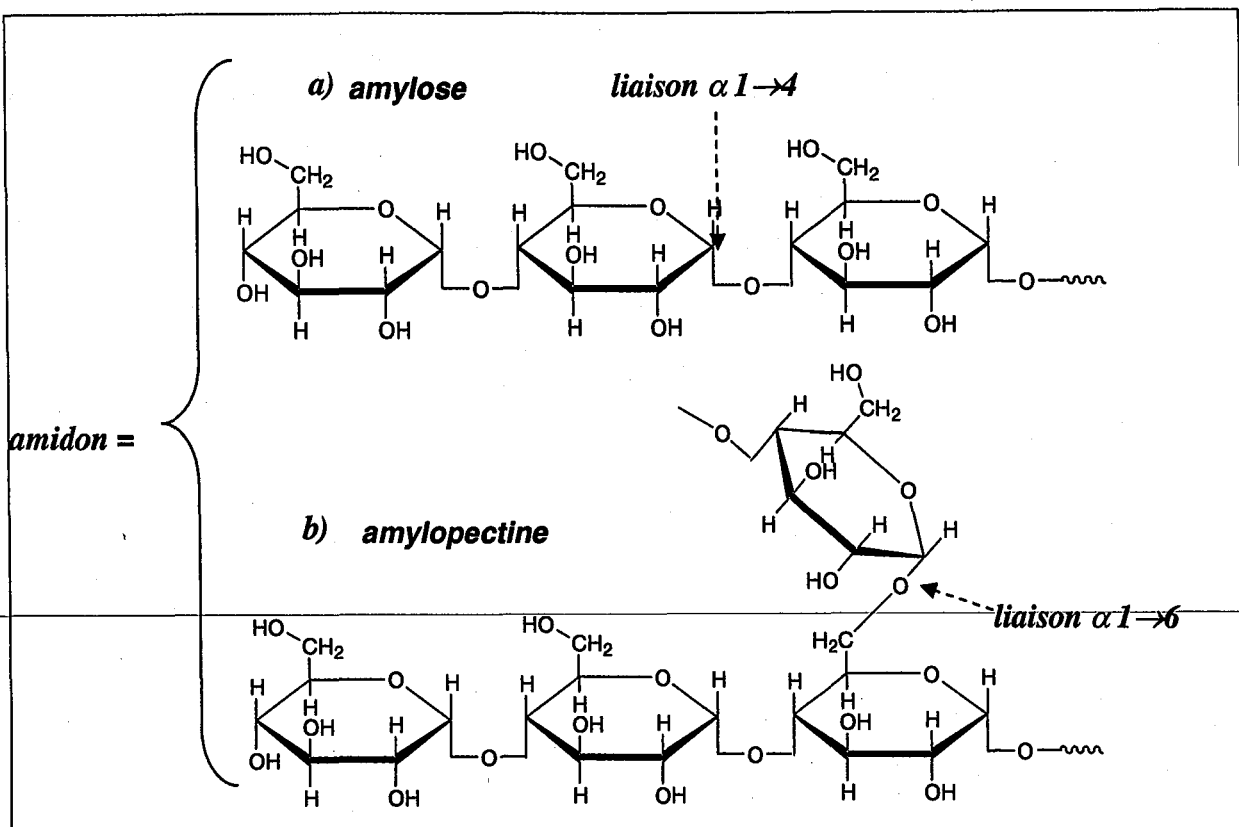


Figure I-1 : Polysaccharides les plus abondants à l'état naturel : amidon, glycogène, cellulose.

II. GENERALITES

II.1. Les polysaccharides

La plupart des carbohydrates naturels sont des polysaccharides de masse molaire élevée. Les polysaccharides, macromolécules encore appelées glycanes, sont constitués par l'enchaînement d'oses (monosaccharides tels que le glucose, le mannose, le fructose...). Ils présentent une grande diversité dans leur structure, aussi bien en termes d'unité ose répétitive que de nature de leur enchaînements, longueur des chaînes, taux de ramifications [2].

Les glycanes sont présents dans la faune (par exemple le glycogène), la flore (par exemple, l'amidon et la cellulose) ou encore les microorganismes. Ils sont souvent classés selon leur fonction biologique : polysaccharide de stockage pour l'amidon et le glycogène (réserve d'énergie) ou polysaccharide de structure pour la cellulose par exemple (constituant de la matière). Ces trois polysaccharides (Figure I-1) sont les plus abondants à l'état naturel et dérivent tous du même monomère : le D-glucose. L'amidon est composé d'un mélange d'amylose et d'amylopectine. Le glycogène est un équivalent de l'amylopectine, mais il présente des greffons plus courts et moins nombreux.

En moindre proportion dans la nature, d'autres polysaccharides peuvent également être signalés :

- La chitine (Figure I-2) est l'un des polymères naturels les plus abondants après la cellulose. C'est un constituant de la carapace des crustacés et insectes. On peut également trouver de la chitine dans certains champignons.

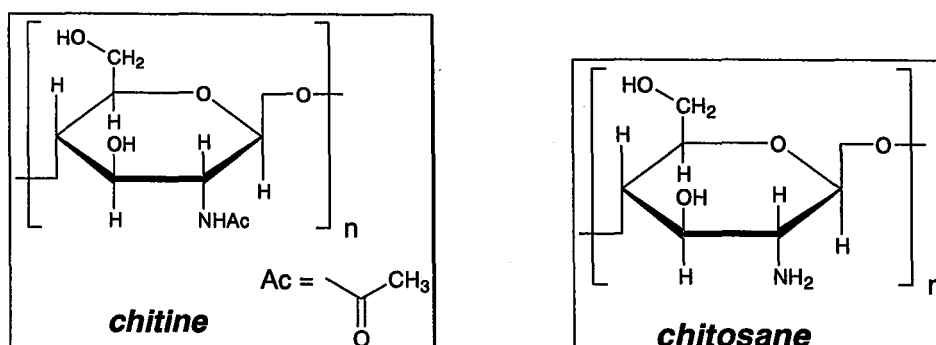


Figure I-2 : Structure de la chitine et du chitosane.

▪ Le chitosane est un dérivé de la chitine. Il résulte d'une déacétylation de cette dernière en milieu alcalin (Figure I-2).

▪ L'alginate de sodium est présent dans la paroi cellulaire de toutes les algues brunes (Figure I-3).

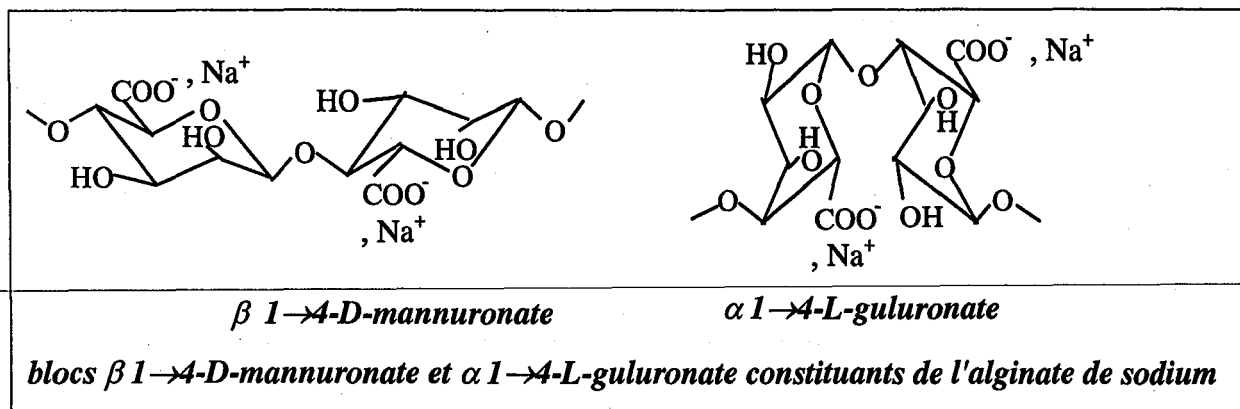


Figure I-3 : Structure de l'alginate.

▪ La pectine est un composant des parois cellulaires de nombreux végétaux (Figure I-4).

▪ L'acide hyaluronique (Figure I-5) est l'un des principaux glycosaminoglycanes (composés d'aminosucres et d'acide uronique ou de galactose) présents dans de nombreux tissus conjonctifs (tels que la peau, le cordon ombilical...) chez l'ensemble des vertébrés.

Outre leur fonction de stockage ou de structure, les polysaccharides naturels sont soit associés à la paroi des cellules, soit excrétés par ces dernières. Dans ce dernier cas, les polysaccharides, en général produits par des microorganismes, sont nommés exopolysaccharides. D'une large diversité, les exopolysaccharides sont utilisés comme rhéo-épaississants, surfactifs, stabilisants... Les plus communs sont le xanthane, le gellane (Figure I-6) ou encore le dextrane (Figure I-7). Le xanthane et le gellane sont d'ailleurs très utilisés comme additifs alimentaires.

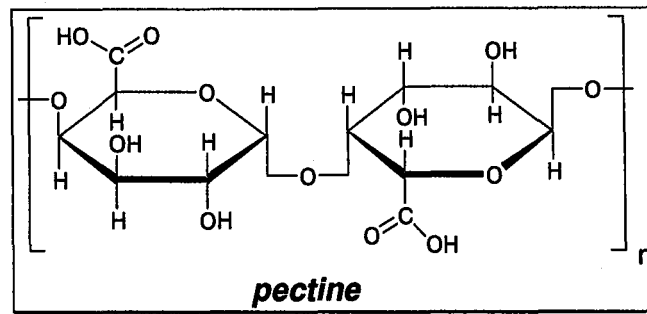


Figure I-4 : Structure de la pectine.

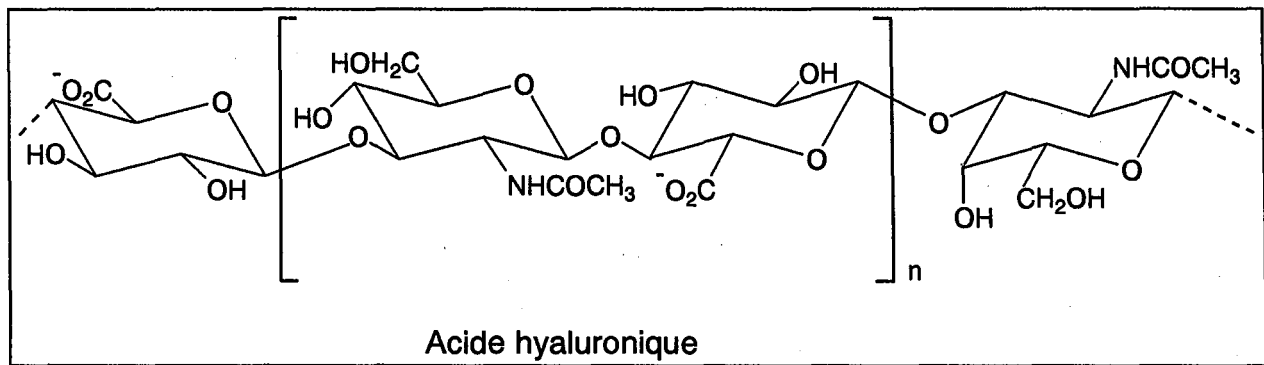


Figure I-5 : Structure de l'acide hyaluronique.

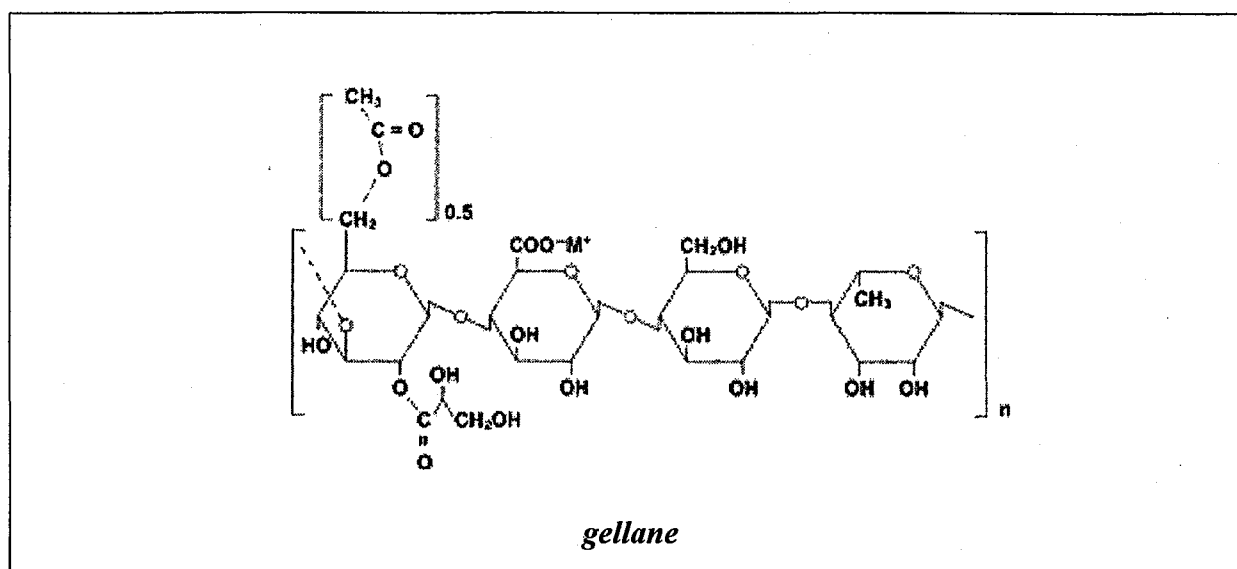
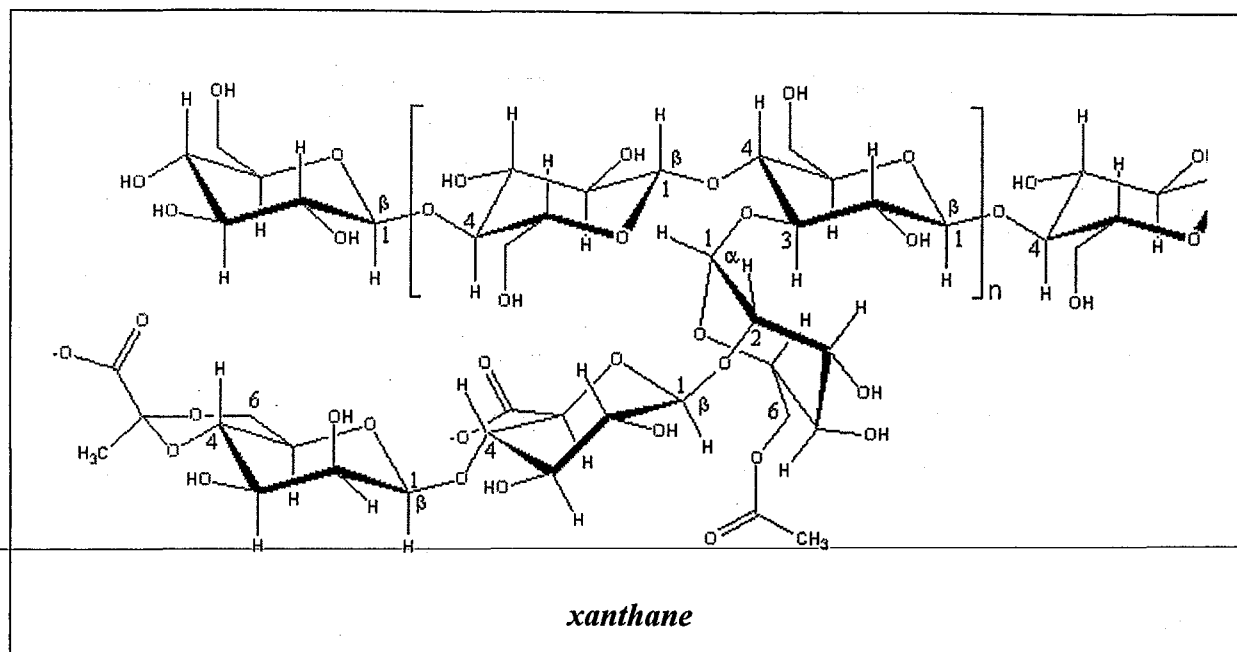


Figure I-6 : Exemples d'exopolysaccharides : Cas du xanthane et du gellane.

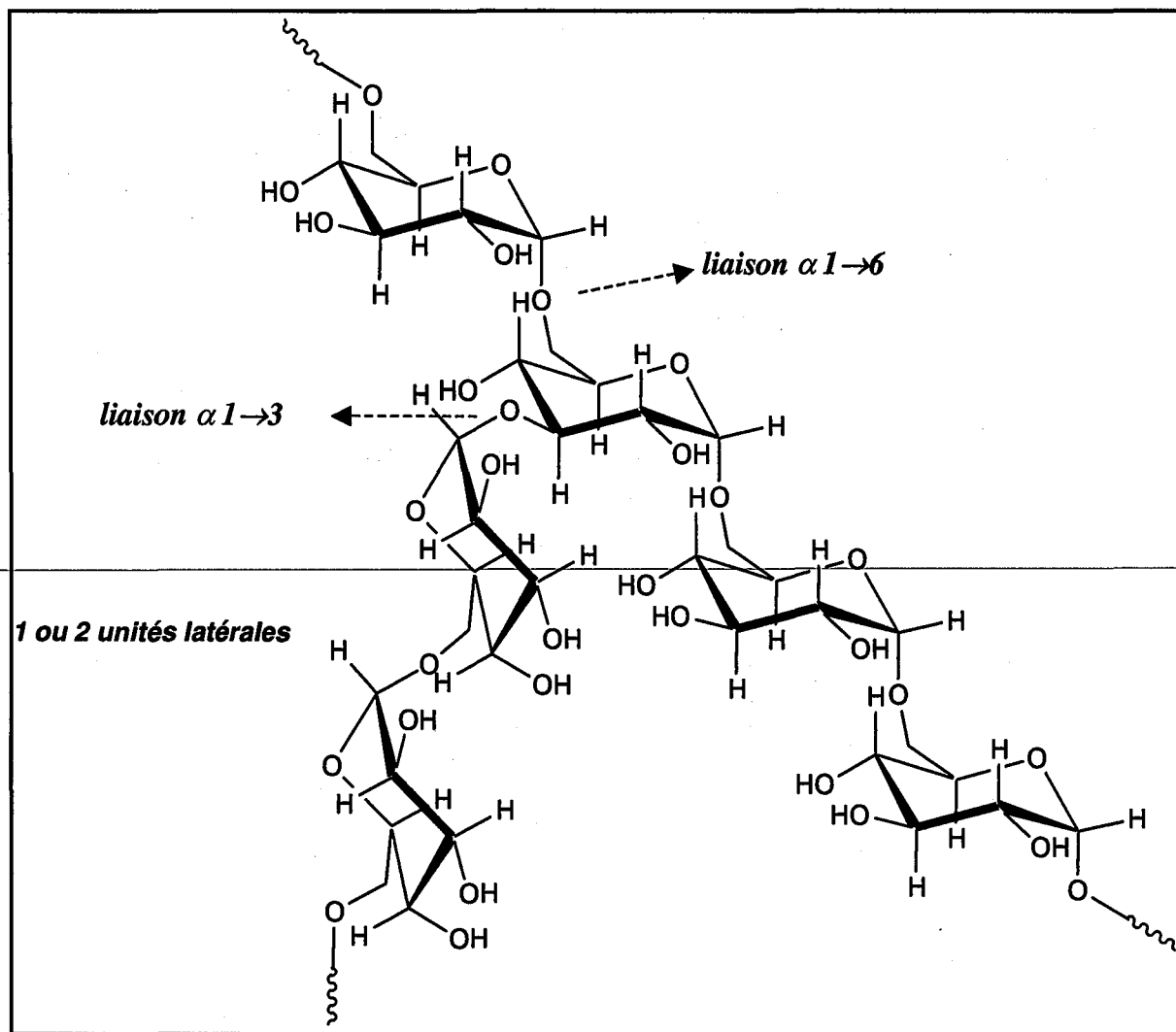


Figure I-7 : Structure du dextrane quasi-linéaire, issu de la souche B-512 F.

Dans le chapitre suivant, le cas du dextrane est examiné en détail puisqu'il constitue la dorsale hydrophile des copolymères dextrane-g-poly lactide que nous avons choisis de synthétiser.

II.2. Le dextrane

II.2.1. Structure et obtention

Les **dextranes** forment un groupe d'exopolysaccharides constitués d'enchaînements d'unités glucopyranosiques (un minimum de 60 % des liaisons glucosidiques sont de type $\alpha-1,6$ [3]). Selon les microorganismes qui produisent le dextrane, ces derniers présentent, en plus des liaisons $\alpha-1,6$, un nombre variable de liaisons $\alpha-1,2$, $\alpha-1,3$ et $\alpha-1,4$ (Figure I-7).

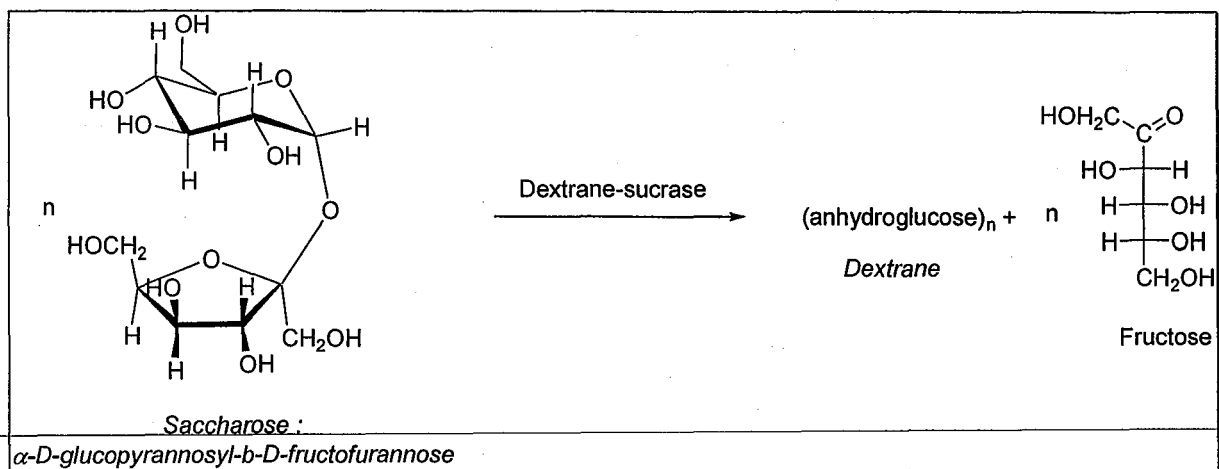


Schéma I-1 : Conversion du saccharose en dextrane.

La bactérie *Leuconostoc Mesentéroïdes* (souche B 512-F) est le microorganisme le plus employé pour la production commerciale du dextrane, notamment du dextrane clinique. Cette bactérie contient une enzyme, la dextrane-sucrase, qui réagit avec le saccharose pour former du fructose et un dextrane dit « natif » [4] (Schéma I-1). Ce dextrane « natif » possède une forte masse molaire et une large distribution de taille (*les masses molaires des chaînes obtenues varient de quelques centaines à plusieurs dizaines de millions de g/mol*). Après hydrolyse partielle de ce dextrane « natif » en présence d'acide chlorhydrique, le mélange de dextrans obtenue est fractionnée à l'aide d'un mélange eau/éthanol [3, 5]. Les fractions de dextrane sont constituées de macromolécules hautement linéaires : elles possèdent un nombre réduit de courtes chaînes (1 à 2 unités glucose), liées en α -1,3 à la chaîne principale (Figure I-7). Leurs masses molaires sont variables, mais réduites par rapport à celle du dextrane « natif » et les taux de ramification sont en général inférieur à 5%. Ces dextrans sont généralement désignés par l'intermédiaire de leur masse molaire moyenne en masse ($\overline{M}_w$) sous le nom générique $T\overline{M}_w$ où la masse molaire est exprimée en kg/mol (*les dextrans commerciaux les plus courants sont des dextrans T10, T40, T70, et T110*). Les indices de polymolécularité pour les dextrans T40 et T70 sont de l'ordre de 1,6-1,7. Compte-tenu du procédé de fabrication, des variations (masses molaires, indice de polymolécularité et degré de ramification) entre les lots de dextrane commerciaux sont souvent observées.

II.2.2. Propriétés du dextrane

II.2.2.1. Physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques du dextrane ont été largement étudiées [6-8]. Le dextrane est un polymère très hydrophile qui n'est soluble que dans l'eau et dans quelques solvants organiques polaires tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), le formamide, l'éthylène glycol ou le glycérol. Il adopte, en solution aqueuse, la conformation de pelote statistique et ne présente pas d'interactions intramoléculaires.

II.2.2.2. Aspects pharmacologiques et cliniques

Compte-tenu des applications biomédicales auxquelles il peut conduire, les propriétés *in vivo* du dextrane ont été largement étudiées [9].

▪ *Excrétion et métabolisme*

Comme la plupart des polymères hydrosolubles, les dextrans de masses molaires inférieures à 7 000 g/mol sont éliminés de l'organisme par le système de filtration rénale. La clairance (élimination du système sanguin par filtration rénale) du dextrane T40 est ainsi d'environ 55% en 4h, mais elle est beaucoup plus lente pour les dextrans de masses molaires supérieures à 50 000 g/mol. Une faible proportion de dextrane peut également être métabolisée via des sécrétions pancréatiques et intestinales (2 à 10 % pour le T40). Le reste du dextrane est dégradé par la dextranase (*enzyme présente dans le système des phagocytes mononucléaires SPM (foie, rate, reins)*) en glucose, lui même totalement hydrolysé en CO₂ et H₂O par la suite.

▪ *Avantages pour des applications biologiques*

Comme nous venons de le voir, le dextrane est totalement biodégradable et par conséquent bioéliminable, qualités indispensables pour une application *in vivo*. De plus ses produits de dégradation sont des éléments constitutifs du système vivant et ne sont donc pas toxiques pour l'organisme. Les principaux autres avantages du dextrane sont sa biocompatibilité et sa faible antigénicité. Cette dernière augmente avec la masse molaire, mais le nombre de chocs anaphylactiques est très bas pour les dextrans cliniques T70 ou T40. Le dextrane possède également des effets anti-thrombiques et activateurs du flux sanguin (dilution et diminution de la viscosité du sang, diminution de l'agrégation des plaquettes), si bien qu'il a été largement utilisé comme substitut du plasma sanguin [9, 10]. En France, ces substituts à base de dextrans T40 et de T70 sont commercialisés sous les noms de Rhéomacrodex et Macrodex.

II.2.3. Bioapplications

Les exemples d'utilisation des dextrans dans le domaine biomédical sont nombreux [7], et nous ne citerons ici que quelques applications significatives. Outre son emploi comme substitut du plasma sanguin, le dextrane présente également la faculté de complexer des métaux lourds et d'en assurer ainsi le transport [11, 12].

Dans le domaine de la vectorisation de principes actifs, le dextrane peut être couplé à un principe actif. On parle alors de vecteurs macromoléculaires ou de prodrogues [11, 13-15]. Le dextrane assure le transport du médicament (solubilisation accrue des principes actifs faiblement solubles en milieu sanguin), limite sa dispersion hors des vaisseaux sanguins et le

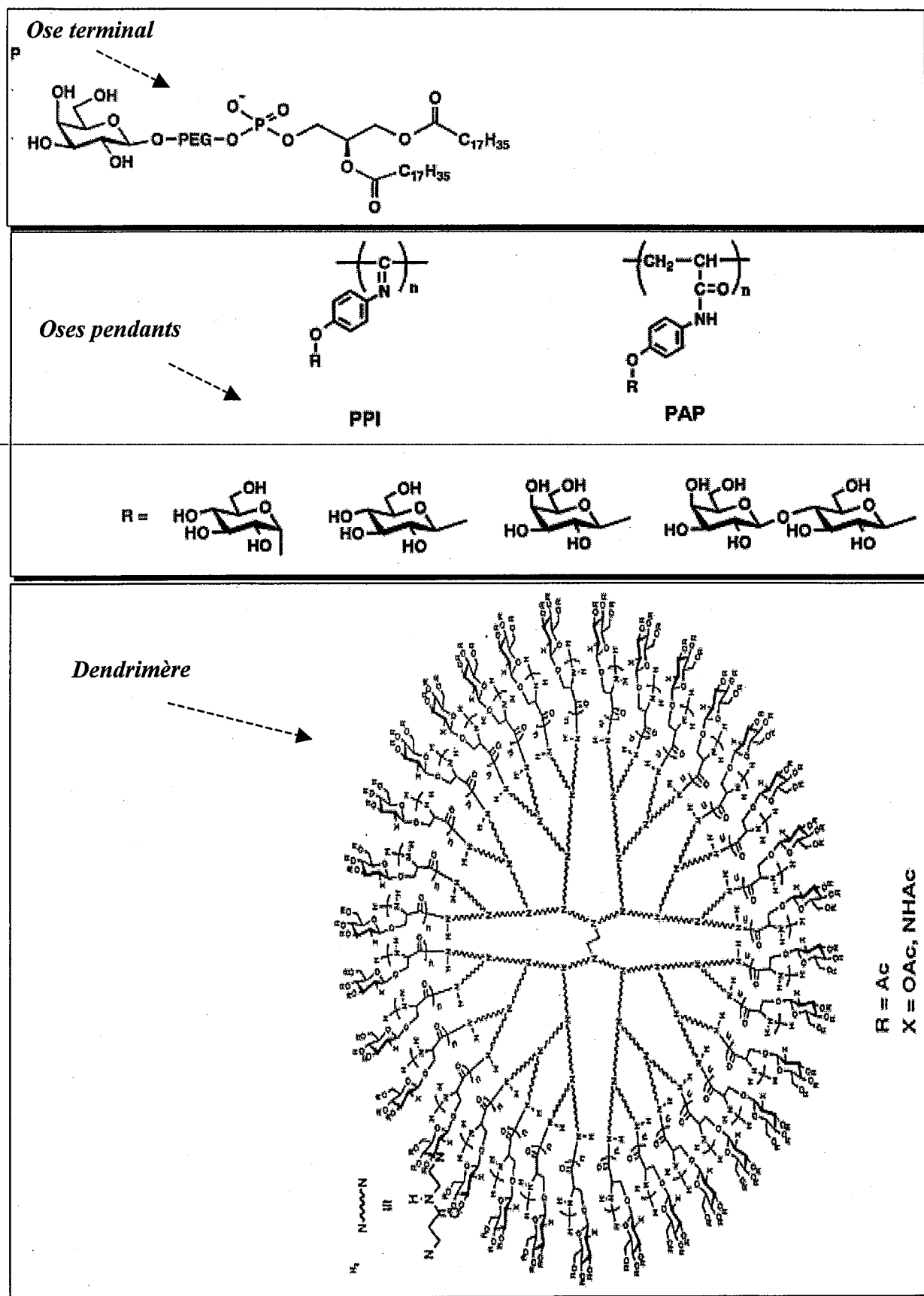


Figure I-8 : Exemples de glycopolymères.

protège contre les dégradations chimiques ou biologiques. La libération du principe actif est observée après hydrolyse ultérieure de la liaison le reliant au dextrane. Ainsi le couplage de l'insuline sur le dextrane a été étudiée, puis proposée pour une utilisation clinique. Depuis d'autres types d'agents thérapeutiques (antibiotiques, peptides, enzymes, vitamines...) ont été fixés au dextrane. Aucune réduction de la biodisponibilité du principe actif n'a été observée (dans certains cas une augmentation a été observée).

Des hydrogels à base de dextrane peuvent également être préparés pour l'encapsulation et la libération contrôlée de peptides ou de protéines. Le plus souvent, ils sont obtenus par réticulation chimique de dextrans modifiés par des unités méthacrylate (voir paragraphe VI.2.1.2.) [16-19]). Dans de plus rares cas, des hydrogels physiques ont été obtenus par stéréocomplexation de certains dextrane-g-poly lactide. Ces copolymères possèdent des greffons poly lactide de stéréorégularités opposées, ce qui permet leur autoassemblage [20, 21] (cf. paragraphe VI.2.1.2.).

II.3. Notion de « glycopolymère »

La notion de glycopolymère n'est pas très bien définie. Au sens large, elle regroupe tout polymère contenant des motifs oses, depuis les polymères synthétiques fonctionnalisés par une unité ose, jusqu'aux copolymères à base de polysaccharide [22, 23]. Au sens strict, seuls sont considérés les polymères comportant une partie sucre qui présente une activité biologique spécifique. Cette partie sucre est constituée d'unités monosaccharides (éventuellement diosides ou triosides) pendantes ou situées en bout de chaîne de polymères linéaires ou d'architectures macromoléculaires plus complexe, comme par exemple des dendrimères (Figure I-8). Cette partie sucre procure à ces glycopolymères des propriétés analogues à celles des glycoconjugués naturels (glycoprotéines ou glycolipides présents dans les plantes ou les animaux) et joue le rôle soit d'un site de reconnaissance envers certaines cellules ou d'un facteur contrôlant la production de fonctions biologiques [22, 24-28].

Dans le cadre de cette partie bibliographique, nous ne considérerons que la définition au sens large, et nous nous limiterons aux polymères comportant des oligo- ou polysaccharides.

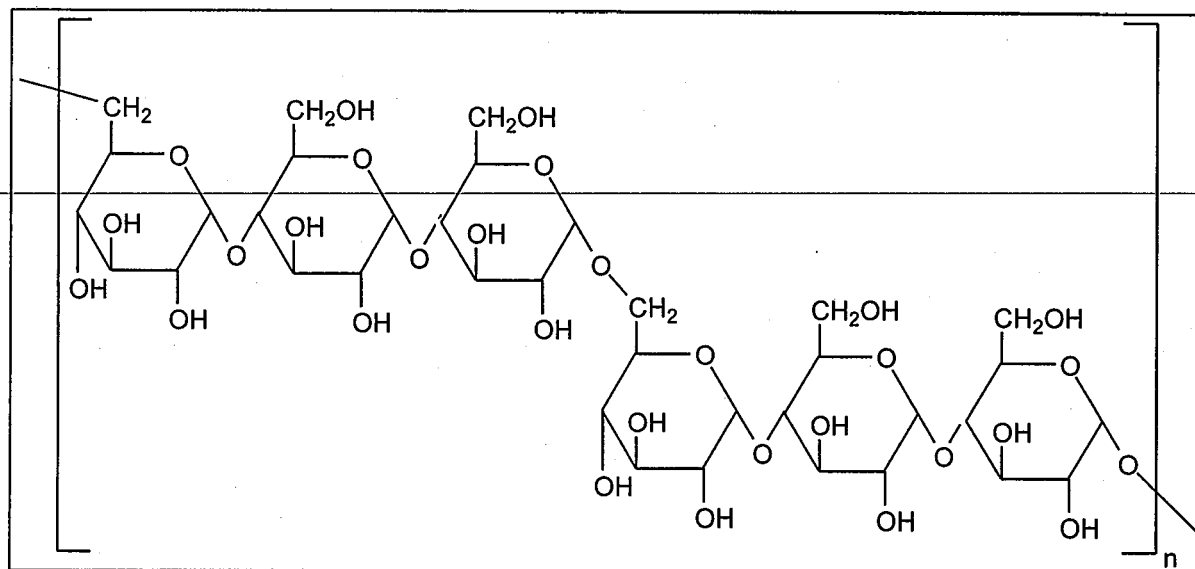


Figure I-9 : Structure du pullulane.

II.4. Polysaccharides modifiés

La définition des glycopolymères sur laquelle nous avons choisi de nous focaliser renferme bien évidemment les polysaccharides modifiés. Les études réalisées dans ce domaine sont nombreuses [29], aussi nous ne citerons ici que quelques exemples afin de montrer la diversité des propriétés et applications de tels polymères.

- L'activité biologique des polysaccharides sulfatés contre le virus HIV (Human Immunodeficiency Virus) a été relatée [29]. Ces produits présentent également une activité anticancéreuse ; ainsi les pullulanes et dextrans sulfatés possèdent des propriétés curatives dans le traitement des ulcères [30]. La structure des pullulanes est donnée dans la Figure I-9. Les dextrans benzylamide sulfonate ont également révélé une certaine aptitude à limiter la prolifération cellulaire [31].

- Comme pour le dextrane, d'autres polysaccharides ont été couplés à des principes actifs afin de les transporter vers des organes cibles [11, 13, 29, 32].

- Enfin, les polysaccharides modifiés par des groupements hydrophobes ont été largement étudiés. Ces groupements hydrophobes peuvent être notamment des alkyles [33-36], des groupements phénoxy [37], laurylestes [38, 39], de l'oxyde d'éthylène [40-43] ou encore des groupes plus complexes comme le cholestérol [44-47] ou des dérivés d'acide biliaire [48, 49]. Ces polymères présentent un caractère amphiphile et possèdent pour la plupart des propriétés tensioactives. Ils peuvent alors être utilisés comme les tensioactifs simples pour la stabilisation d'émulsion [50-52] et constituer alors des alternatives aux tensioactifs déjà existants. Ils peuvent également être employés pour la vectorisation de principes actifs : formation d'émulsions sèches par interactions avec des principes actifs hydrophobes [29, 38, 39], recouvrement de surface de nanoparticules hydrophobes [37, 53] ou encore formation d'hydrogels par interactions hydrophobes. Ces hydrogels sont susceptibles d'être employés pour des applications biomédicales comme matériaux de comblement et/ou de réparation [36, 54, 55] mais également comme vecteurs particuliers [44, 46, 47, 56].

Dans la suite de cette partie bibliographique, nous nous sommes intéressés aux glycopolymères associant un polysaccharide et un polymère de synthèse. Notre attention s'est

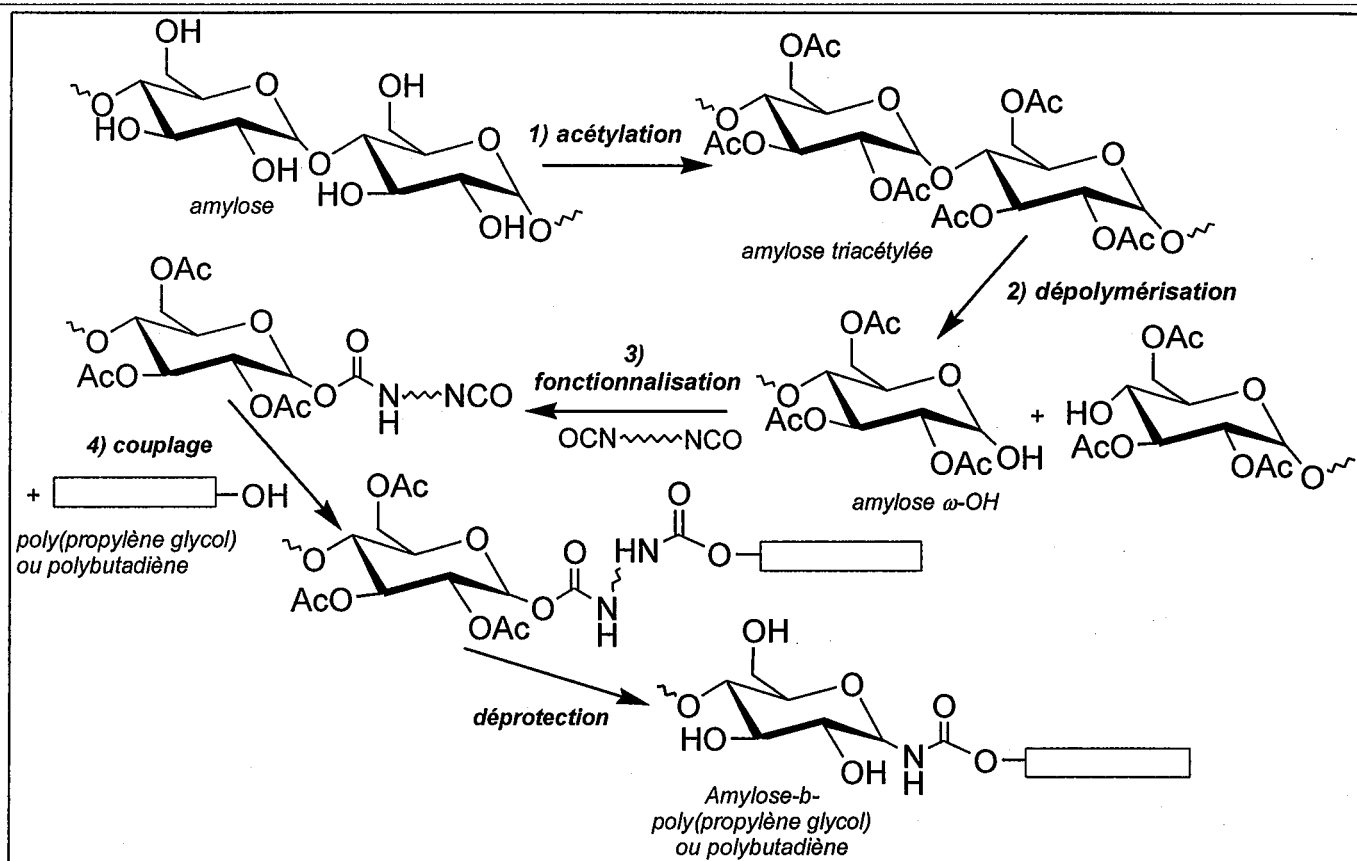


Schéma I-2 : Synthèse de copolymère dibloc amylose-b-poly(propylène glycol) et amylose-b-polybutadiène.

plus particulièrement portée sur les stratégies de synthèse permettant d'obtenir de tels polymères. Pour chacune d'entre elles, les avantages et les inconvénients seront exposés.

III. COPOLYMERES DIBLOC A BASE DE POLYSACCHARIDES

III.1. Généralités

Compte-tenu des nombreux groupements fonctionnels présents sur les polysaccharides, l'obtention de copolymères à blocs nécessite l'utilisation soit d'une méthode de protection permettant d'isoler et d'activer une fonction hydroxyle particulière du polysaccharide, soit d'une méthode (non protectrice) qui exploite la réactivité particulière de la fonction alcool anomérique en bout de chaîne (extrémité réductrice du polysaccharide) [50].

III.2. Méthodes utilisant la protection des fonctions hydroxyle

Cette approche nécessite de nombreuses étapes. Il s'agit dans un premier temps de réaliser une protection partielle du polysaccharide afin de cibler une fonction alcool particulière. Cette fonction est ensuite souvent activée, puis le copolymère dibloc est obtenu à partir de cette fonction soit par réaction de couplage avec un polymère de synthèse ω -fonctionnalisé, soit par amorçage d'une réaction de polymérisation.

III.2.1. Couplage d'un polysaccharide protégé et d'un polymère de synthèse

Des copolymères cellulose-b-poly(propylène glycol) [57] ont été obtenus par ce type d'approche. Des travaux similaires ont également permis de préparer des copolymères amylose-b-poly(propylène glycol) et amylose-b-polybutadiène (Schéma I-2) [58]. La synthèse met alors en jeu une peracétylation de l'amylose suivie de la dépolymérisation partielle de l'amylose acétylée, ce qui permet d'obtenir des amyloses ω -hydroxylées. Ce groupement hydroxyle est ensuite activé en isocyanate, lequel peut réagir avec des polymères

ω -hydroxylés. Une hydrolyse partielle des fonctions protectrices permet d'obtenir les copolymères dibloc désirés.

De façon similaire, des dextrans ω -fonctionnalisés par une fonction amine, puis par une fonction acyllactame, ont été synthétisés (Schéma I-3) dans le but d'obtenir ultérieurement des copolymères dibloc dextrane-b-polyamide par réaction avec un polyamide ω -acyllactame [59, 60]. Les auteurs ont montré que le copolymère dibloc était difficilement obtenu si les fonctions alcool du dextrane n'étaient pas protégées par silylation [60].

III.2.2. Polymérisation à partir d'un polysaccharide modifié

La dégradation partielle, en milieu acide chlorhydrique, d'une cellulose protégée [61] (Schéma I-4) permet d'obtenir des chaînes qui présentent à leur extrémité anomérique des fonctions chlore. Ces fonctions sont susceptibles d'amorcer la polymérisation cationique du tétrahydrofurane, ce qui permet la synthèse de cellulose-g-polytétrahydrofurane.

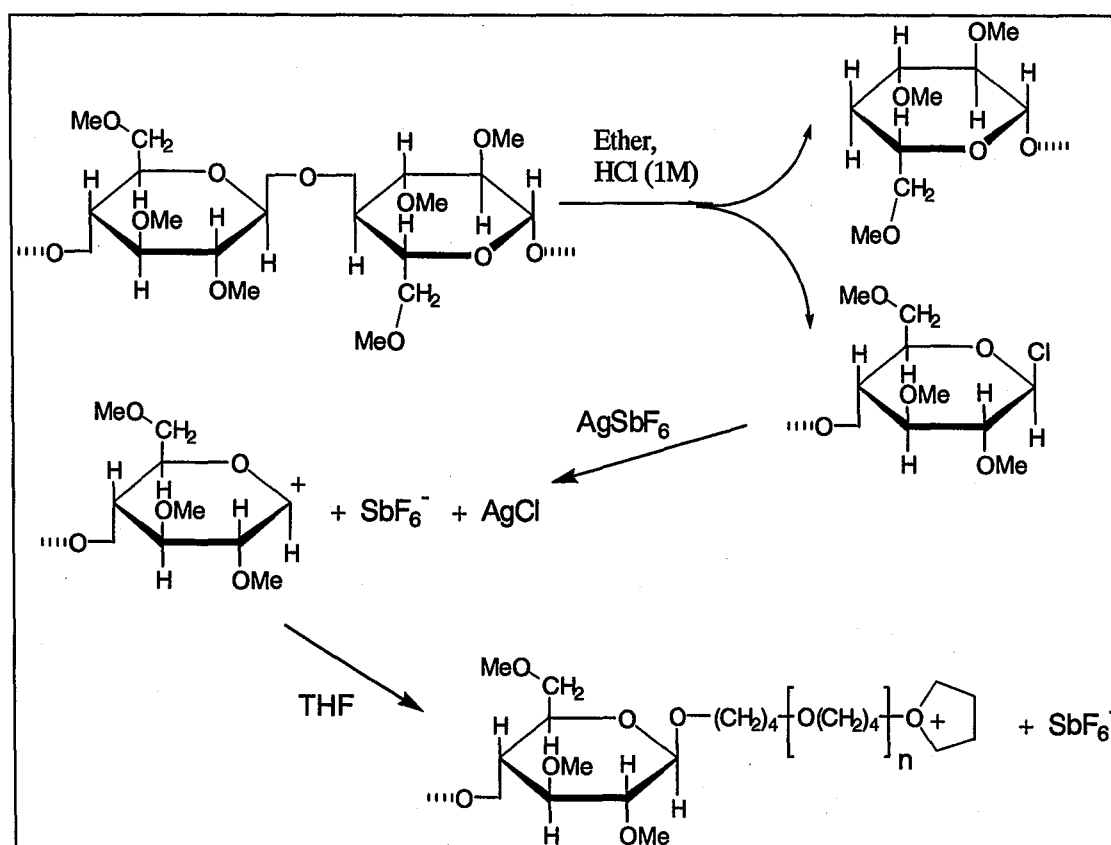
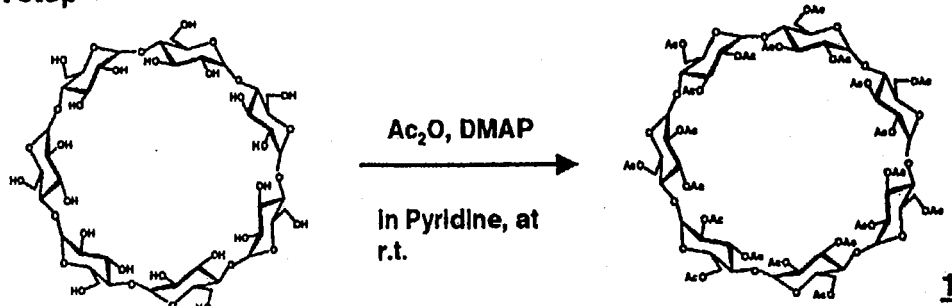
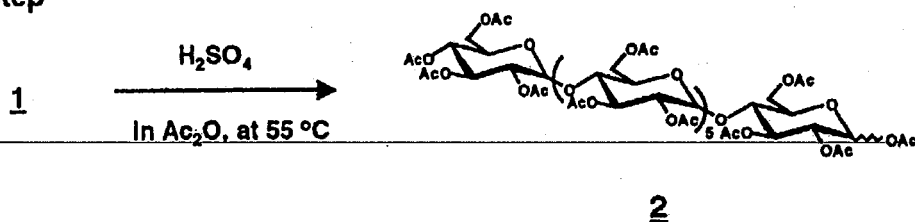


Schéma I-4 : Stratégie de synthèse des copolymères cellulose-b-polytétrahydrofurane

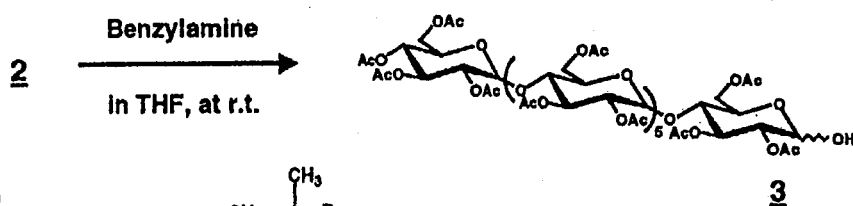
1st step



2nd step



3rd step



4th step

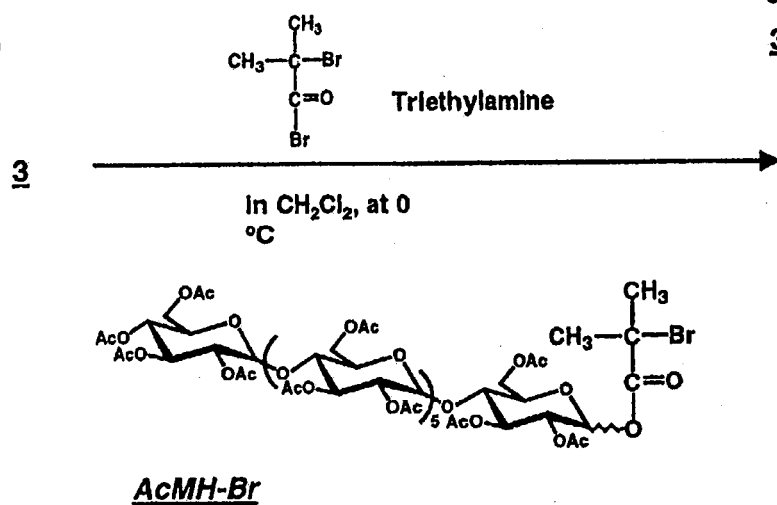


Schéma I-5 : Synthèse de maltoheptaose acétylée et ω -esterbromée.

Des poly(méthacrylate de méthyle)-b-oligosaccharides ont également été décrits. La β -cyclodextrine est protégée par acétylation dans une première étape puis hydrolysée en maltoheptaose acétylée (Schéma I-5) [62]. La fonction acétyle terminale de ces oligosaccharides est spécifiquement déprotégée et transformée en ester bromé. La polymérisation radicalaire contrôlée (ATRP) du méthacrylate de méthyle est ensuite réalisée à partir de ce site d'amorçage. Après déprotection des fonctions acétylées, un copolymère poly(méthacrylate de méthyle)-g-oligosaccharide, de structure bien définie, est obtenu.

III.3. Méthodes utilisant la réactivité particulière de l'alcool anomérique terminal

Lorsque les polysaccharides sont en solution, leur unité glucosidique terminale existe sous deux formes en équilibre : l'une est un hémiacétal cyclique comprenant une fonction alcool en position anomérique et l'autre une chaîne ouverte terminée par une fonction aldéhyde (Schéma I-6). Cet équilibre confère à la fonction anomérique terminale un caractère réducteur qui peut être exploité dans des réactions de couplage avec des fonctions amine. Ces réactions sont alors de deux types : aminolyse d'une lactone terminale ou amination réductrice.

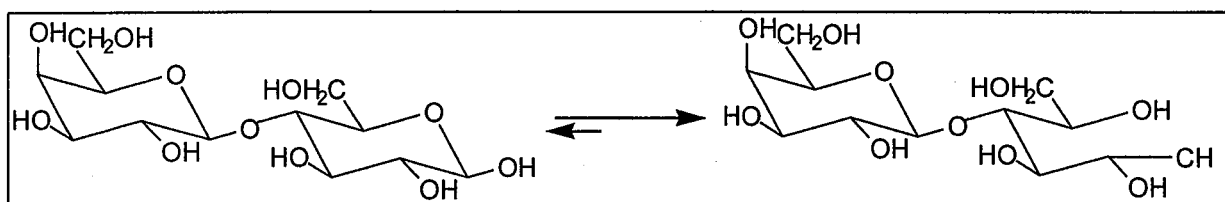


Schéma I-6 : Equilibre entre les deux formes de l'unité terminale d'un polysaccharide (cas de l'amylose)

III.3.1. Aminolyse d'une lactone terminale

La fonction aldéhyde terminale d'un polysaccharide est sélectivement oxydée en acide aldonique. Cet acide est ensuite déshydraté en fonctions lactone cyclique (δ -lactone et γ -lactone), lesquelles peuvent permettre la fixation d'amines (Schéma I-7). Largement utilisée pour la modification des extrémités de chaîne des polysaccharides [50, 63, 64], cette technique a également été employée pour coupler des oligomères d'amylose et un polystyrène ω -aminé [65, 66] (Schéma I-8). Le produit obtenu est employé comme macroamorceur de la

polymérisation enzymatique stéréocontrôlée de l' α -D-phosphate de glucose. On obtient alors un copolymère amylose-b-polystyrène.

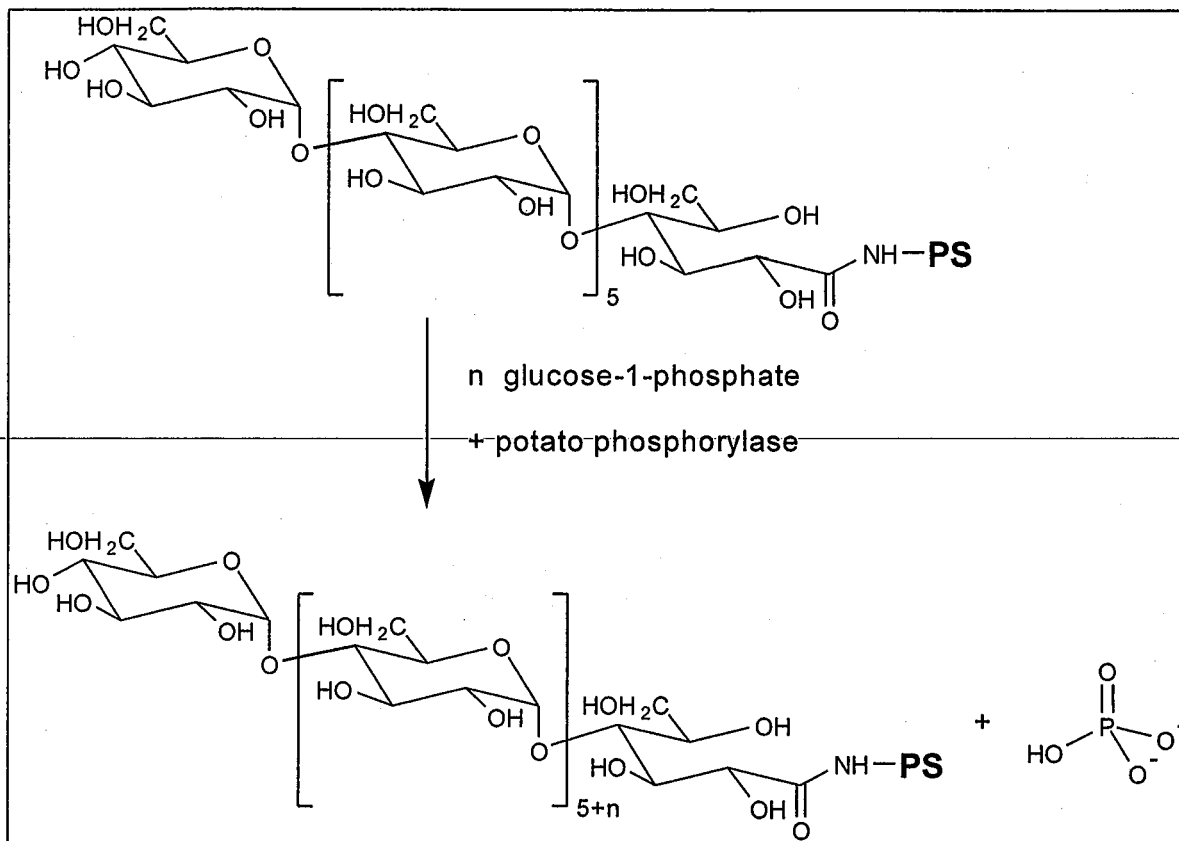


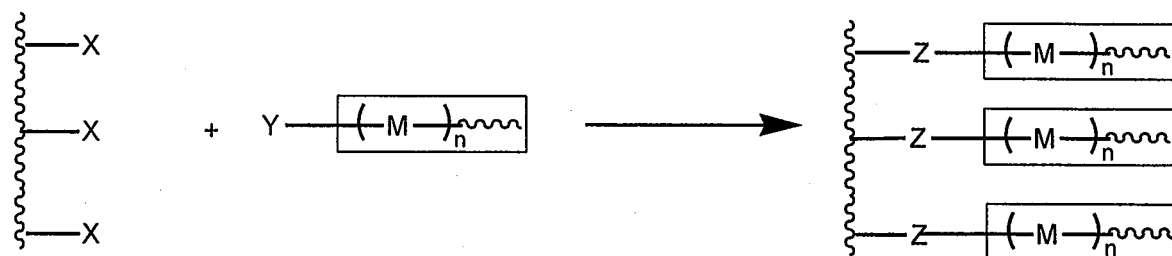
Schéma I-8 : Exemple de synthèse de copolymère dibloc amylose-b-polystyrène

Des copolymères tribloc amylose-b-poly(oxyde d'éthylène)-b-amylose peuvent être obtenus de façon analogue en couplant dans une première étape du maltoheptaose et du poly(oxyde d'éthylène) (POE) α,ω -diaminé. La copolymérisation des produits obtenus avec de l' α -D-phosphate de glucose permet d'obtenir les copolymères tribloc [67].

III.3.2. Amination réductrice

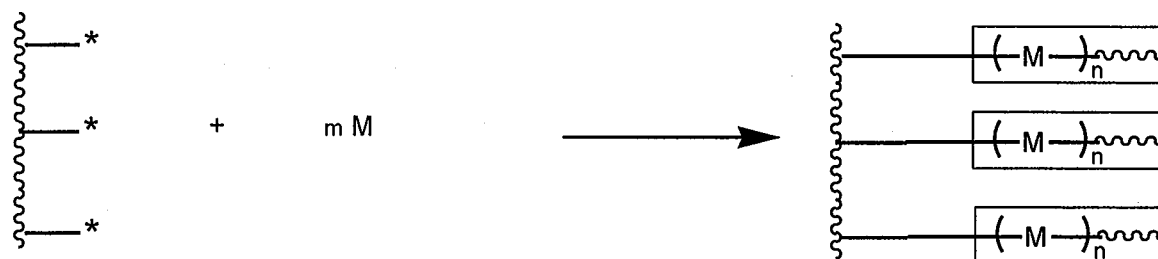
La réaction entre une fonction amine et la fonction aldéhyde terminale du polysaccharide a lieu dans une première étape. Le produit obtenu n'est pas stable et se déshydrate pour donner la fonction imine (base de Schiff) (Schéma I-9). Une dernière étape de réduction permet d'obtenir un polysaccharide ω -aminé. Cette méthode, bien qu'elle permette d'obtenir des structures bien définies, est réalisée avec de plus faibles rendements

Méthode "Grafting onto"



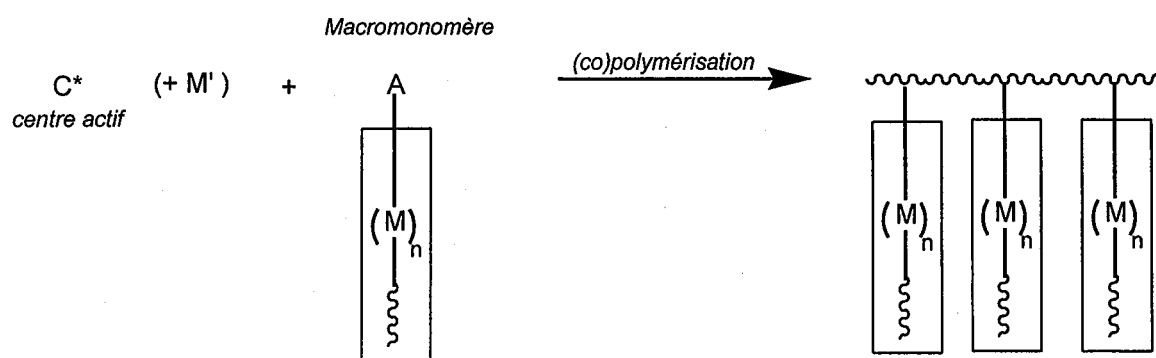
X et Y : groupements fonctionnels antagonistes

Méthode "Grafting from"



* : site d'amorçage

Méthode "Grafting through"



A : fonction polymérisable

Figure I-10 : Méthodes de synthèse des copolymères greffés.

que la précédente. Elle a cependant été utilisée avec succès pour coupler des alginates de faible masse molaire à des poly(éthylène glycol) ω -aminés (Schéma I-10) [68].

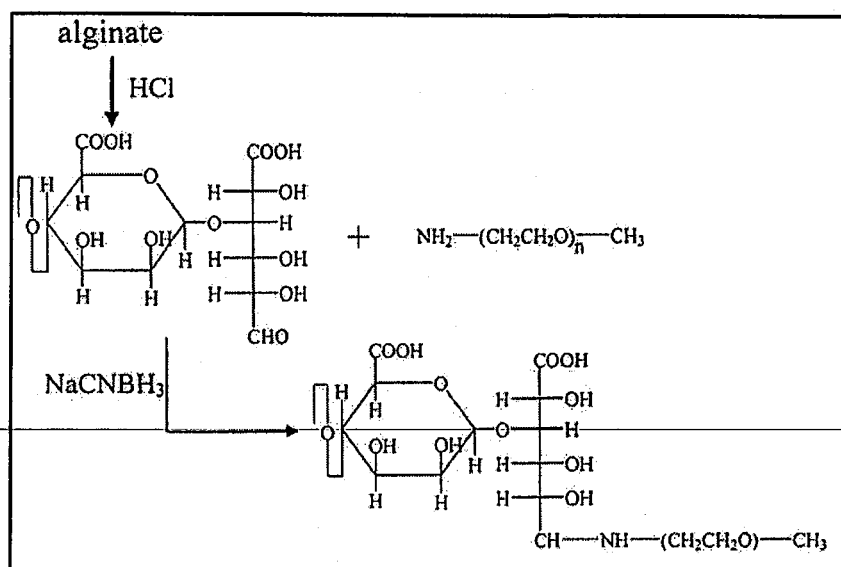


Schéma I-10 : Synthèse de copolymères alginate-b-poly(éthylène glycol).

IV. GENERALITES SUR LES COPOLYMERES GREFFES A BASE DE POLYSACCHARIDES

Les polysaccharides possèdent de nombreuses fonctions réactives et peuvent conduire à une très grande diversité de copolymères greffés. De façon générale, il existe trois méthodes pour préparer des copolymères greffés [69-71] (Figure I-10).

① Greffage de chaînes préformées sur la dorsale ou méthode « *grafting onto* »

Afin de permettre leur couplage, des macromolécules préformées sont fonctionnalisées en bout de chaîne par des groupements Y capables de réagir avec des fonctions antagonistes X disposées le long d'une autre chaîne macromoléculaire (qui constituera le squelette du copolymère greffé).

② Polymérisation à partir de la dorsale ou méthode « *grafting from* »

Cette méthode consiste soit à créer sur la macromolécule (qui constituera le tronc du copolymère greffé) des sites réactifs, ou à utiliser les fonctions préexistantes sur cette chaîne.

Ces sites sont mis à contribution pour amorcer la polymérisation d'un monomère et ainsi générer des greffons.

③ (Co)polymérisation de macromonomères ou méthode ou « grafting through »

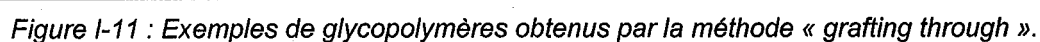
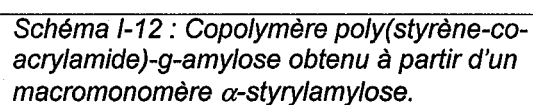
Des copolymères greffés peuvent également être obtenus soit par homopolymérisation d'un macromonomère ou par copolymérisation de ces macromonomères avec un comonomère. Dans le cas d'une homopolymérisation, on obtient un copolymère greffé dont toutes les unités répétitives portent un greffon. En raison de la gêne stérique générée par ces nombreux greffons, ces copolymères sont très rigides et on obtient difficilement une chaîne principale de grande longueur (sauf quelques cas). Aussi, préfère-t-on la voie de la copolymérisation.

Dans la suite de cette partie, nous allons décrire différents exemples de copolymères greffés à base de polysaccharide. Ces exemples seront présentés selon leur méthode de synthèse. La liste des exemples n'a pas pour but d'être exhaustive, mais de montrer d'une part les avantages et les inconvénients de chaque méthode et d'autre part la diversité des copolymères obtenus. En parallèle, les applications de ces copolymères seront présentées.

V. SYNTHÈSE DE COPOLYMERES A BASE DE POLYSACCHARIDES PAR LA METHODE « GRAFTING THROUGH »

L'avantage de cette méthode est de permettre l'obtention de copolymères de structure bien définie, pour autant que deux conditions soient assurées. D'une part, la polymérisation ou la copolymérisation du macromonomère doit être contrôlée et d'autre part, dans le cas d'une copolymérisation, il faut que la réactivité du macromonomère et celle du comonomère soient comparables si on désire une distribution aléatoire des greffons le long du squelette.

Il existe peu d'exemples, dans la littérature, de copolymères greffés à dorsale polysaccharide obtenus par cette méthode. En effet, si on désire préparer un copolymère à dorsale polysaccharide par cette méthode, il faut que l'entité polymérisable du macromonomère génère cette chaîne polysaccharide. Or, la synthèse stéréocontrôlée de polysaccharides à partir d'unités monomères correspondantes est relativement délicate à



mettre en œuvre. De tels polysaccharides ont ainsi été obtenus soit par polymérisation cationique stéréocontrôlée par ouverture de cycle de dérivés d'anhydrosaccharides pontés ou par catalyse enzymatique [72-75] (Un exemple est présenté au Schéma I-11).

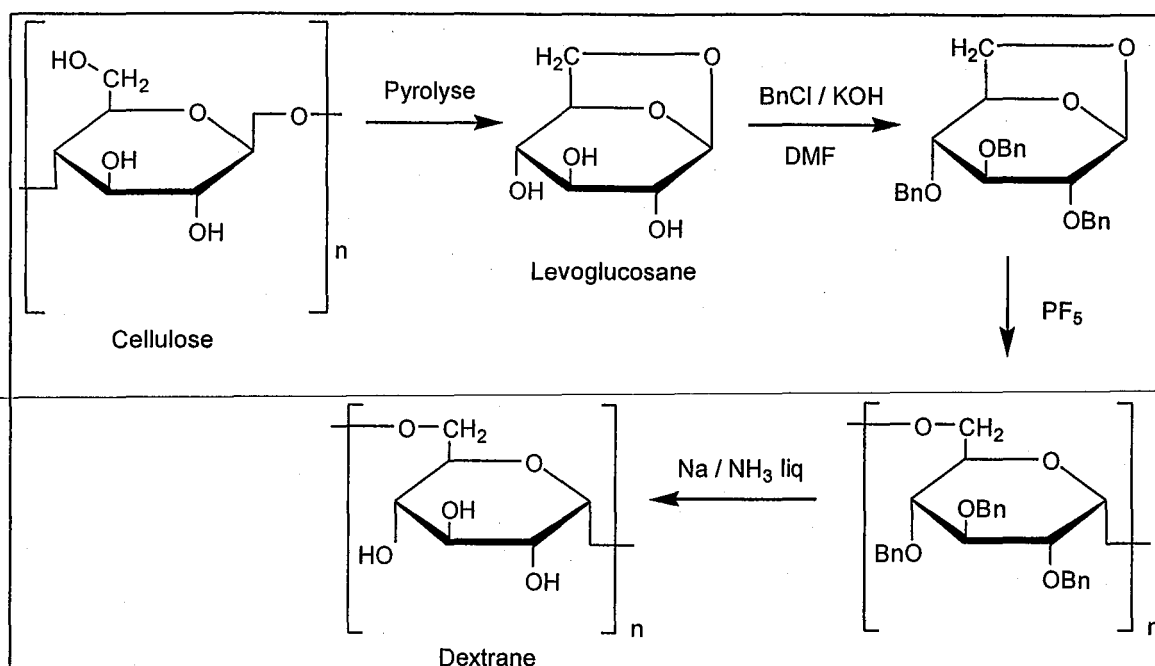


Schéma I-11 : Synthèse de poly(1→6)- α -D-glucopyranose (dextrane) par polymérisation par ouverture de cycle cationique d'anhydroglucose benylé.

La synthèse de copolymères à greffons polysaccharide par la méthode « grafting through » a suscité relativement peu d'intérêt. Elle a cependant été utilisée à de rares occasions dans le cas de squelettes polyvinylique ou polypeptidique. Ainsi, des copolymères polystyrène-g-amylose ou poly(styrène-co-acrylamide)-g-amylose ont été préparés à partir de l'homopolymérisation radicalaire ou la copolymérisation avec de l'acrylamide, d'un macromonomère α -styryl amylose [76] (Schéma I-12). Cependant, l'absence de contrôle de ces (co)polymérisations limite celui de la structure des copolymères obtenus.

De la même façon, des glycopolymères composés d'un squelette polyvinylique et d'oses pendants ont été décrits (Figure I-11) (polyacrylamide-g-aminoglucose [77], polystyrène-g-saccharide [78, 79] ou polystyrène-g-(maltopentose ou maltoheptaose) [80].

L'emploi de la technique de polymérisation radicalaire contrôlée (par la voie des nitroxydes) a récemment permis la synthèse de copolymères polystyrène-g-saccharide [81].

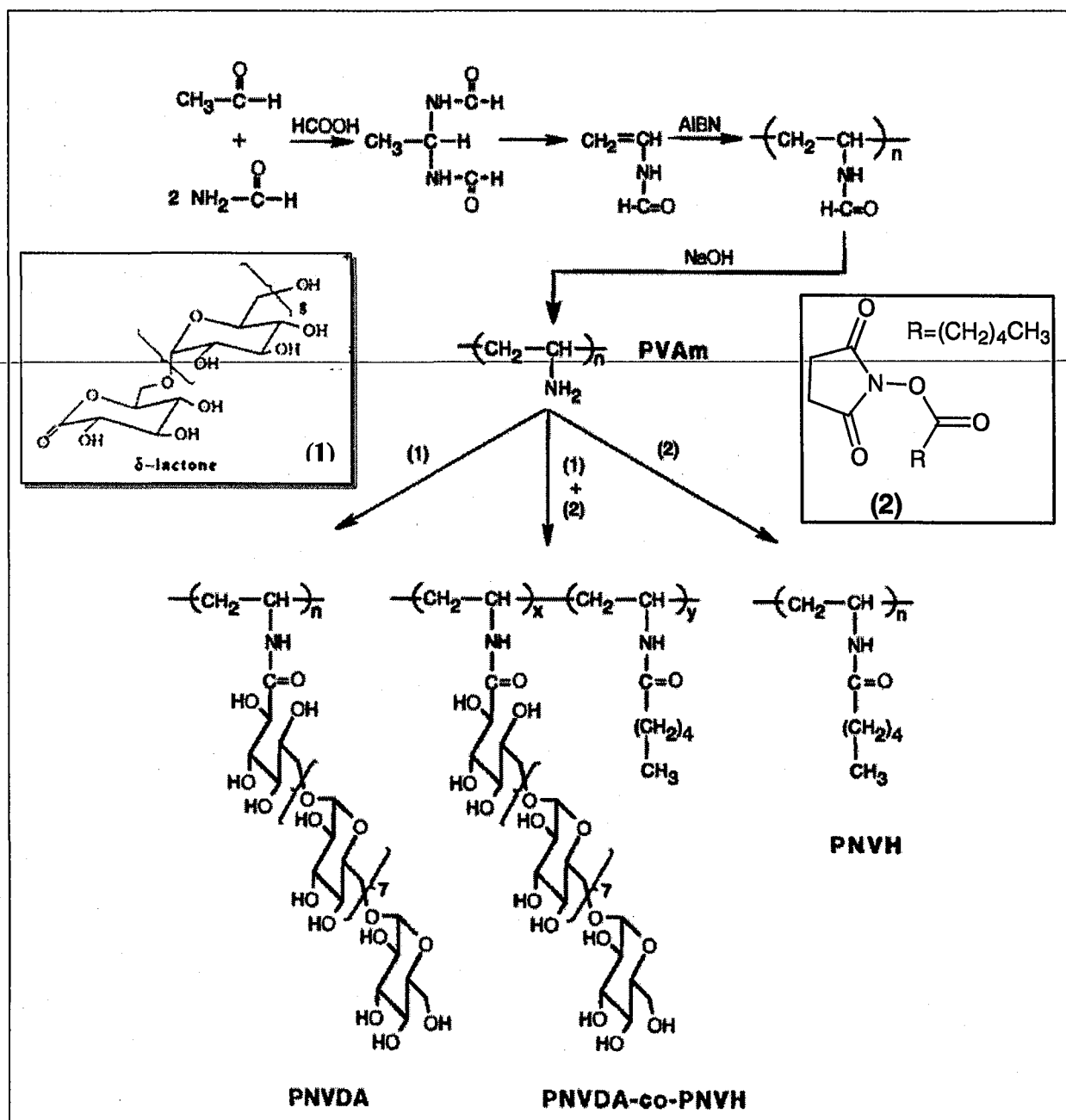


Schéma I-13 : Synthèse de copolymères polyvinyle-g-dextrane (PNVDA) et de copolymères poly(N-vinyl dextrane aldoamide-co-N-vinylhexamide) (PNVDA-co-PNVH) par aminolyse de dextrane ω -lactone (1) et/ou de N-(hexanoyloxy)succinimide (2).

VI. SYNTHÈSE DE COPOLYMERES A BASE DE POLYSACCHARIDES PAR LA METHODE « GRAFTING ONTO »

Cette méthode est la plus populaire. Contrairement à la méthode précédente qui peut s'avérer délicate à mettre en œuvre (difficulté pour synthétiser et homopolymériser le macromonomère), celle-ci ne nécessite que la réalisation d'un couplage entre certaines fonctions présentes sur une chaîne macromoléculaire (qui deviendra le squelette du copolymère greffé) et d'autres chaînes ω -fonctionnalisées qui constitueront les greffons. Les techniques employées varient selon que le polysaccharide constitue la dorsale ou les greffons du copolymère final.

VI.1. Copolymères à greffons polysaccharide

Comme dans le cas des copolymères dibloc, la réactivité particulière de la fonction alcool anomérique en bout de chaîne peut être mise à profit pour réaliser le couplage entre le polysaccharide et un autre polymère, porteur de fonctions réactives.

VI.1.1. *Couplage par aminolyse d'une lactone :*

Des greffons d'oligodextrans ω -lactone sont couplés sur une polyvinylamine (PVAm) [82] obtenue préalablement par polymérisation radicalaire (Schéma I-13). Pour des questions d'encombrement stérique, seules 33 % des fonctions amine sont modifiées par le dextrane ω -lactone. Des copolymères PNDA-co-PNVH ont également été préparés par réaction entre cette polyvinylamine et un mélange d'un dérivé succimide et de dextrane ω -lactone (Schéma I-13). Les glycopolymères obtenus sont des agents de surfaces qui peuvent être utilisés comme modèles de glycopolymères naturels et/ou pour l'hydrophilisation de surface de biomatériaux hydrophobes.

VI.1.2. *Couplage par amination réductrice*

Des copolymères polylysine-g-polysaccharide ont été synthétisés par amination réductrice entre la polylysine et un polysaccharide tel que le dextrane, l'amylose, le maltose ou l'acide hyaluronique [83, 84]). Le cas du greffage de l'acide hyaluronique de faible masse molaire, obtenu après hydrolyse enzymatique d'un précurseur de masse molaire plus élevée

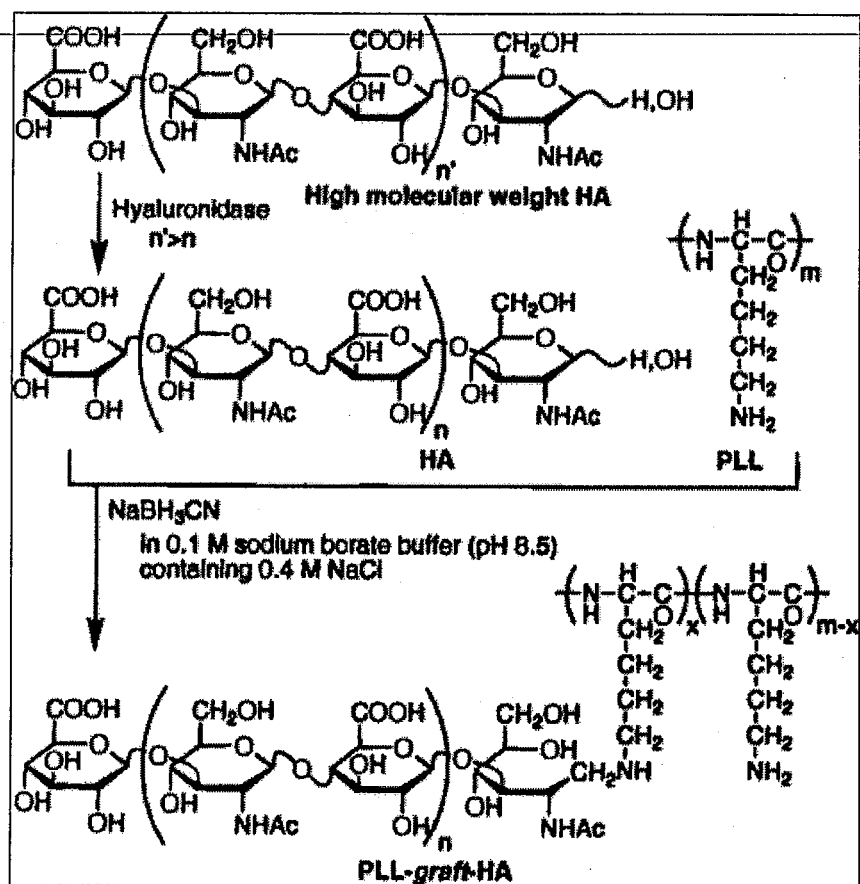


Schéma I-14 : Synthèse d'un copolymère polylysine-g-acide hyaluronique. Couplage réalisé par amination réductrice.

[84] sur la polylysine est illustré dans le schéma I-14. L'efficacité du couplage varie entre 70 et 93% selon le rapport polylysine/polysaccharide utilisé [84, 85]. Les copolymères ainsi obtenus peuvent être employés pour hydrophiliser la surface des particules de polylactide [83, 86, 87]. Ceci permet alors l'adsorption d'acide désoxyribonucléique (ADN) à la surface de la particule, par création d'interactions entre la polylysine et l'ADN [88]. Un ciblage de ce vecteur particulaire est aussi envisageable grâce à la fonctionnalisation de la partie carbohydrate du glycopolymère. L'architecture de ces glycopolymères paraît cruciale pour parvenir à la vectorisation d'ADN et/ou au ciblage des particules formées [85].

Des copolymères chitosane-g-dextrane obtenus, également par amination réductrice ont été employés pour préparer des particules ayant une affinité spécifique pour les membranes cellulaires [89]. Le couplage s'effectue alors entre les fonctions amine du chitosane et l'extrémité réductrice du dextrane.

VI.2. Copolymères à dorsale polysaccharide

Les principales méthodes de couplage font intervenir soit des réactions analogues à celles de la chimie organique, soit une désactivation de polymères « vivants » par les fonctions hydroxyle du polysaccharide.

VI.2.1. Couplage par « estérification »

Ce couplage est réalisé entre les fonctions alcool présentes sur le polysaccharide et des fonctions acide carboxylique (ou le plus souvent des dérivés d'acides), d'un polymère α -fonctionnalisé.

VI.2.1.1. Couplage de polystyrène

Une cellulose partiellement acétylée est couplée, par l'intermédiaire de ses fonctions alcool résiduelles, avec des polystyrènes fonctionnalisés à leur extrémité soit par un acide carboxylique soit par un chlorure d'acyle (Schéma I-15) [90]. L'efficacité de greffage est correcte (40 à 80 %), et des celluloses acétylées-g-polystyrène, de paramètres variés, ont été obtenus : le degré de substitution peut être modifié à partir du rapport initial polystyrène/cellulose acétylée. La protection des alcools secondaires de la cellulose par acétylation sélective (triacétylation puis hydrolyse partielle et préférentielle des alcools

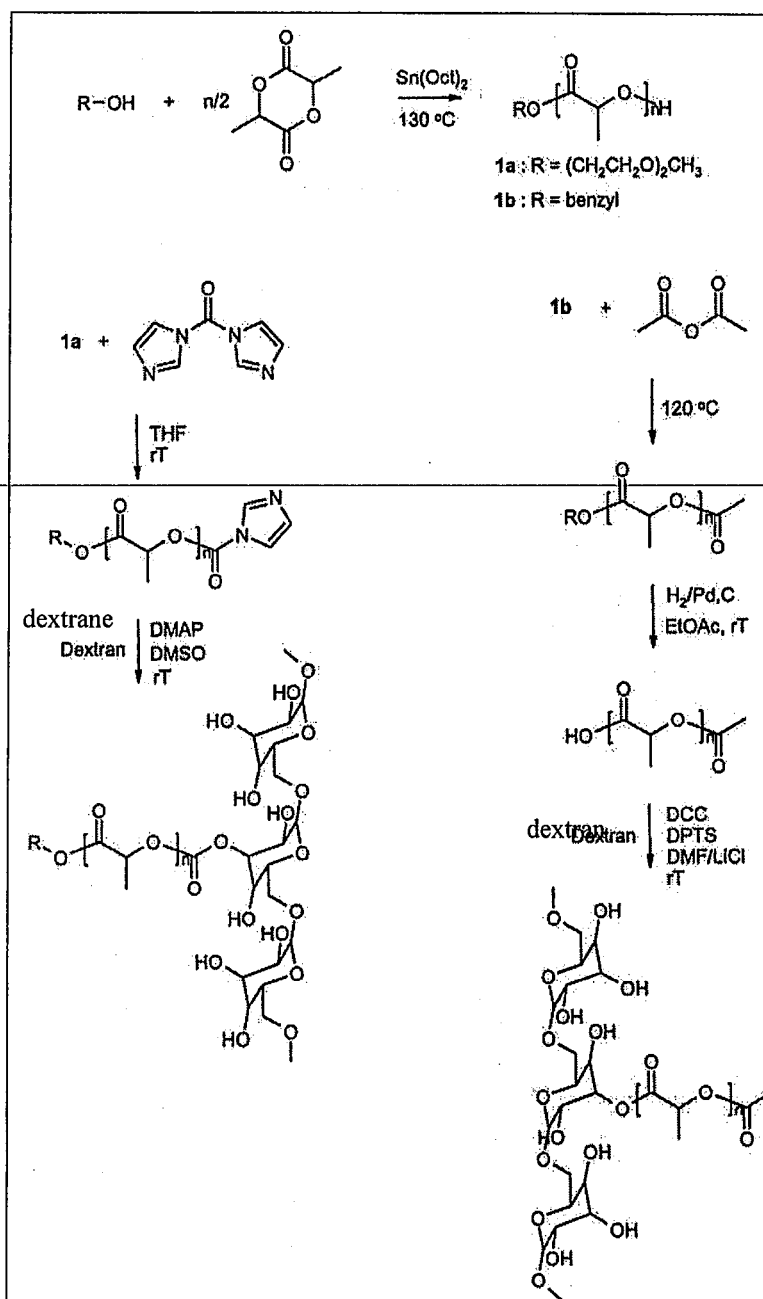


Schéma I-16 : Stratégie de synthèse des copolymères dextrane-g-poly(L,L-lactide). Couplage par « estérification ».

primaires) permet d'assurer un greffage spécifique des polystyrènes sur l'alcool primaire de la cellulose.

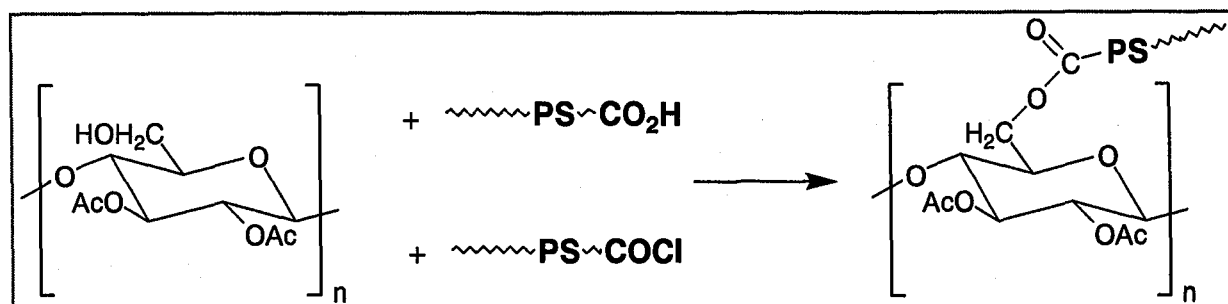


Schéma I-15 : Obtention de cellulose-g-polystyrène par réaction d'estérification.

VI.2.1.2. Couplage de polyesters

Des copolymères dextrane-g-poly lactide peuvent être obtenus par réaction d'estérification entre le dextrane et des oligomères stéréoréguliers de poly(D,D-lactide) et poly(L,L-lactide) [20] (Schéma I-16). Ces oligomères lactate sont générés dans une première étape par polymérisation par ouverture de cycle du D,D- ou L,L-lactide [91] (cf. Chapitre II, Partie II). Cette polymérisation en masse est amorcée par un alcool, le (2-méthoxyéthoxy)éthanol en présence d'octoate d'étain (SnOct_2). Des oligomères isomoléculaires et fonctionnalisés à leur extrémité par une fonction alcool sont ainsi obtenus après séparation par chromatographie préparative. Dans une seconde étape, un couplage entre ces oligomères lactate et le dextrane est effectué en présence de la N, N'-carbonyldiimidazole. Cette méthode permet aux auteurs d'obtenir des copolymères avec des greffons de même taille ; mais la position de ces derniers sur la dorsale polysaccharide n'est pas précisée. L'efficacité du greffage est faible (60% après 24 jours) et des étapes de purification par dialyse contre l'eau puis extraction au chloroforme sont nécessaires pour éliminer les oligomères lactate n'ayant pas réagi. Afin d'améliorer l'efficacité du greffage, un nouveau protocole de couplage, basé sur le même principe, a été réalisé [21] (Schéma I-16). Ainsi des oligomères lactate ω -acétylés, obtenus à partir de l'alcool benzylique et désactivation par l'anhydride acétique, sont hydrogénés pour générer une fonction acide terminale. Ces oligomères stéréoréguliers sont ensuite couplés au dextrane par l'intermédiaire du dicyclohexylcarbodiimide (DCC). La réaction est quasi-quantitative à température ambiante et selon les auteurs, la quantité de poly lactide introduite dans le copolymère peut être modulée selon le ratio dextrane/poly lactide. Remarquons que seuls des petits oligomères lactate de $\overline{M}_n$

inférieure à 650 g/mol ont été couplés au dextrane et que la fraction massique en lactide dans ces copolymères est toujours inférieure à 40%. Les copolymères peuvent ensuite former des hydrogels physiques par stéréocomplexation des greffons poly(L,L)-lactide et poly(D,D)-lactide [20, 21]. La réalisation d'hydrogels mixtes, associant deux copolymères de stéréorégularité opposée, chacun obtenu par une des deux méthodes précédentes, permet d'éviter l'encombrement stérique entre chaînes et d'obtenir des hydrogels plus compacts et plus forts. Ces différents hydrogels ont été utilisés pour la vectorisation de protéines [92].

Des oligolactates ω -HEMA, préparés à partir du méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA), peuvent également être couplés au dextrane après activation de leur fonction hydroxyle terminale par la N, N'-carbonyldiimidazole [93], [94] (Schéma I-17 a).

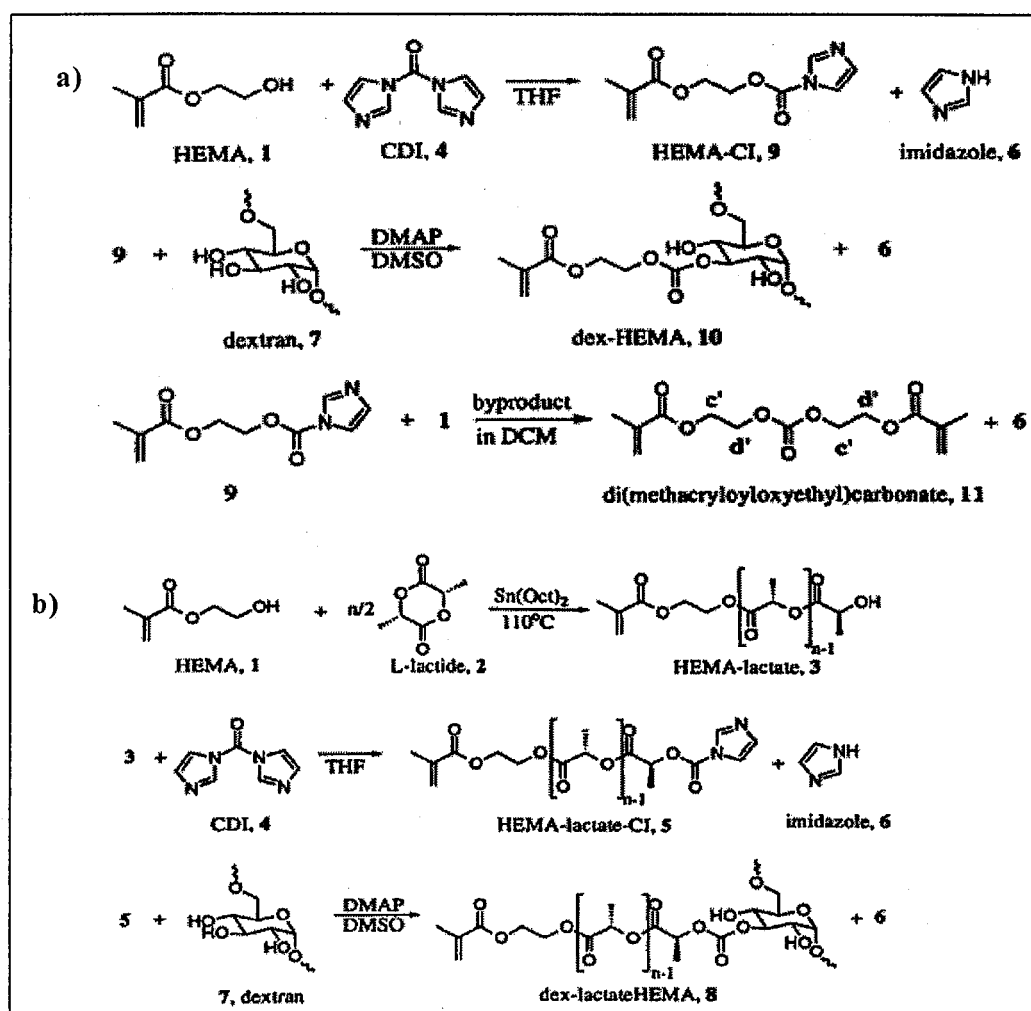


Schéma I-17 : Schéma de synthèse de copolymères dextrane-lactate-HEMA (a) ou dextrane-HEMA (b).

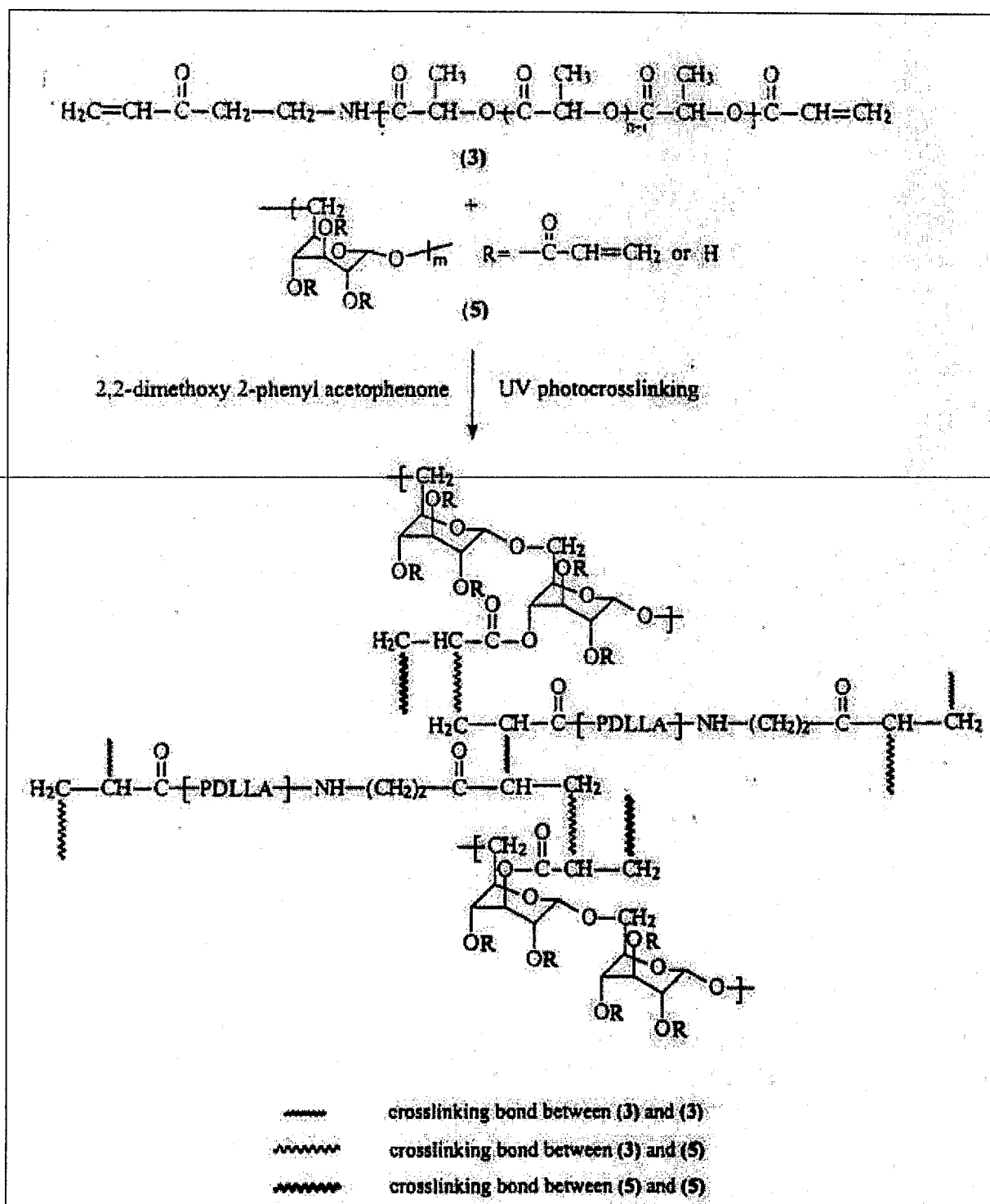


Schéma I-18 : Synthèse de copolymères dextrane-g-poly lactide par photoréticulation.

Des dextrans, substitués par des groupes HEMA peuvent également être obtenus de façon semblable (Schéma I-17 b). Ces macromonomères peuvent ensuite être réticulés chimiquement lors d'une étape ultérieure pour conduire à des hydrogels. La réticulation (polymérisation radicalaire des fonctions méthacrylate latérales) est réalisée par amorçage de type (persulfate + tétraéthylène diamine). Dans le cas des dextrane-g-poly(L-lactate)-HEMA, les oligomères lactate jouent le rôle d'espaceur sensible à l'hydrolyse, si bien que la vitesse de dégradation des hydrogels résultants peut être adaptée selon la longueur et le nombre de ces bras [95]. La biocompatibilité de ces hydrogels a été testée [96] et leur utilisation pour l'encapsulation et le relargage de protéines envisagée [18, 97, 98].

Des hydrogels de ce type, réticulés chimiquement, ont également été préparés par photocopolymérisation radicalaire de dextrans porteurs de fonctions méthacrylate [128, 129] et de macromonomères poly(D,L)-lactide α,ω -diacrylates (Schéma I-18) [99]. Ces hydrogels produits peuvent être utilisés pour la libération contrôlée d'albumine [100], mais aucun contrôle quant à l'architecture des produits n'est obtenu.

L'association du dextrane et du polylactide a également été effectuée par transestérification. La réaction entre les fonctions hydroxyle du dextrane et les groupements ester de la chaîne de polylactide est alors catalysée par de l'acétate de magnésium. La structure obtenue n'est pas contrôlée mais il en résulte la formation d'hydrogels de dextrane. Il a été envisagé d'utiliser ces hydrogels dans certaines applications biomédicales [101].

VI.2.2. Couplage par amidification

Cette réaction de couplage met en jeu soit des dérivés carboxylés de polysaccharide et des polymères ω -aminés, soit un polysaccharide comportant une fonction amine comme le chitosane et un polymère ω -carboxylé ou ω -carbonate.

VI.2.2.1. Couplage de polyacrylamide

Des polysaccharides carboxyméthylés (dextrane [102] ou cellulose [103]) ont été associés à des polyacrylamides ω -aminé en présence de carbodiimide (CDI) (le cas du dextrane est présenté sur le schéma I-19). La synthèse initiale de poly(N-isopropylacrylamide) ω -aminé a été effectuée par amorçage redox (persulfate/aminothiols) [104], ce qui permet d'obtenir des chaînes ω -aminées. Le couplage de ces polymères sur la

carboxyméthylcellulose [103] est presque quantitatif mais les proportions de polyacrylamide fixées sont faibles (1 à 2 greffons de polyacrylamide par chaîne de cellulose).

Dans le cas des dérivés du dextrane, des copolymères poly(N-isopropylacrylamide-co-diméthylacrylamide)- ω hydroxylés ont été préparés par amorçage radicalaire en présence d'éthane thiol comme agent de transfert. La fonction hydroxyle terminale est transformée en amine (par couplage avec une diamine), laquelle est ensuite activée par le p-nitrophénylchloroformate avant le couplage sur le dextrane.

Ces copolymères polysaccharide-g-polyacrylamide conduisent à la formation d'hydrogels thermosensibles, utilisables pour la vectorisation de médicaments.

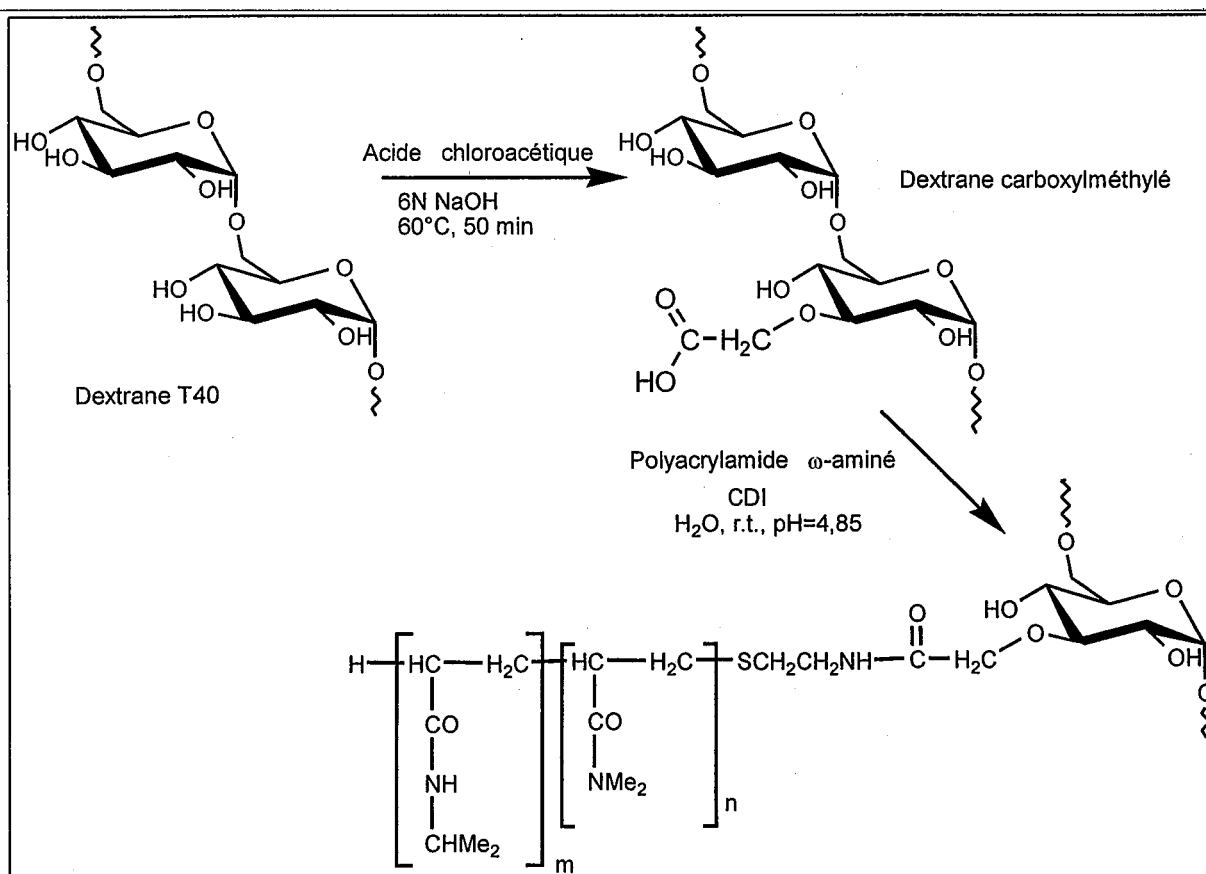


Schéma I-19 : Couplage entre dextrane et polyacrylamide par amidification.

VI.2.2.2. A partir de la fonction amine du chitosane

Du méthoxypoly(éthylèneglycol) ω -acide carboxylique (MPEG) a été fixé sur le chitosane par couplage avec ses fonctions amine (Schéma I-20) [105]. Avant le couplage, les

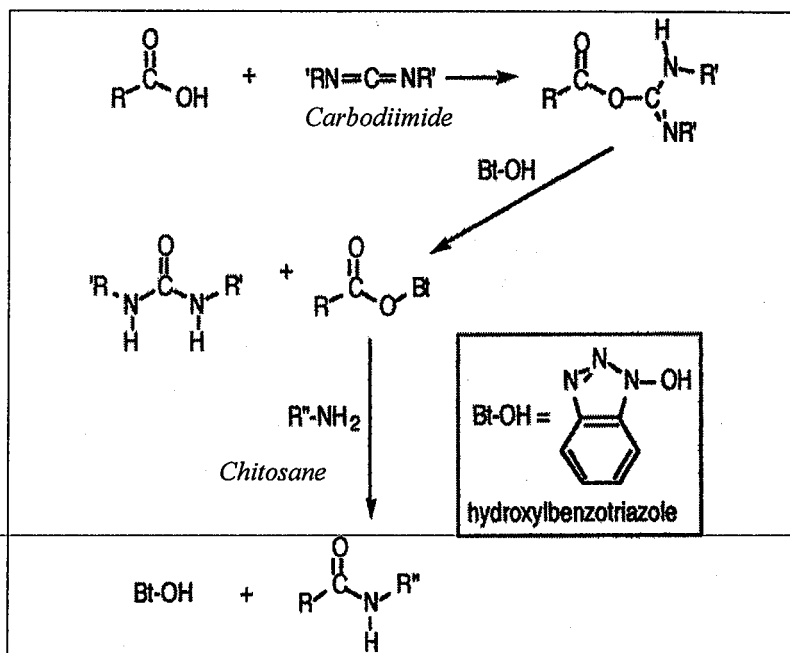


Schéma I-21 : Activation d'un PEG ω -carboxylé par une carbodiimide et hydroxybenzotriazole (BtOH).

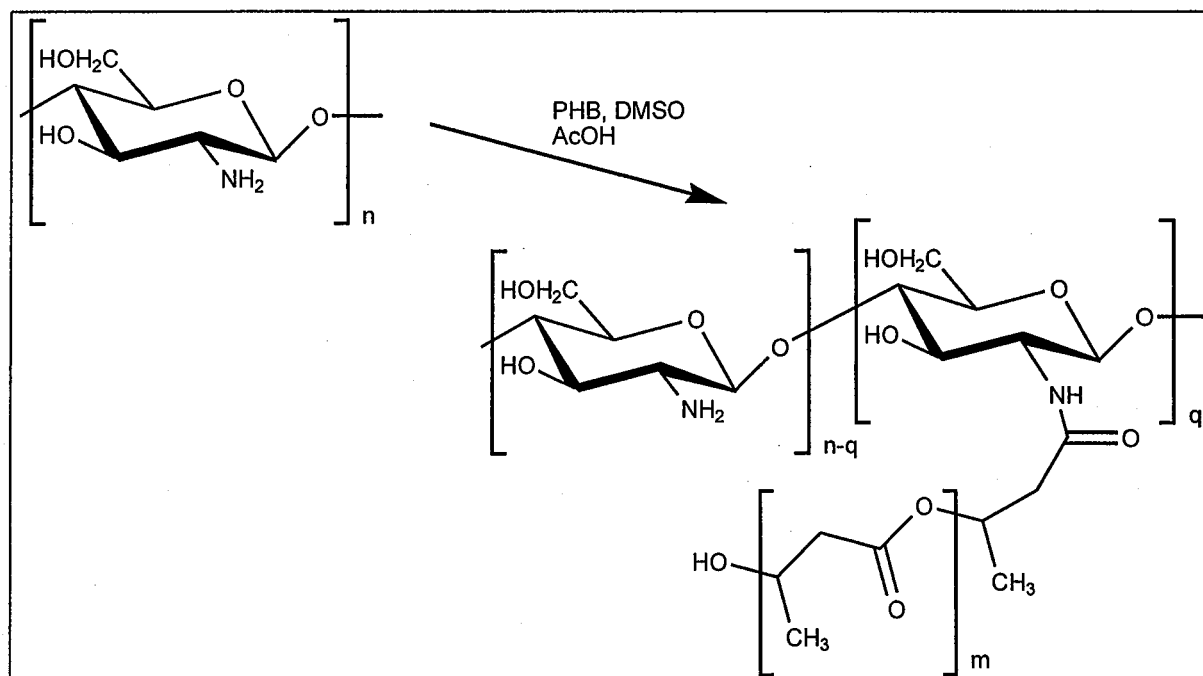


Schéma I-22 : Couplage entre le chitosane et du polyhydroxybutyrate.

fonctions hydroxyle primaires du chitosane sont protégées par des groupements triphénylméthyle à l'aide de diverses étapes de protection et déprotection spécifiques [106, 107]. La réaction entre ce chitosane modifié et le MPEG s'effectue en présence de CDI et d'hydroxylbenzotriazole (le mécanisme est indiqué dans le schéma I-21). Le copolymère obtenu est ensuite déprotégé en milieu acide afin d'obtenir le copolymère chitosane-g-MPEG. Ce produit est hydrosoluble dès que le degré de substitution en MPEG est supérieur à 0,1, mais forme des agrégats qui peuvent solubiliser des substances hydrophobes.

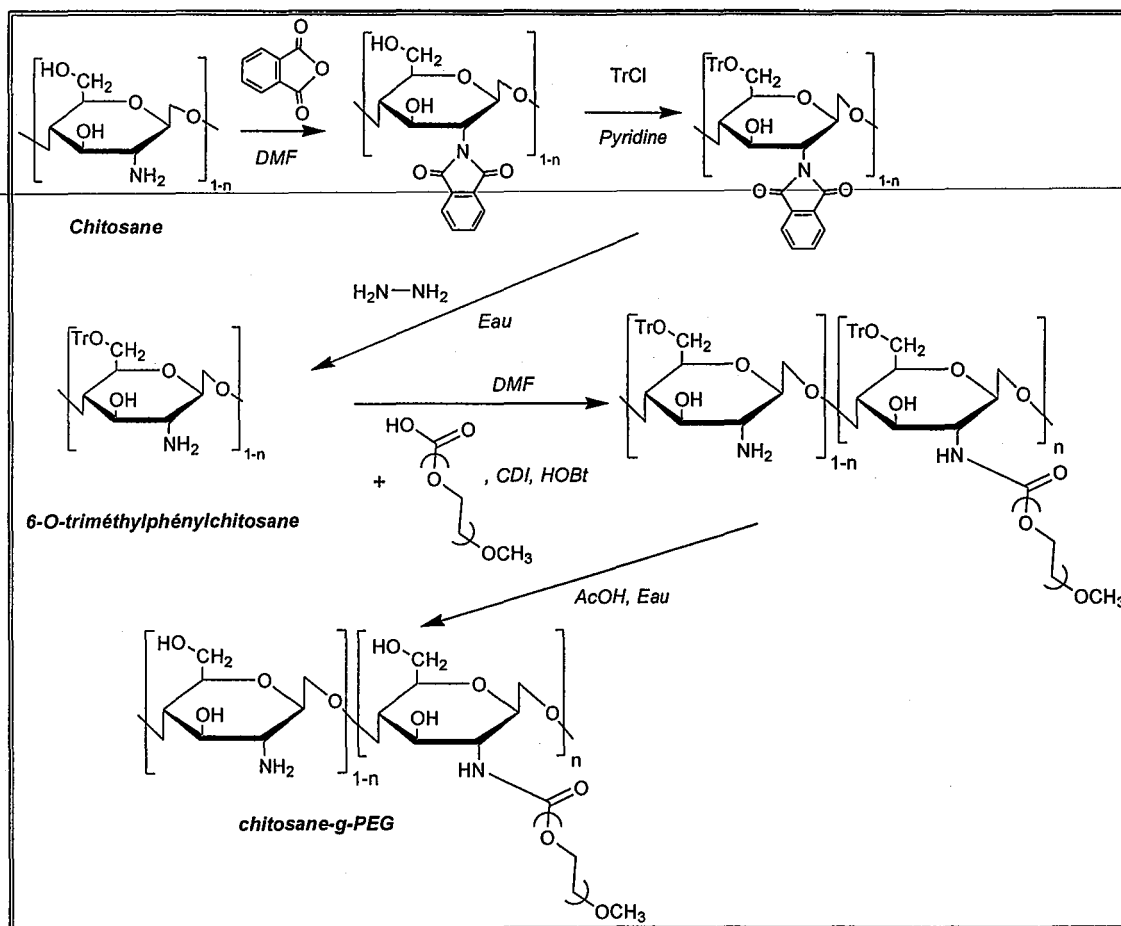


Schéma I-20 : Couplage entre le chitosane et le poly(éthylène glycol) par amidification. CDI = carbodiimide, HOBT = hydroxylbenzotriazole

Des copolymères chitosane-g-polyester sont préparés par réaction en milieu acide entre la fonction carboxylique terminale du poly(hydroxybutyrate) (PHB) et les fonctions amine d'un chitosane [108] (Schéma I-22). Le dérivé obtenu présente un faible degré de substitution des amines.

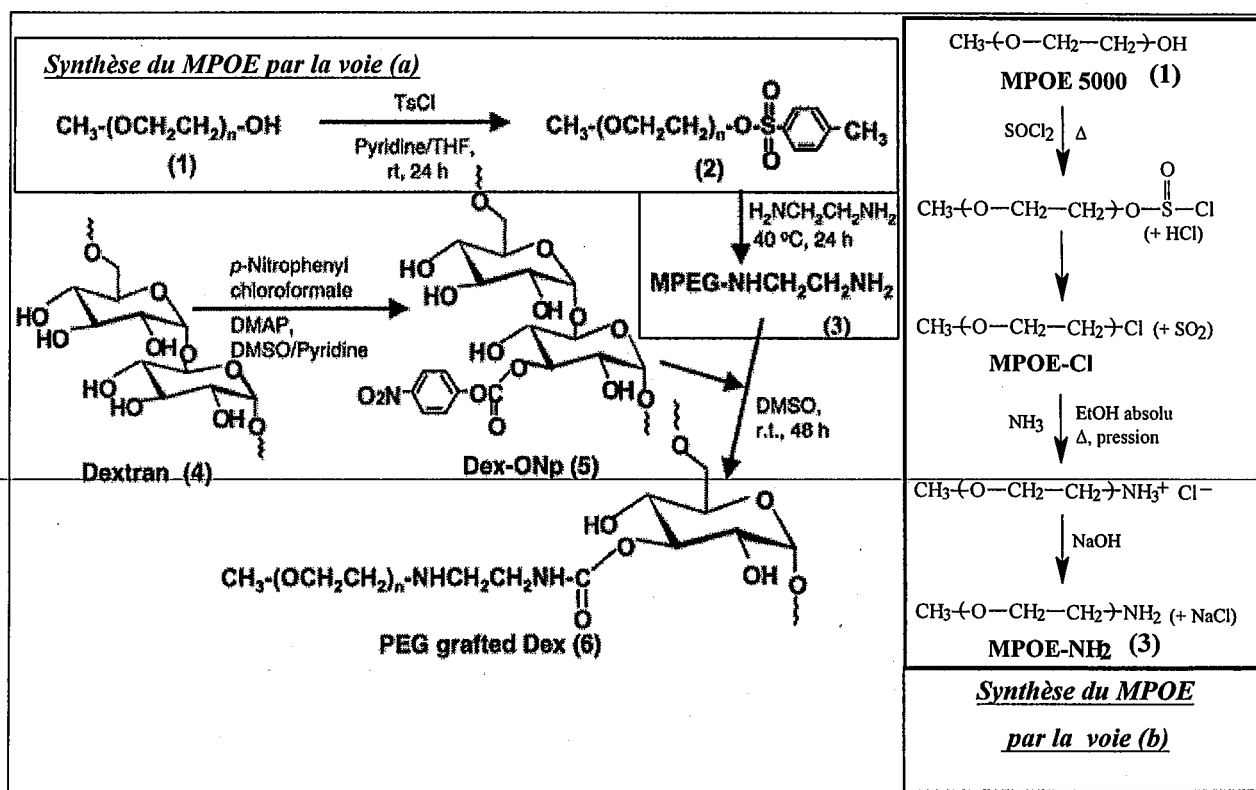


Schéma I-24 : Méthodes de synthèse des dextrane-g-POE par réaction entre le dextrane carbonaté et un POE ω -aminé.

La fonction amine du chitosane peut également réagir avec des polymères ω -aldéhyde. Des copolymères chitosane-g-PEG ont été synthétisés par cette voie [106]. Ces copolymères possèdent une grande affinité à la fois pour les solvants organiques et pour l'eau, contrairement au chitosane. Grâce à leur partie PEG, ils peuvent complexer et solubiliser des cations métalliques de façon significative.

VI.2.3. Formation de liaison uréthane

VI.2.3.1. Réaction entre un dérivé d'acide et une fonction amine

Nous venons de voir au paragraphe précédent qu'un PEG (ou poly(oxyde d'éthylène) POE) porteur d'une fonction acide carboxylique peut être couplé au chitosane par amidification. Lorsque le PEG possède une fonction carbonate à son extrémité [109] (Schéma I-23), celui-ci peut réagir avec les fonctions amine du chitosane et se greffer via une liaison uréthane. L'efficacité de greffage est alors de 80 à 90 %. Les copolymères montrent là encore une solubilité en milieu aqueux (pH = 6,5). L'intérêt de tels copolymères chitosane-g-poly(oxyde d'éthylène) est leur emploi pour recouvrir la surface hydrophobe de particules destinées à une administration intraveineuse [53, 110-113].

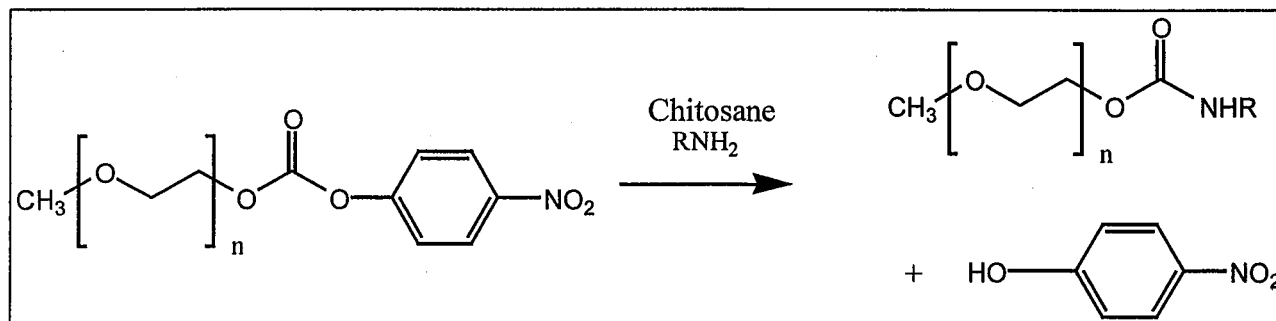


Schéma I-23 : Couplage d'un PEG ω -carbonate avec le chitosane.

Des copolymères dextrane-g-POE ont également été préparés en couplant le poly(oxyde d'éthylène) ω -aminé et le dextrane par une fonction uréthane. Les fonctions hydroxyle du polysaccharide sont, dans un premier temps, activées par un groupement carbonate par réaction avec le 4-nitrophénylchloroformate (Schéma I-24) [111, 112]. Les POE ω -aminés ont été obtenus par diverses méthodes qui mettent en jeu soit l'activation de leur fonction hydroxyle terminale par un groupement tosylate puis réaction avec l'ammoniac [111, 112] ou une diamine [114] (Schéma I-24, Voie a), soit la modification de cette fonction à

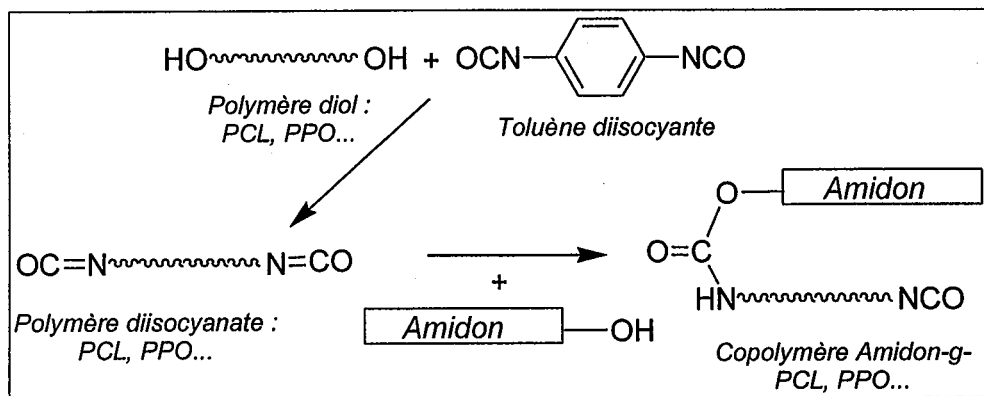


Schéma I-25 : Couplage d'amidon et de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) ou poly(oxyde de propylène) (PPO).

l'aide de chlorure de thionyle, suivie d'une amination à l'ammoniac [53, 113] (Schéma I-24, Voie b).

Cette synthèse présente cependant divers inconvénients :

- Lors de l'étape d'activation des fonctions hydroxyle du dextrane, deux types de structures carbonate peuvent être formées. Tout d'abord une fonction alcool est transformée en carbonate, mais cette dernière peut subir une attaque nucléophile des fonctions hydroxyle adjacentes de la même chaîne de dextrane. Ainsi des structures carbonate inter- et/ou intramacromoléculaires sont obtenues [115] (Figure I-12).

- Même si le POE est introduit en excès par rapport aux fonctions carbonate du dextrane, le greffage n'est pas quantitatif [114, 116].

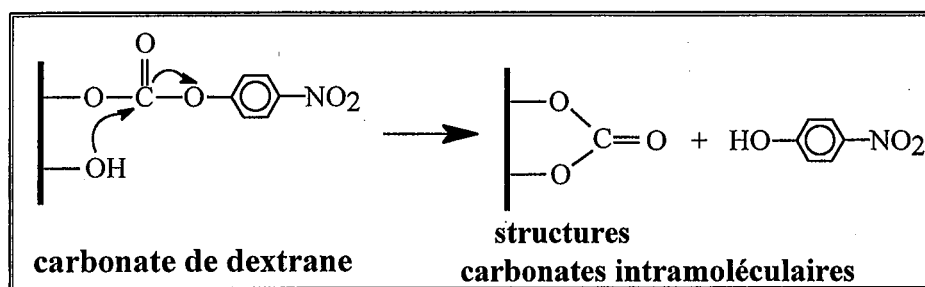


Figure I-12 : Formation de carbonate intramoléculaires

VI.2.3.2. Réaction entre un isocyanate et un alcool

Des polyéthers comme le poly(oxyde de propylène) ont également été couplés à des polysaccharides par l'intermédiaire de liaisons uréthane (Schéma I-25) [117]. Un amidon riche en amylopectine a ainsi été associé avec un polyéther α,ω -diisocyanate. Si la formation de liaison uréthane a été mise en évidence, la structure du produit obtenu n'est pas bien définie : compte-tenu de la bifonctionnalité du polyéther, ce dernier peut se fixer soit à une ou à deux chaînes d'amidon. Ceci conduit à la formation de copolymère greffé, mais également à la réticulation des chaînes du polysaccharide. Ces produits peuvent néanmoins être utilisés pour former des films de polyélectrolytes, présentant de bonnes propriétés mécaniques.

Ce même schéma synthétique a permis d'associer de l'amidon et de la poly(ϵ -caprolactone) α,ω - diisocyanate (Schéma I-25) [118]. Là encore, la structure du produit est

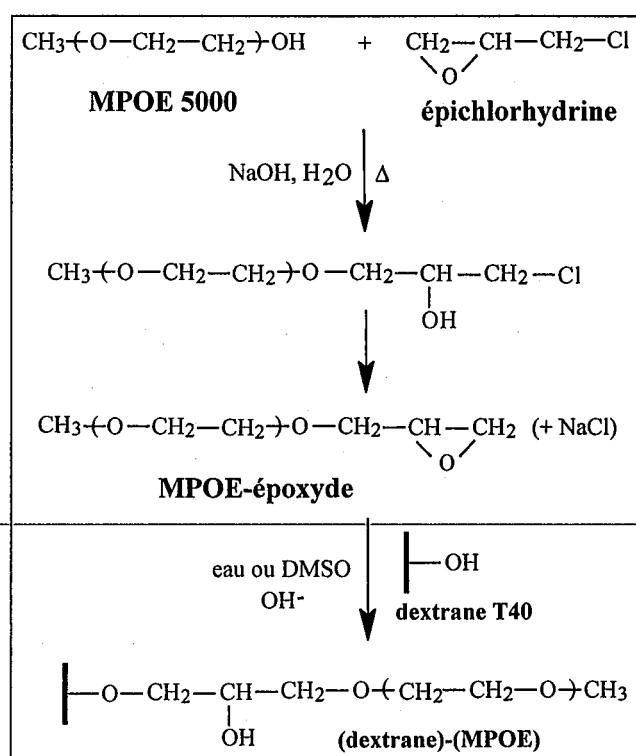


Schéma I-26 : Fixation du MPOE sur le dextrane par l'intermédiaire d'un dérivé époxyde.

mal définie pour les mêmes raisons. Le composé alors obtenu a été utilisé pour compatibiliser des mélanges amidon/polyesters non compatibles.

VI.2.4. Autres réactions de couplage

VI.2.4.1. Formation d'une liaison éther

Différentes méthodes ont été rapportées pour préparer des dextrane-g-POE, dont les deux parties sont reliées par une fonction éther. Les POE utilisés peuvent, par exemple, être préalablement activés par des fonctions époxy terminales (cf. Schéma I-26). La réaction ne conduit alors qu'à une faible efficacité de greffage [116].

VI.2.4.2. Formation d'une liaison amine secondaire

Comme nous l'avons vu au paragraphe V.2.3.1, il est possible d'obtenir des dextrane-g-POE par réaction entre un POE ω -aminé et le dextrane activé par des fonctions carbonate. L'activation du dextrane peut également être réalisée par réaction avec de l'épichlorhydrine en milieu acide. On obtient alors un dérivé dextrane chloré (Schéma I-27) [119], mais cette modification entraîne une dégradation partielle du dextrane [37]. La réaction de ce dérivé avec le POE ω -aminé conduit au couplage des deux parties, lequel est assuré par des liaisons amine secondaire. Ce type de réaction a également été utilisé pour réticuler le dextrane à l'aide d'éthylène diamine [110].

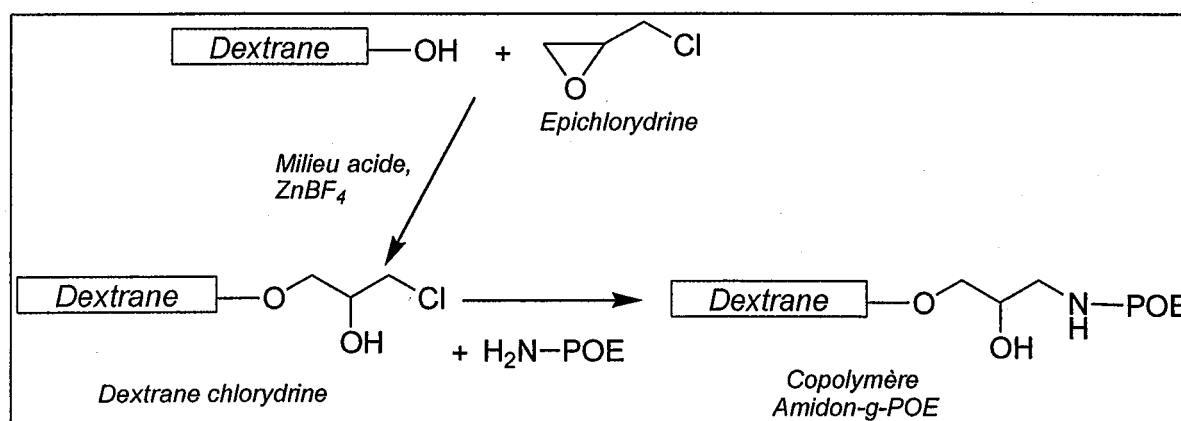


Schéma I-27 : Obtention de dextrane-g-POE après activation du dextrane par l'épichlorhydrine.

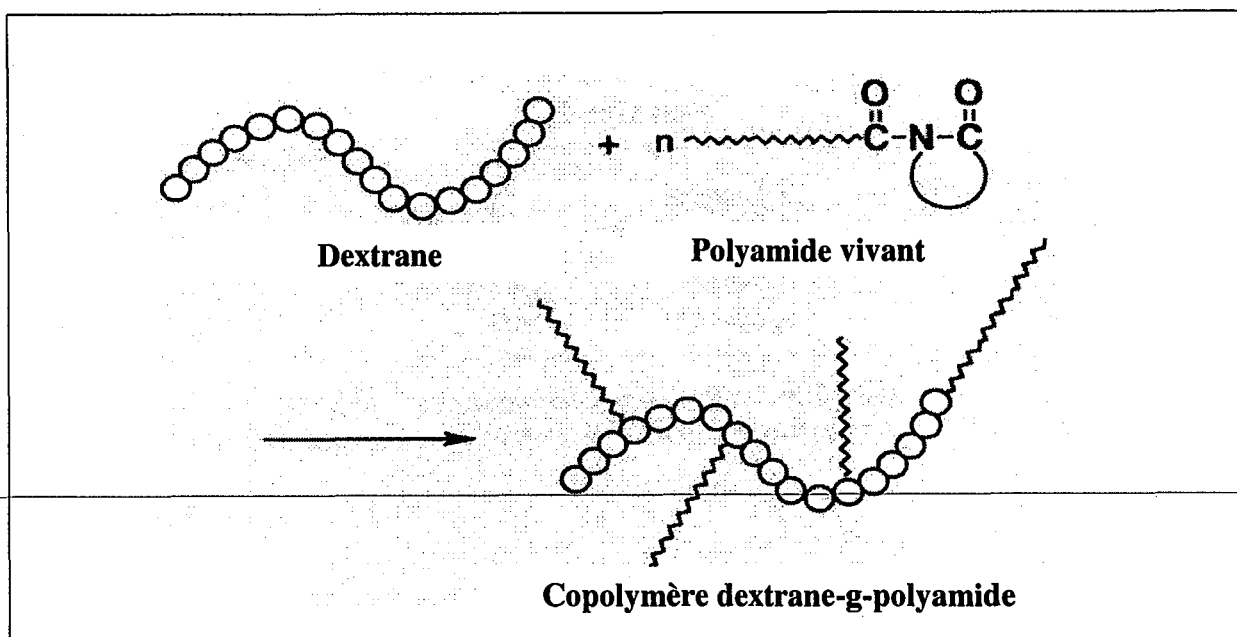


Schéma I-28 : Synthèse de copolymère dextrane-g-polyamide par désactivation de polyamides « vivants ».

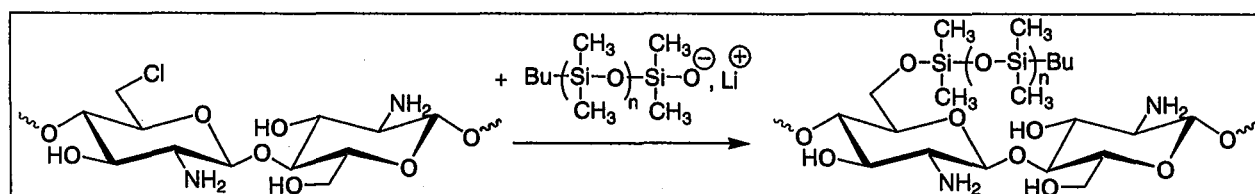


Schéma I-29 : Synthèse de copolymère chitosane-g-polydiméthylsiloxane par désactivation de silanolates de PDMS.

VI.2.5. Couplage par désactivation de précurseurs ioniques par un polysaccharide

Comme nous venons de le voir, l'efficacité de greffage est souvent faible lorsque la méthode « grafting onto » est réalisée à l'aide de réactions chimiques classiques. Une des méthodes pour augmenter cette efficacité consiste à réaliser, dans une première étape, une polymérisation « vivante » puis à désactiver les chaînes en croissance par un polysaccharide.

VI.2.5.1. Dextrane-g-polyamide

Des dextrane-g-polyamides peuvent être synthétisés par désactivation de chaînes en croissance de polyamide (Schéma I-28) [120]. Ces chaînes, obtenues par polymérisation anionique par ouverture de β -lactames, présentent une taille contrôlée et sont terminées par un lactame cyclique. La réaction de ces polyamides ω -lactame avec les fonctions alcool du dextrane conduit bien au couplage, mais le mélange obtenu est composé de copolymère dextrane-g-polyamide, souillé par du dextrane non modifié [120]. Ce type de copolymères greffés a également été préparé par désactivation de polyamides ω -lactame, préalablement obtenus par polymérisation « vivante » de lactame bicyclique [60], par un dextrane partiellement aminé. Dans ces deux cas, la structure des copolymères n'est pas parfaitement contrôlée, notamment en terme de nombre de greffons, ainsi qu'en témoigne la présence de plusieurs populations macromoléculaires sur les chromatogrammes d'exclusion stérique.

VI.2.5.2. Dextrane-g-polydiméthylsiloxane

Des copolymères chitosane-g-polydiméthylsiloxane [121] (Schéma I-29) ont été préparés par désactivation de polysiloxanes « vivants » (PDMS) par un chitosane préalablement substitué par des groupements chlore. Le greffage a été mis en évidence, mais les auteurs observent la présence de polysaccharide et de polysiloxane qui n'ont pas réagi. Les films obtenus à partir de ces produits ont révélé de meilleures propriétés mécaniques et une plus faible énergie de surface que ceux réalisés avec du chitosane. Ceci laisse espérer une bonne biocompatibilité pour ces matériaux (diminution de l'effet antithrombique du chitosane au contact du sang).

VI.2.5.3. (Cellulose acétylée)-g-polystyrène

Une voie de synthèse originale et permettant un bon contrôle de la structure des copolymères (cellulose acétylée)-g-polystyrène a été décrite dans la littérature [122] (Schéma

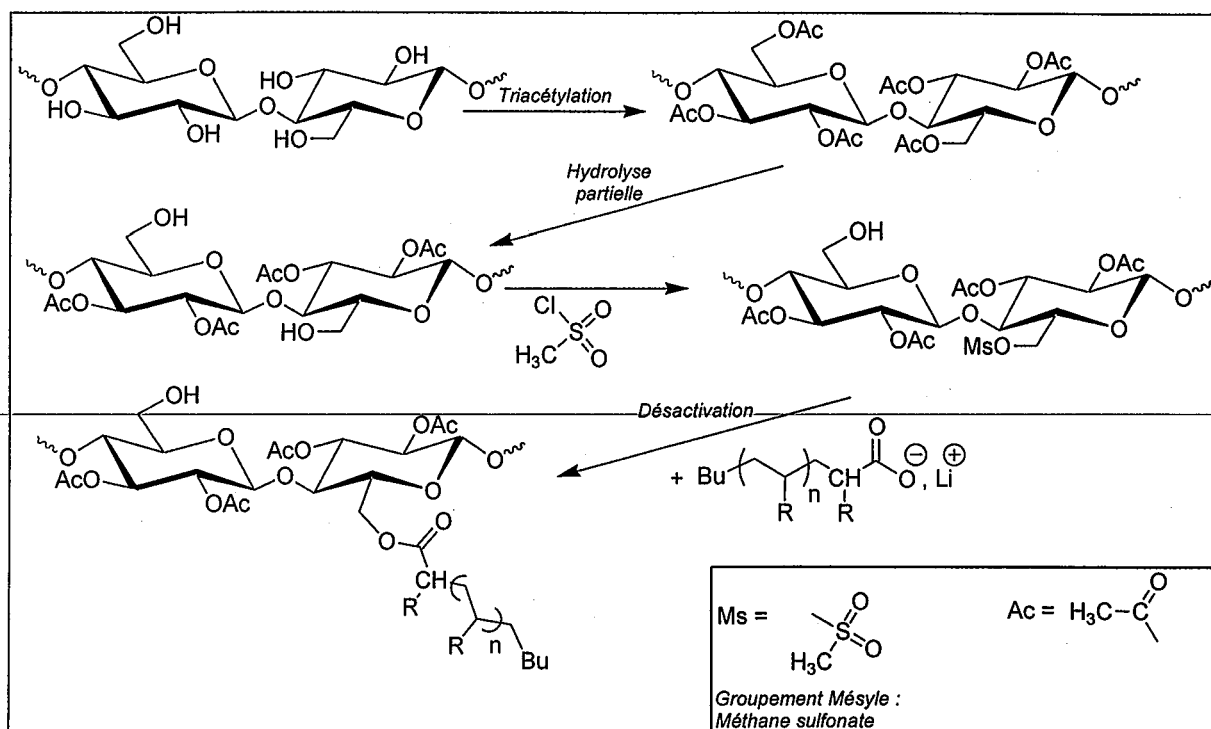


Schéma I-30 : Stratégie de synthèse des copolymères cellulose-g-polystyrène.

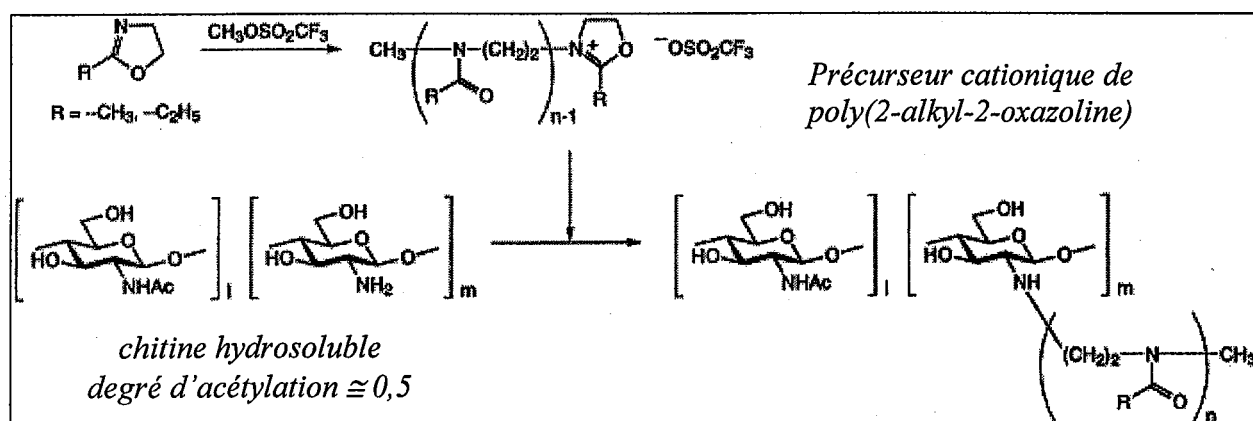


Schéma I-32: Synthèse de copolymères chitine-g-polyoxazoline

I-30). Ces copolymères ont été préparés à l'aide d'un protocole en plusieurs étapes, via une désactivation du polystyrène ω -carboxylate par la cellulose partiellement acétylée. Certains hydroxyles primaires résiduels de la cellulose modifiée sont activés en groupements mésyle. Des polystyrènes ω -carboxylate, générés par réaction entre du dioxyde de carbone et des carbanions polystyryle « vivants » (Schéma I-31), se désactivent alors sur cette cellulose modifiée. Les fonctions carboxylate réagissent facilement avec les groupes mésyle, mais ne sont pas assez réactifs pour attaquer les groupements acétate.

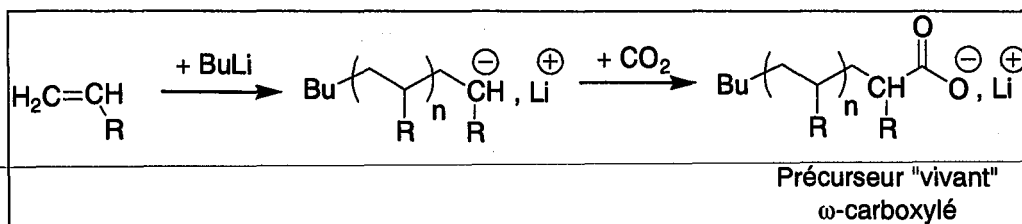


Schéma I-31 Synthèse de précurseurs polystyryle ω -carboxylate

Si cette stratégie de synthèse permet effectivement le greffage du polymère « vivant », la présence d'un nombre non négligeable de fonctions alcool non protégées sur la cellulose acétylée conduit à la désactivation des polystyryles « vivants » et donc à la formation d'homopolymère.

Cette voie de synthèse a également été appliquée à d'autres polysaccharides comme l'amidon et à d'autres précurseurs « vivants » de type poly(méthacrylate de méthyle) ou polybutadiène. Des systèmes réticulés sont également envisageables en employant des précurseurs téléchéliques.

VI.2.5.4. Chitine-g-polyoxazoline

Des précurseurs cationiques « vivants » de type polyoxazoline ont été désactivés par des fonctions amine présentes sur la chitine partiellement déacétylée (Schéma I-32) [123-125]. Le contrôle de la polymérisation cationique par ouverture d'oxazolines, amorcée par le trifluorométhanesulfonate permet de produire des greffons monodisperses. Le nombre des chaînes latérales sur le copolymère peut être contrôlé par le ratio polyoxazoline/chitine. Les copolymères chitine-g-polyoxazoline obtenus sont solubles dans l'eau, dans le diméthylsulfoxyde ou dans la diméthylformamide. Ils sont également miscibles avec des

polymères synthétiques tels que le poly(chlorure de vinyle) et le poly(alcool vinylique), si bien qu'ils peuvent servir d'agents compatibilisants.

VI.3. Conclusions sur la méthode « grafting onto »

De nombreux exemples illustrant l'obtention de glycopolymères par la méthode « grafting onto » ont été rapportés. Les couplages sont effectués par l'intermédiaire des différentes fonctions présentes le long de la chaîne du polysaccharide (ou de leur extrémité réductrice dans le cas des glycopolymères à greffons polysaccharides). Ces fonctions sont en général activées afin de réagir avec des précurseurs ω -fonctionnalisés.

Dans le cas des copolymères polysaccharide-g-polymère, ce type de méthode permet de « contrôler » la longueur des greffons. En effet, ceux-ci sont préformés avant leur couplage, et il est aussi possible de connaître leur taille, voire de la maîtriser en employant des techniques de polymérisation contrôlée.

Le principal inconvénient de ce type de méthode réside dans l'efficacité du greffage. Le nombre de greffons introduit peut être très faible, et il n'est pas toujours maîtrisable. Ainsi, une purification des produits est nécessaire à la fin de la synthèse pour éliminer les polymères ω -fonctionnalisés non greffés. Une des méthodes les plus favorables pour accroître ce greffage consiste à désactiver des polymères « vivants » par la dorsale polysaccharide. Mais dans ce cas, si les fonctions hydroxyle du polysaccharide ne sont pas entièrement protégées, une désactivation des chaînes en croissance est souvent observée, ce qui conduit, là encore, à des produits souillés par des homopolymères.

Le nombre moyen de greffons fixés sur la dorsale ne peut être déterminé qu'à posteriori, après caractérisation du copolymère obtenu. Après purification, le positionnement des greffons sur le squelette polysaccharide a été peu étudié. Compte-tenu des problèmes de réactivité, il n'est pas sûr que la répartition des greffons soit homogène sur une même chaîne. Ce problème est encore plus important si la réaction n'est pas effectuée dans un solvant commun des deux parties du copolymère (squelette et greffons). Un certain « contrôle » peut néanmoins être obtenu si l'on choisit de réaliser un couplage soit sur certaines fonctions des polysaccharides (fonctions amine par exemple), soit par un couplage sélectif (réaction sur les hydroxyles primaires uniquement).

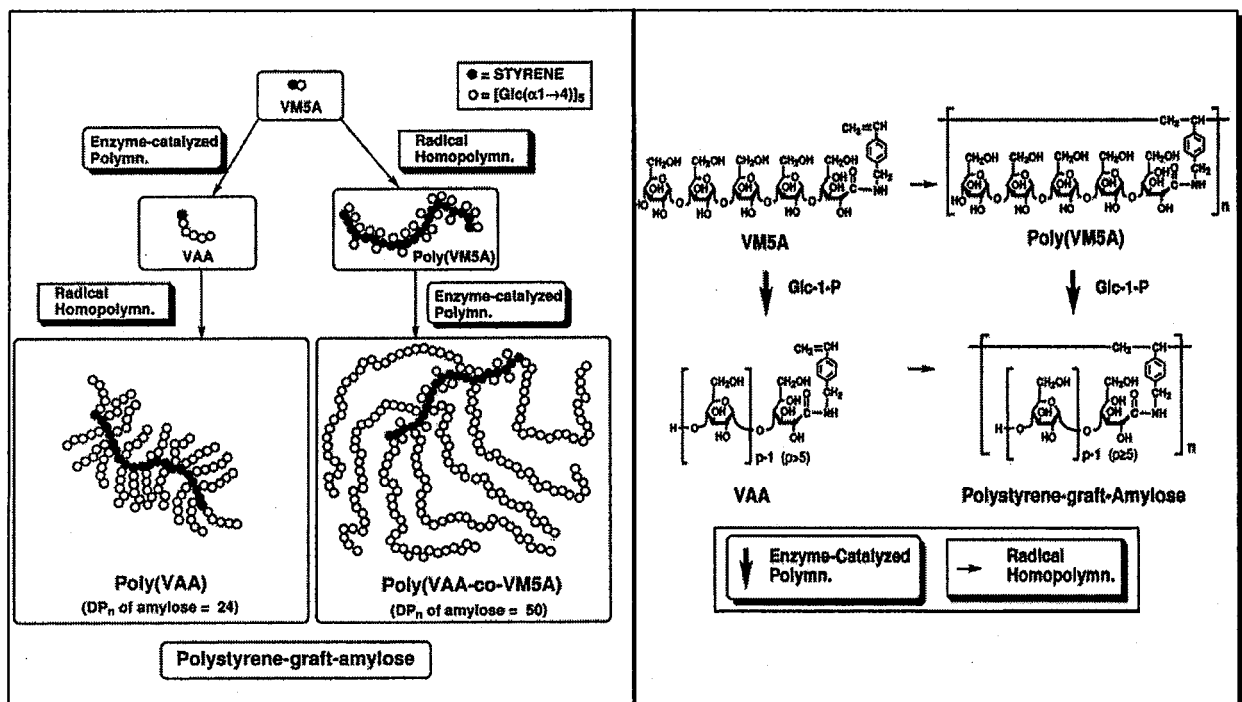


Schéma I-33 : Voies de synthèse de polystyrène-g- amylose par les méthodes « grafting through » et « grafting from ».

Le contrôle de l'architecture des copolymères obtenus par la méthode « grafting onto » n'apparaît donc pas évident. C'est pourquoi des techniques qui, d'une part, augmentent l'efficacité du greffage et donc la proportion en greffons dans le copolymère, et, d'autre part, réduisent ou éliminent la formation d'homopolymère résiduel ont également été développées.

VII. SYNTHÈSE DE COPOLYMERES A BASE DE POLYSACCHARIDES PAR LA METHODE « GRAFTING FROM »

Dans la mesure où la polymérisation d'un monomère, amorcée à partir de sites fonctionnels disposés le long d'une chaîne macromoléculaire (qui deviendra le squelette du copolymère), est réalisée par des techniques de polymérisation contrôlée, cette stratégie permet d'une part d'obtenir des greffons de faible polymolécularité et de longueur maîtrisée, de minimiser la formation d'homopolymère, mais également de contrôler le nombre des greffons, lorsque le nombre de sites d'amorçage est maîtrisé.

VII.1. Copolymères à greffons polysaccharide

Les glycopolymères à greffons polysaccharide, obtenus par cette méthode, sont peu courants. La raison est celle déjà mentionnée au paragraphe IV de cette première partie : la synthèse stéréorégulière des polysaccharides à partir des unités monomères correspondantes est très difficile. Dans le paragraphe IV, nous avons vu que des copolymères polystyrène-g-amylose pouvaient être synthétisés par la méthode « grafting through », par homopolymérisation d'un macroamorceur de type α -styryl amylose [76], lequel était obtenu par polymérisation enzymatique de glucose phosphate à partir d'un monomère α -styryl maltopentaose. L'ordre de ces deux polymérisations (radicalaire et enzymatique) peut être inversé. Dans ce cas, on peut obtenir un copolymère polystyrène-g-maltopentaose par polymérisation radicalaire du monomère initial (Schéma I-33). La polymérisation enzymatique permet ensuite, à partir de la plupart des maltopentaoses pendants de générer des greffons amylose. Un copolymère greffé, constitué d'environ d'un tiers de greffons amylose ($\overline{DP}_n = 140$) et de 2 tiers de petites branches (maltopentose), est alors obtenu.

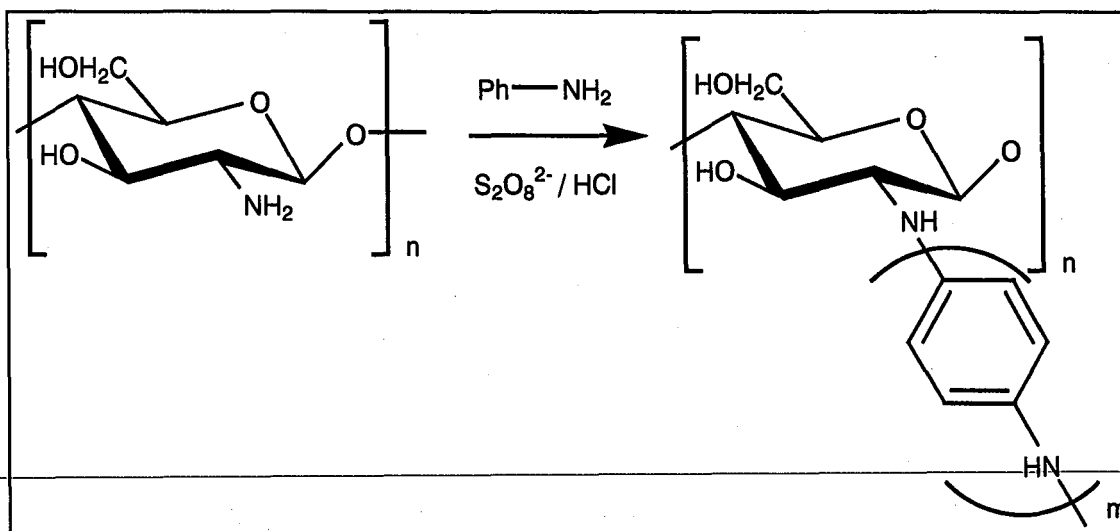


Schéma I-34 : Synthèse de chitosane-g-polyaniline à l'aide d'un amorçage par le persulfate d'ammonium en milieu acide.

Des copolymères polydiméthylsiloxanes-g-amylose ont également été synthétisés par cette méthode [126].

VII.2. Copolymères à dorsale polysaccharide

VII.2.1. *Polysaccharide-g-polyvinylique*

La plupart des glycopolymères synthétisés par la méthode « grafting from » présentent une dorsale polysaccharide et des greffons polyvinyliques. Les recherches ont tout d'abord été menées sur la cellulose et l'amidon et un certain nombre de revues ont été publiées. Mais les plus récentes concernent plus spécifiquement le chitosane [106, 127]. Nous ne citerons donc ici que les principales méthodes d'obtention.

VII.2.1.1. Amorçage par irradiation

Des méthodes mettant en jeu des radiations γ , des rayons X ou des rayons UV [106, 127, 128] ont été employées. L'interaction de ces rayonnements avec les polysaccharides provoque la formation de radicaux libres sur les chaînes macromoléculaires. Si ces polysaccharides sont mis en présence du monomère, avant même l'irradiation, les copolymères sont obtenus en une seule étape mais aucun contrôle de leur architecture ne peut être obtenu. Les copolymères sont généralement souillés par de grandes quantités d'homopolymère.

VII.2.1.2. Amorçage radicalaire

L'amorçage de monomères vinylique peut être réalisé à l'aide de systèmes d'amorçage chimique classiques de type AIBN ou persulfate d'ammonium. L'emploi d'AIBN a permis de polymériser des monomères tels que l'acrylonitrile, le méthacrylate de méthyle ou l'acétate de vinyle à partir du chitosane, mais la proportion de la partie polyvinylique est en général faible [106, 127]. L'emploi de persulfate d'ammonium a permis, quant à lui, d'obtenir des hydroxypropylchitosane-g-poly(acide méthacrylique) [129] et des chitosane-g-polyaniline [130] (Schéma I-34). Dans ces deux cas, les greffons sont portés par les fonctions amine du chitosane et la formation plus ou moins notable d'homopolymère est observée.

L'ion cérium (IV) est un agent oxydant capable de générer des radicaux libres sur différents substrats organiques, notamment sur les polysaccharides. Cette technique est la plus

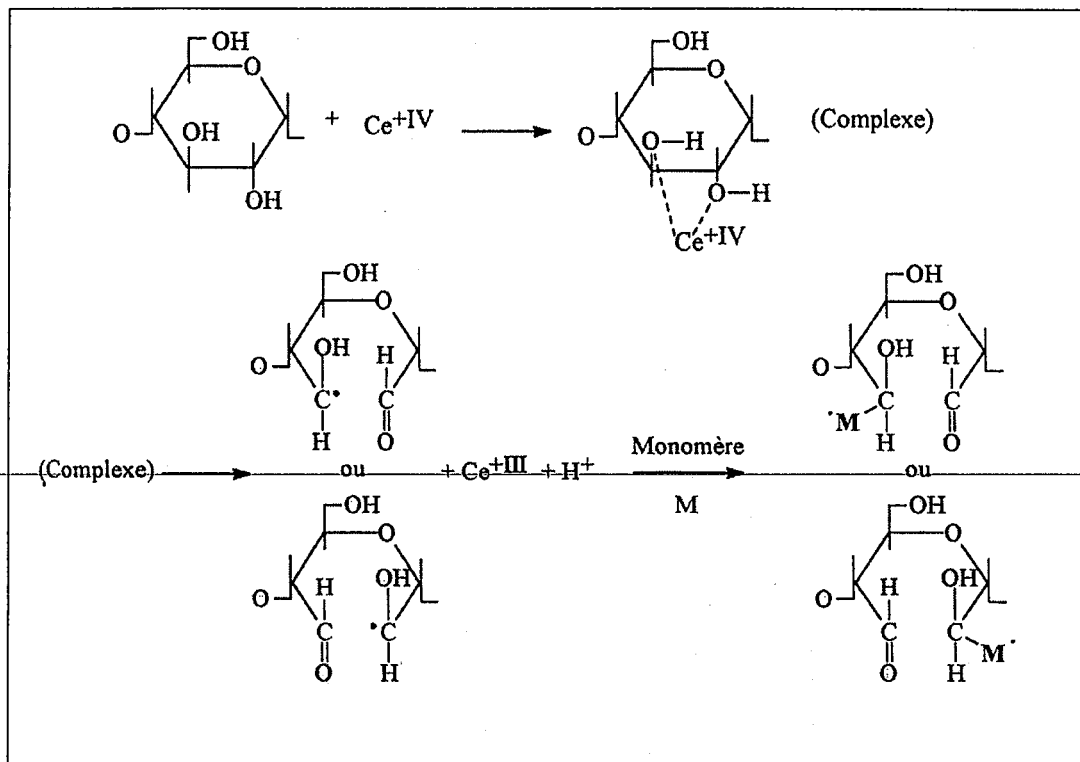


Schéma I-35 : Mécanisme d'amorçage par l'ion cérique. Cas de la cellulose.

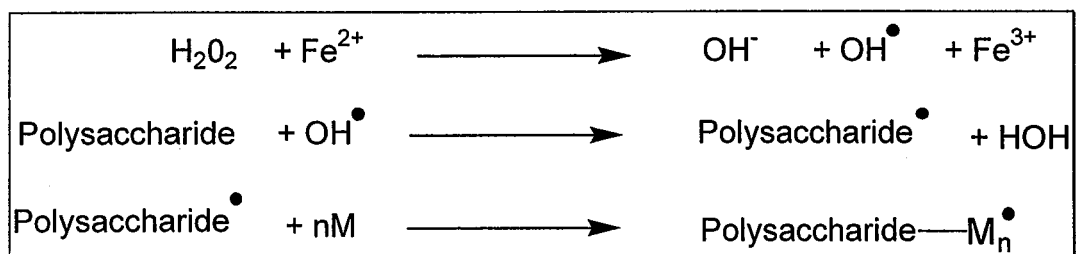


Schéma I-36 : Amorçage par le système de Fenton (H_2O_2/Fe^{2+}) sur les polysaccharides.

employée, après l'amorçage par irradiation. Le mécanisme à partir de la cellulose [131] est donné dans le schéma I-35. Après formation d'un complexe entre une unité glucose et l'ion cérique (Ce^{4+}), celui-ci est réduit en Ce^{3+} en milieu acide. Simultanément un radical libre est créé sur le substrat polysaccharide.

Des copolymères dextrane-g-poly(N-isopropylacrylamide) ont ainsi été synthétisés [132], mais l'efficacité de greffage est faible (inférieure à 35%) et la présence d'homopoly(N-isopropylacrylamide) est observée. Ces copolymères peuvent être employés pour leurs propriétés tensioactives dans des applications biomédicales. De la même façon, des copolymères à squelette chitosane ou chitine et à greffons polyacrylamide ont été décrits [127]. Des copolymères amylopectine-g-polyacrylamide [133], hydroxyéthyl(guar)-g-polyacrylamide [134] ou alginate-g-polyacrylamide [135] ont été obtenus par cette méthode et étudiés en tant qu'agents flocculants pour des applications à usage courant. Des (hydroxyéthylcellulose)-g-poly(carboxybétaine) [136] ont été étudiés comme agents épaississants pour l'extraction du pétrole [136, 137].

Cet amorçage par l'ion cérique a également permis d'obtenir des copolymères amidon-g-polyacrylonitrile ou amidon-g-polyméthacrylate [138, 139], des cellulose-g-poly(acrylonitrile-co-éthylméthacrylate) [140], et des dextrane-g-polyméthacrylamide employés dans l'industrie papetière comme additifs flocculants [141]. Le dextrane et l'héparine ont également été greffés par du poly(méthacrylate de méthyle) afin de recouvrir des particules hydrophobes de PMMA d'une couronne hydrophile [142-144].

Le système redox $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ a également été testé pour amorcer la polymérisation radicalaire à partir des polysaccharides [127] (Schéma I-36). Là encore la polymérisation conduit à des taux notables d'homopolymère. Des copolymères chitosane-g-poly(méthacrylate de méthyle) ont été ainsi préparés avec une efficacité de greffage de 72%. De nombreux systèmes redox analogues au couple $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ ont été développés, mais ils conduisent également à la formation d'homopolymère [127].

La plupart des méthodes présentées dans ces paragraphes VI.2.1.1 et VI.2.1.2, même si elles sont faciles à mettre en œuvre, ne permettent pas de contrôler l'architecture des copolymères obtenus. Si l'efficacité de greffage est parfois élevée, les structures des macromolécules présentent le plus souvent un nombre réduit de greffons, de très hautes

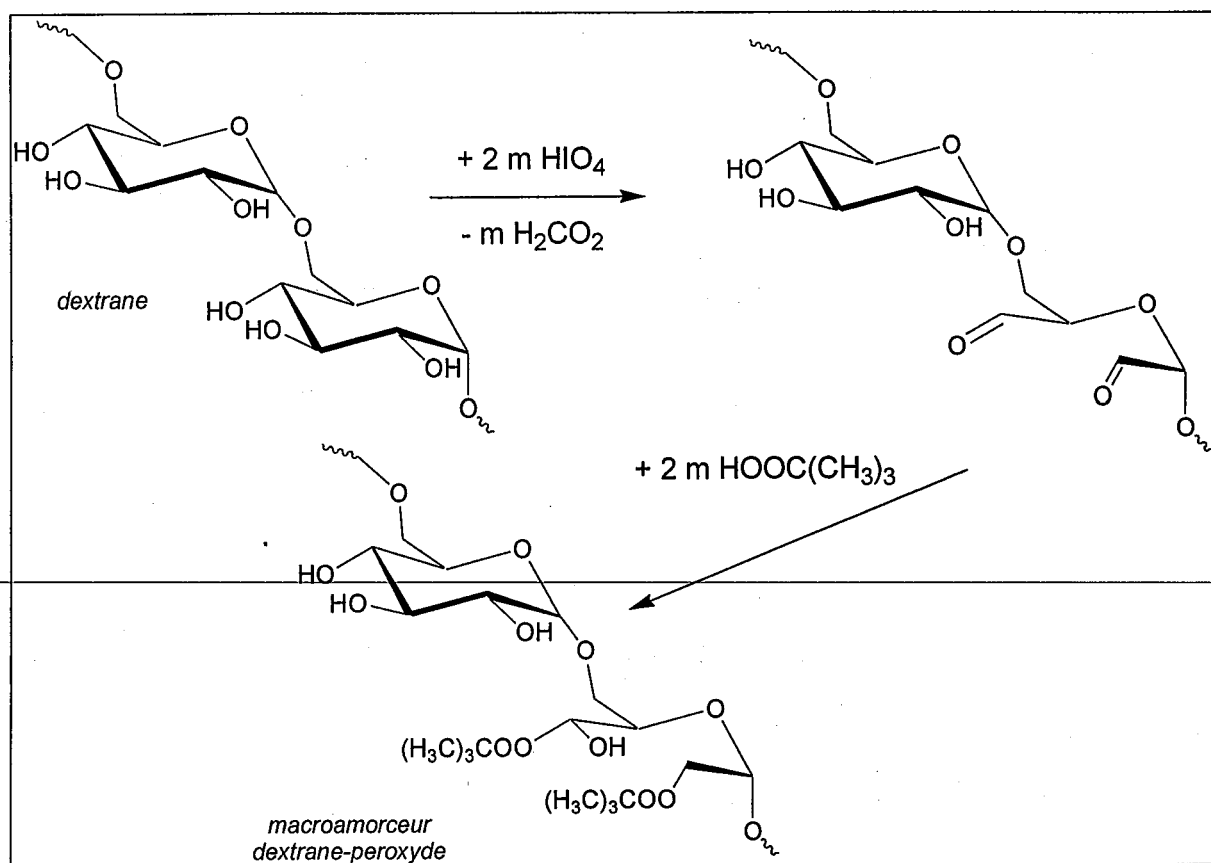


Schéma I-38 : Formation d'un macroamorceur dextrane-peroxyde.

masses molaires. La longueur de ces greffons est difficile à contrôler, ainsi que leur polymolécularité. Le non-contrôle de l'architecture provient de l'emploi de techniques classiques de polymérisation radicalaire, bien connues pour leur absence de sélectivité.

VII.2.1.3. Tentatives pour maîtriser les amorçages radicalaires : introduction de groupements spécifiques sur les polysaccharides

Des méthodes d'amorçage radicalaire, autres que les précédentes, ont été utilisées dans le but d'essayer de contrôler l'architecture du copolymère désiré. Elles mettent en jeu des groupements spécifiques volontairement fixés sur les polysaccharides. Ces groupements sont alors susceptibles d'amorcer une polymérisation radicalaire par amorçage photochimique, ou en présence d'un co-amorceur.

L'emploi du peroxyde d'hydrogène en présence de polysaccharides fonctionnalisés par des groupements thiocarbonates (schéma I-37) a été développé sur la cellulose, puis sur l'amidon [145].

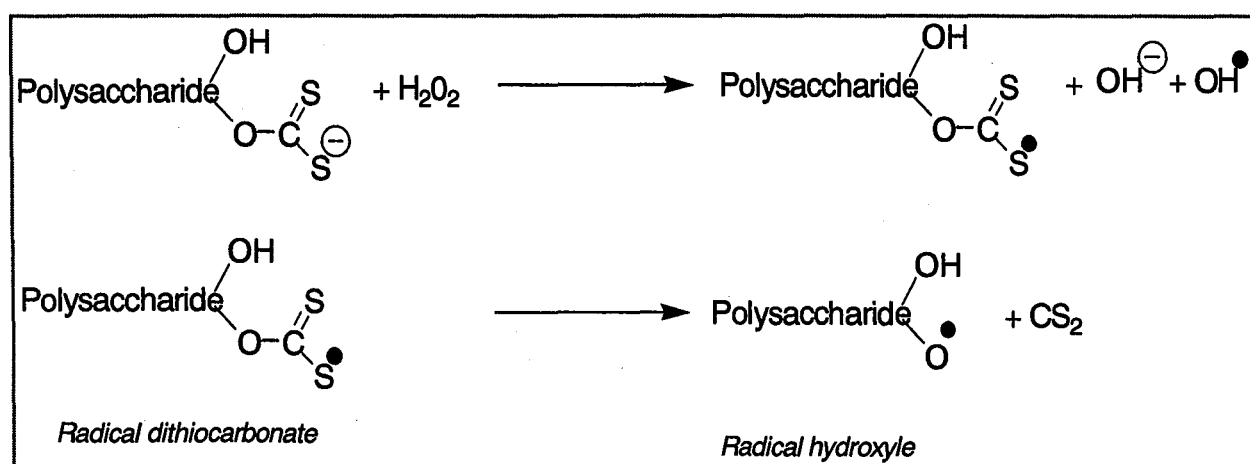


Schéma VII-37 : Amorçage radicalaire à partir de polysaccharides thiocarbonates par le peroxyde d'hydrogène.

La fixation d'un groupement peroxyde sur le dextrane a été réalisée en deux étapes : oxydation par l'iode, ce qui conduit à la formation de fonctions aldéhyde, puis réaction avec un hydroperoxyde (Schéma I-38) [146]. Les sites peroxyde alors fixés sur le polysaccharide permettent d'obtenir, par polymérisation en émulsion, des copolymères greffés de type polysaccharide-g-(polystyrène ou polyacrylate). Lors de la décomposition des groupements

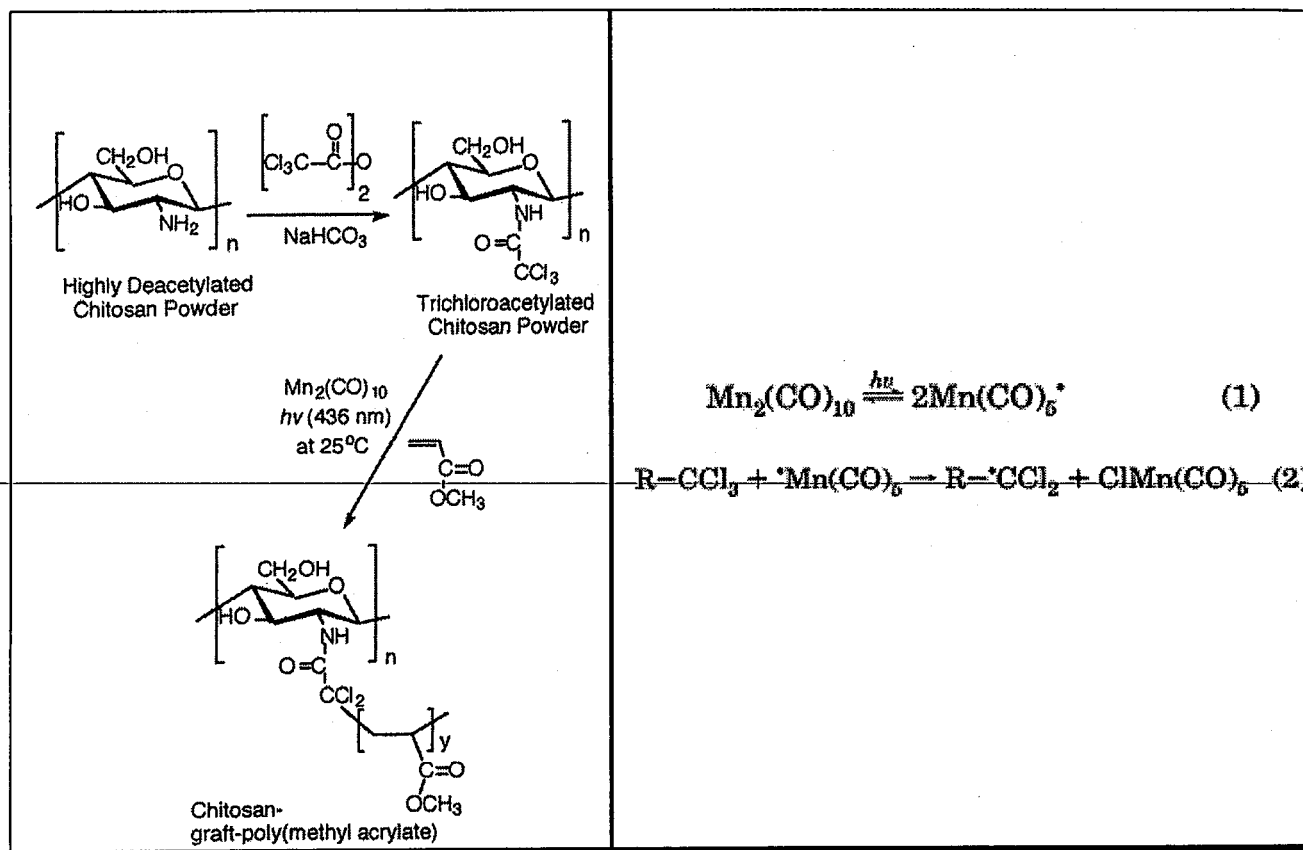


Schéma I-39 : Synthèse des copolymères Chitosane -g-PMMA.

Schéma I-40 : Mécanisme d'amorçage du couple redox dérivé halogéné/ $\text{Mn}_2(\text{Co})_{10}$.

péroxyde, des sites radicalaires sur la chaîne polysaccharide et des radicaux libres en solution sont formés simultanément, ce qui conduit à l'obtention, là encore, d'un copolymère greffé souillé d'homopolymère.

Afin d'éviter cet amorçage parasite et de ne favoriser que l'amorçage par les macroradicaux, des systèmes redox spécifiques ont été créés pour ne générer que des radicaux libres fixés sur la chaîne polysaccharide. Ces systèmes impliquent en général des métaux de transition tels que le vanadium (V), le manganèse (III), le fer (III) [127]. Cette méthode a déjà été appliquée au dextrane [13, 147] ou au chitosane [148]. Ainsi, dans le cas du chitosane (Schéma I-39), des groupes trichloroacétyle ou tribromoacétyle sont introduits dans un premier temps sur le polysaccharide. L'ajout de métaux carbonyles ($\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$ ou $\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}$) conduit, par photodissociation, à la formation de macroradicaux (le mécanisme est présenté dans le Schéma I-40), puis à l'obtention de copolymère chitosane-g-polymère. Les polymérisations du méthacrylate de méthyle, de l'acrylamide ou encore de l'acide acrylique ont alors été testées. Dans ce cas également, les auteurs sont confrontés au problème classique des réactions de transfert (20 à 30% de transfert dans le cas du chitosane-g-PMMA) [148] qui se produisent au cours des polymérisations radicalaires.

VII.2.1.4. Amorçage spécifique à partir de l'alcool primaire en position 6

Les exemples suivants sont présentés avec la chitine, mais s'appliquent également aux polysaccharides possédant une fonction alcool primaire en position 6, comme l'amylose ou la cellulose.

Les thiols sont connus pour être des agents de transfert qui permettent de « contrôler » la polymérisation radicalaire. L'introduction de groupes mercaptan sur les polysaccharides permet d'obtenir des glycopolymères greffés par transfert de radicaux. Dans le cas de la chitine, le groupe thiol est sélectivement introduit sur l'alcool primaire par une suite de réactions (tosylation, traitement par des thioacétates de potassium puis désacétylation) (Schéma I-41) [106]. Des copolymères présentant uniquement des greffons sur le C6 sont ensuite obtenus. Cependant, cette méthode génère encore la formation d'homopolymère. De plus, après analyse, il apparaît qu'une très faible partie des groupements thiols (4%) ont participé à la polymérisation.

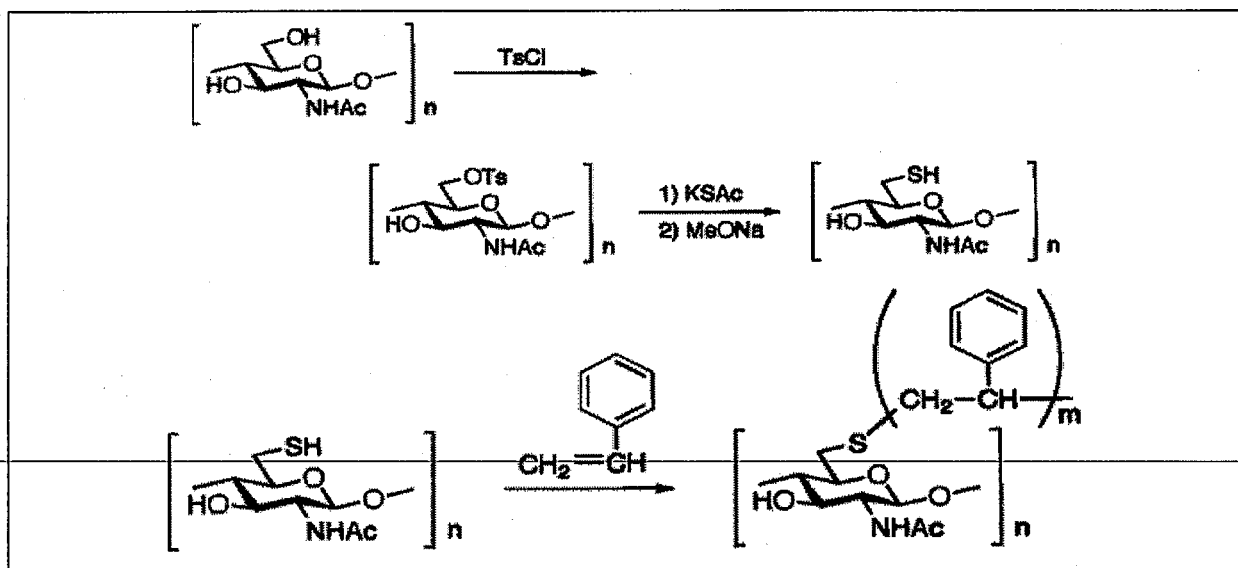


Schéma I-41: Obtention de chitine-g-polystyrène par transfert radicalaire sur des groupes mercaptan

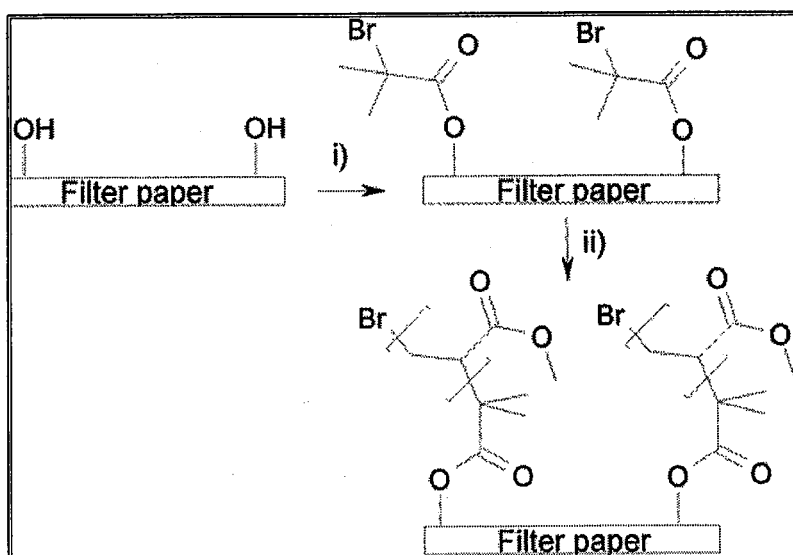


Schéma I-43 : Greffage de poly(acrylate de méthyle) sur les fibres en cellulose du papier.

- (i) 2-bromoisobutyryl bromide, triéthylamine, DMAP, CH_2Cl_2 ;
- (ii) acrylate de méthyle, éthyl 2-bromoisobutyrate, Cu(I)Br , tri(2-(diméthylamino)éthyl)amine, acétate d'éthyle.

Une autre façon de fixer des greffons de façon spécifique sur l'alcool primaire de la chitine est d'utiliser les chitines polysaccharides sélectivement iodé sur cette position [149] (Schéma I-42). Des radicaux libres peuvent alors être générés par voie photochimique. Dans ce cas, il se forme peu d'homopolymère. L'addition d'un acide de Lewis, comme SnCl_4 ou TiCl_4 , sur la chitine iodée permet de générer des carbocations sur la chaîne macromoléculaire et des greffons polystyrène sont obtenus par polymérisation cationique. Cette méthode permet un excellent greffage et la longueur des greffons est très élevée ($\overline{M}_n = 58\,000$ g/mol).

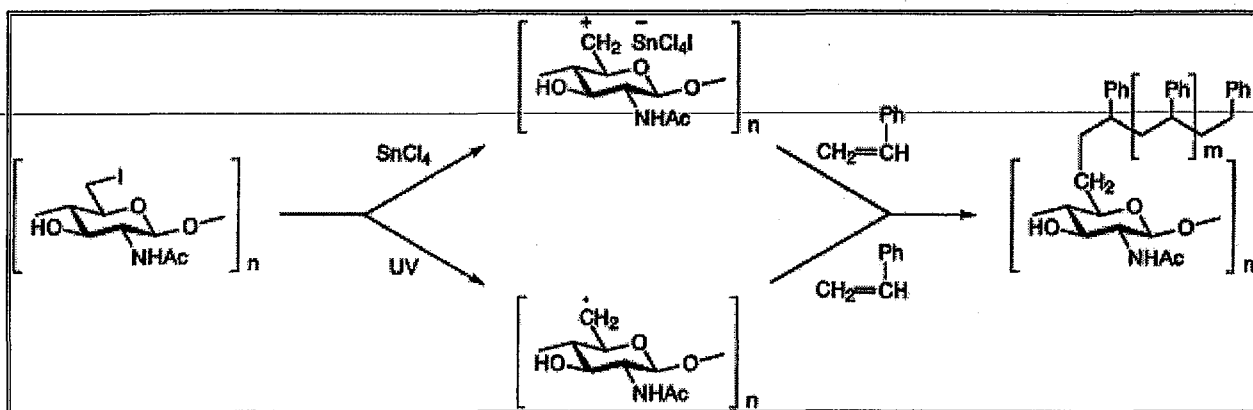


Schéma I-42 : Synthèse de chitine-g-polystyrène à partir de chitine iodée.

Afin d'éliminer le problème de la formation parasite d'homopolymère et de limiter les inconvénients de la polymérisation radicalaire « classique », l'emploi des méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée [127] a évidemment été suggéré. Cependant, ces méthodes récentes ont été très peu appliquées à la formation de glycopolymères. Très récemment, quelques travaux ont cependant été relatés et la technique des iniferters a ainsi été appliquée à un acide hyaluronique de forte masse molaire ($\overline{M}_n = 150$ à $500\,000$ g/mol) substitué par des sites dithiocarbamates. Des copolymères acide hyaluronique-g-polyacrylamide ont ensuite été obtenus ($\overline{M}_n$ de chaque greffon = 5000 à 9000 g/mol) [150]. A notre connaissance, la seule autre méthode de polymérisation radicalaire contrôlée actuellement examinée est la polymérisation par transfert d'atome (ATRP). Elle a été appliquée pour fixer des greffons polyacrylate sur une surface de cellulose. Les fonctions hydroxyle de la cellulose sont modifiées par des bromoesters dans une première étape. L'acrylate de méthyle est ensuite polymérisé en présence de bromure de cuivre et d'une amine tertiaire (Schéma I-43) [151]. Il faut signaler que les auteurs ont volontairement rajouté

un amorceur bromé afin de contrôler la longueur des greffons. Cette technique permet d'hydrophobiser la surface de la cellulose. Les greffons obtenus sont isomoléculaires, mais les conditions expérimentales n'étant pas optimisées, leur longueur n'est pas parfaitement contrôlée. Signalons que des copolymères en étoile ont été synthétisés par cette méthode en employant des cyclodextrines [152], [153].

VII.2.2. Polysaccharide-g-poly(éthylène imide)

Des copolymères cellulose-g-poly(éthylène imide) peuvent être préparés par polymérisation cationique de 2-oxazolines amorcée à partir de sites esters sulfoniques préalablement introduits sur le polysaccharide (Schéma I-44) [154, 155].

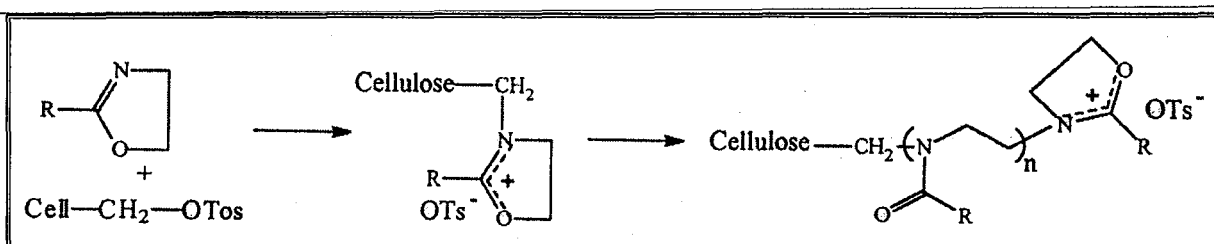


Schéma I-44 : Synthèse de copolymères cellulose-g-poly(éthylène imide) par polymérisation cationique par ouverture d'oxazolines

La formation notable d'homopolymère poly(éthylène imide) est observée durant la polymérisation. L'importance de ces impuretés peut être réduite en diminuant le degré de tosylation de la cellulose et la proportion de monomère utilisée [154]. L'explication donnée par les auteurs, pour expliquer la présence de ces impuretés est la présence de chlorure de tosylo emprisonné au sein de la structure. De plus, ils observent une dégradation partielle de la cellulose au cours de la synthèse.

Cette même méthode de synthèse a été appliquée à la cellulose partiellement acétylée [156] ou plus récemment à la chitine [106]. Dans tous les cas, on observe une formation non négligeable d'homopolymère. De fortes proportions massiques de poly(éthylène imine) ont pu être fixées sur le polysaccharide (82 % pour la cellulose et 62 % pour la chitine), mais une grande part des groupements tosylate initiaux ne participent pas à la polymérisation. Le remplacement des groupements tosylate par des groupements iodés réduit encore l'efficacité du greffage.

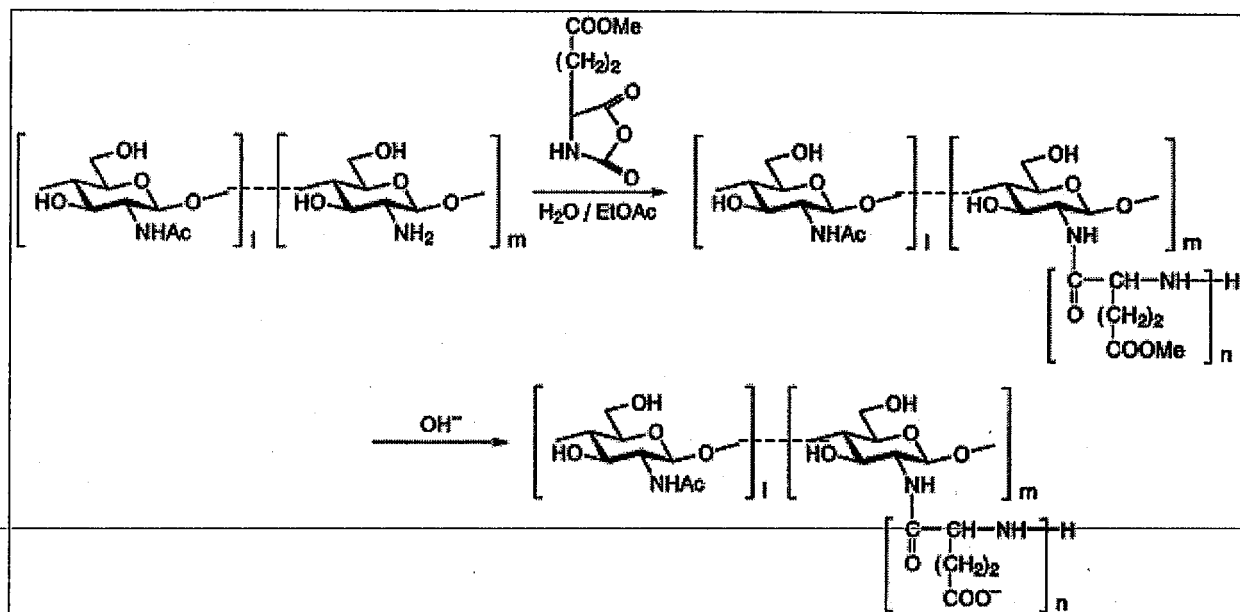


Schéma I-45 : Polymérisation par ouverture de cycle d'anhydrides de Leuchs à partir des fonctions amine d'une chitine partiellement désacétylée.

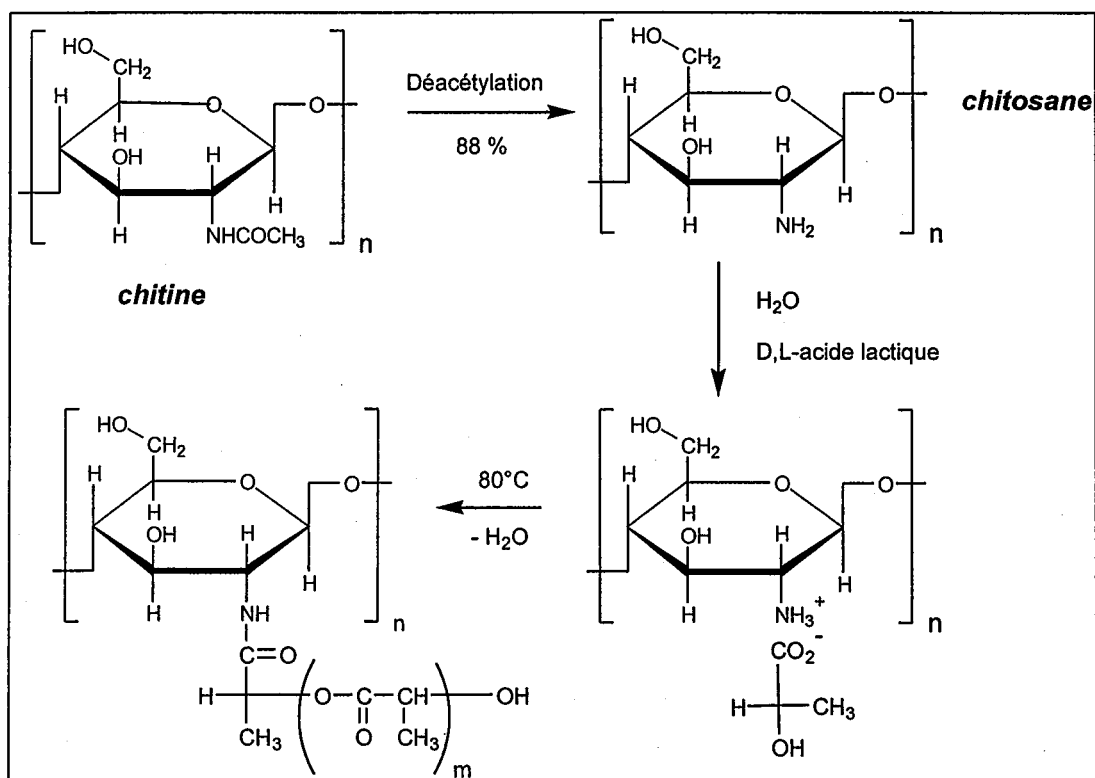


Schéma I-46 : Synthèse par polycondensation de chitosane-g-oligolactide

L'avantage de cette méthode est la grande réactivité de l'alcool primaire (de la cellulose ou de la chitine) vis à vis de la réaction de tosylation. Ceci permet de fixer ce groupement de façon régiosélective, et ainsi de fixer les greffons sur les alcools primaires de ces polysaccharides.

VII.2.3. Chitine-g-polypeptide

Des matériaux hybrides chitine/polypeptide peuvent être obtenus par polymérisation par ouverture de cycle d'anhydride de Leuchs (NCA) [106, 157]. La polymérisation de ces anhydrides peut être amorcée à partir des fonctions amine d'une chitine hydrosoluble (partiellement désacétylée) ou du chitosane. Des copolymères chitine-g-poly(γ -méthyl L-glutamate) ont pu être obtenus par polymérisation par ouverture de cycle d'anhydrides de Leuchs dans un mélange eau/acétate d'éthyle, à 0°C. Aucune impureté de type homopolymère n'a été rapportée (Schéma I-45). Les taux de conversion et d'efficacité de greffage sont élevés (75 à 90 % de greffage) et la longueur des greffons peut alors être modulée par le ratio NCA/polysaccharide. Cependant, leur longueur reste inférieure ou égale à 20 unités répétitives. La polymérisation est également possible dans le DMSO, mais l'efficacité du greffage est alors plus faible que précédemment, compte tenu de l'hétérogénéité du système. Après synthèse de ces copolymères, les groupements esters des greffons peuvent être hydrolysés en milieu basique, ce qui conduit à des dérivés chitine-g-(L-glutamate de sodium) hydrolubles (Schéma I-45).

VII.2.4. Polysaccharide-g-polyester :

Les études portant sur l'association polysaccharide/polyester via la méthode « grafting from » sont relativement récentes. Comme nous allons le voir, peu d'entre elles permettent d'obtenir le contrôle de la structure des copolymères obtenus.

VII.2.4.1. Polycondensation

Il est possible de générer des chaînes de polylactide (PLA) par polycondensation de l'acide lactique sur la fonction amine du chitosane [158] (Schéma I-46). Le chitosane est alors dissous dans une solution aqueuse d'acide lactique, ce qui provoque la formation de sels d'aminolactate. Leur déshydratation provoque simultanément la formation d'une liaison amide et la polycondensation de l'acide lactique, ce qui permet de générer les greffons PLA. L'absence de contrôle au cours de cette polycondensation conduit à la formation simultanée

de courts greffons de polylactide ($\overline{M}_n < 320$ g/mol) et d'oligolactates en solution. Selon les auteurs, les greffons PLA ne seraient fixés que sur les fonctions amine du chitosane, mais les degrés de substitution en greffons sont faibles ($< 18\%$ des fonctions amine). Par cette méthode, il est aussi possible d'obtenir des chitosane-g-(polyglycodide ou poly(lactide-co-glycolide)) [159]. Les produits obtenus forment alors en milieu aqueux des hydrogels par interactions hydrophobes. Ils sont sensibles au pH car les fonctions amine non substituées du chitosane peuvent se protonner en milieu acide, ce qui favorise l'extension du gel et sa rétention d'eau.

VII.2.4.2. Polymérisation enzymatique par ouverture de cycle

L' ϵ -caprolactone a été polymérisée à la surface d'un film d'hydroxyéthylcellulose [160] (Schéma I-47). La polymérisation a été effectuée en milieu hétérogène, faute d'un solvant organique permettant de solubiliser ce dérivé de la cellulose. La polymérisation enzymatique de l' ϵ -caprolactone est essentiellement amorcée à partir des groupements hydroxypropyle situés en surface du film. La faiblesse du degré de substitution ($< 0,35$) est attribuée au manque d'accessibilité des groupements alcool primaire à la surface du film. Il faut aussi signaler la formation d'homopolymère.

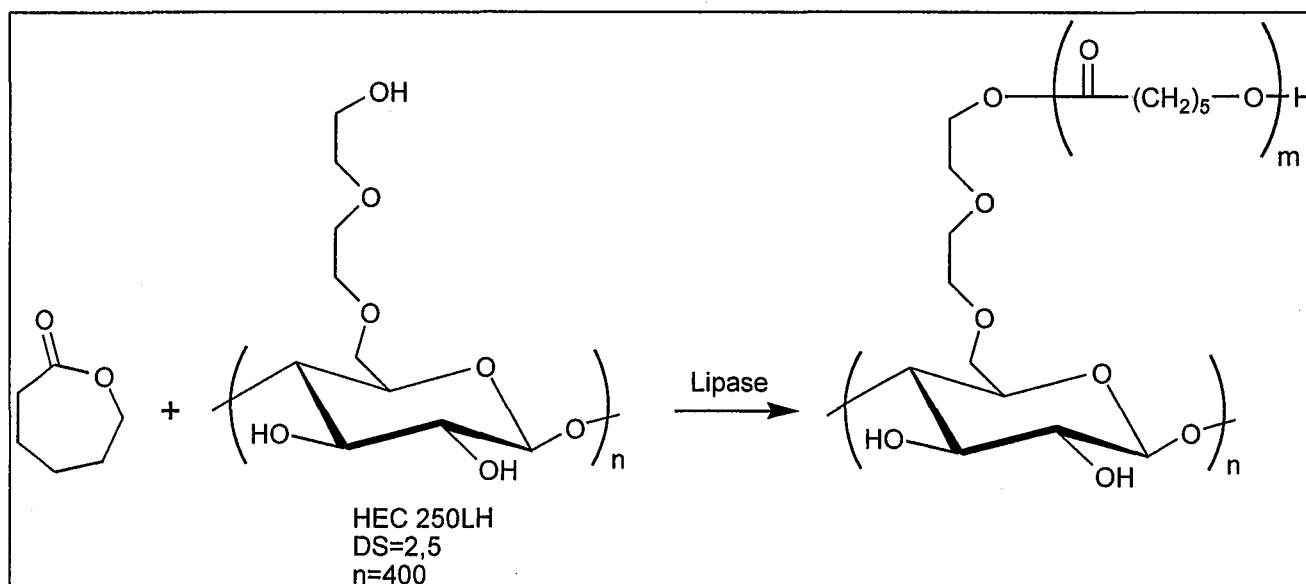
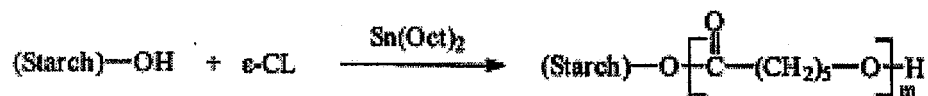


Schéma I-47 : Synthèse d'(hydroxyéthylcellulose)-g-PCL par polymérisation enzymatique

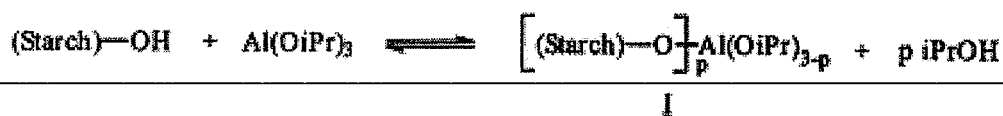
Equ. 1

Lewis acid catalyst : stannous octoate

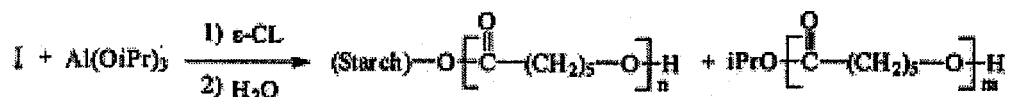
**Equ. 2**

Metal alkoxide (example with aluminum isopropoxide)

a) Exchange reactions between starch hydroxyls and $\text{Al}(\text{OiPr})_3$ catalytic amount

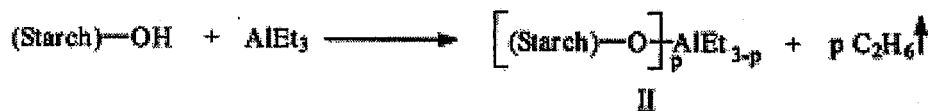


b) Ring-opening polymerization leading to polycaprolactone-grafted starch

**Equ. 3**

In situ generated metal alkoxide (from triethyl aluminum)

a) Initiator preparation



b) Ring-opening polymerization leading to polycaprolactone-grafted starch

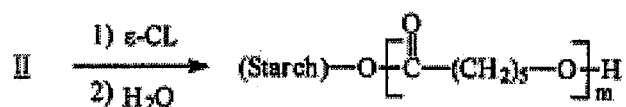


Schéma I-48 : Synthèse d'amidon-g-PCL à l'aide de divers co-amorceurs.

VII.2.4.3. Polymérisation par ouverture de cycles en milieu hétérogène.

Des copolymères amidon-g-poly(ϵ -caprolactone) (amidon-g-PCL) ont été préparés par polymérisation en masse, par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone (Schéma I-48) [161]. La polymérisation est alors amorcée en employant divers co-amorceurs, à partir des fonctions alcool de l'amidon de maïs (riche en amylopectine), situées à la surface des grains d'amidon. Pour favoriser l'amorçage des greffons de PCL, les grains d'amidon sont préalablement plastifiés par du glycérol ou mis en suspension dans le toluène. L'efficacité du greffage est faible lorsque l'octaoate d'étain (SnOct_2) est employé comme co-amorceur (on obtient 4 à 14% de PCL greffée sur l'amidon), et une forte proportion d'homopCL est formée. Ce PCL est produit soit par la présence d'eau résiduelle dans l'amidon, soit par des réactions de transestérification au cours de la synthèse. Le remplacement de l'octoate d'étain par des isopropylates d'aluminium limite encore plus les taux de la polymérisation et de greffage. En fait, le triéthyl aluminium semble être le co-amorceur le plus adapté. Lorsqu'il est employé, 90% de la PCL formée est fixée sur l'amidon. Il reste cependant une contamination non négligeable par l'homopolymère, et la structure des produits est mal définie.

D'autres auteurs ont choisi d'accroître la réactivité de l'amidon par plastification par l'eau [162]. La polymérisation de l' ϵ -caprolactone, co-amorcée par SnOct_2 , conduit là encore à la formation d'homopCL, mais les auteurs obtiennent néanmoins une bonne efficacité de greffage en choisissant des proportions amidon/CL/eau adéquates. Ces copolymères ont été testés pour comptabiliser les mélanges amidon/PCL [163]. Les copolymères obtenus ont ensuite fait l'objet d'une étude poussée par RMN 2D. Le degré de substitution en greffons reste faible (inférieur à 25 greffons pour 100 unités glucose) et leur longueur ne dépasse pas 5 unités monomères.

Différents dextrans fonctionnalisés soit par des sulfates de sodium (dextrane sulfate de sodium) ou des ammoniums tertiaires ((diéthylaminoéthyl)dextrane) ont également été greffés avec du poly(D,L-lactide), du polyglycolide et du poly(lactide-co-glycolide) [164, 165]. La polymérisation a lieu en masse, à haute température en présence de SnOct_2 et ces conditions ne permettent pas de contrôler la structure des produits. Des réactions de transestérification se produisent notamment, ce qui conduit à une polymolécularité des greffons et à la formation d'homopolylactide. Malgré les fortes proportions de polyester dans

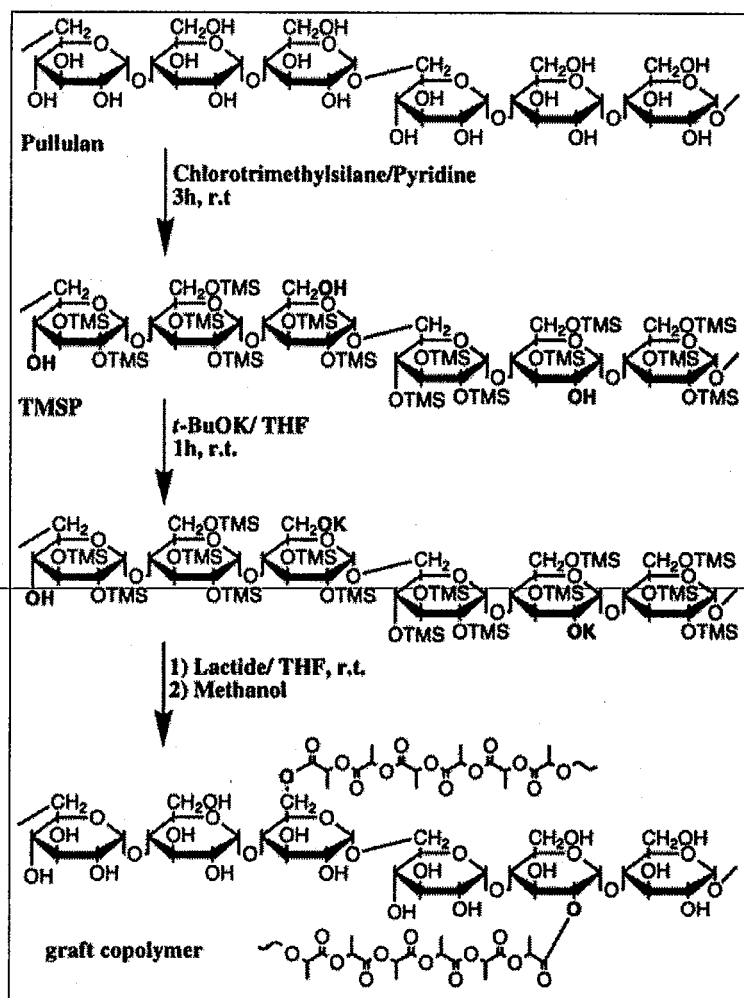


Schéma I-49 : Stratégie de synthèse des copolymères pullulane-g-poly(L-lactide).

les copolymères obtenus, il est probable que ceux-ci possèdent de multiples petits greffons de polyester. Il a été envisagé d'utiliser ces produits pour la vectorisation de principes actifs, et c'est pourquoi leur dégradation a été étudiée *in vivo*. Ces copolymères présentent une dégradation accélérée par rapport au polyester car la présence de groupements chargés sur la dorsale dextrane favorise l'adsorption d'eau, et par conséquent la dégradation des greffons polyesters. L'étude des mécanismes de dégradation a montré les éléments suivants : il se produit une coupure de la liaison reliant le squelette aux greffons dans le cas des dérivés sulfatés, alors qu'une dégradation aléatoire le long des greffons polyester est observée dans le cas des dérivés du (diéthylaminoéthyl)dextrane.

Des copolymères (cellulose partiellement acétylée)-g-PCL ont été synthétisés par amorçage de la polymérisation de l' ϵ -caprolactone à l'aide du dibutyldilaurate d'étain [166]. La polymérisation est effectuée en masse à 150°C et la structure des produits obtenus n'a pas été réellement élucidée.

VII.2.4.4. Polymérisation par ouverture de cycles en solution.

Dans les cas précédents, la polymérisation des esters cycliques a été effectuée en masse ou en milieu hétérogène. Ceci limite l'accessibilité de toutes les fonctions alcool du polysaccharide, et réduit alors l'efficacité du greffage. Seules deux équipes se sont attachées à réaliser une polymérisation en milieu homogène, condition indispensable au contrôle de l'architecture du copolymère final.

L'une des études a été réalisée dans le DMSO. Des copolymères pullulane-g-(PCL ou PLA) ont été préparés en employant SnOct₂. [167]. La polymérisation est effectuée durant 6 jours (à 60°C pour l' ϵ -CL ou à 75°C pour le lactide). Dans ces conditions, la cinétique de polymérisation est très lente et le taux de polymérisation n'atteint pas 40%. Cette polymérisation, non-contrôlée, conduit à la formation d'homopolymère en proportion non négligeable et à des copolymères très polymoléculaires. Les degrés de substitution en greffons sont plus ou moins faibles (de 8 à 75 greffons pour 100 unités glucoses) et la longueur de ces derniers est très courte (environ une unité lactate).

La seconde étude consiste tout d'abord à silyler un polysaccharide (pullulane [168] ou amylose [169]) dans une première étape, afin de le rendre organosoluble. Dans le cas du pullulane, la stratégie en trois étapes est présentée dans le Schéma I-49. La polymérisation du

L-lactide est ensuite réalisée dans le THF, en présence d'un alcoolate ionique. L'utilisation de ce co-amorceur anionique ne permet pas d'assurer le contrôle de la polymérisation, si bien qu'il se forme de l'homopolylactide [169]. Les copolymères formés comportent de très fortes proportions massiques de lactide ($>$ à 95% dans le cas du pullulane et $>$ à 60 % dans le cas de l'amylose). Le contrôle du taux de silylation devrait permettre d'assurer celui du nombre des greffons, mais la réaction de silylation n'a pas été optimisée. Les architectures comportent en moyenne 30 greffons pour 100 unités glucoses dans le cas du pullulane, et 12 à 21 greffons dans le cas de l'amylose. L'étape de déprotection des groupements silyle est réalisée en milieu alcool. La biodégradation des produits ainsi préparés a été étudiée dans le but d'utiliser ces copolymères pour des applications biomédicales [168], [169].

VII.3. Conclusions sur la méthode « grafting from »

La stratégie « grafting from » semble la méthode la plus adaptée pour contrôler l'architecture des glycopolymères à dorsale polysaccharide. Cette stratégie a été beaucoup moins étudiée que la méthode « grafting onto » car elle est plus difficile à mettre en œuvre :

① Cette technique demande un contrôle de la polymérisation du monomère voulu, si on désire à la fois contrôler la longueur et la polymolécularité des greffons.

② La vérification de la longueur des greffons est difficile. Elle se fait ultérieurement soit par clivage de la liaison reliant la dorsale aux greffons, soit par dégradation du polysaccharide. Cette opération peut facilement être réalisée dans le cas de greffons non dégradables (cas des polyvinyliques par exemple), mais dans le cas des greffons polyester, une dégradation en milieu acide de la dorsale conduit également à une dégradation des greffons. Par ailleurs, l'emploi d'une enzyme spécifique au polysaccharide n'entraîne que sa dégradation partielle. La présence des greffons latéraux rigidifie la chaîne et gêne alors l'approche du site actif de l'enzyme [19].

③ Lorsque les sites d'amorçage sont les fonctions alcool du polysaccharide, il est nécessaire d'effectuer une étape préalable de protection, si on désire contrôler et limiter leur nombre (et par là même le nombre des greffons)

④ Enfin, dans le cas des greffons dont la polymérisation est réalisée en milieu organique, la modification du polysaccharide est nécessaire pour le rendre organosoluble.

Une fois ces problèmes surmontés la stratégie « grafting from » apparaît comme la voie la plus prometteuse pour obtenir des glycopolymères greffés, d'architecture contrôlée.

VIII. CONCLUSIONS GENERALES SUR LES STRATEGIES DE SYNTHESSES DES GLYCOPOLYMERES GREFFES

Comme nous venons de le montrer, de nombreux glycopolymères ont déjà été synthétisés. Ils varient selon leur composition (nature du polysaccharide et du polymère associé), mais également selon leur architecture (copolymère à blocs ou greffés). Cependant, très peu de glycopolymères présentent une architecture bien définie. Dans le cas des polysaccharide-g-polyester par exemple, aucune des synthèses décrites n'a permis jusqu'à présent le contrôle de leur architecture.

Si différentes stratégies peuvent être mises en œuvre pour obtenir des copolymères greffés de façon contrôlée, il semble que la voie la plus prometteuse pour l'obtention de glycopolymères à dorsale polysaccharide soit la stratégie « grafting from ».

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Yalpani M.,
Synthesis of new carbohydrate polymers, polysaccharide analogues and conjugates.,
in *Polysaccharides. Modifications and structure : properties relations.*, M. Yalpani, Editor.
1988
2. Morin A.,
8. Screening of polysaccharides - producing microorganisms, factors, influencing the productions, and recovery of microbial polysaccharides.,
in *Polysaccharides*, S. Dumitriu, Editor.
1998, Marcel Dekker, Inc: N. Y., Basel, Hong-Kong. p. 275-296
3. Barker P. E., Bhamlbra K. S., Alsop R. M. and Gibbs R.,
Fractionation of dextran using ethanol.
Chem. Eng. Res. Des., 1987. **65**: p. 390-395
4. Kitaoka M. and Robyt J.,
Mechanism of the action of Leuconostoc mesenteroides B-512FMC dextranase: kinetics of the transfer of D-glucose to maltose and the effects of enzyme and substrate concentrations.
Carbohydr. Res., 1999. **320**: p. 183-191
5. Alsop R. M. and Vlachogiannis G. J.,
Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel permeation chromatography on TSK PW type columns.
J. Chromatogr., 1982. **246**: p. 227-240
6. Gekko K.,
Solution properties of dextran and its ionic derivatives.,
in *Solution properties of polysaccharides*, D.A. Brant, Editor.
1981, American Chemical Society, Washington, DC. p. Chap. 29
7. De Belder A.,
Medical application of dextran and its derivatives.,
in *26- Polysaccharides in medicinal applications*, S. Dumitriu, Editor.
1996, Marcel Dekker Inc.: New York, Basel, Hong-Kong. p. 505-523
8. Ioan C. E., Aberle T. and Burchard W.,
Structure properties of dextran. 2. Dilute solution.
Macromolecules, 2000. **33**: p. 5730-5739
9. Dellacherie E.,
17. Polysaccharides in oxygen-carrier blood substitutes.,
in *Polysaccharides in medicinal applications*, S. Dumitriu, Editor.
1996, Marcel Dekker, Inc: N. Y., Basel, Hong-Kong. p. 525-544
10. Thorén L.,
Dextran as plasma volume substitute.,
in *Blood substitutes and Plasma Expanders*, T.J. Greenwalt, Editor.
1978, A. R. Liss: New York. p. 265
11. Molteni L.,
Dextran as drug carriers.,
in *6-Drug carriers in biology and medicine*, G. Gregoradis, Editor.
1979, Academic Press: London, New York, San Francisco. p. 107-125

12. Rebizak R., Schaefer M. and Dellacherie E.,
Polymeric conjugates of Gd³⁺-diethylenetriaminepentaacetic acid and dextran. 1. Synthesis, Characterization and paramagnetic properties.
Bioconjugate Chem., 1997. 8: p. 605-610
13. Bamford C. H., Middleton I. P. and Al-Lamee Kadem G.,
Studies of the esterification of dextran : Routes to bioactive polymers and graft copolymers.
Polymer, 1986. 27: p. 1981-1985
14. Yamaoka T., Kurooda M., Tabata Y. and Ikada Y.,
Body distribution of dextran derivatives with electric charges after intravenous administration.
Int. J. Pharm., 1995. 113: p. 149-157
15. Elmalak O., Lovich M. A. and Edelman E.,
Correlation of transarterial transport of various dextrans with their physicochemical properties.
Biomaterials, 2000. 21: p. 2263-2272
16. Hennink W. E., Franssen O., Van Dijk-Wolthuis W. E. and Talsma H.,
Dextran hydrogels for the controlled release of proteins.
J. Control. Release, 1997. 48: p. 107-114
17. Franssen O., Van Ooijen R. D., De Boer D., Maes R. A. A., Herron J. N. and Hennink W. E.,
Enzymatic Degradation of methacryled Dextrans.
Macromolecules, 1997. 30: p. 7408-7413
18. Franssen O., Vandervennet L., Roders P. and Hennink W. E.,
Degradable dextran hydrogels: controlled release of a model protein from cylinders and microspheres.
J. Control. Release, 1999. 60: p. 211-221
19. Franssen O., Van Ooijen R. D., De Boer D., Maes R. A. A. and Hennink W. E.,
Enzymatic Degradation of Crosss-Linked Dextrans.
Macromolecules, 1999. 32: p. 2896-2902
20. De Jong S. J., De Smedt S. C., Demeester J., Wahls M. W. C., Van Nostrum C. F., Kettenes-Van Den Bosch J. J. and Hennink W. E.,
Novel self-assembled hydrogels by stereocomplex formation in aqueous solution of enantionmeric lactic acid oligomers grafted to dextran.
Macromolecules, 2000. 33: p. 3680-3686
21. De Jong S. J., De Smedt S. C., Demeester J., Van Nostrum C. F., Kettenes-Van Den Bosch J. J. and Hennink W. E.,
Biodegradable hydrogels based on stereocomplex formation between lactic acid oligomers grafted dextran.
J. Control. Release, 2001. 72: p. 47-56
22. Okada M.,
Molecular design and syntheses of glycopolymers.
Prog. Polym. Sci., 2001. 26: p. 67-104
23. Flitsch S.,
Chemical and enzymatic synthesis of glycopolymers.
Curr. Opinion in Structural Biology, 2000. 4: p. 619-625
24. Roy R.,
Syntheses and some applications of chemically defined multivalent glycoconjugates.
Curr. Opinion in Structural Biology, 1996. 6: p. 692-702
25. Cao S. and Roy R.,
Synthesis of glycopolymers containing GM₃-saccharide.
Tetrahedron Lett., 1996. 37: p. 3421-3424

26. Ejaz M., Ohno K., Tsujii Y. and Fukuda T.,
Controlled grafting of a well-defined glycopolymer on a solid surface by surface-initiated atom transfer radical polymerization.
Macromolecules, 2000. 33: p. 2870-2874
27. Baek M.-G. and Roy R.,
Design and synthesis of water-soluble glycopolymers bearing breast tumor marker and enhanced lipophilicity for solid-phase assays.
Biomacromolecules, 2000. 1: p. 768-770
28. Bahulekar R., Tokiwa T., Kano J., Mastsumura T., Kojima I. and Kodama M.,
Polyacrylamide containing sugar residues : synthesis, characterization and cell compatibility studies.
Carbohydr. Polym., 1998. 37: p. 71-78
29. Ouchi T. and Ohya Y.,
Synthetic design by modification of natural materials.,
in *Macromolecular design of polymer materials*, O. Vogl, Editor.
1997: New-york, Basel, Hong Kong. p. 351-364
30. Mähner C., Lechner M. D. and Nordmeier E.,
Synthesis and characterization of dextran and pullulan sulphate.
Carbohydr. Res., 2001. 331: p. 203-208
31. Krenzel L., Chaubet F., Champion J., Ermakov I., Litmanovich A., Palte N. and Jozefonvicz J.,
Anticoagulant activity of functionalized dextrans, structure analyses of carboxymethylated dextran and first Monte Carlo simulations.
Carbohydr. Polym., 1997. 33: p. 63-71
32. Rogovin Z. A., Virnik A. D., Khomaikov K. P., Lalatina O. P. and Penenzhik M. A.,
Study of the synthesis of dextran derivatives.
J. Macromol. Sci.-Chem., 1972. A6: p. 569-593
33. Zhang J., Pelton R. and Wagberg L.,
Aqueous biphasic formation by mixtures of dextran and hydrophobically modified dextran.
Colloid Polym. Sci., 1998. 276: p. 476-482
34. Wesslén K. B. and Wesslén B.,
Synthesis of amphiphilic amylose and starch derivatives.
Carbohydr. Polym., 2002. 47: p. 303-311
35. Cohen Stuart M. A., Fokkink R. G., Van Der Host P. M. and Lichtenbelt J. W. T.,
The adsorption of hydrophobically modified carboxymethylcellulose on a hydrophobic solid : effects of pH and ionic strength.
Colloid Polym. Sci., 1998. 276: p. 335-341
36. Miralles-Houzelle M.-C., Hubert P. and Dellacherie E.,
Hydrophobic alkyl chains-pectin conjugates. Comparative study of some physicochemical properties in relation to covalent coupling vs ionic association.
Langmuir, 2001. 17: p. 1384-1391
37. Fournier C., Léonard M., Le Coq-Leonard I. and Dellacherie E.,
Coating polystyrene particles by adsorption of hydrophobically modified dextran.
Langmuir, 1995. 11: p. 2344-2347
38. Reinhart T. and Bauer K. H.,
Untersuchungen zum hämolyse- und solubilisationsverhalten einiger nichtionischer polymerer tensidklassen.
Pharmazie, 1995. 50: p. 403-407

39. Bauer K. H., Reinhart T. and Stenz R.,
Dextran fatty acid esters as polymeric surfactants with low hemolytic activity.
Macromol. Symp., 1997. **120**: p. 39-45
40. Zhou Q., Zhang L., Okamura H., Minoda M. and Takeali M.,
Synthesis and properties of O-2-[2-(2-methoxy)ethoxy]acetyl Cellulose.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 2001. **39**: p. 376-382
41. Pitha J., Kociolek K. and Caron M. G.,
Detergents linked to polysaccharides : preparation and effects on membranes and cells.
Eur. J. Biochem., 1979. **94**: p. 11-18
42. Rosén O., Sjöström J. and Piculell L.,
Responsive polymer gels based on hydrophobically modified ethers and their interactions with ionic surfactants.
Langmuir, 1998. **14**: p. 5795-5801
43. Thuresson K. and Lindmann B.,
Effect of hydrophobic modification of a nonionic cellulose derivative on the interaction with surfactants . Phase-behavior-and-association.
J. Phys. Chem. B, 1997. **101**: p. 6460-6468
44. Akiyoshi K., Shigeru D., Moriguchi N., Shigehiko Y. and Sunamoto J.,
Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water : Formation and characteristics of nanoparticles.
Macromolecules, 1993. **26**: p. 3062-3068
45. Fukui H., Akiyoshi K. and Sunamoto J.,
O/W-Emulsion stabilised by hydrophobized polysaccharide.
Bull. Chim. Soc. Jpn., 1996. **69**: p. 3659-3665
46. Akiyoshi K., Kobayashi S., Schichibe S., Mix D., Baudys M., Kim S. W. and Sunamoto J.,
Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs : Complexation and stabilization of insulin.
J. Control. Release, 1998. **54**: p. 313-320
47. Akiyoshi K., Kang E.-C., Kurumada S., Sunamoto J., Principi T. and Winnik F. M.,
Controlled association of amphiphilic polymers in water : Thermosensitive nanoparticles formed by self-assembly of hydrophobically modified pullulans and poly(N-isopropylacrylamides).
Macromolecules, 2000. **33**: p. 3244-3249
48. Nichifor M. C., A.,
Bile acids covalently bound to polysaccharides. I. Esters of bile acids with dextran.
Eur. Polym. J., 1999. **35**: p. 2125-2129
49. Nichifor M., Lopes A., Carpov A. and Melo E.,
Aggregation in water of dextran hydrophobically modified with bile acids.
Macromolecules, 1999. **32**: p. 7078-7085
50. Marchant R. E., Ruegsegger M. and Qiu Y.,
23. Polysaccharide surfactants : Structure, synthesis, and surface-active properties.,
in *Polysaccharides*, S. Dumitriu, Editor.
1998, Marcel Dekker, Inc: N. Y., Basel, Hong-Kong. p. 851-886
51. Rouzes C., Durand A., Léonard M. and Dellacherie E.,
Surface activity and emulsification properties of hydrophobically modified dextrans.
J. Colloid Interf. Sci., 2002. **253**: p. 217-223

52. Rouzes C., Gref R., Léonard M., Delgado A. D. and Dellacherie E.,
Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique.
J. Biomed. Mater. Res., 2000. **50**: p. 557-565
 53. Delgado A. D., Léonard M. and Dellacherie E.,
Surface modification of polystyrene nanoparticles using dextrans and dextran-POE copolymers : polymer adsorption and colloidal characterization.
J. Biomat. Sci. Polym. Ed., 2000. **11**: p. 139-1410
 54. Hunziker E. B.,
Articular cartilage repair : basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects.
Osteosis and cartilage, 2002. **10**: p. 432-463
 55. Pelletier S., Hubert P., Payan E., Marchal P., Choplin L. and Dellacherie E.,
Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair : rheological properties.
J. Biomed. Mater. Res., 2001. **54**: p. 102-108
-
56. Rastello-De Boisseson M.,
Microparticules d'alginate associatifs: élaboration, caractérisation et encapsulation de molécules actives. 2002, **doctorat de l' INPL**: Nancy
 57. Kim S., Stannett V. T. and Gilbert R. D.,
A new class of biodegradable polymers.
J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed., 1973. **11**: p. 731-735
 58. Stannett V. T., Lynn M. M. and Gilbert R. D.,
Synthesis and biodegradability of amylose block copolymers.
J. Polym. Sci., Chem Ed., 1980. **18**: p. 1967-1977
 59. Hashimoto K., Imanishi S.-I., Okada M. and Sumitomo H.,
Chemical modification of the reducing chain end in dextrans and trimethylsilylation of its hydroxyl groups.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1991. **29**: p. 1271-1279
 60. Hashimoto K., Sugata T., Imanishi S.-I. and Okada M.,
Synthesis of saccharide-conjugated polyamides by quasi-living anionic polymerization of bicyclic lactam.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1994. **32**: p. 1619-1625
 61. Fieger C. and Cantow H. J.,
Cellulose containing block copolymers. 1. Synthesis of trimethylcellulose-[b-poly(oxytetramethylene) star block copolymers.
Polym. Bull., 1980. **3**: p. 407-413
 62. Haddleton D. M. and Ohno K.,
Well-Defined oligosaccharide-terminated polymers from living radical polymerization.
Biomacromolecules, 2000. **1**: p. 152-156
 63. Zhang T. and Marchant R. E.,
Novel polysaccharide surfactants : the effect of hydrophobic and hydrophilic chain length on the surface active properties.
J. Colloid Interf. Sci., 1996. **177**: p. 419-426
 64. Zhang T. and Marchant R. E.,
Novel polysaccharide surfactants : Synthesis of model compounds and dextran-based surfactants.
Macromolecules, 1994. **27**: p. 7302-7308

65. Loos K. and Stadler R.,
Synthesis of amylose-block-polystyrene. Rod-coil block copolymers.
Macromolecules, 1997. **30**: p. 7641-7643
66. Loos K. and Müller A. H. E.,
New routes to the synthesis of amylose-block-polystyrene. Rod-coil block copolymers.
Biomacromolecules, 2002. **30**: p. 368-373
67. Pfannemüller B., Schmidt M., Ziegast G. and Matsuo K.,
Properties of once-broken wormlike chain based on amylose tricarbanilate. Light scattering, viscosity, and dielectric relaxation.
Macromolecules, 1984. **17**: p. 710-716
68. Chang S. J., Lee C. H., Hsu C. Y. and Wang Y. J.,
Biocompatible microcapsules with enhanced mechanical strength.
J. Biomed. Mater. Res., 2002. **59**: p. 118-126
69. Fontanille M. and Gnagnou Y.,
Synthèse macromoléculaire,
in *Chimie-et-physico-chimie-des-polymères.*
2002, Dunod: Paris. p. 348-371
70. Gnagnou Y.,
Design and synthesis of new model polymers.
Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem. Phys., 1996. **C36**: p. 77
71. Rempp P. F. and Lutz P. J.,
Synthesis of graft copolymers.,
in *Comprehensive Polymer Science. The synthesis, characterization, reactions & applications of polymers.,* P. Sigwalt, Editor.
1989, Pergamon Press: Oxford, New York, Beijing, Frankfurt, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto. p. 403-421
72. Kobayashi S., Sakamoto J. and Kimura S.,
In vitro synthesis of cellulose and related polysaccharides.
Prog. Polym. Sci., 2001. **26**: p. 1525-1560
73. Yoshida T.,
Synthesis of polysaccharides having specific biological activities.
Prog. Polym. Sci., 2001. **26**: p. 379-441
74. Hatanaka K.,
Chemical synthesis of polysaccharides,
in *26- Polysaccharides in medicinal applications,* S. Dumitriu, Editor.
1996, Marcel Dekker Inc.: New York, Basel, Hong-Kong. p. 3-20
75. Kasuya M. C. and Hatanaka K.,
Chemical synthesis of comb-shaped polysaccharide derivatives via cationic ring-opening polymerization and copolymerization of an anhydrosaccharide monomer.
Macromolecules, 1999. **32**: p. 2131-2136
76. Kobayashi K. and Kamiya S.,
Amylose-carrying styrene macromonomer and its homo- and copolymers : synthesis via enzyme - catalyzed polymerization and complex formation with iodine.
Macromolecules, 1996. **29**: p. 8670-8676
77. Nishimura S.-I., Matsuoka K., Furuike T., Ishii S., Kurita K. and Nishimura K. M.,
Synthetic glycoconjugates. 2. n-Pentenyl glycosides as convenient mediators for the syntheses of new types of glycoprotein models.
Macromolecules, 1991. **24**: p. 4236-4241

78. Revilla J., Delair T., Pichot C. and Gallot B.,
Preparation and properties of comb-like polymeres obtained by radical homo- and copolymerization of liposaccharidic monomer with styrene.
Polymer, 1996. **37**: p. 687-698
79. Kobayashi K. and Kamiya S.,
Solubilization of oligosaccharides into chloroform by their incorporation into styrene as pendant groups.
Macromol. Symp., 1997. **120**: p. 139-146
80. Kobayashi M., Sumitomo H. and Itoigawa T.,
Maltopentaose- and maltoheptaose-carrying styrene macromonomer and their homopolymers.
Macromolecules, 1987. **20**: p. 906-908
81. Ohno K., Wong B. and Haddleton D. M.,
Synthesis of well-defined cyclodextrin-core star polymers.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 2001. **39**: p. 2206-2214
82. Qiu Y., Zhang T., Ruegsegger M. and Marchant R. E.,
Novel nonionic oligosaccharide surfactant polymers derived from poly(vinylamine) with pendant dextran and hexanoyl groups.
Macromolecules, 1998. **31**: p. 165-171
83. Maruyama A., Ishihara T., Kim J.-S., Kim S. W. and Akaike T.,
Nanoparticle DNA carrier with poly(L-lysine) grafted polysaccharide copolymer and poly(D,L-lactic acid).
Bioconjugate Chem., 1997. **8**: p. 735-742
84. Asayama S., Nogawa M., Takei Y., Akaike T. and Maruyama A.,
Synthesis of novel polyampholyte comb-type copolymers consisting of poly(L-lysine) backbone and hyaluraunic acid side chains for DNA carrier.
Bioconjugate Chem., 1998. **9**: p. 476-481
85. Maruyama A., Watanabe H., Ferdous A., Ishihara T. and Akaike T.,
Characterization of interpolyelectrolyte complexes between double stranded DNA and poly(L-lysine) comb-type copolymer having hydrophilic side chains.
Bioconjugate Chem., 1998. **9**: p. 292-299
86. Ferdous A., Akaike T. and Maruyama A.,
Inhibition of sequence-specific protein-DNA inter action and restriction endonulease cleavage via triplex stabilization by poly(L-lysine)-graft-dextran copolymer.
Biomacromolecules, 2000. **1**: p. 186-193
87. Maruyama A., Ishihara T., Kim J.-S., Kim S. W. and Akaike T.,
Design of multi-layered nanoparticle as DNA carrier.
Colloid and Surface . A. Physicochem. Eng. Aspect, 1999. **153**: p. 439-443
88. Janes K. A., Calvo P. and Alonso M. J.,
Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules.
Adv. Drug Deliv. Rev., 2001. **47**: p. 83-87
89. Park Y. K., Park Y. H., Shin B. A., Choi E. S., Park Y. R., Akaide T. and Cho C. S.,
Galactosylated chitosan-graft-dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier.
J. Control. Rel., 2000. **69**: p. 97-108
90. Mansson P. and Westfelt L.,
Grafting of monodisperse low-molecular-weight polystyrène onto cellulose acetate.
J. Polym. Sci. : Polym. Chem. Ed., 1981. **19**: p. 1509-1515

91. De Jong S. J., Van Dijk-Wolhuis W. N. E., Kettenes-Van Den Bosch J. J., Schuyl P. J. W. and Hennink W. E.,
Monodisperse enantiomeric lactic acid oligomers : preparation, characterization and stereocomplex formation.
Macromolecules, 1998. **31**: p. 6397-6402
92. De Jong S. J., Van Eerdenbrugh B., Van Nostrum C. F., Kettenes-Van Den Bosch J. J. and Hennink W. E.,
Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation between lactic acid oligomers : degradation and protein release behavior.
J. Control. Release, 2001. **71**: p. 261-275
93. Hennink W. E. and Van Nostrum C. F.,
Novel crosslinking methods to design hydrogels.
Adv. Drug Deliv. Rev., 2002. **54**: p. 13-36
94. Van Dijk-Wolhuis W. N. E., Tsang S. K. Y., Kettenes-Van Den Bosch J. J. and Hennink W. E.,
A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups : hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer.
Polymer, 1997. **38**: p. 6235-6242
95. Cadee J. A., De Kerf M., De Groot C. J., Den Otter W. and Hennink W. E.,
Synthesis, characterization of 2-(methacryloyloxy)ethyl-(di-) L-lactate and their application in dextran-based hydrogels.
Polymer, 1999. **40**: p. 6877-6881
96. De Groot C. J., Van Luyn M. J. A., Van Dijk-Wolhuis W. N. E., Cadee J. A., Plantinga J. A., Den Otter W. and Hennink W. E.,
In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts.
Biomaterials, 2001. **22**: p. 1197-1203
97. Van Dijk-Wolhuis W. N. E., Hoogeboom J. A. M., Van Steengergen M. J., Tsang S. K. Y. and Hennink W. E.,
Degradation and release behavior of dextran-based hydrogels.
Macromolecules, 1997. **30**: p. 4639-4645
98. Cadee J. A., De Groot C. J., Jiskoot W., Den Otter W. and Hennink W. E.,
Release of recombinant human interleukin-2 from dextran-based hydrogels.
J. Control. Release, 2002. **78**: p. 1-13
99. Zhang Y., Won C.-Y. and Chu C.-C.,
Synthesis and characterization of biodegradable network hydrogels having both hydrophobic and hydrophilic components with controlled swelling behavior.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1999. **37**: p. 4554-4569
100. Zhang Y. and Chu C.-C.,
Biodegradable dextran-polyactide hydrogel network and its controlled release of albumin.
J. Biomed. Mater. Res., 2001. **54**: p. 1-11
101. Gevaert M. R., Massia, S.,
Polylactide/ dextran graft co-polymers for biomaterials and tissue engineering applications.
Patent N° WO 0179315, 2001
US, Gevaert, M.R., Massia, S., Univ. Clemson (US)
102. Huh K. M., Hashi J., Ooya T. and Yui N.,
Synthesis and characterization of dextran grafted with poly(N-isopropylamide-co-N,N-dimethylacrylamide).
Macromol. Chem. Phys., 2000. **201**: p. 613-619

103. Bokias G., Mylonas Y., Staikos G., Bumbu G. G. and Vasile C.,
Synthesis and aqueous solution properties of novel thermoresponsive graft copolymers based on a carboxymethylcellulose backbone.
Macromolecules, 2001. **34**: p. 4958-4964
104. Durand A. and Hourdet D.,
Synthesis and thermoassociative properties in aqueous solution of graft copolymers containing poly(N-isoacrylamide) side chains.
Polymer, 1999. **40**: p. 4941-4951
105. Ouchi T., Nishizawa H. and Ohya Y.,
Aggregation phenomenon of PEG-grafted chitosan in aqueous solution.
Polymer, 1998. **39**: p. 5171-5175
106. Kurita K.,
Controlled functionalization of the polysaccharide chitin.
Prog. Polym. Sci., 2001. **26**: p. 1921-1971
107. Nishimura S.-I., Kohgo O. and Kurita K.,
Chemospecific manipulations of a rigid polysaccharide : syntheses of novel chitosan derivatives with excellent solubility in common organic solvents by regioselective modifications.
Macromolecules, 1991. **24**: p. 4745-4748
108. Yalpani M., Marchessault R. H., Mori F. G. and Monasterios C. J.,
Syntheses of poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) conjugates : PHA-carbohydrate and PHA-Synthetic polymer conjugate.
Macromolecules, 1991. **24**: p. 6046-6049
109. Saito H., Wu X., Harris J. M. and Hoffman A. S.,
Graft copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and chitosan.
Macromol. Rapid. Commun., 1997. **18**: p. 547
110. Marchant R. E., Yuan S. and Szakalas-Gratzl G.,
Interactions of plasma proteins with novel polysaccharide surfactants physisorbed to polyethylene.
J. Biomater. Sci., Polym. Ed., 1994. **6**: p. 549-564
111. Hoste K., Brunel D., De Marre A., De Schrijver F. and Schacht E.,
Synthesis and characterization of poly(oxyethylene) modified dextrans.
Makromol. Rapid. Commun., 1994. **15**: p. 697-704
112. Coombes A. G. A., Tasker S., Linblad M., Holmgren J., Hoste K., Toncheva V., Schacht E., Davies M. C., Illum L. and Davis S. S.,
Biodegradable polymeric microparticles for drug delivery and vaccine formulation: the surface attachment of hydrophilic species using the concept of the poly(ethylene glycol) anchoring segments.
Biomaterials, 1997. **18**: p. 1153-1161
113. Delgado A. D., Léonard M. and Dellacherie E.,
Surface properties of polystyrene nanoparticles coated with dextrans and dextran-POE copolymers. Effect of polymer architecture on protein adsorption.
Langmuir, 2001. **2001**: p. 4386-4391
114. Huh K. M., Ooya T., Lee W. K., Sasaki S., Kwon I. C., Jeong S. Y. and Yui N.,
Supramolecular-structured hydrogels showing a reversible phase transition by inclusion complexation between poly(ethylene glycol) grafted dextran and α -cyclodextrin.
Macromolecules, 2001. **34**: p. 8657-8662
115. Vandoorne F., Vercauteren R., Permentire D. and Schacht E.,
Re-investigation of the 'nitrophenyl chloroformate activation of dextran. Evidence for the formation of different types of carbonate moieties.
Makromol. Chem., 1985. **186**: p. 2455-2460

116. Delgado A.,
Latex de polystyrène à propriétés de surface contrôlées par adsorption de copolymères à base de dextrane et de poly(oxyéthylène). 2000, doctorat de l' INPL: Nancy
117. Dragunski D. C. and Pawlicka A.,
Preparation and characterization of starch grafted with toluene poly(propylene oxide) diisocyanate. Carbohyd. Res., 2001. 4: p. 77-81
118. Mani R. T., J.; Bhattacharya, M.,
Synthesis and characterization of starch-graft-polycaprolactone as compatibilizer for starch/polycaprolactone blends. Macromol. Rapid. Commun., 1998. 19: p. 283-286
119. Duval J. M., Delestre C., Carré M. C., Hubert P. and Dellacherie E.,
Synthesis and characterization of some covalent dextran-polyoxyethyleneglycol derivatives. Carbohyd. Polym., 1991. 15: p. 233-242
120. Hashimoto K., Yasuda J. and Kobayashi M.,
*Proton transfer- controlled anionic polymerization of substituted β -lactams with potassium *t*-butoxide and subsequent coupling reaction with saccharides*. J. Polym. Sci., A: Polym. Chem., 1998. 29: p. 1271-1279
121. Kweon D. K.,
Preparation and characterization of chitosan-g-PDMS copolymer. Polym. Bull., 1998. 41: p. 645-651
122. Biermann C. J., Chung J. B. and Narayan R.,
Grafting of polystyrene onto cellulose acetate by nucleophilic displacement of mesylate groups using the polystyrylcarboxylate anion. Macromolecules, 1987. 20: p. 954-957
123. Aoi K., Takasu A. and Okada M.,
New chitin-based polymers hybrids. 2 Improved miscibility of chitin derivatives having monodisperse poly(2-methyl-2-oxazoline) side chains with poly(vinyl chloride) and poly(vinyl alcohol). Macromolecules, 1997. 30: p. 6134-6138
124. Aoi K., Takasu A. and Okada M.,
Characterization of chitin-based polymers hybrids by temperature programmed analytical pyrolysis techniques. 1. Chitin -g-poly(2-methyl-2-oxazoline) / poly(vinyl chloride) blends. Macromolecules, 1997. 30: p. 4030-4037
125. Aoi K. and Okada M.,
Polymerization of oxazolines. Prog. Polym. Sci., 1996. 21: p. 151-208
126. Von Braunmühl V., Jonas G. and Stadler R.,
Enzymatic grafting of amylose from poly(dimethylsiloxanes). Macromolecules, 1995. 28: p. 17-24
127. Jenkins D. W. and Hudson S. M.,
Review of vinyl graft copolymerization featuring recent advances toward controlled radical-based reactions and illustrated with chitin/ chitosan trunk polymers. Chem. Rev., 2001. 101: p. 3245-3272
128. Kim S. H., Won C. Y. and Chu C. C.,
Synthesis and characterization of dextran-based hydrogel prepared by photocrosslinking. Carbohydrate Polymers, 1999. 40: p. 183-190

129. Xie W., Xu P., Liu Q. and Xue J.,
Graft-copolymerization of methylacrylic acid onto hydroxypropyl chitosan.
Polym. Bull., 2002. 49: p. 47-54
130. Yang S., Tirmizi S. A., Burns A., Barney A. A. and Risen W. M.,
Chitiline materials : soluble chitosan-polyaniline copolymers and their conductive doped forms.
Synth. Met., 1989. 32: p. 191-200
131. Doba T., Rodehed C. and Ranby B.,
Mechanisms of graft copolymerization onto polysaccharides initiated by metal ion oxydation reactions of model compounds for starch and cellulose.
Macromolecules, 1984. 17: p. 2512-2519
132. Wang L.-Q., Tu K., Li Y., Zhang J., Jiang L. and Zhang Z.,
Synthesis and characterization of temperature responsive graft copolymers of dextran with poly(N-isopropylacrylamide).
React. Funct. Polym., 2002. 53: p. 19-27
133. Rath S. K. and Singh R. P.,
Grafted-amylopectin : applications in flocculation.
Colloid and Surface . A. Physicochem. Eng. Aspect, 1998. 139: p. 129-135
134. Nayak B. R. and Singh R. P.,
Synthesis and characterization of grafted hydropropyl guar gum by ceric ion induced initiation.
Eur. Polym. J., 2001. 37: p. 1655-1666
135. Tripathy T., Pandey S. R., Karmakar N. C., Bhagat R. P. and Singh R. P.,
Novel flocculating agent based on sodium alginate and acrylamide.
Eur. Polym. J., 1999. 35: p. 2057-2072
136. Zhang L. M., Tan Y. B. and Li Z. M.,
New water-soluble ampholytic polysaccharides for oilfield drilling treatment : a preliminary study.
Carbohydr. Polym., 2001. 44: p. 255-260
137. Zhang L. M.,
Cellulosic associative thickeners.
Carbohydr. Polym., 2001. 45: p. 1-10
138. Otey F. H., Westhoff R. P. and Russel C. R.,
Starch graft copolymers-degradable fillers for poly(vinylchloride) plastics.
Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 1976. 15: p. 139-142
139. Reyes Z., Clark C. F., Dreier F., Philips R. C., Russel C. R. and Rist C. E.,
Continuous production of acrylonitrile-starch graft copolymers by ceric ion catalysis.
Ind. Eng. Chem. Process Des. Develop., 1973. 12: p. 62-67
140. Gupta K. C. and Sahoo S.,
Graft copolymerization of acrylonitrile and ethylmethacrylate comonomers on cellulose using ceric ions.
Biomacromolecules, 2001. 2: p. 239-247
141. Hoover M. F., Sinkovitz G. D. M. and Schaper R. J.,
Anionic dextran graft copolymers.
Patent N° 3 826 767, 1974
US, Calgon corporation
142. Passirani C., Baratt G., Devisaguet J. P. and Labarre D.,
Interaction of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system.
Life Sci., 1998. 62: p. 775-785

143. Passirani C., Ferrarini L., Baratt G., Devisaguet J. P. and Labarre D.,
Preparation and characterization of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently-linked to poly(methyl methacrylate).
J. Biomat. Sci. Polym. Ed., 1999. **10**: p. 47-62
144. Passirani C., Baratt G., Devisaguet J. P. and Labarre D.,
Long-circulating nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate).
Pharmaceut. Res., 1998. **15**: p. 1046-1050
145. Brockway C. E., Estes R. R. and Smith D. R.,
Amylaceous graft copolymers and process for preparing same.
Patent N° 3095391, 1963
US, Staley, A. E.
146. Voronov S., Donchak V., Harhai H., Tokarev V. and Fernandez C.,
Peroxide macro-initiators for improving biodegradability of polymers.
Polym. Int., 2001. **50**: p. 688-692
147. Bamford C., Middleton I., Al-Lamee K., Parprotny J. and Satake Y.,
Routes to bioactive hydrophilic polymers.
Polym. J., 1987. **19**: p. 475-483
148. Jenkins D. W. and Hudson S. M.,
Heterogenous graft copolymerization of chitosan powder with ethylacrylate using trichloroacetyl-manganese carbonyl co-initiation.
Macromolecules, 2002. **35**: p. 3413-3419
149. Kurita K., Inoue S., Yamamura K., Yohsino H., Ishii S. and Nishimura S. I.,
Cationic and radical graft copolymerization of styrene onto Iodochitin.
Macromolecules, 1992. **25**: p. 3791-3794
150. Ohya Y., Nakayama Y. and Matsuda T.,
Thermoresponsive artificial extracellular matrix for tissue engineering : hyaluronic acid bioconjugated with poly(N-acrylamide) grafts.
Biomacromolecules, 2001. **2**: p. 856-863
151. Calmark A. and Malmström E.,
Atom transfer radical polymerization from cellulose fibers at ambient temperature.
J. Am. Chem. Soc., 2001. **124**: p. 900-901
152. Haddleton D. M. and Ohno K.,
Well defined oligosaccharide-terminated polymers from living radical polymerization.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 2001. **39**: p. 2206-2214
153. Stenzel-Rosenbaum M. H., Davis T. P., Chen V. and Fane A. G.,
Synthesis of poly(styrene) star polymers grown from sucrose, glucose and cyclodextrin cores via living radical polymerization mediated by half-metallocene iron carbonyl complex.
Macromolecules, 2001. **34**: p. 5433-5438
154. Cheradame H., Tadjang A. U. and Gandini A.,
The cationic grafting of cellulose with 2-methyl-2-oxazoline, 2a) Influence of the extent of esterification of cellulose.
Makromol. Chem., 1988. **9**: p. 255-256
155. Cheradame H., Tadjang A. U. and Gandini A.,
The cationic grafting of cellulose with 2-methyl-2-oxazoline.
Makromol. Chem., Macromol. Symp., 1986. **6**: p. 261-270

156. Kobayashi M., Mureo K. and Saegusa T.,
Grafting of 2-oxazolines onto cellulose and cellulose diacetate.
Macromolecules, 1988. **21**: p. 1921-1925
157. Kurita K., Yoshida A. and Koyama Y.,
Studies on chitin. 13. New polysaccharide/polypeptide hybrid materials on chitin and poly(g-methylglutamate).
Macromolecules, 1988. **21**: p. 1579-1583
158. Qu X., Wirsén A. and Albertsson A.-C.,
Synthesis and characterization of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid.
J. Appl. Polym. Sci., 1999. **74**: p. 3193-3202
159. Qu X., Wirsén A. and Albertsson A.-C.,
Novel pH-sensitive chitosan hydrogels : swelling behavior and states of water.
Polymer, 2000. **41**: p. 4589-4598
160. Lie J., Xie W., Cheng M., Nickol R. G. and Wang P. G.,
Polycaprolactone-modified hydroxyethylcellulose film prepared by lipase -catalysed ring-opening polymerization.
Macromolecules, 1999. **32**: p. 2789-2792
161. Dubois P., Krishnan M. and Narayan R.,
Aliphatic polyester-grafted starch-like polysaccharides by ring-opening polymerization.
Polymer, 1999. **40**: p. 3091-3100
162. Choi E.-J., Kim C.-H. and Park J.-K.,
Synthesis and characterization of starch-g-polycaprolactone copolymer.
Macromolecules, 1999. **32**: p. 7402-7408
163. Choi E.-J., Kim C.-H. and Park J.-K.,
Structure-properties relationship in PCL/starch blend compatibilized with starch-g-PCL copolymer.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1999. **37**: p. 2430-2438
164. Li Y., Volland C. and Kissel T.,
Biodegradable brush-like graft polymers from poly(D,L-lactide) or poly(D,L-lactide-co-glycolide) and charge-modified, hydrophilic dextrans as backbone -in vitro degradation and controlled releases of hydrophilic macromolecules.
Polymer, 1998. **39**: p. 3087-3097
165. Li Y., Nothnagel J. and Kissel T.,
Biodegradable brush-like graft polymers from poly(D,L-lactide) or poly(D,L-lactide-co-glycolide) and charge-modified, hydrophilic dextrans as backbone -synthesis, characterization and in vitro degradation properties.
Polymer, 1997. **38**: p. 6197-6206
166. Hatakeyama H., Yoshida, T., Hatakeyama,
The effect of side Chain association on thermal and viscoelastic properties. Cellulose acetate based polycaprolactones.
J. of Thermal Analysis and Calorimetry, 2000. **59**: p. 157-168
167. Donabedian D. H. and McCarthy S. P.,
Acylation of pullulan by ring-opening of lactones.
Macromolecules, 1998. **31**: p. 1032-1039
168. Ohya Y., Maruhashi S. and Ouchi T.,
Graft polymerization of L-lactide on pullulan through the trimethylsilyl protection method and degradation of the graft copolymers.
Macromolecules, 1998. **31**: p. 4662-4665

169. Ohya Y., Maruhashi S. and Ouchi T.,
Preparation of poly(lactic acid)-grafted amylose through the trimethylsilyl protection method and its biodegradation.
Macromol. Chem. Phys., 1998. **199**: p. 2017-2022

Partie II

Synthèse des copolymères dextrane-g-poly lactide

PARTIE II :

SYNTHESE DES COPOLYMERES

DEXTRANE-G-POLYLACTIDE

INTRODUCTION :

OBJECTIFS ET STRATEGIE DE SYNTHESE

L'objectif de ces travaux de recherche est la synthèse de copolymères greffés dextrane-g-poly lactide, entièrement biocompatibles et d'architecture contrôlée. De tels copolymères sont constitués d'une dorsale dextrane (polysaccharide hydrophile) et de greffons poly lactide (PLA, polyester hydrophobe). Cette association de parties hydrophile et hydrophobe devrait alors leur conférer un caractère amphiphile. En maîtrisant leur synthèse, les proportions relatives en dextrane et en poly lactide seront modulables à souhait, en contrôlant à la fois le nombre et la longueur des greffons ; et les copolymères synthétisés seront soit hydrosolubles soit organosolubles. Différents comportements aux interfaces (eau/air ou eau/huile) sont ainsi susceptibles d'être obtenus. Afin de pouvoir relier ultérieurement leurs propriétés physico-chimiques à leurs paramètres structuraux, il apparaît également nécessaire de contrôler au mieux leur architecture et par conséquent leur synthèse. Dans ce but, nos efforts se sont portés sur le contrôle de la structure, tant au niveau du nombre de greffons polyesters que de leur longueur.

Comme cela a été décrit dans la partie I, la synthèse de polysaccharides à greffons polyesters a déjà été relatée en employant des stratégies de type « grafting onto ». Dans le cas de la synthèse de copolymères dextrane-g-poly lactide par cette méthode [1-4], une contamination du copolymère final par des chaînes poly lactide non greffées était observée. Selon nous, la stratégie la plus appropriée pour la synthèse de tels copolymères greffés consiste à employer une méthode de type « grafting from » : génération des greffons via une polymérisation à partir de sites réactifs disposés le long de la dorsale de dextrane. Le contrôle

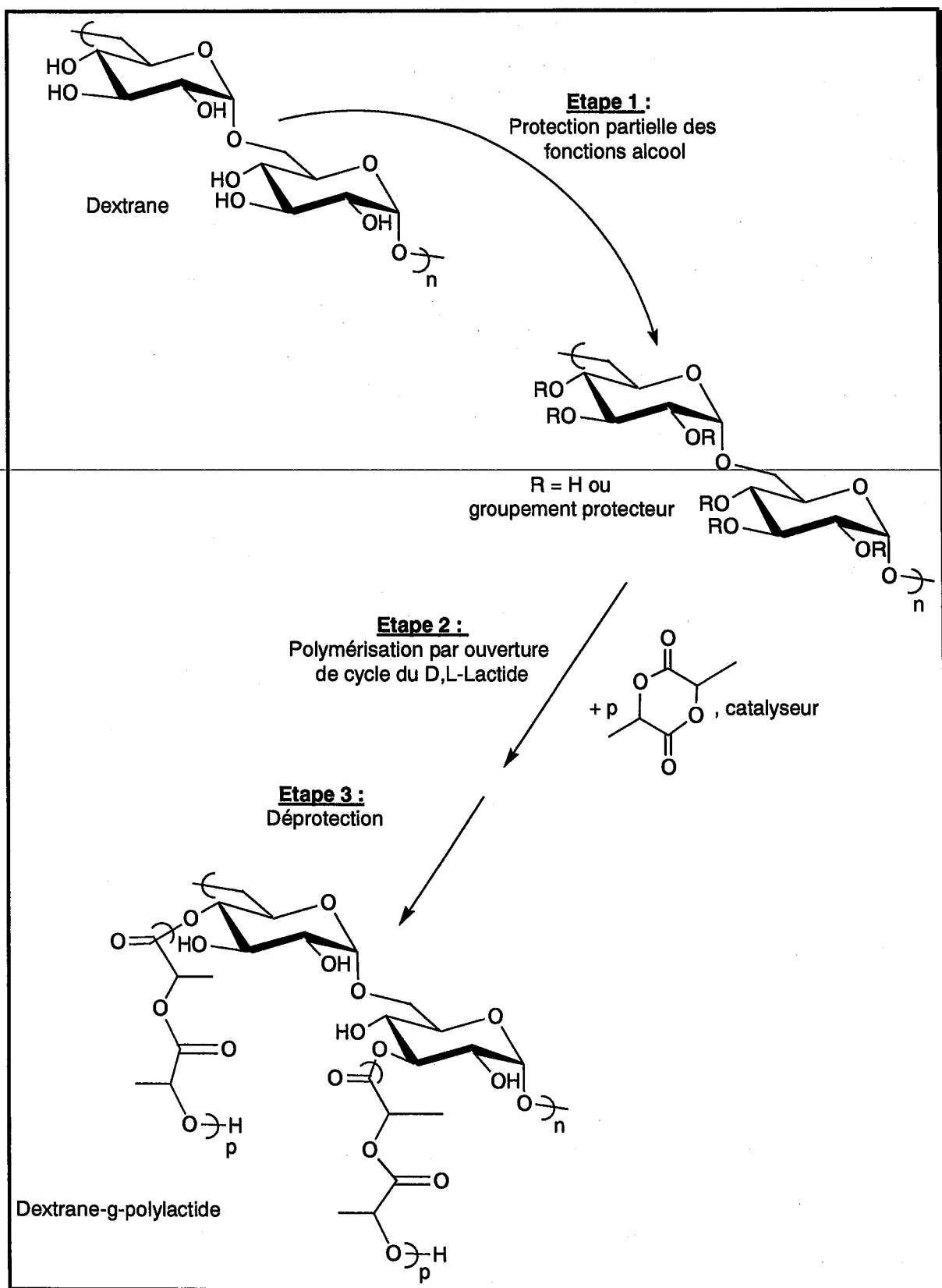


Schéma II-1 : Stratégie de synthèse des copolymères dextrane-g-poly lactide

de l'architecture est alors obtenu pour autant que le contrôle de la polymérisation (notamment en termes de longueur de greffons et d'équiréactivité des sites d'amorçage) soit assuré.

La stratégie de synthèse employée dans ces travaux de recherche (décrite dans le Schéma II-1) comporte trois étapes. La non compatibilité entre le squelette de dextrane et les greffons polyesters rend la synthèse de ces copolymères délicate. Aussi, afin d'éviter que la polymérisation ne se déroule en milieu hétérogène, ce qui est défavorable au contrôle de la réaction, il apparaît nécessaire d'hydrophobiser le polysaccharide. Le dextrane est donc partiellement modifié dans une première étape de façon à pouvoir le solubiliser, par la suite, dans un milieu peu polaire comme le toluène (solvant dans lequel se déroulera la polymérisation). Cette première étape, qui consiste à protéger une partie des fonctions hydroxyle de la chaîne de dextrane, permet également de contrôler le nombre de fonctions alcool résiduelles et par là même, le nombre de greffons dans le copolymère final. Les greffons polylactide sont alors générés via une polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide à partir de ces fonctions alcool, lors de la seconde étape de cette synthèse. Enfin, afin d'assurer un caractère amphiphile au copolymère final, les groupements protecteurs sont hydrolysés lors de la dernière étape.

Les trois étapes de cette synthèse vont être successivement examinées au cours des chapitres qui constituent cette seconde partie du manuscrit. Une attention particulière sera portée au contrôle de chacune des étapes, ainsi qu'à la structure des copolymères obtenus.

Chapitre I :

Silylation

Chapitre I : Silylation

I. METHODES DE PROTECTION DES FONCTIONS ALCOOL	61
I.1. Choix de la méthode de protection.....	62
I.2. Choix du groupement silylé	63
II. SILYLATION DES POLYSACCHARIDES : CONDITIONS ET DISCUSSION	64
II.1. Antécédents / Différences de réactivités des polysaccharides	64
II.2. Nature des agents silylants employés	65
II.3. Nature du milieu réactionnel.....	66
II.4. Conclusions / Choix des conditions réactionnelles.....	67
III. DETERMINATION DES TAUX DE SILYLATION	68
III.1. Définitions	68
III.2. Méthodes d'Analyse.....	68
IV. RESULTATS AVEC HMDS SEUL.....	69
IV.1. Mécanisme	69
IV.2. Paramètres d'influence	69
IV.2.1. Température et durée de la réaction	69
IV.2.2. Quantité d'agent silylant	70
IV.2.3. Influence du solvant	70
IV.2.4. Lot de dextrane.....	71
V. EFFETS DE L'AJOUT D'UN CATALYSEUR A HMDS	72
VI. AUTRE AGENT SILYLANT : LA N,O-BIS(TRIMETHYLSILYL)- ACETAMIDE (BSA).....	74
VII. ANALYSES STRUCTURALES DES DEXTRANES SILYLES ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	77
VII.1. Analyse IRTF.....	77
VII.2. Propriétés Thermiques	77
VII.3. Analyse RMN	78
VII.3.1. Analyses RMN du dextrane	78
VII.3.2. Détermination des taux de silylation des dextrans silylés.....	80
VII.3.2.1. Spectres RMN ¹ H.....	80
VII.3.2.2. Zone du H anomérique.....	80
VII.3.2.3. Taux de silylation.....	80
Méthode Directe	80
Méthode Indirecte.....	81
VII.3.3. Ordre de réactivité des différents OH	83
VII.3.3.1. Analyse des dextrans faiblement silylés (dans DMSO-d ₆)	84
VII.3.3.2. Analyse des dextrans hautement silylés (dans CDCl ₃)	84
VII.3.3.3. Conclusions sur les sites préférentiels de silylation.....	85
VIII. CONCLUSIONS	86
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	87

CHAPITRE I : SILYLATION

Au cours de ce chapitre, seule la première étape de la synthèse qui consiste à protéger une partie des fonctions hydroxyle du dextrane est examinée. Pour rappel, cette étape permet d'une part de rendre le dextrane soluble dans les milieux peu polaires et d'autre part de limiter et de contrôler ultérieurement le nombre de greffons dans le copolymère final.

Pour les applications envisagées (utilisation de ces copolymères comme agent d'interfaces liquide/liquide, solide/liquide ou solide/solide), une certaine mobilité de la dorsale du copolymère semble être nécessaire pour qu'il puisse se positionner le plus aisément possible à l'interface. Cette mobilité étant reliée au nombre de greffons, il apparaît incontournable de les limiter. La limitation des greffons hydrophobes permet d'envisager l'obtention de copolymères présentant une forte proportion en partie hydrophile (squelette dextrane). De tels copolymères seront hydrosolubles et utilisables dans diverses applications biomédicales. Dans le cas d'un dextrane T40¹, quelques dizaines de greffons polylactide de longueur limitée ($\overline{M}_n$ des greffons inférieure à 1000 g/mol) conduisent à des copolymères finaux présentant des fractions massiques en dextrane de l'ordre de 80-90%.

On comprend alors qu'il est nécessaire d'atteindre des taux de protection élevés pour obtenir un nombre limité de greffons. A l'issue de cette première étape, la gamme de degré de substitution (DS)² que nous avons ciblée est comprise entre 2,5 et 2,95 (ce qui équivaut à un taux de protection des fonctions alcool variant de 83 à 96%).

I. METHODES DE PROTECTION DES FONCTIONS

ALCOOL

La modification des fonctions alcool du dextrane doit satisfaire à différentes contraintes imposées par la synthèse que nous avons choisie :

- Les groupements protecteurs doivent être hydrophobes afin de rendre le dextrane soluble dans les solvants organiques peu polaires.

¹ Le dextrane T40 présente une masse molaire moyenne en masse ($\overline{M}_w$) d'environ 40 000 g/mol (cf. Part I- Chapitre I).

² Degré de substitution (DS) = nombre de groupements protecteurs présents par unité glucose, (3 au maximum).

- La modification doit être effectuée dans des conditions suffisamment douces pour ne pas dégrader la chaîne macromoléculaire de dextrane.
- La protection doit être réversible et permettre de restituer toutes les fonctions protégées dans des conditions douces, sans dommage pour le squelette polysaccharidique. Ces conditions doivent également être compatibles avec les greffons polylactide pour éviter toute lyse tant au niveau des liaisons esters constituant leurs points de branchement sur la dorsale de dextrane, que des greffons eux-mêmes.
- Les groupements protecteurs doivent être stables dans les conditions de polymérisation : la polymérisation de type pseudo-anionique est catalysée par des sels métalliques tel que l'octoate d'étain et ces conditions ne doivent pas provoquer une déprotection prématurée. De plus, les groupements protecteurs ne doivent pas interférer avec la polymérisation en générant des réactions secondaires.

I.1. Choix de la méthode de protection

Il existe différents groupements protecteurs des fonctions alcool. Examinons les plus employés en chimie des glucides [5].

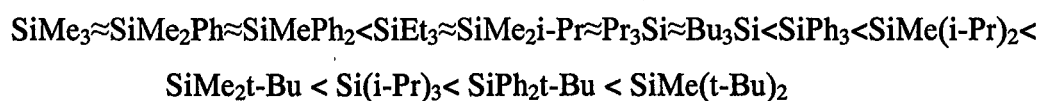
Stables en milieu basique et labiles en milieu acide, les groupements acétal pourraient correspondre aux contraintes de notre synthèse. Cependant, les acétals protègent deux fonctions alcool et soit laissent libre une des trois fonctions hydroxyle de l'ose, soit conduisent à des réticulations inter- ou intrachâînes néfastes au déroulement de la seconde étape.

La protection par des fonctions esters est une méthode très employée pour la modification des polysaccharides [6, 7]. Elle a notamment été utilisée lors de la synthèse de copolymères dextrane-g-poly(méthacrylate de méthyle) [8] ou de glycopolymères tels que des oligosaccharide-b-poly(méthacrylate de méthyle) [9]. Dans notre cas, elle est exclue en raison de la nature chimique des groupements esters proche de celle du PLA. En effet, les réactions secondaires de transestérifications parfois observées au cours de la polymérisation du lactide (cf. Partie II Chapitre II) pourraient également avoir lieu avec ces fonctions esters. D'autre part, leur déprotection nécessite des conditions qui pourraient conduire à une dégradation (même partielle) des greffons PLA.

Vitesse relative de formation des éthers silylés



Stabilité relative des groupements trialkylsilyléthers (hydrolyses en milieu acide)



Stabilité relative des groupements trialkylsilyléthers (hydrolyses en milieu basique)

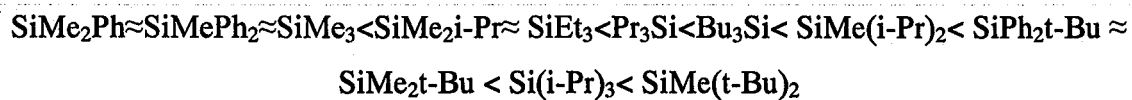


Figure II-1 : Stabilité relative des groupements trialkylsilyléthers et triarylsilyléthers [20, 21]

Les éthers présentent l'avantage d'être stables à la fois en milieux acide et basique. Mais ils sont pour la plupart trop stables pour être facilement labiles, si bien qu'il sont souvent utilisés comme modification permanente des polysaccharides [10-12]. Malgré ce constat, un type de protection éther est couramment employée pour la protection des fonctions alcool : les éthers silylés. Leur formation est quantitative sur les glucoses [13-15]. Ils sont stables en milieu peu basique et en présence d'un réducteur ou d'un organométallique peu réactif. Les triméthylsilyléthers ont d'ailleurs déjà été utilisés avec succès dans des conditions anioniques pour réaliser des architectures polysaccharidiques de types diblocs [16] ou greffés [17, 18]. Facilement labiles en milieu acide, leur déprotection peut s'effectuer dans des conditions douces. D'autres groupements protecteurs silyléthers plus encombrés, comme le tert-butyltriméthylsilyle (t-BuMe₃), ont également été employés lors de la polymérisation anionique du 4-vinylphénol [19].

I.2. Choix du groupement silylé

Il existe de nombreux groupements silyléthers. Leurs réactivités (vitesse de formation ou labilité) peuvent être modulées par un choix judicieux des substituants présents sur l'atome de silicium [20]. La réactivité des groupements les plus courants est décrite dans la Figure II-1. De façon générale, plus les substituants alkyle sont encombrants, plus les silyléthers sont délicats à introduire, stables et difficiles à déprotéger [21]. Les effets électroniques des substituants permettent également de modifier la sélectivité des éthers silylés, notamment leur labilité. Ainsi, les silyléthers à substituants alkyle sont plus rapidement hydrolysés en milieu acide que leurs homologues à substituants aryle et inversement en milieu basique [22].

D'après la Figure II-1, le triméthylsilyléther (-SiMe₃ ou TMS) est le groupement éther silylé le plus facile à introduire, mais également l'un des plus labiles en milieu acide ou basique. Comme le TMS s'est déjà avéré suffisamment stable dans des conditions de polymérisation du D,L-lactide [17, 18], sa très grande réactivité envers les alcools et sa labilité en milieu acide en font le groupement le plus intéressant pour la protection des fonctions alcool du dextrane. Il a donc été retenu pour la première étape de notre synthèse.

II. SILYLATION DES POLYSACCHARIDES : CONDITIONS ET DISCUSSION

II.1. Antécédents / Différences de réactivités des polysaccharides

Depuis le milieu du siècle dernier [23], la silylation des polysaccharides a suscité un vif intérêt. Il s'agissait alors pour les chercheurs d'accroître la stabilité thermique des polysaccharides afin qu'ils supportent sans dommage des mises en forme par fusion (étape indispensable dans les procédés textiles [24]), et/ou de leur conférer une meilleure solubilité dans divers solvants organiques [25]. La cellulose, très peu soluble dans la plupart des milieux (elle peut néanmoins être gonflée avant modification à l'aide d'une plastification par l'eau ou par un autre solvant) est le polysaccharide dont la silylation a été la plus étudiée, pour faciliter sa mise en œuvre pour le recouvrement de papier carton [26, 27] ou comme isolant électrique [28, 29] par exemple.

Les premières silylations notables de la cellulose [23] et de l'amidon [30] ont été réalisées en suspension dans la pyridine à l'aide de divers chlorures de silanes. Les degrés de substitution (DS) ne dépassaient pas 2,75. Ce protocole a été ensuite amélioré par Keilich et coll. [31] en solubilisant le chlorure de triméthylsilyle (TMSCl) dans de l'éther de pétrole et en ajoutant lentement cette solution au milieu pyridine : ceci permet alors à la cellulose de se solubiliser au fur et à mesure de sa modification dans la phase étherée, afin d'y poursuivre sa silylation jusqu'à substitution complète. La silylation d'autres polysaccharides a également été réalisée à l'aide de TMSCl [13, 31, 32] ou d'hexaméthylidisilazane (HMDS) [33].

Pour les mêmes conditions de protection, la réactivité des polysaccharides varie en fonction de leur architecture et de leur nature chimique [31]. Ainsi si des polysaccharides linéaires comme l'amylose, la cellulose de coton et le pullulane ont pu être complètement silylés en présence de TMSCl [31], des polysaccharides branchés tels que l'amylopectine ou le dextrane T100 n'ont pu être que partiellement modifiés dans les mêmes conditions. L'augmentation de la température et du temps de réaction n'a pas permis d'obtenir la silylation complète de ces polysaccharides branchés. Ces différences de réactivités entre polysaccharides linéaires et branchés sont expliquées par l'encombrement stérique généré par les chaînes latérales. L'origine du polysaccharide peut également influencer sa structure et alors engendrer des différences de comportement. Mormann et coll. ont ainsi observé des

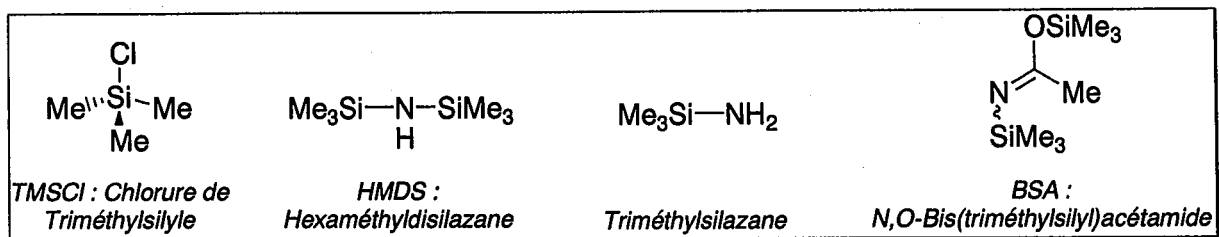


Figure II-2 : Quelques agents silylants.

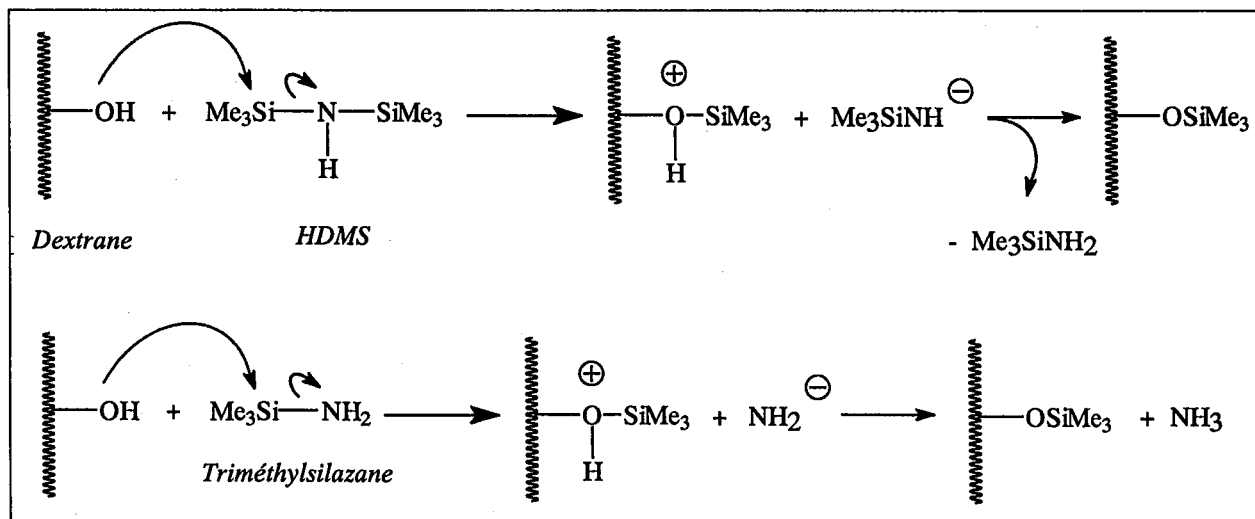


Schéma II-2 : Réaction de HMDS sur le dextrane - Mécanisme global.

différences de réactivités, selon l'origine de la cellulose, attribuées à la morphologie de la cellulose et à la valeur des masses molaires [34-36].

II.2. Nature des agents silylants employés

Bien qu'il existe une grande variété d'agents silylants mono- ou multifonctionnels [25, 37], le TMSCl et l'HMDS (Figure II-2) sont les plus employés.

Le TMSCl est l'agent silylant le plus employé et le moins cher. Mais lorsqu'il est utilisé seul, il ne possède qu'un faible pouvoir silylant en raison de l'acide chlorhydrique qu'il génère. De plus, la présence d'un tel acide augmente le risque de dégrader les chaînes de polysaccharides. Aussi, il est nécessaire d'ajouter une base comme la pyridine, la triéthylamine, l'imidazole ou l'HMDS pour capter cet acide libéré. Dans ce cas, des sels d'ammonium sont produits lors de la silylation. Ces sels sont connus pour activer les réactions de silylation mais ils sont en revanche assez délicats à éliminer³ [33] et contaminent souvent les produits finaux [25, 27]. En outre, le TMSCl est souvent contaminé par des traces de silanes di- ou trichlorés [26-28] difficiles à éliminer par distillation. Le TMSCl employé tel quel peut alors conduire à la réticulation des chaînes de polysaccharides, ce qui empêche alors la solubilisation en milieu peu polaire des polysaccharides hautement silylés [30, 38].

L'HMDS est beaucoup moins réactif que le TMSCl, mais il est très largement utilisé en raison de ses nombreux avantages :

- Bas prix et facilité d'utilisation (il ne génère pas d'acide chlorhydrique).
- Bas point d'ébullition donc facilement éliminable après réaction.
- Il ne génère comme produits secondaires que de l'ammoniac ou du triméthylsilazane (Schéma II-2 et Figure II-2). Ces dérivés sont facilement éliminables par évaporation et ne risquent a priori pas de dégrader les chaînes de polysaccharides.

L'HMDS permet donc une silylation dans des conditions plus douces que celles rencontrées pour le TMSCl. C'est pourquoi il a été utilisé en remplacement de ce dernier pour la silylation de la cellulose [24, 28, 34, 36, 39-45] ou d'autres polysaccharides [16, 33]. En

³ Ces sels peuvent être éliminés par filtration sur Al_2O_3 ou précipitation par l'éthanol en présence de petites quantités d'acétate de sodium.

dépit de sa plus faible réactivité, il permet d'obtenir des taux de silylation notables s'il est employé en présence de catalyseur (acides, TMSCl, ou agents nucléophiles) [28, 33, 36, 44].

D'autre part, des silylamides peuvent aussi être employées [46, 47]. Plus réactives que les silazanes, grâce à leur fonction carbonyle adjacente, elles permettent une silylation rapide et facile des alcools [37, 48]. La N,O-(bis triméthylsilyl)acétamide (BSA, Figure II-2) est la silylamide la plus utilisée et est décrite comme l'un des agents silylants les plus puissants [37]. Tout comme l'HMDS, elle ne génère que des sous-produits neutres tels que l'acétamide ou la triméthylsilylacétamide. La BSA a ainsi été avantageusement employée pour la silylation de polysaccharides tels que la cellulose du bois [28, 29]. Elle n'a, à notre connaissance, jamais été utilisée pour la silylation du dextrane.

II.3. Nature du milieu réactionnel

Comme nous l'avons déjà signalé, différents auteurs se sont attachés à réaliser la silylation dans des conditions les plus homogènes possibles. Ceci permet d'une part d'éviter les problèmes d'hétérogénéité de protection entre différentes chaînes ou au sein d'une même chaîne de polysaccharide, et d'autre part d'accroître les taux de substitution. Compte tenu de la différence de polarité entre les polysaccharides natifs et leurs homologues silylés, il est en fait assez délicat de trouver un milieu qui permette la solubilisation du polymère tout le long de sa modification [28].

La plupart des polysaccharides naturels sont solubles dans peu de solvants⁴ (voire aucun pour la cellulose). Ainsi, le dextrane [49] n'est soluble que dans l'eau, l'éthylène glycol, le glycérol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le formamide (solubilité limitée en fonction de $\overline{M}_n$ [33]). Le N,N-diméthylformamide (DMF) peut également être employée pour solubiliser le dextrane, à condition d'y ajouter des sels comme LiCl qui le complexe alors. Les solvants protiques tels que l'eau et les alcools étant inadaptés pour des réactions de silylation (ils réagissent eux-mêmes avec les agents silylants), le formamide et le DMSO nous sont apparus comme les solvants les plus adaptés pour effectuer une telle protection. Le formamide a d'ailleurs déjà été utilisée comme solvant pour silyler divers polysaccharides et notamment le dextrane [33].

⁴ Le nombre élevé de fonctions hydroxyle des chaînes de polysaccharides génère un grand nombre de liaisons hydrogène qui limitent leur solubilité. Des problèmes de cristallinité peuvent également intervenir.

II.4. Conclusions / Choix des conditions réactionnelles

Quelles que soient les conditions employées, aucune silylation complète du dextrane n'a jamais été reportée : le degré de substitution maximal observé est de 2,9 pour des dextrans T10 ($\overline{M}_w = 10\,000$ g/mol) ou de plus faible masse molaire [16, 33].

Il s'agissait donc pour nous d'effectuer une triméthylsilylation quasi complète et non dégradante du dextrane, dans les conditions les plus homogènes possibles. Pour cela, nous avons décidé d'opérer dans un solvant du dextrane et contrairement à Harmon [33], nous avons choisi le DMSO et non le formamide pour différentes raisons :

- Le DMSO possède une polarité plus faible que le formamide⁵ [50] ce qui devrait ralentir l'insolubilisation du dextrane au fur et à mesure de sa silylation.
- Il a été démontré que le DMSO activait les réactions de silylation. Ainsi, les cinétiques de silylation de glucose dans ce solvant sont beaucoup plus rapides que dans le DMF [15].

Concernant le choix de l'agent silylant, l'emploi d'HMDS est préférable à celui du TMSCl. Dans un premier temps, l'HMDS a été utilisé seul puis activé par des agents catalyseurs. Dans un deuxième temps, nous avons testé la silylation par la BSA.

Les divers paramètres influençant la réaction (nature et quantité du réactif silylant, température, durée de la réaction, nature du milieu réactionnel et lot de dextrane⁶) ont été étudiés de façon à optimiser le taux de modification du dextrane et donc le nombre de fonction alcool résiduelles sur le squelette.

Pour chaque condition opératoire, il nous a fallu vérifier que la chaîne polysaccharidique n'était pas dégradée. Le fait que le dextrane natif soit hydrosoluble et que le dextrane partiellement silylé soit organosoluble complique cette vérification. Pour contourner ce problème, l'absence de dégradation a été vérifiée après hydrolyse des groupements protecteurs du dextrane silylé et les résultats seront exposés dans le chapitre III de cette partie. Les conditions de déprotection (étape 3 du schéma fonctionnel) ont été préalablement optimisées. Rappelons que ces conditions ne doivent ni dégrader la dorsale

⁵ E_T (paramètre de polarité de Reichard ; kcal/mol) : 45,1 (DMSO) / 55,8 (formamide)
Constante Diélectrique : 46,7 (DMSO) / 109 (formamide).

⁶ Deux lots de dextrane T40 ont été utilisés dans ce travail de thèse, notés D_{40}^1 et D_{40}^2 .

polysaccharide ni les greffons polyesters. Dans ce chapitre, il ne sera donc pas fait mention de la dégradation éventuelle du dextrane.

III. DETERMINATION DES TAUX DE SILYLATION

III.1. Définitions

Le rendement de la réaction de silylation peut être représenté à l'aide de deux grandeurs que nous avons déjà évoquées précédemment. Il s'agit ici de rappeler la définition de ces grandeurs :

Taux de silylation (exprimé en pourcentage) : nombre moyen de groupements silylés sur 100 fonctions alcool du dextrane natif.

Degré de substitution : nombre moyen de groupements protecteurs par unité glucose sur le dextrane. Chaque unité glucose comportant au maximum 3 fonctions alcool, les degrés de substitution varient de 0 à 3.

III.2. Méthodes d'Analyse

Il existe diverses méthodes pour déterminer les taux de silylation.

- La gravimétrie consiste à déterminer le taux de silylation à l'aide du gain massique obtenu après réaction [16, 23, 39]. Cette méthode n'est valable que si les produits sont convenablement purifiés. Aussi, afin d'ôter toute trace de DMSO, il est nécessaire de précipiter le dextrane partiellement silylé, ce qui conduit nécessairement à des pertes en masse. De plus, et nous le verrons au paragraphe IV de ce chapitre, le DMSO est très difficilement éliminable et joue le rôle de plastifiant du dextrane silylé. Pour toutes ces raisons, cette technique a été rejetée.

- L'analyse élémentaire a été quant à elle couramment utilisée pour la détermination des rendements de silylation [24, 28, 30-32, 34-36, 40-43, 51]. Elle nécessite un produit très purifié et repose sur un protocole complexe (oxydation du composé sous forme d'acides siliciques SiO_2 , puis dosage de l'acide formé [52]) mais permet une analyse assez précise des taux de substitution.

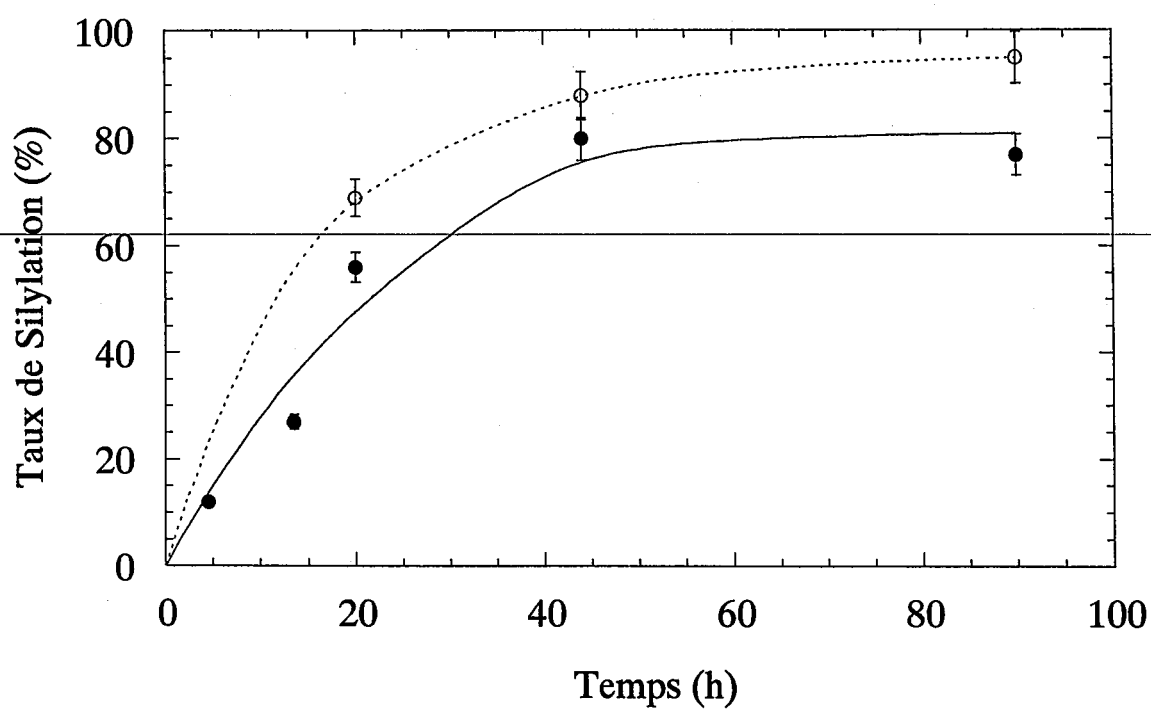


Figure II-3 : Cinétiques des silylations effectuées sur D_{40}^1 dans le DMSO avec HMDS/OH (rapport molaire)= 2. (●) à 50°C et (○) à 80°C
(Taux de silylation calculés à partir de l'équation (II-1), cf. paragraphe VII.3.2.2.) .

- L'analyse RMN n'a été que très peu décrite dans la littérature [17, 18]. Même si elle est moins précise que l'analyse élémentaire, sa facilité et sa rapidité d'usage en ont fait l'élément de choix pour notre étude. La méthode de calcul qui permet de déterminer le taux de silylation à partir du spectre RMN ^1H sera présentée dans le paragraphe VII.3.2 de ce chapitre.

IV. RESULTATS AVEC HMDS SEUL

Les résultats présentés dans ce paragraphe concernent les essais de silylation du dextrane par l'HMDS, dans le DMSO.

IV.1. Mécanisme

De façon globale, les fonctions alcool du dextrane réagissent avec le disilazane pour donner le dextrane silylé et le triméthylsilazane (Schéma II-2). Ce dernier peut à nouveau réagir en silylant une autre fonction alcool et en libérant de l'ammoniac. Quelle que soit l'espèce silylante, il s'agit à chaque fois d'une réaction de substitution nucléophile sur les fonctions alcool du dextrane, dont le mécanisme détaillé met en jeu la formation de complexes (états de transitions ou intermédiaires réactionnels) du silicium d'ordre 5 ou 6 selon les cas [53]. Dans ce mécanisme, le DMSO joue le rôle d'un activateur dont nous aborderons le mode d'action au paragraphe V.

IV.2. Paramètres d'influence

IV.2.1. *Température et durée de la réaction*

Une première série d'expériences a été effectuée sur le dextrane D_{40}^1 à 50°C, en augmentant le temps de réaction (Figure II-3). Le taux de silylation maximum obtenu est alors légèrement inférieur à 80%. Alors que le dextrane est soluble dans le milieu en début de réaction (le milieu n'est pas toujours homogène du fait de l'immiscibilité entre l'HMDS et le DMSO), il s'insolubilise au fur et à mesure de sa silylation et finit par précipiter progressivement dans le milieu, ce qui contribue à diminuer sa réactivité.

Dans le but d'accroître la cinétique de la réaction mais aussi d'améliorer la solubilité du dextrane partiellement silylé dans le milieu réactionnel, nous avons augmenté la température de réaction. Les résultats obtenus à 80°C sont présentés sur la Figure II-3. Ainsi

Dextrane Initial	Rapport molaire HMDS/OH	Taux de Silylation (%) ^a	DS ^b
D ₄₀ ¹	2,00	56	1,7
	3,00	70	2,1
	4,00	73	2,2
D ₄₀ ²	0,25	37	1,1
	0,50	68	2,0
	2,00	76	2,3
	5,00	78	2,3

Tableau II-1 : Effet du rapport molaire HMDS/OH sur le taux de silylation et le degré de substitution (DS). Chaque expérience a été réalisée pendant 20h, à 50°C dans le DMSO.

a : calculé à partir de l'équation (II-1) (cf. paragraphe VII.3.2.2.).

b : calculé à partir de l'équation (II-3) (cf. paragraphe VII.3.2.2.).

Mélange Solvant (v/v)	Taux de Silylation (%) ^a	DS ^b
DMSO	56	1,7
DMSO/THF (1/1) ^c	52	1,6
DMSO/THF (1/1) ^d	70	2,1
DMSO/THF (4/1) ^d	72	2,2
DMSO/Toluene (1/1) ^c	83	2,5
DMSO/Toluene (1/1) ^d	88	2,6
DMSO/Pyridine (1/1) ^c	66	2,0

Tableau II-2 : Effet du co-solvant sur le taux de silylation et le DS. Chaque réaction de silylation a été réalisée sur le D₄₀¹, avec HMDS/OH = 2 à 50°C pendant 20h.

a : calculé à partir de l'équation (II-1) (cf. paragraphe VII.3.2.2.).

b : calculé à partir de l'équation (II-3) (cf. paragraphe VII.3.2.2.).

c : co-solvant ajouté au début de la réaction de silylation

d : co-solvant ajouté après la précipitation du dextrane partiellement silylé dans le DMSO

pour le même dextrane et dans les mêmes conditions opératoires, augmenter la température de 30°C permet d'accroître le taux de substitution de 80% à 95%.

IV.2.2. Quantité d'agent silylant

L'influence de la quantité d'HMDS sur le rendement de la réaction de silylation a été étudiée. Comme cela peut être observé dans le Tableau II-1, accroître le rapport molaire HMDS/fonctions hydroxyle du dextrane (ce rapport est noté HMDS/OH) permet d'augmenter le taux de silylation. Quel que soit le lot de dextrane employé (l'influence du lot de dextrane sera étudiée au paragraphe IV.2.4), les taux de silylation restent assez faibles (inférieurs à 80%) après 20 h de réaction à 50°C, et ce même en employant un large excès de réactif (HMDS/OH = 5).

IV.2.3. Influence du solvant

Dans les premières expériences, nous avons observé que l'emploi de DMSO comme seul solvant conduit à un milieu hétérogène où le dextrane partiellement silylé n'est pas soluble. Dans le but d'accroître le taux de silylation, nous avons envisagé de poursuivre la réaction en milieu homogène. Pour ce faire l'influence d'un co-solvant (solvant du dextrane partiellement silylé) ajouté au DMSO a été étudiée.

L'ajout d'un co-solvant moins polaire que le DMSO (THF ou toluène) après la précipitation effective du dextrane partiellement silylé (généralement observée après 4h de réaction), permet d'homogénéiser à nouveau le milieu réactionnel et d'y poursuivre la réaction. Dans ces conditions, les taux de silylation obtenus sont nettement améliorés (Tableau II-2). Dans le cas du toluène, une augmentation de 56% à 88% est observée alors qu'elle n'est que de 56% à 70% pour le THF. Il semblerait que plus la polarité du co-solvant diminue, plus le rendement de la silylation est élevé⁷. Ceci est en accord avec la solubilité du dextrane modifié. En effet, le dextrane silylé est plus soluble dans le toluène que le THF. Dans les conditions employées, le rapport volumique co-solvant/DMSO semble sans

⁷ Polarité des cosolvants Echelle E_T = Paramètre de polarité de Reichard [50]

	E_T (kcal/mol)
Toluène	34,3
THF	37,4
Pyridine	40,5
DMSO	45,1

	$\overline{M}_n$ (g/mol)	$\overline{M}_w$ (g/mol)	I : Indice de polymolécularité
D ₄₀ ¹	31750	39000	1,23
D ₄₀ ²	28900	36150	1,25

Tableau II-3 : Paramètres macromoléculaires des dextrans T40 (déterminés par SEC-MALLS, phase aqueuse, cf. Partie expérimentale)

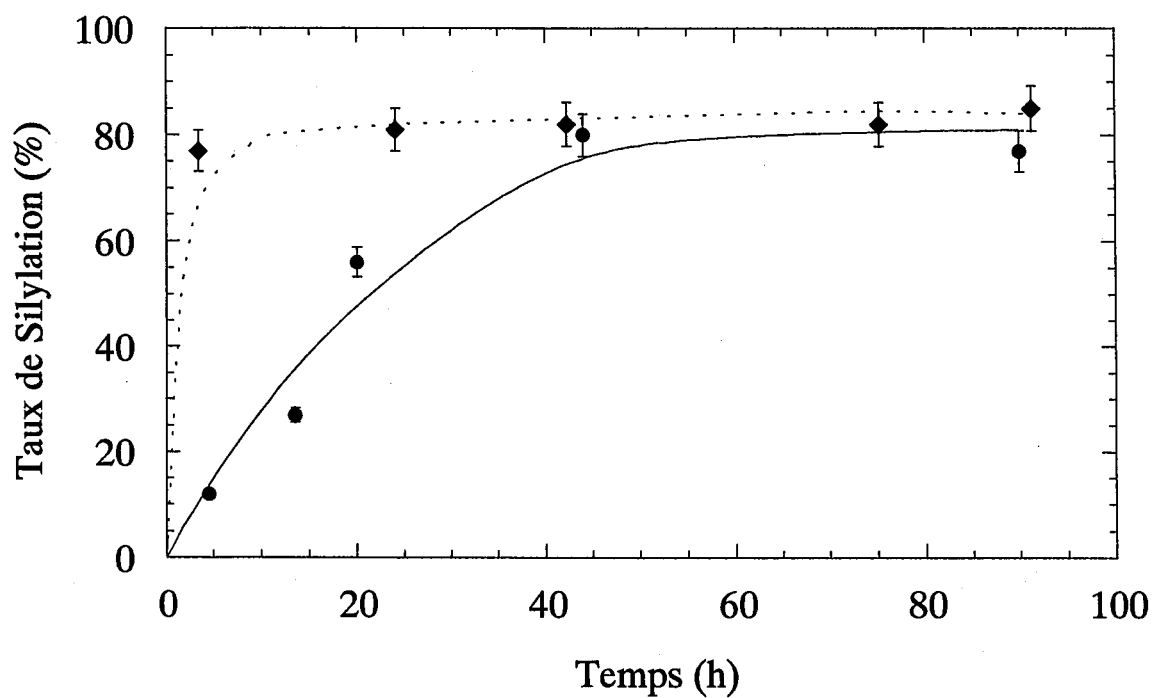


Figure II-4 : Cinétiques des silylations effectuées dans le DMSO avec HMDS/OH = 2 à 50°C (• D₄₀¹, ◆ D₄₀²) ; Taux de silylation calculés à partir de l'équation (II-1) (cf. paragraphe VII.3.2.2.)

influence. En effet, dès lors qu'une quantité suffisante de co-solvant est ajoutée, le dextrane partiellement silylé est solubilisé et la silylation se poursuit.

D'autre part, l'ajout du co-solvant peut également être réalisé dès le début de la réaction. Il se produit alors une insolubilisation partielle du dextrane et la silylation débute en milieu hétérogène, avec certainement une cinétique ralentie. Mais la silylation progressant, le dextrane partiellement silylé se solubilise et la réaction se poursuit en milieu homogène (l'HMDS résiduel est alors solubilisé dans le milieu réactionnel). Ainsi, les rendements de silylation sont inférieurs au cas précédent (à cause de l'insolubilisation initiale). Les seuls résultats favorables ne sont obtenus qu'après un ajout de toluène (Tableau II-2). Ce résultat s'explique par le fait que le dextrane natif est plus soluble dans un mélange DMSO/toluène (50/50 : v/v) que dans un milieu DMSO/THF (50/50 : v/v), si bien que l'insolubilisation initiale est moindre dans le cas du toluène. Si le co-solvant est encore plus polaire (pyridine), son ajout dès le début de la réaction ne provoque aucune insolubilisation du dextrane natif et les taux de silylation augmentent alors de 56 à 66%. Au cours de la réaction, le dextrane partiellement silylé reste soluble plus longtemps dans ce milieu mais s'insolubilise malgré tout, ce qui limite au final le taux de silylation.

Pour conclure, il est préférable d'une part d'employer le toluène comme co-solvant, et d'autre part d'ajouter le co-solvant après précipitation effective du dextrane partiellement silylé dans le milieu réactionnel.

IV.2.4. Lot de dextrane

Deux lots différents de dextrane T40 (notés D_{40}^1 et D_{40}^2) ont été employés lors des expériences de silylation. Leurs caractéristiques macromoléculaires sont présentées dans le Tableau II-3.

Les évolutions des taux de silylation avec la température et la durée de la réaction, présentées dans le Tableau II-1 et la Figure II-4, illustrent l'influence du lot de dextrane. Ainsi, dans des conditions opératoires identiques (réactions effectuées dans le DMSO à 50°C pendant 20h avec HMDS/OH=2), les taux de protection augmentent de 56% (D_{40}^1) à 76% (D_{40}^2).

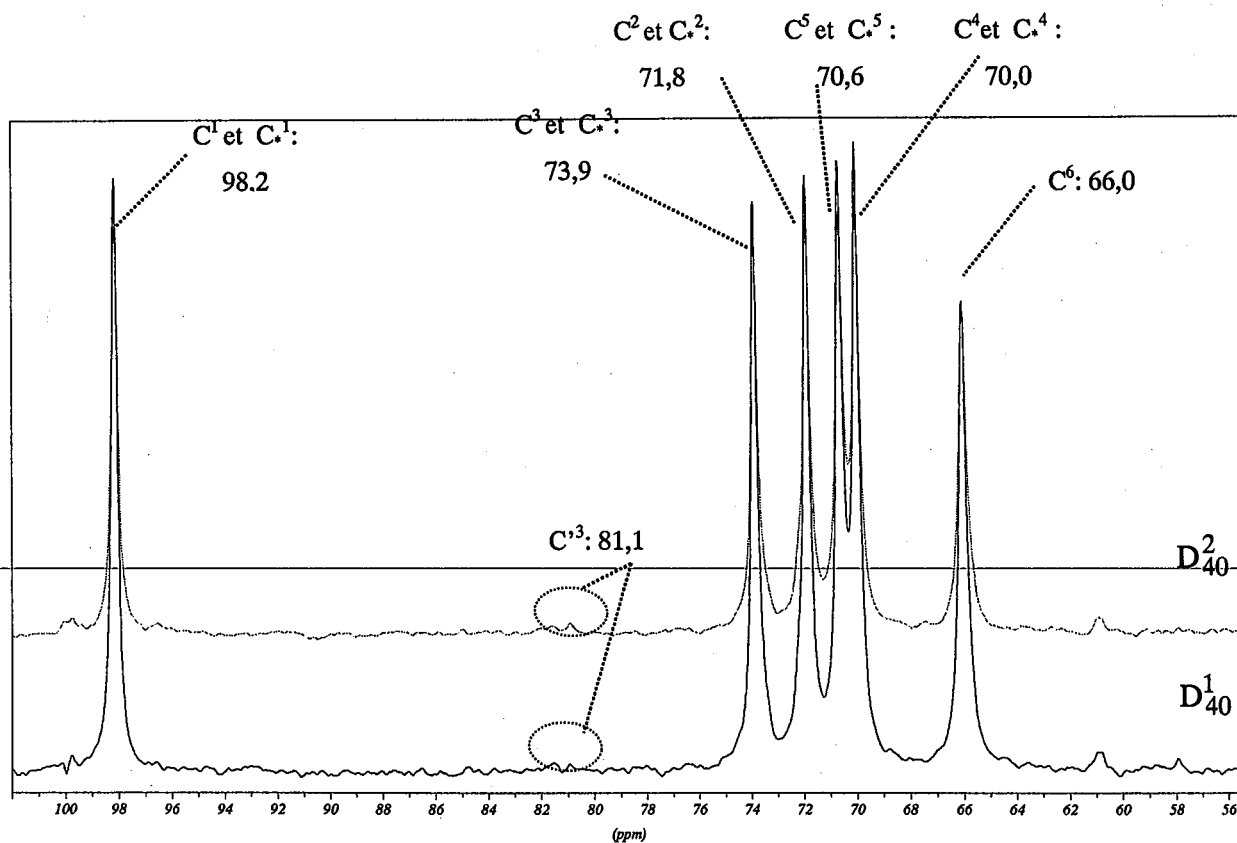


Figure II-5 : Spectres ^{13}C RMN des lots de dextrans D_{40}^1 et D_{40}^2 , effectués dans D_2O .

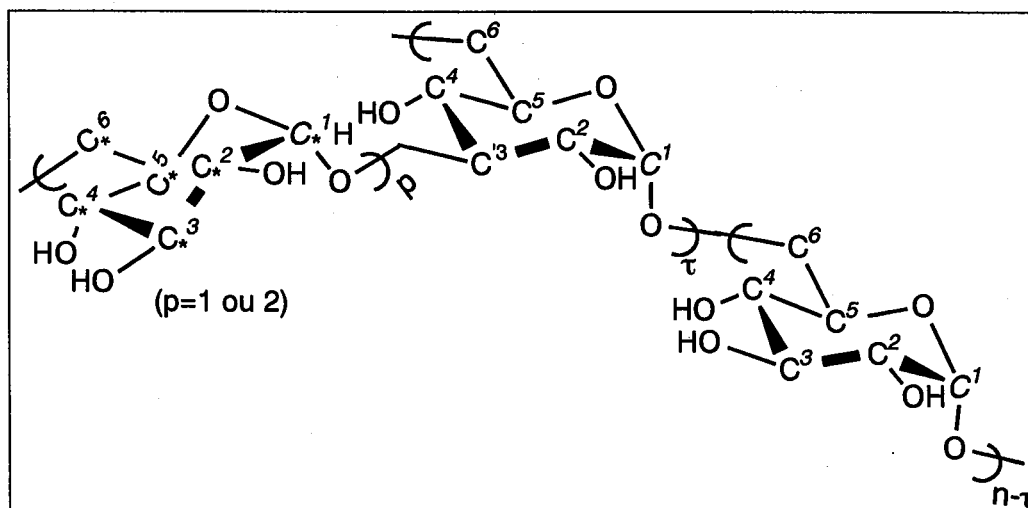


Figure II-6 : Représentation d'un dextrane T40 avec branchement $\alpha 1 \rightarrow 3$.

τ : taux de branchement du dextrane.

C^* : carbones sur les unités latérales

C'^3 : carbone n°3 branché.

Quelles que soient les conditions employées, le dextrane D_{40}^1 semble moins réactif que le D_{40}^2 . Les différences de réactivité entre ces deux lots de dextrane ont été attribuées à des taux de ramification différents. Comme il a déjà été mentionné au paragraphe II.1, l'augmentation des taux de branchement des polysaccharides provoque une diminution de l'accessibilité des fonctions hydroxyle, ce qui se traduit par un ralentissement de la cinétique de modification. Il semblerait donc que le lot D_{40}^1 soit plus ramifié que le D_{40}^2 . Afin de vérifier cette hypothèse, une étude des spectres RMN ^{13}C des deux lots de dextrane a été effectuée. Cette tentative a échoué : D_{40}^1 et D_{40}^2 possèdent des spectres similaires, présentés dans la Figure II-5, qui correspondent à des dextrans quasi-linéaires comportant un taux de branchement latéral inférieur à 5% [54, 55]. L'attribution des différents pics a été effectuée conformément aux études réalisées antérieurement [6, 7, 56-58] (*la numérotation des carbones est explicitée dans la Figure II-6*).

V. EFFETS DE L'AJOUT D'UN CATALYSEUR A HMDS

Dans les conditions opératoires décrites précédemment, un maximum de 90 % de silylation ne semblait pas pouvoir être dépassé, sauf si cette réaction était effectuée à 80°C pendant plus de 40h. Or (et nous le verrons dans le chapitre III de cette même partie), ces conditions expérimentales sont dégradantes pour la chaîne de polysaccharide. C'est pourquoi, de nouvelles expériences ont été réalisées dans le but d'accroître ce taux de modification dans des conditions opératoires plus douces, c'est à dire à 50°C et en employant des catalyseurs.

D'après la littérature, l'HMDS a déjà été employé en présence de nombreux catalyseurs :

- Acides tels que l'acide chlorhydrique [26], l'acide paratoluènesulfonique ou l'acide trifluoroacétique [37]. Ces acides d'une part permettent de protonner l'HMDS et d'exalter sa réactivité vis à vis des nucléophiles [59], et d'autre part conduisent à la formation de sels qui catalysent également la réaction (cf. point suivant). Les inconvénients majeurs de tels catalyseurs sont un risque de dégradation accru des chaînes de polysaccharides (même si l'HMDS ou l'ammoniac qu'il libère peuvent capter ces acides) et la production de sels difficiles à éliminer.

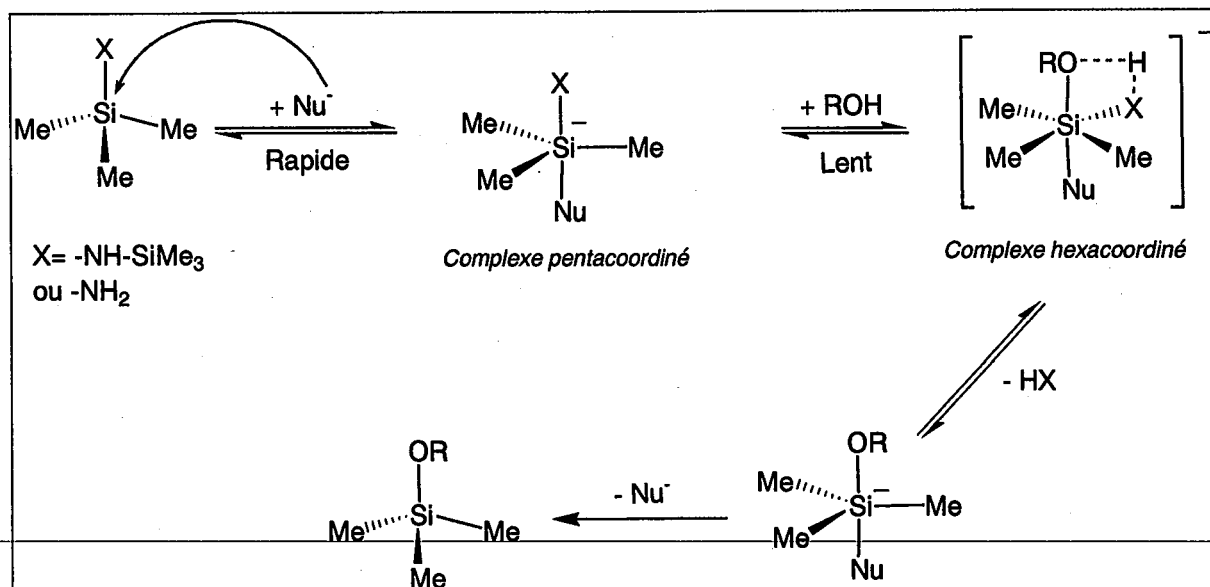


Schéma II-4 : Mécanisme de silylation en présence de catalyseurs nucléophiles [53]

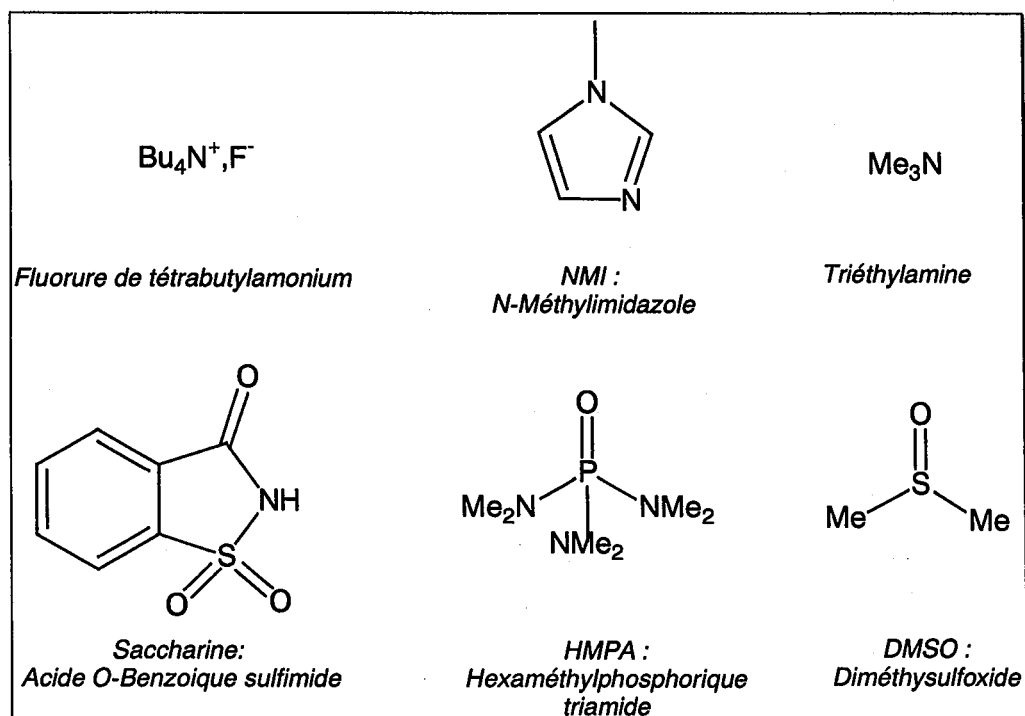


Figure II-7 : Formule des agents nucléophiles employés.

- Sels d'ammoniums [45, 60, 61].
- TMSCl employé en moindre proportion [14, 16, 60, 62] voire en quantités catalytiques [24, 59]. Dans ce cas, l'HMDS, ainsi que l'ammoniac qu'il libère, neutralisent l'acide chlorhydrique produit par TMSCl. Pour expliquer l'activation de l'HMDS par le TMSCl, Nagy et coll. [44] proposent une première réaction entre le TMSCl et les fonctions alcool, qui génère de l'HCl. Cet acide réagit alors avec l'HMDS pour régénérer du TMSCl et produire de l'ammoniac (Schéma II-3).

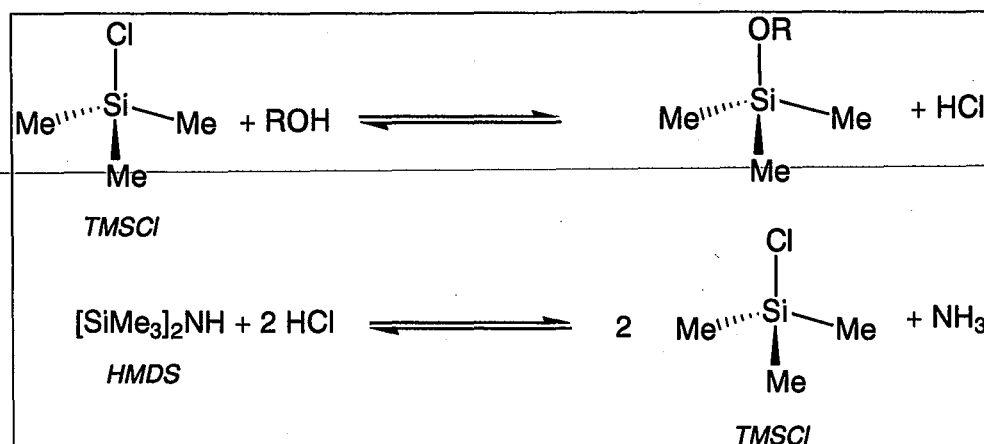


Schéma II-3 : Silylation avec un mélange silylant HMDS/TMSCl selon le mécanisme proposé par Nagy et coll. [44]

- Agents nucléophiles possédant un oxygène ou un azote enrichi en électrons [53, 61]. Dans ce cas, le catalyseur nucléophile est très réactif et forme un intermédiaire pentacoordiné avec l'agent silylant. Ce complexe, beaucoup plus réactif que l'agent silylant de départ, peut facilement réagir avec les fonctions alcool. Le mécanisme proposé par Corriu et coll. [53, 63-66] est présenté dans le Schéma II-4. Une large variété de nucléophiles a ainsi été testée : la N-méthylimidazole (NMI), l'hexaméthylphosphorique triamide (HMPA), la N-méthylpyrrolidinone (NMP) [28, 29], la saccharine [36, 61] ou encore des fluorures (introduits le plus souvent sous forme de Bu_4NF) [67] (Figure II-7). On peut aussi remarquer que le DMSO entre dans cette catégorie d'agents, même s'il n'est pas parmi les plus réactifs [44].

- Autres catalyseurs nucléophiles tels que l'iode [68] ou à base de phosphore [69, 70].

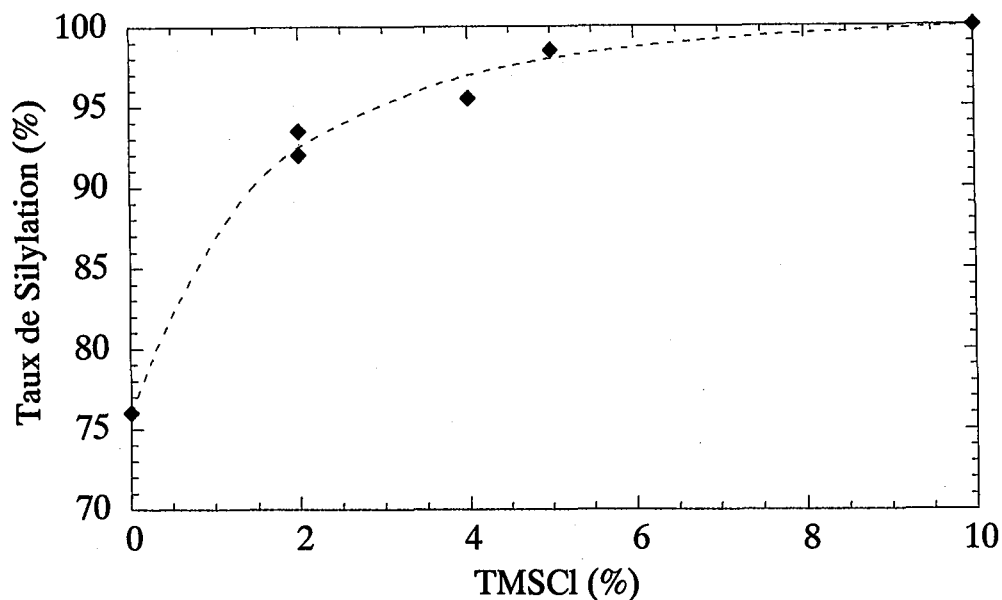


Figure II-8 : Influence de la quantité de TMSCl sur le taux de substitution. Expériences réalisées sur D_{40}^2 , avec 2 moles de réactif silylant par mole de fonction OH (x % mol. TMSCl et $(100-x)$ % mol. HMDS dans le mélange silylant), pendant 20h, à 50°C dans le DMSO.

Dextrane Initial	Agent Silylant (mol/mol OH)	Taux de Silylation (%) ^a	DS ^b
D_{40}^1	HMDS (2)	56	1,7
	HMDS (2) + NEt ₃ (0,1)	79	2,4
	HMDS (1,8) + TMSCl (0,2) ^c	91	2,0
D_{40}^2	HMDS (2)	76	2,3
	HMDS (1,8) + TMSCl (0,2) ^c	100	3,0
	HMDS (2) + HMPA (0,1)	86	2,6
	HMDS (2) + NMI (0,1)	77	2,3
	HMDS (2) + Saccharine (0,1)	90	2,7
	HMDS (2) + Bu ₄ NF (0,1)	88	2,8

Tableau II-4 : Silylation par l'HMDS. Effets de l'addition de différents catalyseurs sur le taux de silylation et le degré de substitution (DS). Chaque réaction de silylation a été à 50°C pendant 20h, dans le DMSO.

a : calculé à partir de l'équation (II-1) (cf. paragraphe VII.3.2.2.).

b : calculé à partir de l'équation (II-3) (cf. paragraphe VII.3.2.2.).

c : correspond à 2 mol/mol OH d'un mélange silylant (10% mol. TMSCl + 90 % mol. HMDS).

Le TMSCl, catalyseur couramment employé, a été testé dans notre étude. L'influence de la quantité de TMSCl est illustrée sur la Figure II-8. Comme le Schéma II-3 le suggérait, la réactivité du mélange HMDS/TMSCl croît avec la proportion de TMSCl dans le mélange. Ainsi, dans le cas du dextrane D_{40}^2 , les taux de substitution peuvent être modulés de 76 à 100%, lorsque la quantité molaire de TMSCl utilisée varie de 0 à 10%.

Pour éviter les catalyseurs acides qui risqueraient d'entraîner une dégradation du dextrane, nous avons également testé l'action de divers agents nucléophiles courants et commerciaux. Les résultats sont regroupés dans le Tableau II-4. Si tous les nucléophiles testés (NEt_3 , HMPA, NMI, Bu_4NF , saccharine) ont permis d'obtenir des taux de silylation supérieurs à celui obtenu lors des expériences réalisées avec l'HMDS seul, la NMI ne semble activer que faiblement la silylation (ceci est peut-être dû au fait que ce produit ait été employé sans aucune purification préalable). Contre toute attente, la triéthylamine s'est avérée très efficace (mais son activité n'a pas toujours été reproductible), alors qu'elle est décrite comme peu active [53].

En conclusion, si l'HMDS est utilisé seul, un taux de silylation de 90% peut être atteint soit à 80°C après 40h, soit à 50°C après 20h en ajoutant du toluène après précipitation effective du dextrane partiellement silylé. 90% de silylation sont également obtenus à 50°C après 20h en utilisant Bu_4NF ou la saccharine comme catalyseurs. L'utilisation de TMSCl comme catalyseur peut permettre d'obtenir la silylation totale du dextrane D_{40}^2 . Dans tous les cas, la dégradation éventuelle de la chaîne de dextrane restera à vérifier.

VI. AUTRE AGENT SILYLANT :

LA N,O-BIS(TRIMETHYLSILYL)ACETAMIDE (BSA)

Un autre agent silylant aussi courant et aussi peu coûteux que l'HMDS a également été testé. Il s'agit de la N, O- Bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA). La BSA a été choisie en raison de sa très grande réactivité [48] et parce qu'elle ne produit aucune réaction secondaire avec le DMSO ; contrairement à la N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) [71]. Bien que la BSA puisse être représentée sous deux formes tautomères en équilibre comme on le

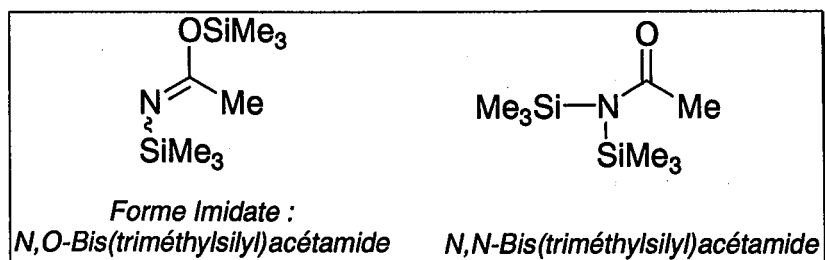
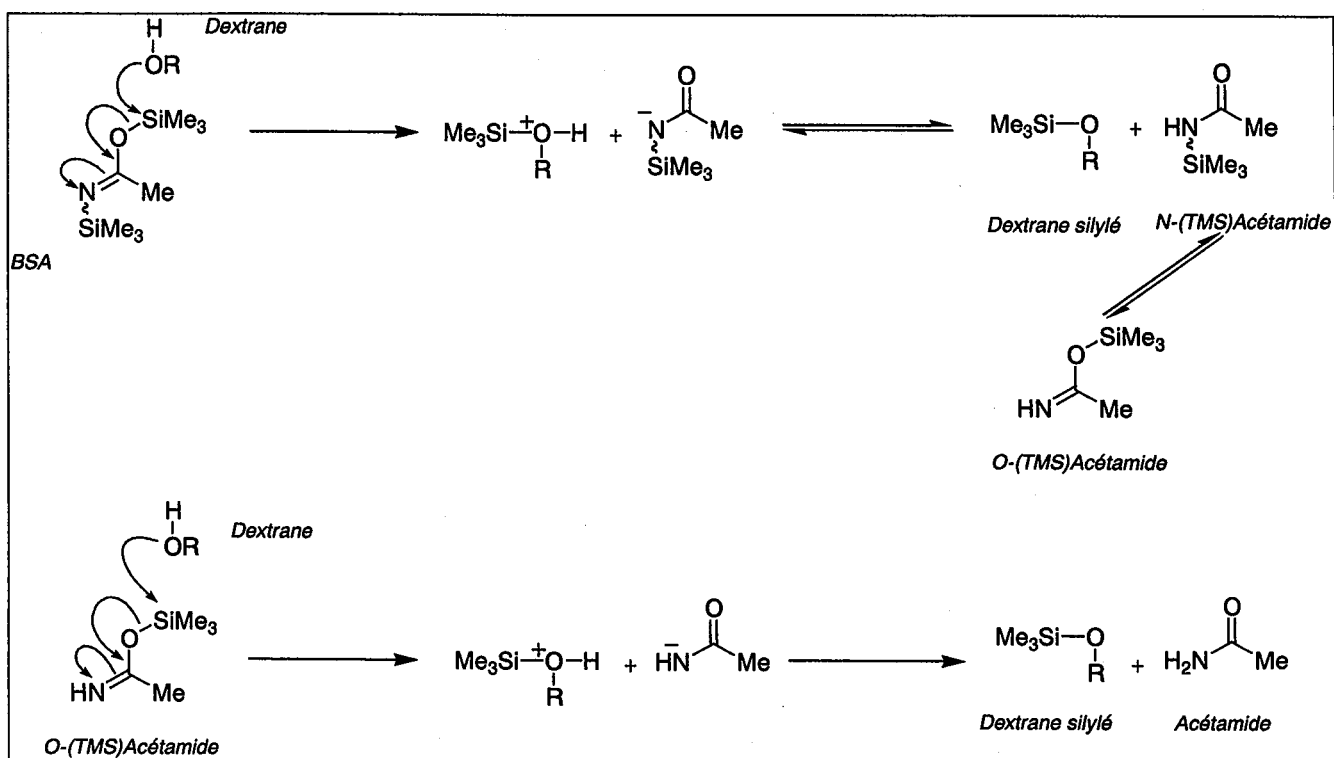


Figure II-9 : Représentations de la Bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA).



voit sur la Figure II-9, diverses études RMN ont montré que sa forme prédominante était la forme imidate (N,O-triméthylsilylée) [72], les deux groupements silylés s'interchangeant très rapidement (Schéma II-5).

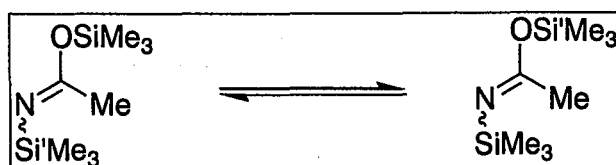


Schéma II-5 : Echange intramoléculaire sous la forme Imidate

La BSA est un « amphotère » : elle peut soit se comporter comme une base faible et accepter des protons, soit réagir avec des nucléophiles [73]. En illustration de ce dernier cas, la BSA peut réagir avec des fonctions hydroxyle du dextrane. Le mécanisme proposé est présenté dans le Schéma II-6 : la fonction alcool du polysaccharide attaque le groupement triméthylsilyle porté par l'oxygène de la BSA [72]. Après une étape de déprotonation, la formation du silyléther est observée et la (TMS)acétamide est générée. Selon les conditions opératoires, cette monosilylamide peut également agir comme agent silylant selon un mécanisme analogue [73]. Les seuls produits secondaires formés au cours de cette silylation (acétamide et (TMS)-acétamide) sont neutres et relativement faciles à éliminer.

Les résultats des diverses expériences que nous avons réalisées avec la BSA sont présentés dans le Tableau II-5 et la Figure II-10. La BSA permet non seulement d'augmenter notablement les taux de silylation dès 50°C (par rapport aux expériences analogues réalisées avec l'HMDS), mais également d'accroître rapidement la cinétique de réaction sur le dextrane ; ce qui permet de s'affranchir, du moins en partie, des problèmes de solubilité des dextrans partiellement silylés. En effet, les expériences avec la BSA ont volontairement été poursuivies pendant 20 h de façon à pouvoir comparer leurs résultats avec ceux obtenus lors de l'utilisation d'HMDS ; mais la réaction est probablement finie en moins d'une heure (le dextrane modifié s'insolubilise très rapidement dans le milieu et une gélification est observée). Augmenter la température de 50 °C à 80°C ne permet pas d'éviter la gélification du milieu, ce qui se traduit par des taux de silylation identiques, comme on peut le voir sur le Tableau II-5. En revanche, l'emploi d'un mélange DMSO/toluène dès le début de la réaction, permet d'obtenir à 80°C un dextrane totalement silylé, en employant seulement une mole de BSA par mole de fonction OH.

Dextrane Initial	Température (°C)	Agent silylant	Rapport molaire Agent silylant/OH	Taux de Silylation (%) ^a	DS ^b
D ₄₀ ¹	50	HMDS	2	56	1,7
	50	BSA	2	86	2,6
D ₄₀ ²	50	HMDS	2	76	2,3
	50	BSA	2	98	2,9
	50	BSA	1	90	2,7
	80	BSA	1	91	2,7
	80 ^c	BSA	1	100	3,0

Tableau II-5 : Comparaison des deux agents silylants HMDS et BSA. Expériences réalisées pendant 20h.

a : calculé à partir de l'équation (II-1) (cf. paragraphe VII.3.2.2.).

b : calculé à partir de l'équation (II-3) (cf. paragraphe VII.3.2.2.).

c : mélange DMSO/Toluène (2/1 : v/v).

Deux points sont à retenir :

- Les taux de silylation peuvent être modulés en fonction de la quantité de BSA employée (Figure II-10).

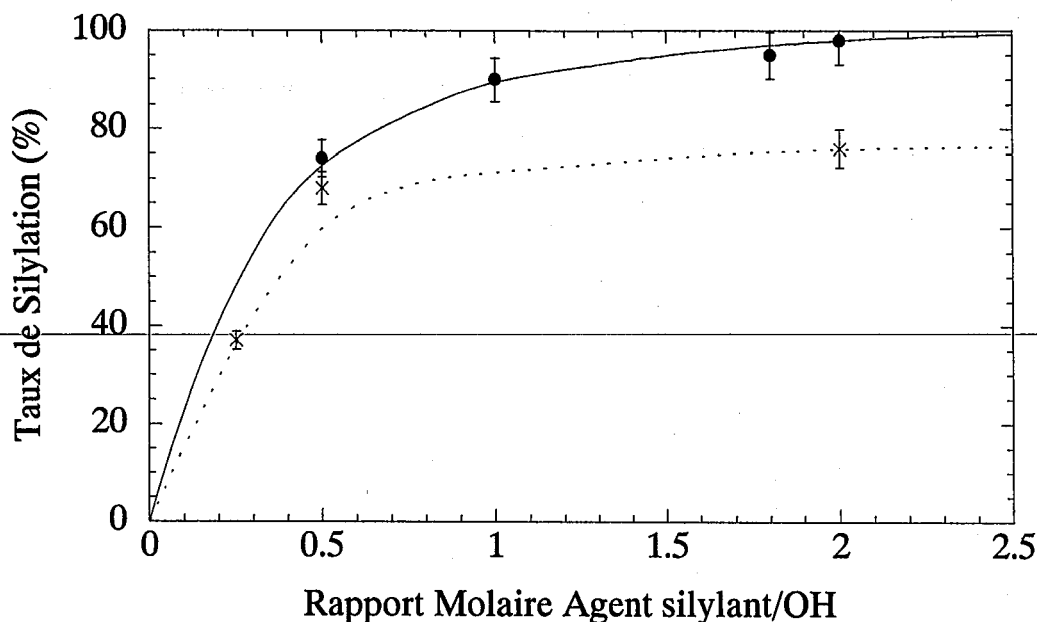


Figure II-10 : Influence de la quantité d'agent silylant (moles de réactif par mole de fonctions OH) sur le taux de substitution. Expériences réalisées sur D_{40}^2 , pendant 20h, à 50°C dans le DMSO :
 (●) avec la BSA
 (×) avec l'HMDS.

- Après 20h de réaction, une silylation complète du dextrane peut être observée soit dès 50°C dans le DMSO pour un rapport molaire BSA/OH=2 ($\Leftrightarrow$ 4 équivalents de groupements silyle par rapport aux fonctions hydroxyle), soit à 80°C avec BSA/OH=1 dans un mélange DMSO/toluène.

Pour conclure, la BSA se révèle comme un agent silylant particulièrement efficace. Mais son emploi pour silyler la chaîne de dextrane, comme celui de l'HMDS, ne sera validé qu'après avoir vérifié que celui-ci n'entraîne pas une dégradation du polysaccharide.

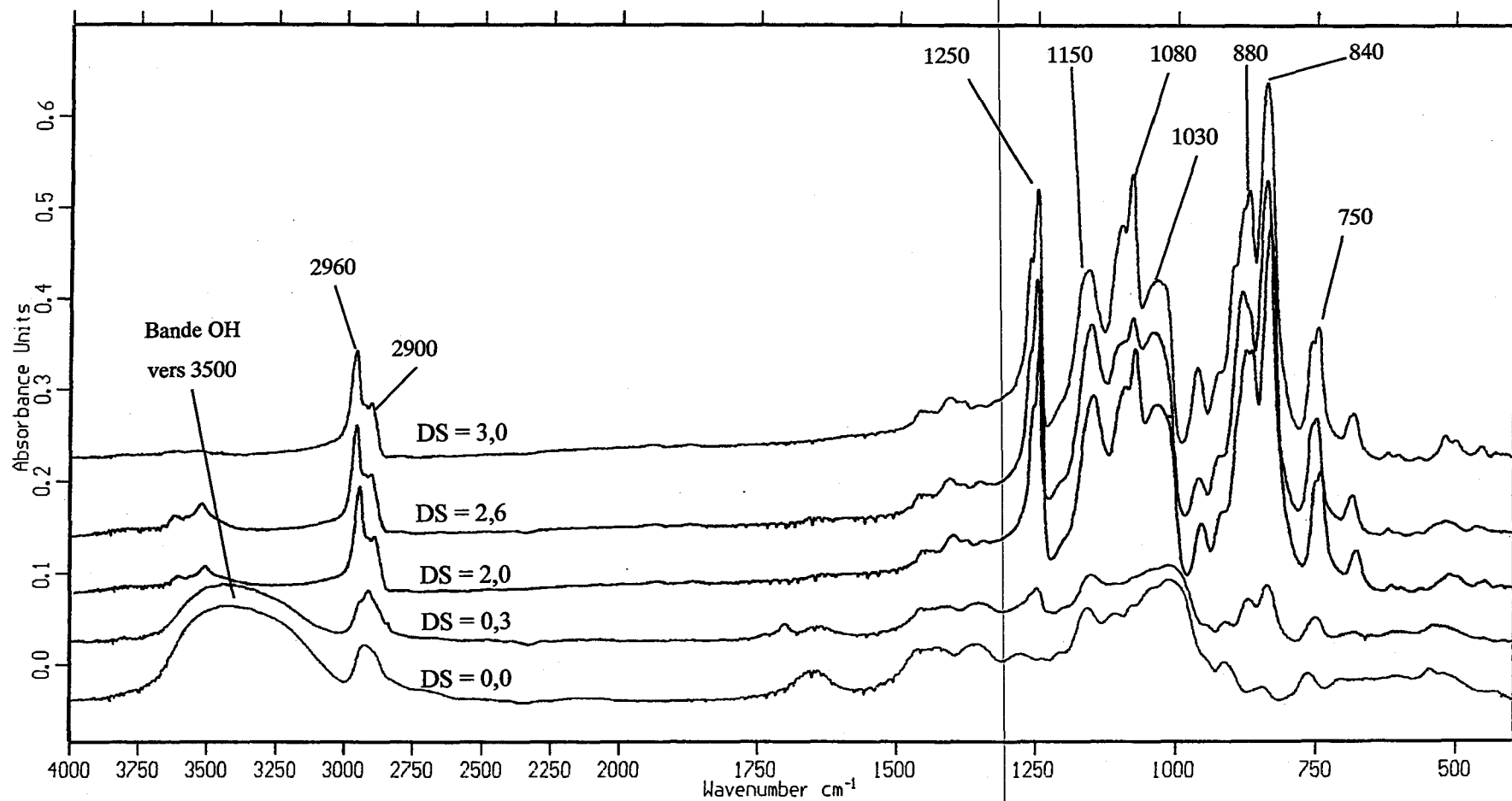


Figure II-11 : Spectrogrammes Infra-Rouge de divers dextrans silylés avec des degrés de substitutions variables (pastilles KBr).

VII. ANALYSES STRUCTURALES DES DEXTRANES SILYLES ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Diverses études ont été menées de façon à mieux caractériser les dextrans silylés obtenus.

VII.1. Analyse IRTF

Conformément aux données de la littérature [16, 33, 74], six nouvelles bandes caractéristiques des groupements SiMe_3 sont mises en évidence sur les spectres IRTF des dextrans partiellement silylés (Figure II-11) :

- A 750, 840 et 1250 cm^{-1} se situent les bandes de vibration correspondant à la liaison Si-CH_3 .
- Les bandes situées à 880, 1030 et 1150 cm^{-1} sont quant à elles caractéristiques des liaisons (Si-O-C), ce qui prouve leur présence sur les unités glucose.

D'autre part, la bande correspondant aux fonctions alcool située vers 3400-3500 cm^{-1} , disparaît progressivement lorsque le degré de substitution du polymère augmente. L'absence de cette bande permet de vérifier que la silylation du dextrane est quantitative.

VII.2. Propriétés Thermiques

Les dextrans, qu'ils soient partiellement ou totalement silylés, ont été analysés par Calorimétrie Différentielle à Balayage Modulée (MDSC). Cette technique permet de séparer les contributions des flux de chaleur provenant de phénomènes réversibles (comme ceux caractéristiques des températures de transition vitreuse (T_g) par exemple), de ceux issus de phénomènes irréversibles (dus à l'histoire de l'échantillon et/ou consécutifs aux réarrangements des chaînes ...) (cf. Partie IV expérimentale).

Contrairement au dextrane, il apparaît une T_g sur les thermogrammes des dextrans silylés à plus de 50% (Figure II-12). Cette température varie entre 119 et 140°C en fonction du taux de silylation. Il faut cependant remarquer que cette T_g est très sensible aux traces de solvants résiduels dans le polymère, et tout particulièrement à celles de DMSO. Le DMSO, qui peut être totalement éliminé par « évaporation/précipitation du dextrane silylé par l'eau froide/séchage sous vide », joue alors le rôle de plastifiant, ce qui contribue à diminuer la valeur de cette T_g .

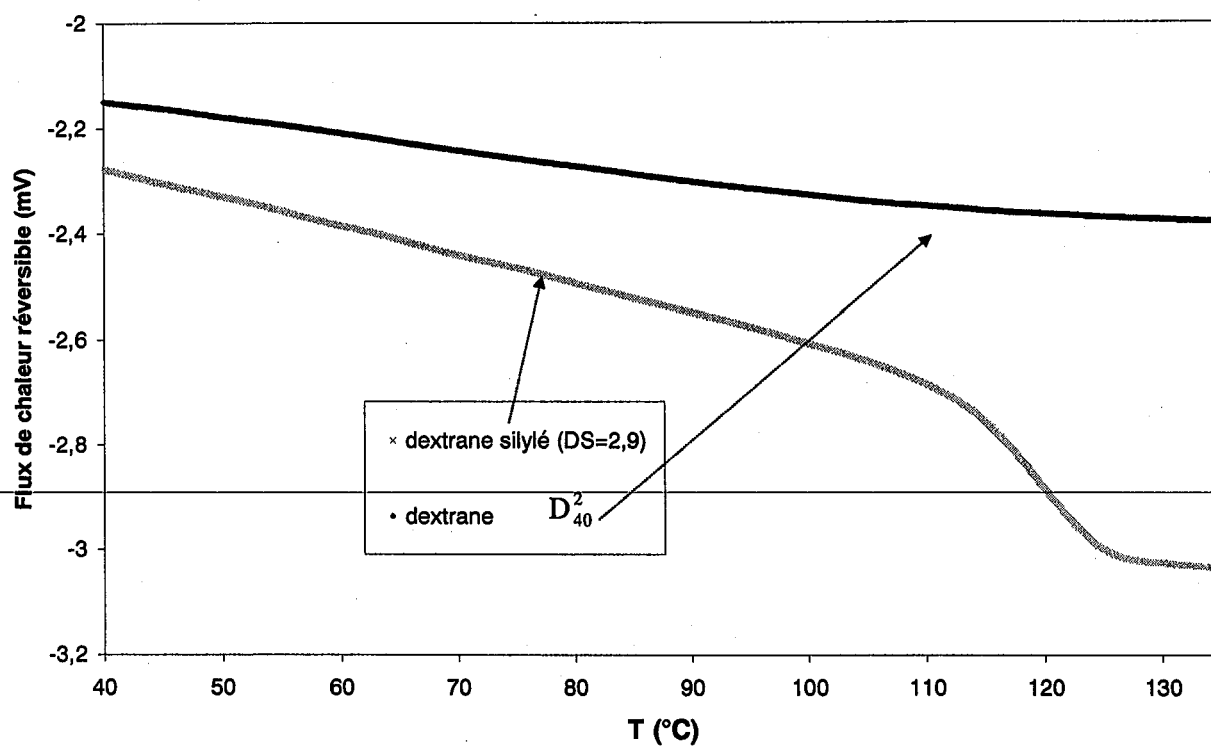


Figure II-12 : Thermogrammes du dextrane natif et d'un dextrane silylé (DS=2,9)

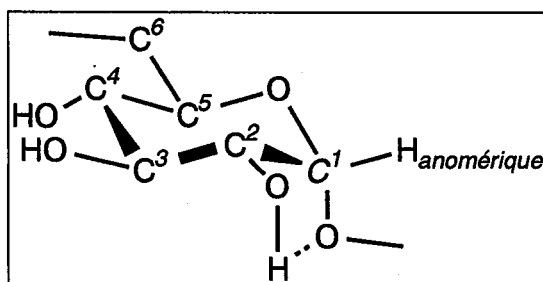


Figure II-14 : Unité Anhydroglucose répétitive du dextrane

VII.3. Analyse RMNVII.3.1. *Analyses RMN du dextrane*

Le spectre RMN ^1H du dextrane dans le DMSO- d_6 n'est pas souvent détaillé dans la littérature [75, 76]. Généralement, le pic du Hanomérique (Figures II-13 et II-14) est situé vers 4,7 ppm et ceux des fonctions alcool sont désignés comme les trois pics de part et d'autre de celui du Hanomérique. Les 6 hydrogènes glucosidiques résonnent sous le massif de la zone [2,9-3,9] ppm. Cependant, la position exacte de chaque hydrogène (glucosidique ou hydroxylique) n'était pas connu jusqu'à récemment [77, 78].

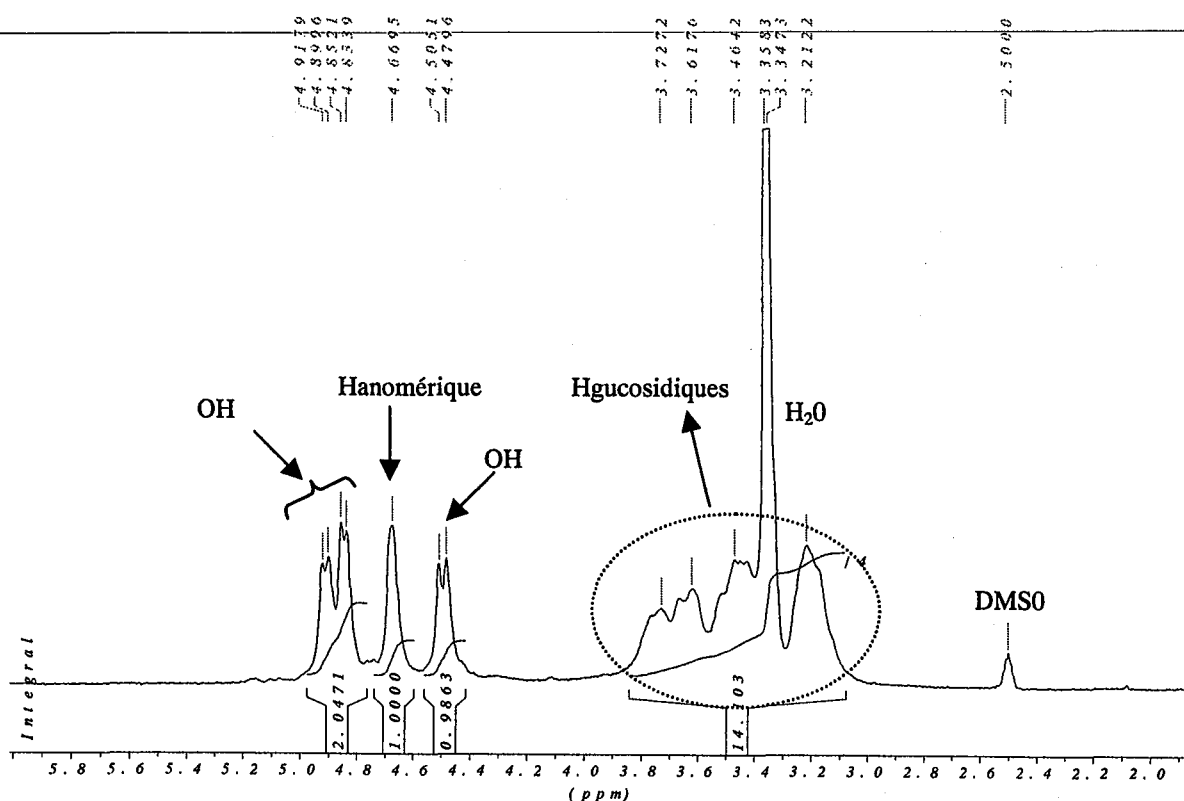


Figure II-13 : Spectre RMN ^1H du dextrane (DMSO- d_6) - Attribution Globale.

Afin de réaliser des analyses détaillées des spectres RMN ^1H des dextrans partiellement silylés, ces informations nous ont été indispensables, notamment en ce qui concerne la position des différentes fonctions alcool.

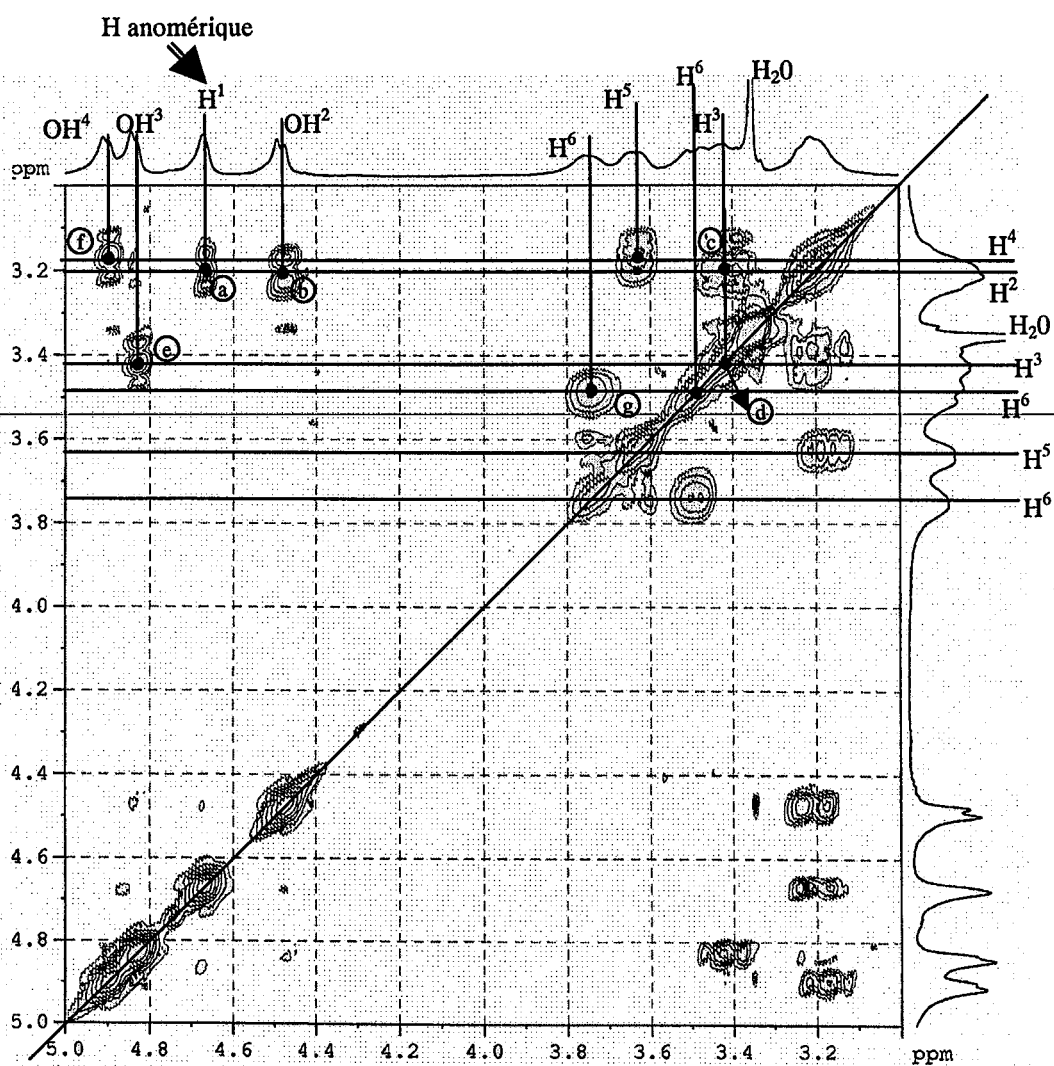


Figure II-15 : Spectre Cosy 45° du Dextrane D_{40}^2 (DMSO- d_6)

H^x = Hydrogène porté par le carbone $n^\circ x$

OH^x = fonction hydroxyle portée par le carbone $n^\circ x$ (cf. Figure II-14).

Dans ce but, une étude préliminaire en RMN 2D, de type $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY 45° (Figure II-15), a été effectuée sur le dextrane (cf. *Partie IV Expérimentale*). Ce type d'analyse fait apparaître des massifs correspondant aux couplages entre des hydrogènes voisins. A partir de l'attribution globale du spectre RMN ^1H (Figure II-13) et du positionnement connu du Hanomérique, il est alors possible de remonter, de proche en proche, au positionnement des pics des différents hydrogènes glucosidiques et hydroxyliques. Par exemple, la tache a sur le spectre COSY 45° atteste du couplage entre le Hanomérique et le H glucosidique porté par le carbone n°2 voisin (H^2). Les taches b et c permettent alors d'identifier l'hydrogène hydroxylique porté par le carbone n°2 (OH^2) et l'hydrogène glucosidique du carbone n°3 (H^3)....

Une analyse RMN 2D, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ - HMQC (Hétéronucléaire Multiple Quantum Cohérence ; Figure II-16), a ensuite été réalisée sur le dextrane. Ce type d'analyse met en évidence les corrélations entre un hydrogène et le carbone qui le porte. A partir de l'étude précédente du spectre RMN ^1H , les différents pics du spectre ^{13}C ont été attribués (Figure II-16). Les résultats sont en accord avec la littérature (Spectres ^{13}C dans D_2O [1, 56-58, 79] ou DMSO-d_6 [6, 7]).

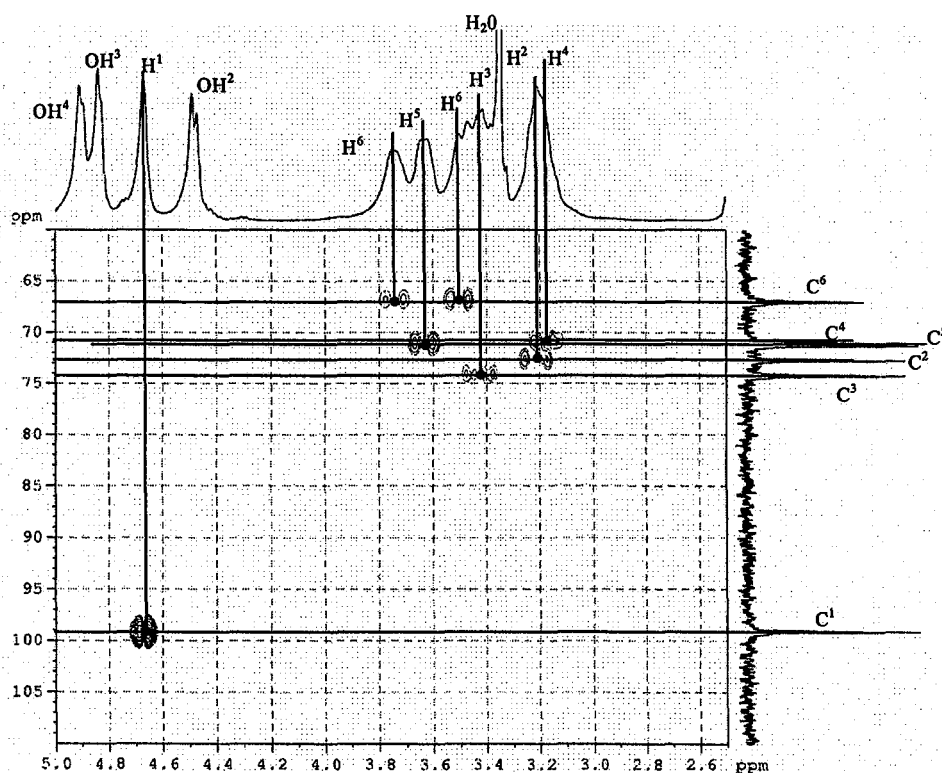


Figure II-16 : Spectre HMQC du Dextrane D_{40}^2 (DMSO-d_6).

H^x = Hydrogène porté par le carbone n°x

OH^x = fonction hydroxyle portée par le carbone n°x (cf. Figure II-14).

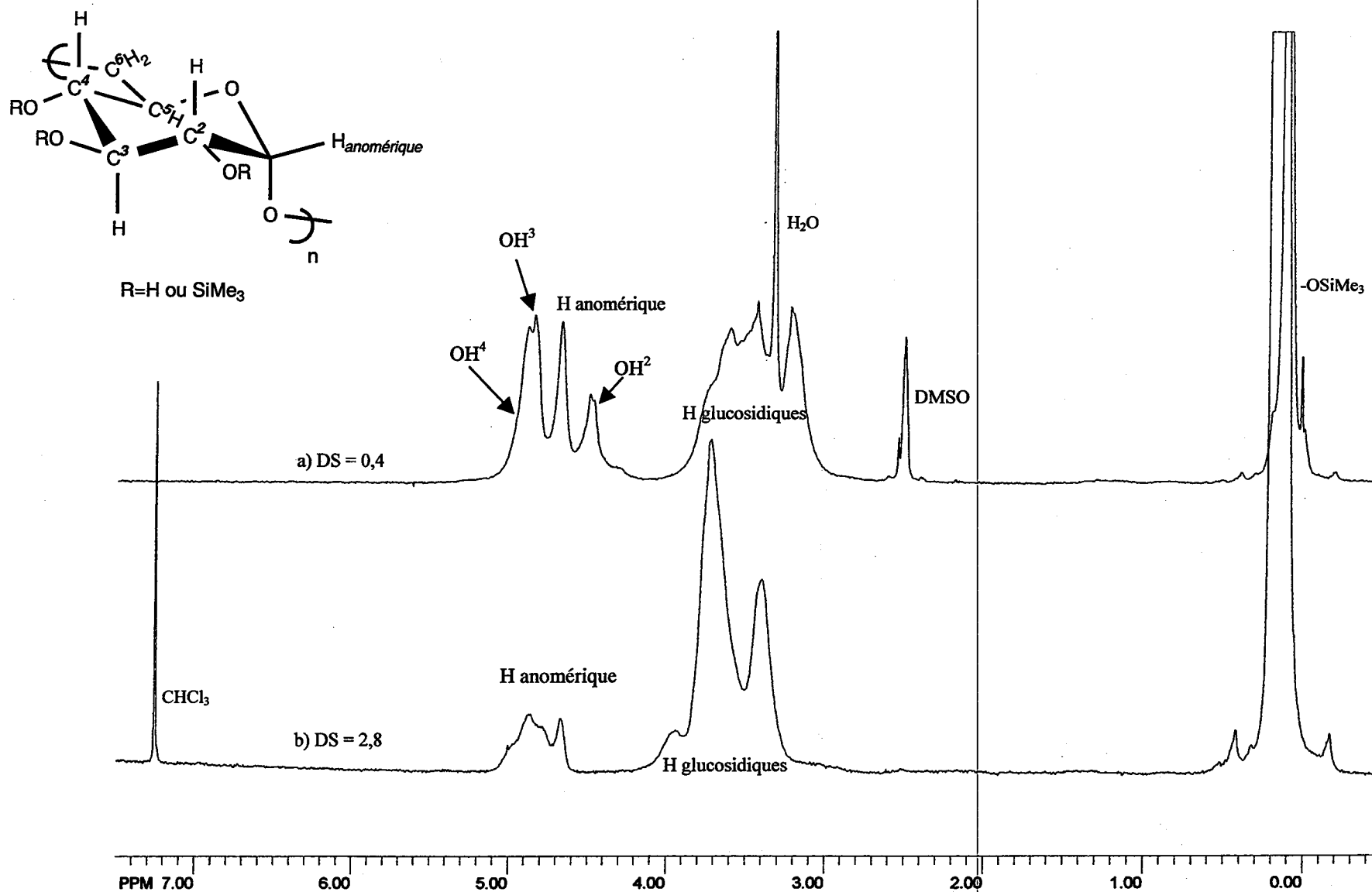


Figure II-17 : Spectres RMN 1H des Dextranes Silylés – a) DS=0,4- ($DMSO-d_6$), b) DS=2,8- ($CDCl_3$)

VII.3.2. Détermination des taux de silylation des dextranses silylés

VII.3.2.1. Spectres RMN ^1H

Les taux de substitution des dextranses partiellement silylés sont déterminés par RMN ^1H . Les dextranses modifiés sont solubles dans le DMSO jusqu'à des taux de silylation d'environ 50%, et dans le chloroforme ou le toluène au delà. L'analyse a donc été effectuée soit dans le DMSO- d_6 ou dans le CDCl_3 selon le degré de substitution des dextranses partiellement silylés. Il faut cependant remarquer que les dextranses très faiblement silylés peuvent également être analysés dans D_2O . Les types de spectres obtenus sont donnés sur la Figure II-17.

VII.3.2.2. Zone du H anomérique

Dans le cas des spectres des dextranses partiellement silylés, réalisés dans le DMSO- d_6 , le pic correspondant au H anomérique est entouré de ceux représentant les différents hydroxyles résiduels [75], comme précédemment dans le cas du dextrane. Cette hypothèse est confirmée par ajout de D_2O (disparition des pics correspondant aux hydroxyles). L'attribution exacte des différents hydroxyles, présentée à la Figure II-17, est basée sur celles effectuées pour le dextrane (Paragraphe VII.3.1).

Dans le cas des spectres réalisés dans CDCl_3 , le multiplet centré à 4,7 ppm correspond uniquement au proton anomérique de différents types d'unités glucose (unités glucose trisilylée, disilylée en position 2 et 3, disilylée en position 2 et 4 ... *d'où les différents pics perceptibles sous ce multiplet*). Ce massif n'est pas représentatif des hydroxyles résiduels, en effet, un ajout de D_2O ne modifie ni l'aire ni la forme du multiplet.

VII.3.2.3. Taux de silylation

Méthode Directe

Les taux de silylation peuvent être facilement calculés à l'aide des équations (II-1) et (II-2) qui font intervenir les aires des pics correspondant aux groupements silylés (A_{OSiMe_3}) situés entre 0,1 et 0,2 ppm, au proton anomérique ($A_{\text{H anomérique}}$) centré à 4,7 ppm ou ceux des 6 protons glucosidiques ($A_{\text{H glucosidiques}}$) situés entre 3,2 et 4,2 ppm dans CDCl_3 ou entre 3 et 4 ppm dans le DMSO- d_6 .

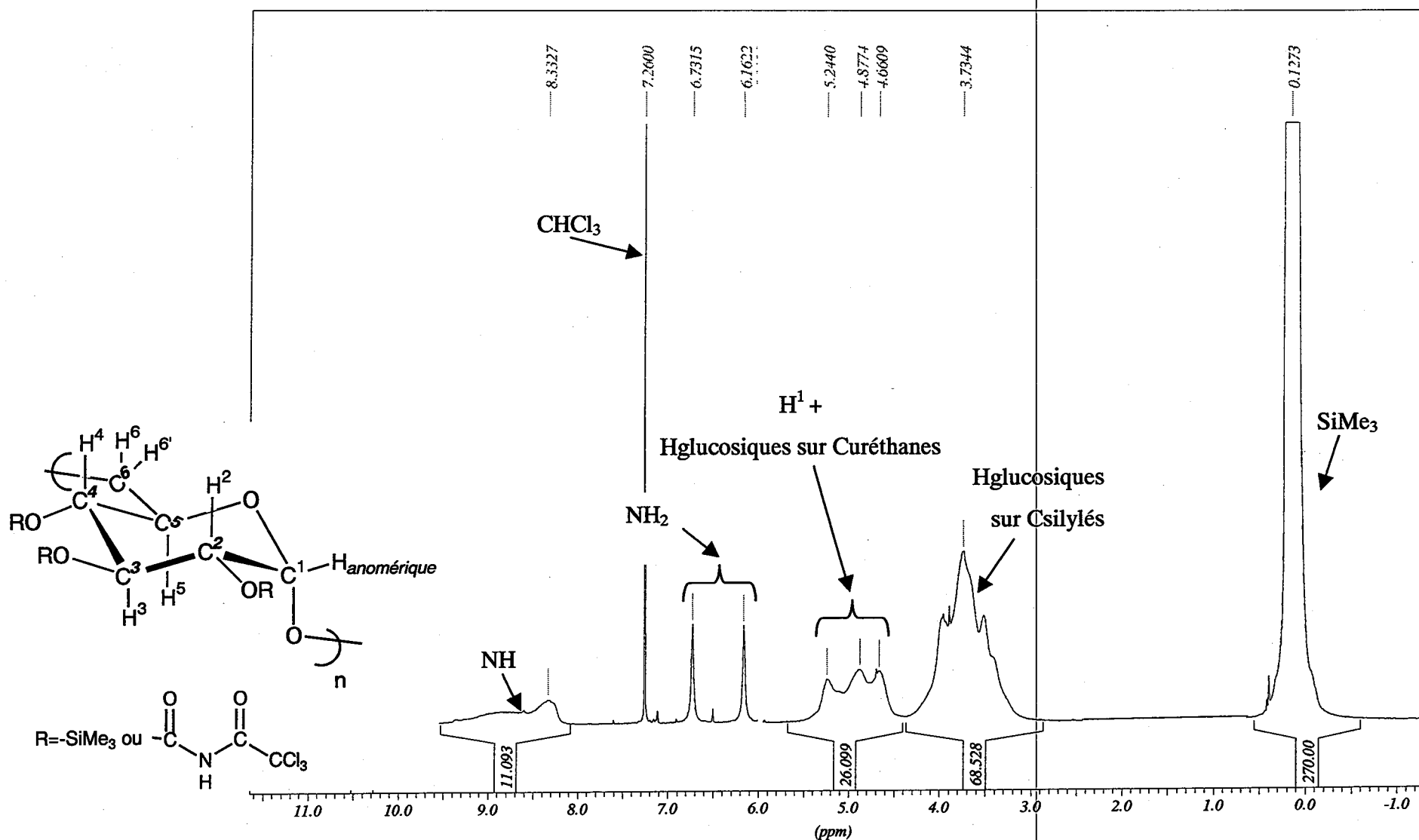


Figure II-18 : Spectre RMN ¹H d'un dextrane partiellement silylé après réaction avec le trichloroacétylisocyanate (CDCl₃, 74% de silylation)

$$\text{Taux de silylation (\%)} = \frac{A_{\text{OSiMe}_3}}{A_{\text{H anomerique}}} \times \frac{100}{27} \quad (\text{II-1})$$

ou

$$\text{Taux de silylation (\%)} = \frac{A_{\text{OSiMe}_3}}{A_{\text{H glucosidiques}}} \times \frac{6 \times 100}{27} \quad (\text{II-2})$$

Le degré de substitution (DS) peut alors être obtenu à partir du taux de silylation à l'aide de l'équation (II-3) :

$$\text{DS} = \frac{3 \times \text{Taux de silylation (\%)}}{100} \quad (\text{II-3})$$

Méthode Indirecte

Un dosage des OH résiduels par réaction avec un isocyanate permet de retrouver de façon indirecte les taux de silylation. La grande réactivité du trichloroacétylisocyanate permet de transformer la totalité des alcools résiduels en fonctions uréthane [80-82] (Schéma II-7).

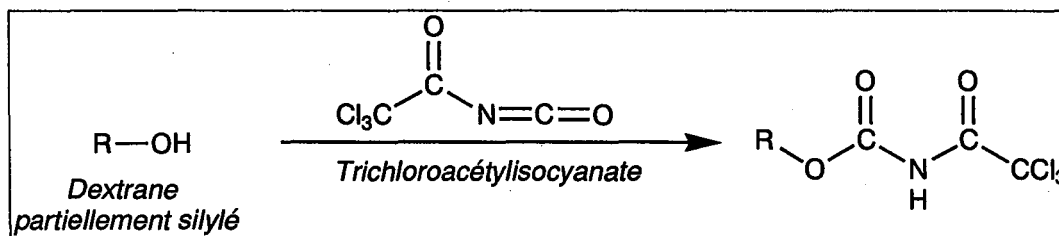


Schéma II-7 : Transformation des fonctions hydroxyle en fonctions uréthane

Le spectre RMN ^1H du dextrane partiellement silylé ayant réagi avec l'isocyanate (Figure II-18) laisse apparaître ces protons uréthane sous un massif centré vers 8,9 ppm [80-82]. De plus, nous pouvons remarquer deux pics (déplacements chimiques de 6,16 et 6,73 ppm) caractéristiques des fonctions amide, obtenues lors de la réaction entre le trichloroacétylisocyanate et les traces d'eau selon le Schéma II-8 [80].

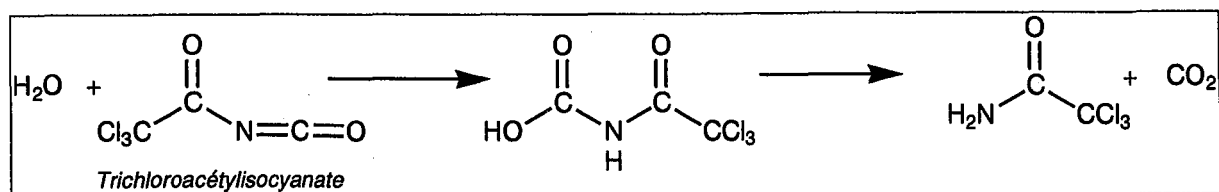


Schéma II-8 : Réaction de l'eau et du trichloroacétylisocyanate.

Enfin, il faut observer une modification des pics représentatifs des hydrogènes du dextrane (H glucosidiques + H anomérique). Comme l'attestent les aires de ces pics, le multiplet situé vers 5 ppm n'est plus représentatif seulement de l'hydrogène anomérique mais également des hydrogènes glucosidiques situés sur des carbones porteurs de fonctions uréthane. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été observé lors de l'acétylation du dextrane [83, 84] ; en effet, il a déjà été relaté que l'estérification de composés hydroxylés induit en effet un déplacement des pics de résonance des hydrogènes en α des fonctions alcool, ce qui conduit souvent à un éclatement des pics [80].

Le taux de modification des fonctions alcool du dextrane peut alors être obtenu à l'aide de l'équation (II-4), en prenant en compte la totalité des aires ($A_{\text{Hanomérique}} + A_{\text{Hglucosidiques}}$, zone [3-5,5] ppm) correspondant à l'ensemble des hydrogènes des cycles glucose (6H glucosidiques + Hanomérique).

$$\text{Taux Uréthane (\%)} = \frac{A_{\text{NH}}}{(A_{\text{Hanomérique}} + A_{\text{Hglucosidiques}})} \times \frac{7 \times 100}{27} \quad (\text{II-4})$$

Le taux de silylation peut être obtenu de façon indirecte comme le complément à 100% du taux de modification par les fonctions uréthane (équation (II-5)).

$$\text{Taux de Silylation (\%)} = 100 - \frac{A_{\text{NH}}}{(A_{\text{Hanomérique}} + A_{\text{Hglucosidiques}})} \times \frac{7 \times 100}{27} \quad (\text{II-5})$$

Le taux de silylation peut être également obtenu à partir du même spectre (dextrane silylé ayant réagi avec un isocyanate) selon la formule donnée dans l'équation (II-6).

$$\text{Taux de Silylation (\%)} = \frac{A_{\text{OSiMe}_3}}{(A_{\text{Hanomérique}} + A_{\text{H glucosidiques}})} \times \frac{7 \times 100}{27} \quad (\text{II-6})$$

Quelles que soient les équations utilisées (II-1), (II-2), (II-5), (II-6), des résultats comparables sont obtenus dès lors que les produits sont suffisamment purifiés.

VII.3.3. Ordre de réactivité des différents OH

Différentes analyses RMN (^{13}C , $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC, ou $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY 45°) ont été effectuées dans le but de déterminer la réactivité relative des fonctions alcool du dextrane.

La différence de réactivité des diverses fonctions alcool portées par les sucres ou par les polysaccharides est largement connue [85]. Elle provient d'effets à la fois stériques et électroniques mais dépend aussi des conditions réactionnelles. Pour ce qui concerne plus particulièrement le dextrane, la réactivité relative des fonctions hydroxyle a surtout été étudiée pour la préparation de dextrans partiellement acétylés. Cette réactivité varie selon la nature de l'agent d'acétylation [6, 7], mais dans de nombreux cas, l'alcool OH^2 (Figure II-14) semble le plus réactif. Cette réactivité exacerbée est due à la formation d'une liaison hydrogène entre cet alcool et l'oxygène voisin situé sur le carbone n° 1 (*les deux oxygènes sont en position cis*) qui augmente la basicité du OH^2 . La réactivité de l'alcool OH^3 est également importante du fait de son moindre encombrement stérique. Selon la nature du réactif employé, sa réactivité peut être supérieure à OH^4 , voire même à OH^2 : c'est le cas lors de l'emploi de réactifs très fortement encombrés [6, 79]. Au contraire, si les mécanismes sont fortement ioniques, la réactivité suit l'ordre suivant : $\text{OH}^2 > \text{OH}^4 > \text{OH}^3$ [6, 86].

Afin de mener à bien cette étude, nous avons posé différentes hypothèses :

- Toutes les unités anhydroglucoses du dextrane sont équi-accessibles tout le long de la chaîne polysaccharide.
- L'effet des bouts de chaînes est négligeable.
- La substitution d'une fonction alcool ne modifie pas la réactivité des fonctions hydroxyle adjacentes.

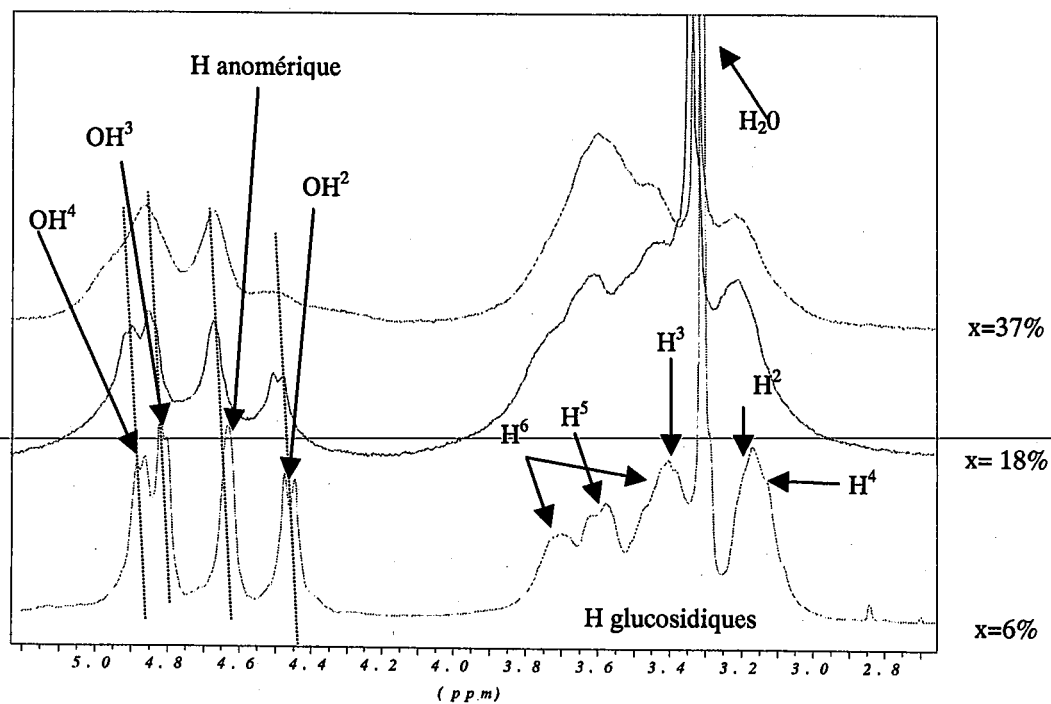


Figure II-19 : Spectres RMN ^1H de différents dextrans silylés.
 $6\% < x = \text{taux de silylation} < 40\%$ ($\text{DMSO}-d_6$).

VII.3.3.1. Analyse des dextrans faiblement silylés (dans DMSO- d_6)

Une étude comparative de plusieurs spectres RMN ^1H de différents dextrans faiblement silylés (Figure II-19, taux de silylation < 40%) a été effectuée. Il en ressort que le déplacement chimique de chaque pic dans la zone [4-5] ppm croît avec le taux de silylation. L'attribution de chaque pic est alors aisée, quel que soit le taux de modification. Une modification de la forme du massif correspondant aux H glucosidiques (zone [3-4] ppm) avec le taux de modification est observée. Comme nous l'avons déjà mentionné, la substitution sur un alcool modifie le déplacement chimique de l'hydrogène glucosidique du carbone correspondant, mais également ceux des carbones voisins ([6, 7, 86-88]), ce qui complique l'attribution exacte du massif compris entre 3 et 4 ppm. En effet comme nous le verrons l'attribution des H glucosidiques dans le cas d'un dextrane silylé à 6% est totalement différente de celle observée dans le cas d'un dextrane silylé à 99%.

L'évolution de l'aire des différents pics de la zone [4-5] ppm permet de conclure que OH^2 est le plus réactif et se substitue en premier (*son pic caractéristique diminue dès les plus faibles taux de silylation*). Il semble ensuite que OH^4 soit préférentiellement modifié par rapport à OH^3 .

VII.3.3.2. Analyse des dextrans hautement silylés (dans CDCl_3)

Des analyses RMN ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC, ou $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY 45°) effectuées sur divers dextrans hautement silylés ont permis d'attribuer les différents pics du spectre RMN ^{13}C (zone [50-110] ppm). Sur les Figures II-20 et II-21 sont représentés les spectres $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC et $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY 45° d'un dextrane silylé à 99%, à titre d'exemples.

Ces attributions sont cohérentes avec celles publiées pour des dextrans tribenzylés [58]. Ces résultats confirment la silylation quantitative des OH^2 à fort taux de silylation. En effet, toutes les unités glucose disylées sont silylées sur le OH^2 . La modification se poursuit progressivement sur les OH^4 puis sur les OH^3 . Même aux plus hauts taux de silylation, il apparaît cependant des unités glucose disylées, non silylées sur OH^4 . Ainsi, à des taux de protection élevés, il reste encore des fonctions OH^4 non protégées alors qu'une partie des fonctions OH^3 est déjà silylée.

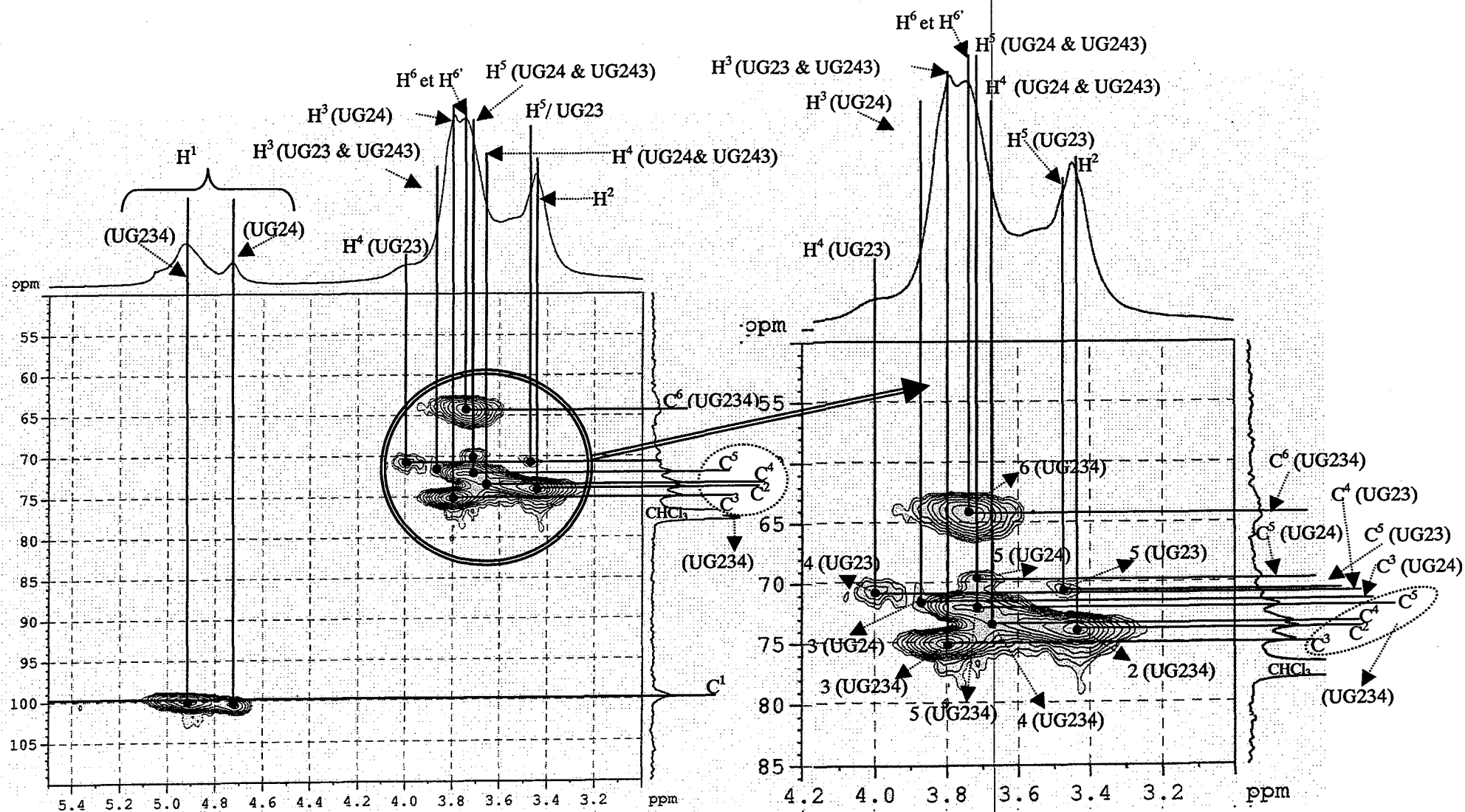


Figure II-21 : Spectre $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC d'un dextrane silylé à 99% (CDCl_3).

H^x (UGXY(Z)) = hydrogène porté par le carbone $n^\circ x$ et situé sur une unité glucose silylée sur ses fonctions alcool X,Y, (voir Z).

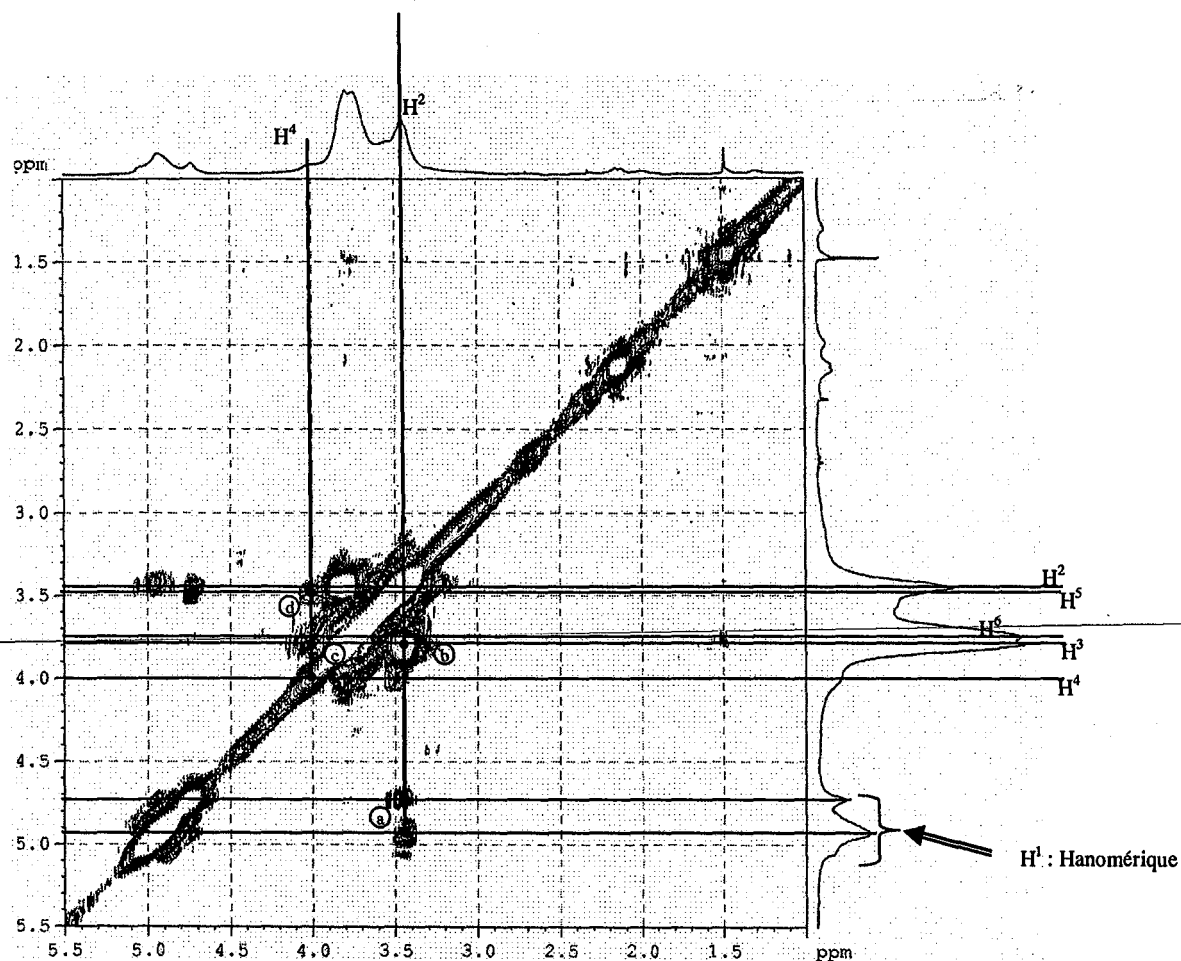


Figure II-20 : Spectre $^1\text{H}/^1\text{H}$ Cosy 45° d'un dextrane silylé à 99% (CDCl_3).

VII.3.3.3. Conclusions sur les sites préférentiels de silylation

L'ensemble de ces analyses permet de confirmer, pour les plus hauts taux de protection, une silylation quantitative des alcool OH^2 et une silylation partielle des OH^3 et OH^4 (ceux sur le carbone n°4 étant préférentiellement silylés).

VIII. CONCLUSIONS

La triméthylsilylation du dextrane T40, première étape de notre synthèse, a été effectuée dans le DMSO en présence de silazane (HMDS) ou de silylamide (BSA). Le dextrane est soluble dans le milieu à 50°C mais, quel que soit l'agent de silylation employé, précipite au fur et à mesure de sa silylation.

L'influence de divers paramètres (durée de la réaction, température, quantité d'agent silylant, nature du milieu réactionnel, lot de dextrane...) a été étudiée et leur optimisation nous permet de moduler à souhait le taux de silylation (et donc la proportion de fonctions alcool résiduelles) du dextrane.

Parmi toutes ces conditions, il apparaît que certaines permettent d'obtenir une silylation quasi-totale du dextrane D₄₀² à 50°C, dans le DMSO, au bout de 20 heures de réaction, avec 2 moles de réactif silylant par mole de fonction hydroxyle:

- emploi d'un mélange HMDS/TMSCl de proportion molaire 90/10.
- utilisation de BSA.
- emploi d'HMDS en combinant différents facteurs favorables (température, ajout de toluène comme co-solvant, emploi de 10 % de saccharine ou de Bu₄NF, voire augmentation de la durée de réaction à 60 heures).

Les dextrans modifiés ont ensuite été caractérisés. La silylation effective du dextrane a pu être vérifiée par analyse Infra-Rouge ou par l'apparition d'une température de transition vitreuse, inexistante dans le cas du dextrane. De plus, il a été possible en utilisant la RMN (¹H, ¹³C, Cosy 45°, HMQC) de déterminer l'ordre de réactivité des fonctions hydroxyle du dextrane vis à vis d'une silylation (OH² >> OH⁴ > OH³) et donc d'identifier la position des sites d'amorçage de la réaction de polymérisation du D,L-lactide qui sera faite par la suite. Cette polymérisation constitue la seconde étape de la synthèse et fait l'objet du chapitre suivant.

Quelles que soient les conditions utilisées, il reste à vérifier que cette première étape ne conduit pas à la dégradation du squelette polysaccharide. Cette étude sera décrite au chapitre III de cette même partie.

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Van Dijk-Wolthuis W. N. E., Tsang S. K. Y., Kettenes-Van Den Bosch J. J. and Hennink W. E.,
A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups : hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer.
Polymer, 1997. **38**: p. 6235-6242
2. Cadee J. A., De Kerf M., De Groot C. J., Den Otter W. and Hennink W. E.,
Synthesis, characterization of 2-(methacryloyloxy)ethyl-(di-) L-lactate and their application in dextran-based hydrogels.
Polymer, 1999. **40**: p. 6877-6881
3. De Jong S. J., De Smedt S. C., Demeester J., Wahls M. W. C., Van Nostrum C. F., Kettenes-Van Den Bosch J. J. and Hennink W. E.,
Novel self-assembled hydrogels by stereocomplex formation in aqueous solution of enantiomeric lactic acid oligomers grafted to dextran.
Macromolecules, 2000. **33**: p. 3680-3686
4. De Jong S. J., De Smedt S. C., Demeester J., Van Nostrum C. F., Kettenes-Van Den Bosch J. J. and Hennink W. E.,
Biodegradable hydrogels based on stereocomplex formation between lactic acid oligomers grafted dextran.
J. Control. Release, 2001. **72**: p. 47-56
5. Pertursson S.,
Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry.
J. Chem. Ed., 1997. **74**: p. 1297-1303
6. Arranz F. and Sanchez-Chaves M.,
¹³C Nuclear Magnetic Resonance spectral study on the distribution of the substituents in relation to the preparation method of partially acetylated dextran.
Polymer, 1988. **29**: p. 507-512
7. Arranz F., San Roman J. and Sanchez-Chaves M.,
¹³C NMR study of the selectivity in the modification of dextran with ethylchloroformate.
Macromolecules, 1987. **20**: p. 801-806
8. Bamford C. H., Middleton I. P. and Al-Lamee Kadem G.,
Studies of the esterification of dextran : Routes to bioactive polymers and graft copolymers.
Polymer, 1986. **27**: p. 1981-1985
9. Haddleton D. M. and Ohno K.,
Well-Defined oligosaccharide-terminated polymers from living radical polymerization.
Biomacromolecules, 2000. **1**: p. 152-156
10. Rouzes C., Gref R., Léonard M., Delgado A. D. and Dellacherie E.,
Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique.
J. Biomed. Mater. Res., 2000. **50**: p. 557-565
11. Wesslén K. B. and Wesslén B.,
Synthesis of amphiphilic amylose and starch derivatives.
Carbohydr. Polym., 2002. **47**: p. 303-311
12. Rogovin Z. A., Virnik A. D., Khomaikov K. P., Lalatina O. P. and Penenzhik M. A.,
Study of the synthesis of dextran derivatives.
J. Macromol. Sci.-Chem., 1972. **A6**: p. 569-593

13. Henglein F. A., Abelsnes G., Heneka H., Lienard K., Nakhre P. and Scheinnost K.,
Organosilyl derivative von dicarbonsäuren, oxycarbonsäuren und Zuckern.
Makromol. Chem., 1957. **24**: p. 1-24
14. Sweeley C., Bentley R., Makita M. and Wells W.,
Gas-liquid Chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances.
J. Am. Chem. Soc., 1963. **85**: p. 2497-2507
15. Elis W. C.,
Solvents for the formation and quantitative chromatography of trimethylsilyl derivatives of monosaccharides.
J. Chromatogr., 1969. **41**: p. 325-334
16. Hashimoto K., Imanishi S.-I., Okada M. and Sumitomo H.,
Chemical modification of the reducing chain end in dextrans and trimethylsilylation of its hydroxyl groups.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1991. **29**: p. 1271-1279
17. Ohya Y., Maruhashi S. and Ouchi T.,
Graft polymerization of L-lactide on pullulan through the trimethylsilyl protection method and degradation of the graft copolymers.
Macromolecules, 1998. **31**: p. 4662-4665
18. Ohya Y., Maruhashi S. and Ouchi T.,
Preparation of poly(lactic acid)-grafted amylose through the trimethylsilyl protection method and its biodegradation.
Macromol. Chem. Phys., 1998. **199**: p. 2017-2022
19. Hirai A., Yamaguchi K., Tamimaka T., Suzuki K. and Nakahama S.,
Polymerization of monomers containing functional groups protected by trialkyls groups, 1.
Macromol. Chem. Rapid. Commun., 1982. **3**: p. 941-946
20. Wuts G.,
Silylethers,
in *Protective groups in organic chemistry*, I. John WILEY & SONS, Editor.
1991, Wiley-Interscience: New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto. p. 10-142
21. Brook M. A.,
Replacing H with Si : silicon-based reagents,
in *Silicon in organic, organometallic, and polymer chemistry*, I. John WILEY & SONS, Editor.
2000, Wiley-Interscience: New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto. p. 189-255
22. Nelson T. D. and Crouch R. D.,
Selective deprotection of silylethers.
Synthesis, 1996: p. 1031-1069
23. Schuyten H. A., Weaver J. W., Reid J. D. and Jurgens J. F.,
Trimethylsilylcellulose.
J. Am. Chem. Soc., 1948. **70**: p. 1919-1920
24. Cooper G. K., Sandberg K. R. and Hinck J. F.,
Trimethylsilyl cellulose as precursor to regenerated cellulose fiber.
J. Appl. Polym. Sci., 1981. **26**: p. 3827-3836
25. Kricheldorf H. R.,
Miscellaneous modifications : silylation of polysaccharides in chap. 7 'Chemical modification of polymers and surfaces',
in *Silicon in polymer synthesis*, H.R. Kricheldorf, Editor.
1996, Springer: Paris. p. 440-443

26. Klebe J. F. and Schenectady N. Y.,
Process for producing trimethylsilylated cellulose.
Patent N° US 3 418 313, 1968
US, General Electric Compagny
27. Klebe J. F. and Schenectady N. Y.,
Process for producing soluble trimethylsilylated cellulose.
Patent N° US 3 418 312, 1968
US, General Electric Compagny
28. Klebe J. F. and Finkbeiner H. L.,
Silyl celluloses : a new class of soluble derivatives.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1969. 7: p. 1947-1958
29. Finkbeiner H. L., Klebe J. F. and Schenectady N. Y.,
Soluble silylated cellulose and method of preparing same.
Patent N° US 3 432 488, 1969
US, General Electric Compagny
30. Kerr R. W. and Hobbs K. C.,
Substitued Silyl Derivatives of Starch.
Ind. Eng. Chem., 1953. 45: p. 2542-2544
31. Keilich V. G., Tihlarik K. and Husemann E.,
Über die herstellung von tris-O- trimethylsilylpolysacchariden.
Makromol. Chem., 1968. 120: p. 87-95
32. Henglein F. A. and Scheinnost K.,
Substituierte Silylderivative des Pektins und der Glucose.
Makromol. Chem., 1956. 21: p. 59-73
33. Harmon R. E., De K. K. and Gupta S. K.,
New procedure for preparing trimethylsilyl derivatives of polysaccharides.
Carbohyd. Res., 1973. 31: p. 407-409(New procedure for preparing trimethylsilyl derivatives of polysaccharides)
34. Mormann W. and Wagner T.,
Silylation of cellulose and low-molecular-weight carbohydrates with hexamethyldisilazane in liquid ammonia.
Macromol. Rapid. Commun., 1997. 18: p. 515-522
35. Mormann W. and Wagner T.,
Silylation of cellulose with hexamethyldisilazane in liquid ammonia.
Carbohyd. Polym., 2000. 43: p. 257-262
36. Mormann W. and Demeter J.,
Silylation of cellulose with hexamethyldisilazane in liquid ammonia-First examples of completely trimethylsilylated cellulose.
Macromolecules, 1999. 32: p. 1706-1710
37. Kricheldorf H. R.,
Silylation and silylating agents,
in *Silicon in Polymer Synthesis*, H.R. Kricheldorf, Editor.
1996, Springer: Paris. p. Appendix b
38. Schuyten H. A., Weaver J. W. and Reid J. D.,
Silicon containing derivatives of cellulosic material.
Patent N° US 2 562 955, 1948
US, US State

39. Schempp W., Krause T., Seifried U. and Koura A.,
Herstellung hochsubstituierter trimethylcellulosen im system dimethylacetamid/lithium.
Papier, 1984. **38**: p. 607-610
40. Pawlowski W. P., Sankar S. S. and Gilbert R. D.,
Synthesis and solid ¹³C-NMR studies of some cellulose derivatives.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1987. **25**: p. 3355-3362
41. Mormann W., Demeter J. and Wagner T.,
Reaktionen von cellulose in amoniak-silylierung und desilylierung.
Papier, 1998. **12**: p. 725-730
42. Mormann W., Demeter J. and Wagner T.,
Partial silylation of cellulose with predictable degree of silylation- stoichiometric silylation with hexamethyldisilazane in ammonia.
Macromol. Chem. Phys., 1999. **200**: p. 693-697
43. Mormann W. and Demeter J.,
Controlled desilylation of cellulose with stoichiometric amounts of water in the presence of ammonia.
Macromol. Chem. Phys., 2000. **201**: p. 1963-1968
44. Nagy J., Borebély-Kuszmán A., Becker-Pálóssy K. and Zimonyi-Hegedüs E.,
Über den lösungsmittelleffekt bei der silylierung von cellulose mit hexamethyl-disilazan.
Makromol. Chem., 1973. **165**: p. 335-338
45. Green J. G.,
Trimethylsilylation of cellulose.
Patent N° US 4 390 692, 1983
US, The Dow Chemical Compagny
46. Birkofer L., Ritter A. and Benz F.,
Silylierung der glucose und einiger glucosederivate; eine gentiobiose-synthese über silylglucose.
Chem. Ber., 1964. **97**: p. 2196-2201
47. Brederick V. K., Strunk K. and Menrad H.,
Persilylierung von cellulose, amylose und polyvinylalkohol.
Makromol. Chem., 1969. **126**: p. 139-146
48. Klebe J. F.,
Silyl-proton exchange reactions.
Accounts Chem. Res., 1970. **3**: p. 299-305
49. De Belder A.,
Medical application of dextran and its derivatives.,
in 26- Polysaccharides in medicinal applications, S. Dumitriu, Editor.
1996, Marcel Dekker Inc.: New York, Basel, Hong-Kong. p. 505-523
50. Reichart C.,
Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators.
Chem. Rev., 1994. **94**: p. 2319-2358
51. Stein A., Wagenknecht W., Klemm D. and Phillip B.,
Verfahren zur herstellung von O-trialkylsilylcellulosen.
Patent N° DD 299 314, 1989
Est Germany, Friedrich-Schiller-Universität Jena
52. Mc Hard J. A., Servais P. C. and Clark H. A.,
Determination of silicon in organosilicon compounds.
Anal. Chem., 1948. **20**: p. 325-328

53. Brook M. A.,
Reaction mechanisms for nucleophilic substitution at silicon,
in *Silicon in organic, organometallic, and polymer chemistry*, I. John WILEY & SONS, Editor.
2000, Wiley-Interscience: New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto. p. 115-141
54. Cheetham N. W. H., Fiala-Beer E. and Walker G. J.,
Dextran Structural Details from High-Field Proton NMR Spectroscopy.
Carbohydr. Polym., 1991. **14**: p. 149-158
55. Seymour F., Knapp R., Bishop S. and Jeanes A.,
High temperature enhancement of ^{13}C NMR chemical shift of unusual dextrans, and correlation with methylation structural analysis.
Carbohydr. Res., 1979. **68**: p. 123-140
56. Seymour F., Knapp R. and Bishop S.,
Determination of the structure of dextran by ^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.
Carbohydr. Res., 1976. **51**: p. 179-194
57. Kobayashi M., Takagi S. and Mastuda K.,
Structural characteristics of water-soluble dextran from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1298.
Agric. Biol. Chem., 1985. **49**: p. 773-777
58. Granaire D. and Vignon M.,
Etude par ^{13}C et ^1H RMN du dextrane et de ses dérivés acétylés et benzylés.
Makromol. Chem., 1977. **178**: p. 2321-2333
59. Langer S., Connell S. and Wender I.,
Preparation and properties of trimethylsilyl ethers and related compounds.
J. Org. Chem., 1958. **23**: p. 50-58
60. Cossy J. and Pale P.,
Silylation sélective par l'hexaméthylidisilazane.
Tetrahedron Lett., 1987. **48**: p. 6039-6040
61. Bruynes C. and Jurriens T.,
Catalysts for silylations with 1,1,1,3,3,3-hexamethylidisilazane.
J. Org. Chem., 1982. **47**: p. 3966-3969
62. Speier J. L.,
The preparation and properties of (hydroxyorgano)-silanes and related compounds.
J. Am. Chem. Soc., 1952. **74**: p. 1003-1009
63. Corriu R. J. P., Dabosi G. and Martineau M.,
Kinetic and stereochemical evidence for nucleophilic assistance in the nucleophilic hydrolysis of chlorosilanes.
J. C. S. Chem. Com., 1977: p. 649-650
64. Corriu R. J. P., Dabosi G. and Martineau M.,
Mécanisme de l'hydrolyse des chlorosilanes catalysée par un nucléophile. Etude cinétique et mise en évidence d'un intermédiaire hexacoordiné.
J. Organomet. Chem., 1978. **150**: p. 27-38
65. Corriu R. J. P.,
Hypervalent species of silicon : structure and reactivity.
J. Organomet. Chem., 1990. **400**: p. 81-106

66. Bassindale A. R. and Stout T.,
The interaction of electrophilic silanes Me_3SiX ($X = ClO_4, I, CF_3SO_3, Br, Cl$) with nucleophiles, the nature of silylation mixture in solution.
Tetrahedron Lett., 1985. **26**: p. 3403-3406
67. Tanabe Y., Murakami M., Kitaichhi K. and Yoshida Y.,
Mild, effective and selective method for the silylation of alcohols using silazanes promoted by catalytic tetrabutylammonium Fluoride.
Tetrahedron Lett., 1994. **34**: p. 8409-8412
68. Karimi B. and Golshani B.,
Mild and highly efficient method for the silylation of alcohols using hexamethyldisilazane catalysed by iodine under nearly neutral reactions conditions.
J. Org. Chem., 2000. **65**: p. 7228-7230
69. D'sa A. B., Mcleod D. and Verkade J. G.,
 $P(MeNCH_2CH_2)_3N$: An Efficient Catalyst.
J. Am. Chem. Soc., 1996. **118**: p. 12832-12833
70. D'sa A. B., Mcleod D. and Verkade J. G.,
Nonionic Superbase-catalysed silylation of alcohols.
J. Org. Chem., 1997. **62**: p. 5057-5061
71. Little J.,
Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them.
J. Chromatogr. A, 1999. **844**: p. 1-22
72. El Gihani M. T. and Heaney H.,
The use of bis(trimethylsilyl)acetamide and bis(trimethylsilyl)urea for protection and as control reagents in synthesis.
Synthesis, 1998: p. 357-375
73. El-Khawaga A. M. and Hoffmann H. M. R.,
The reagent N, O-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) - A mild silyl transfer reagent.
J. prakt. Chem., 1995. **337**: p. 332-334
74. Noll W.,
Chemistry and technology of silicones. 1968, NY and London: Academic Press
75. Van Dijk-Wolthuis W. N. E., Kettenes-Van Den Bosch J. J., Van Der Kerk-Van Hoof A. and Hennink W. E.,
Reaction of dextran with glycidyl methacrylate : an unexpected transesterification.
Macromolecules, 1997. **30**: p. 3411-3413
76. Hashimoto K., Sugata T., Imanishi S.-I. and Okada M.,
Synthesis of saccharide-conjugated polyamides by quasi-living anionic polymerization of bicyclic lactam.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1994. **32**: p. 1619-1625
77. Tylianakis M., Syros A., Dais P., Taravel F. R. and Perico A.,
NMR study of the rotational dynamics of linear homopolysaccharides in dilute solutions as a function of linkage position and stereochemistry.
Carbohydr. Res., 1999. **315**: p. 16-34
78. Ferreira L., Gil M. H. and Dordick J. S.,
Enzymatic synthesis of dextran-containing hydrogels.
Biomaterials, 2002:

79. Mähner C., Lechner M. D. and Nordmeier E.,
Synthesis and characterization of dextran and pullulan sulphate.
Carbohydr. Res., 2001. **331**: p. 203-208
80. Goodlett V. W.,
Use of in situ reactions for characterization of alcohols and glycols by nuclear magnetic resonance.
Anal. Chem., 1965. **37**: p. 431-432
81. De Vos R. and Goethals E. J.,
End groups analysis of commercial poly(ethylene glycol) monomethyl ether's.
Polym. Bull., 1986. **15**: p. 547-549
82. Van Meivenne D., Haucourt N. and Goethals E. J.,
A new initiating system for the "living" polymerization of vinyl ethers leading to hydroxy-terminated polymers.
Polym. Bull., 1990. **23**: p. 185-190
83. Gagnaire D. and Vignon M.,
Etude par ^{13}C et ^1H RMN du dextrane et de ses dérivés acétylés et benzylés.
Makromol. Chem., 1977. **178**: p. 2321-2333
84. Sanchez-Chaves M. and Arranz F.,
Water-insoluble dextran polymers by grafting of hydrophobic groups : I. Reaction with butyric anhydride and heterogeneous hydrolysis of the partially modified dextran.
Ang. Makromol. Chem., 1983. **118**: p. 53-63
85. Haines A. H.,
Reactivities of hydroxyl groups in carbohydrates.
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1976. **33**: p. 11-109
86. Sanchez-Chaves M. and Arranz F.,
Synthesis of amidoxime containing modified dextran.
Polymer, 1996. **37**: p. 4403-4407
87. Mc Ewan T., Mc Innes A. G. and Smith D. G.,
 ^1H - and ^{13}C -N.M.R. spectra of the methyl mono-, di-, and tri-O-acetyl- α - and - β -D-xylopyranosides.
Carbohydr. Res., 1982. **104**: p. 161-168
88. Yoshimoto K., Itatani Y. and Tsuda Y.,
 ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra of O-acylglucoses. Additivity of shift parameters and its application to structure elucidations.
Chem. Pharm. Bull., 1980. **28**: p. 2065-2076

Chapitre II :

Polymérisation du D,L-lactide à partir du macromorceur dextrane silylé

Chapitre II : Polymérisation du D,L-Lactide à partir du macroamorceur Dextrane Silylé

I. GENERALITE SUR LES POLYESTERS.....	94
I.1. Présentation.....	94
I.2. Synthèse des polylactides- Généralités.....	96
I.2.1. Polycondensation	96
I.2.2. Polymérisation par Ouverture de Cycle (POC) :	96
I.3. POC du lactide	97
I.3.1. Dépolymérisation et Réactions de transestérification.....	97
I.3.2. Les différents amorceurs de la POC du lactide.....	97
I.3.2.1. Polymérisation cationique :	98
I.3.2.2. Polymérisation anionique :	98
I.3.2.3. Polymérisation pseudo-anionique ou par coordination :	99
I.3.2.4. Polymérisation par voie enzymatique :	101
I.3.3. Cas particulier de l'octoate d'étain (2-éthylhexanoate d'étain II, SnOct ₂).....	101
I.3.3.1. Mécanismes proposés pour la POC en présence de SnOct ₂	101
I.3.3.2. Pertinence des mécanismes ③ et ④	103
I.3.4. Paramètres de sélectivités des catalyseurs de la POC du lactide	104
II. MISE AU POINT DES CONDITIONS DE POLYMERISATION	106
II.1. Conditions opératoires.....	106
II.1.1. Choix du catalyseur	106
II.1.2. Choix des conditions opératoires : solvant, température.....	107
II.2. Analyse RMN ¹ H.....	108
II.3. Synthèses préliminaires	110
II.4. Influence de la quantité d'amorceur	112
II.5. Cinétiques de polymérisation sur un dextrane silylé	113
III. BILAN DES POLYMERISATIONS AVEC R=0,03.....	113
III.1. Analyses RMN ¹ H et SEC.....	113
III.2. Analyse Infra-Rouge	116
III.3. MDSC.....	117
III.4. RMN ¹³ C & HMQC	117
III.4.1. RMN ¹³ C	117
III.4.2. RMN 2D (HMQC).....	118
IV. CONCLUSION.....	119
V. BIBLIOGRAPHIE	121

CHAPITRE II : POLYMERISATION DU D,L-LACTIDE A PARTIR DU MACROAMORCEUR DEXTRANE SILYLE

La seconde étape de la synthèse des copolymères dextrane-g-poly lactide constitue l'objet de ce second chapitre. Après avoir réalisé l'hydrophobisation des chaînes de dextrane par l'intermédiaire d'une silylation, il s'agit désormais de générer les greffons polylactide par une stratégie de type « grafting from ». La polymérisation du D,L-lactide est alors amorcée à partir des fonctions alcool résiduelles portées par la dorsale dextrane (Schéma II-1). L'objectif que nous nous sommes fixé est d'effectuer cette polymérisation en contrôlant au mieux la longueur et l'indice de polymolécularité des greffons, tout en évitant une contamination du copolymère final par des chaînes d'homopolylactide.

I. GENERALITE SUR LES POLYESTERS

I.1. Présentation

Le *polylactide* (PLA) appartient à la famille des polyesters aliphatiques. Leur structure générale est représentée sur la Figure II-22a.

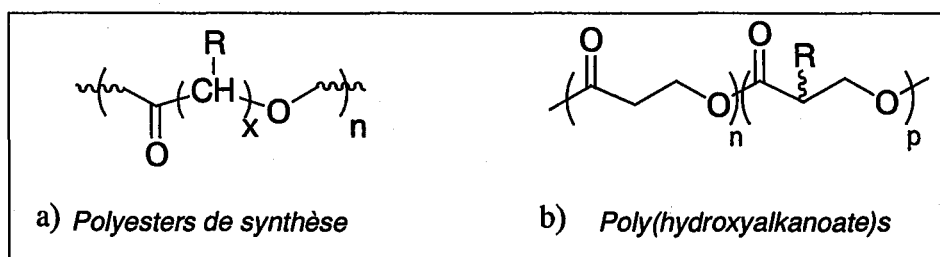


Figure II-22 : Structure chimique des polyesters de synthèse (a) ou naturels (b)

Parmi tous les polyesters aliphatiques, seuls les *poly(β-hydroxyalkanoate)s* (PHAs) peuvent être naturels (Figure II-22 b) : ils sont alors synthétisés par des microorganismes et leur servent de source de carbone et de réserve d'énergie.

Incinérables ou épanchables, les polyesters aliphatiques peuvent servir de substituts aux matières plastiques [1-3]. Biodégradable, ils peuvent alors contribuer à réduire les problèmes des déchets plastiques toxiques non dégradables, et permettre de remédier aux problèmes croissants d'environnement.

La vitesse de dégradation de ces polyesters aliphatiques varie selon leur nature chimique, leur hydrophobie et leur cristallinité [4, 5]. Elle peut également être modulée en réalisant des mélanges de polyesters ou des copolyesters [6].

Parmi les polyesters de synthèse (Figure II-22 a), citons la *poly(ε-caprolactone)* (PCL/ R=H, x= 5), la *poly(δ-valérolactone)* (PVL/ R=H, x= 4), le *polylactide ou poly(acide lactique)* (PLA/ R= CH₃, x=1), le *polyglycolide ou poly(acide glycolique)* (PGA/ R=H, x=1)... Ces polymères sont non seulement biodégradables mais aussi biocompatibles. Leurs produits de dégradation étant eux-mêmes biocompatibles et bioassimilables, ces polymères peuvent être définis comme biorésorbables ¹. Ainsi, ils ont été largement utilisés dans le domaine biomédical [4, 9-12] comme matériaux biorésorbables [13] (fil de suture [6], matériel d'ostéosynthèse, peau artificielle, support de régénération cellulaire [14]....) ou comme matrice de vecteurs particuliers permettant la libération contrôlée de principes actifs [15-18].

Parmi ces polyesters, le PLA suscite un intérêt tout particulier pour diverses raisons :

- Il est obtenu à partir de ressources naturelles renouvelables. Son unité répétitive (l'acide lactique), produite par la fermentation de sucres et/ou de

¹ Les terminologies relatives aux polymères dégradables varient d'un auteur à l'autre. Nous explicitons ici le sens que nous avons donné aux différents termes que nous avons employés [7, 8].

Un polymère est :

- *Biocompatible* s'il est compatible avec les systèmes vivants.
- *Biodégradable* si la perte de ses propriétés mécaniques est due à une altération des macromolécules par coupure des chaînes. Cette altération peut avoir lieu par voie hydrolytique, enzymatique ou par l'intermédiaire de microorganismes.
- *Fragmentable* si la perte de ses propriétés physico-mécaniques est due à son alération, sans coupure des macromolécules.
- *Bioassimilable* si les macromolécules ou leurs fragments sont minéralisés ou métabolisés par des microorganismes de l'environnement.
- *Biorésorbable* si les macromolécules ou leurs fragments sont métabolisés ou excrétés d'un organisme vivant.

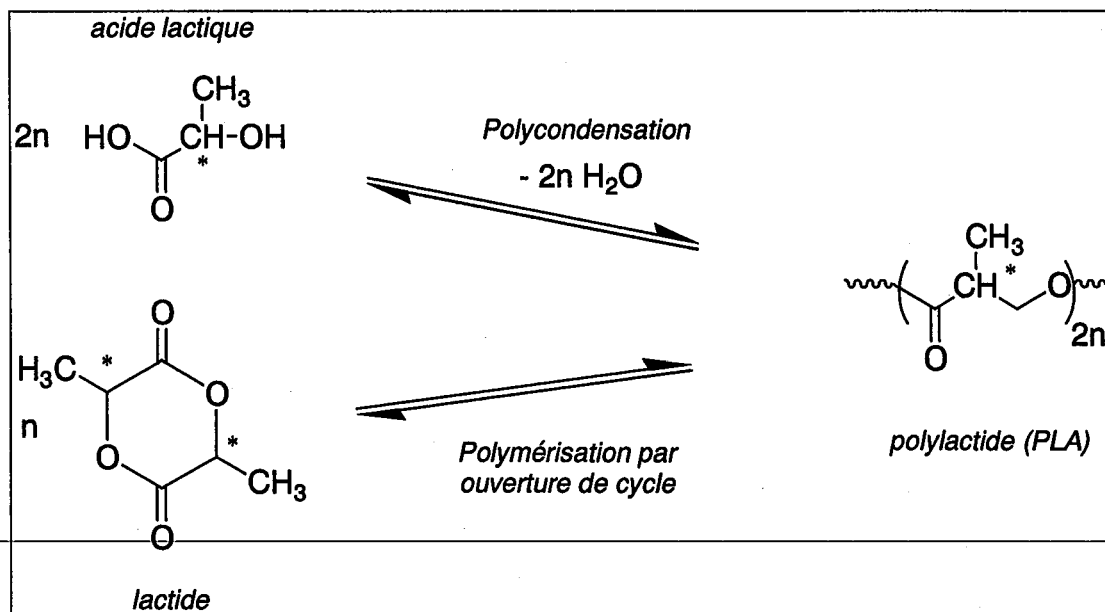


Schéma II-9 : Voies de synthèse du PLA.

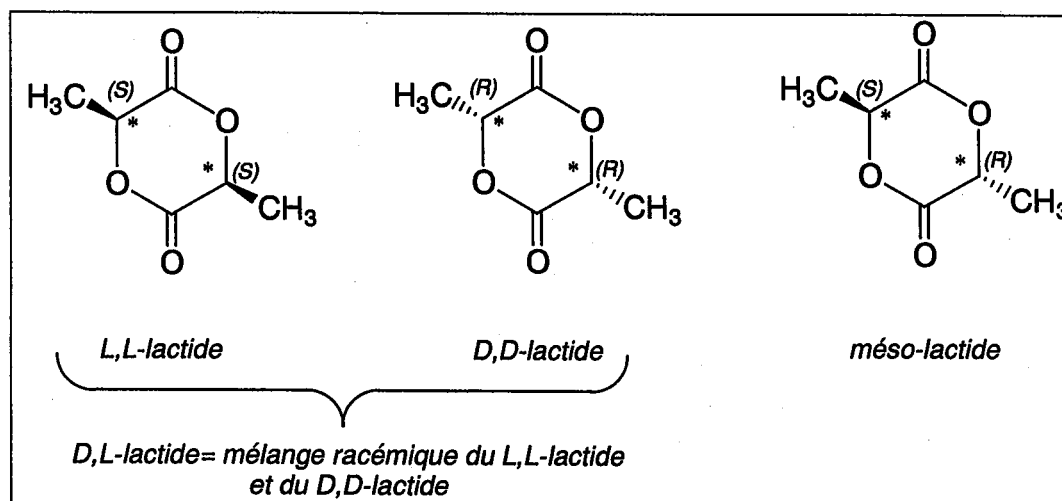


Figure II-23 : Stéréo-isomères du lactide.

l'amidon (de blé ou de maïs) [2, 3], est un intermédiaire dans le métabolisme des glucoses.

- Le PLA est non immunogène (c'est à dire qu'il ne déclenche pas de réaction immunitaire) et faiblement toxique (absence de réactivité vis à vis des tissus) [13].
- Sa vitesse d'hydrolyse se situe entre celle du polyglycolide et celles, beaucoup plus lentes, des polylactones.
- Les coûts de production du PLA étant désormais largement réduits [8], le PLA pourrait alors constituer un élément de choix pour remplacer les matériaux plastiques issus de la pétrochimie.

I.2. Synthèse des polylactides- Généralités

De façon générale, les polyesters peuvent être obtenus soit par polycondensation soit par Polymérisation par Ouverture d'esters Cycliques (POC) [13, 19-23]. Nous examinerons dans ce paragraphe plus particulièrement le cas du polylactide (Schéma II-9).

1.2.1. Polycondensation

Bien que peu onéreuse, la polycondensation présente beaucoup d'inconvénients :

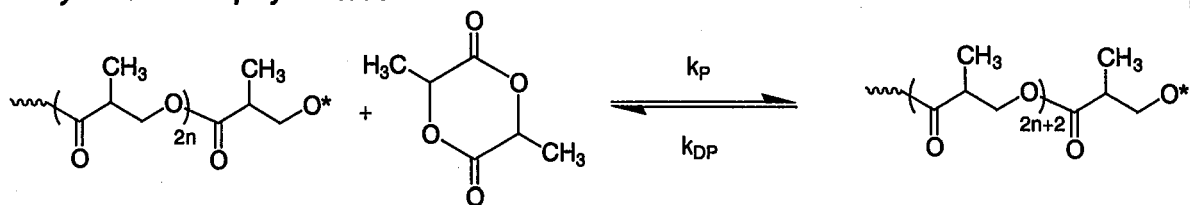
- températures élevées (supérieures à 180°C) et longues durées de réaction (plusieurs heures).
- nécessité d'éliminer l'eau (sous-produit de la réaction) afin d'obtenir des masses molaires notables, qui cependant restent limitées à 30 000 g/mol.
- non contrôle de la longueur des chaînes.

1.2.2. Polymérisation par Ouverture de Cycle (POC) :

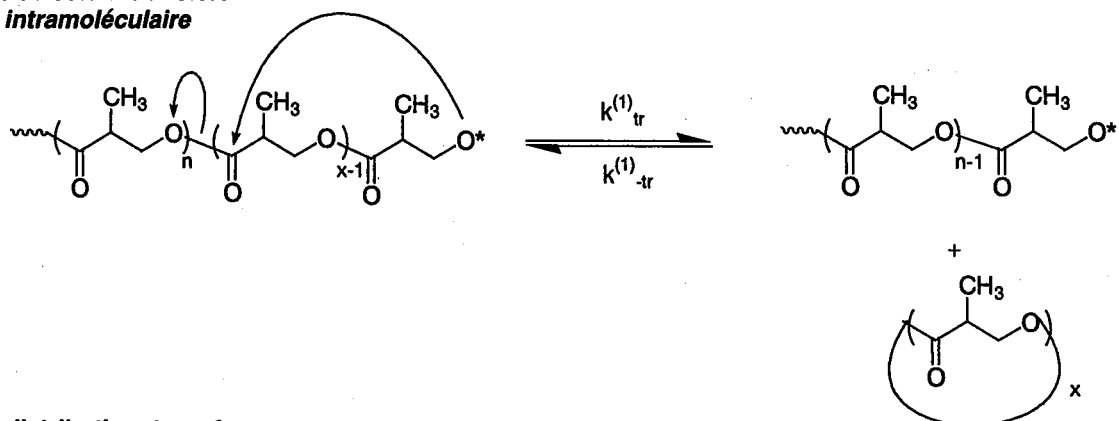
La POC consiste à obtenir le polylactide (PLA) à partir du dimère de l'acide lactique : le lactide.

Il existe trois isomères du lactide (Figure II-23). Le L,L-lactide conduit au poly(L,L-lactide) semi-cristallin, et le D,L-lactide (mélange racémique de L,L-lactide et D,D-lactide) au poly(D,L-lactide) amorphe. Dans le cadre de ces travaux, nous nous intéresserons au poly(D,L-lactide), car sa dégradation hydrolytique est plus rapide que celle d'un poly(L,L-lactide) [24].

**Equilibre :
Polymérisation-Dépolymérisation**



**Rétrocission: transfert
intramoléculaire**



**Redistribution: transfert
intermoléculaire**

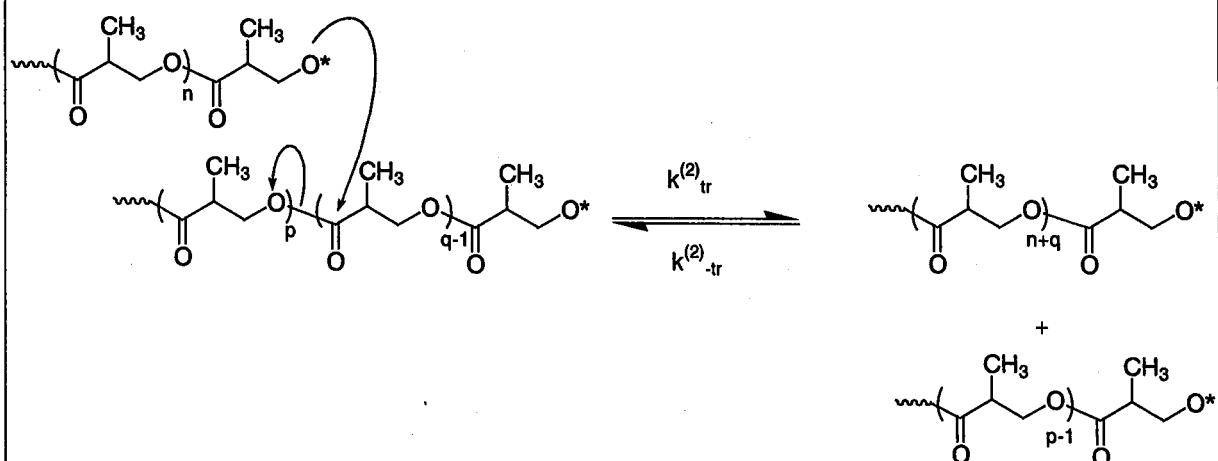


Schéma II-10 : Equilibres intervenant lors la polymérisation par ouverture du lactide.

La polymérisation par ouverture de cycle permet de réaliser une polymérisation dans des conditions plus douces que la polycondensation et, dans certains cas, de contrôler les masses molaires des polylactides.

I.3. POC du lactide

1.3.1. Dépolymérisation et Réactions de transestérification

D'un point de vue thermodynamique, les fortes contraintes exercées sur le cycle lactide sont libérées lors de sa POC. Ceci se traduit par une enthalpie de polymérisation négative. Cependant, l'entropie de polymérisation étant elle-même négative, un équilibre de polymérisation-dépolymérisation doit alors être considéré (Schéma II-10) [25, 26]. Les concentrations à l'équilibre du monomère ont été calculées pour diverses températures de polymérisation (0,06 mol/l à 80°C dans le dioxane avec SnOct₂ comme catalyseur [25] par exemple).

D'autres réactions secondaires équilibrées peuvent également intervenir lors de la POC et nuire au contrôle de la polymérisation. Elles sont dues à des réactions de transfert mettant en jeu les chaînes en croissance. Ces réactions de transfert aux polymères sont appelées réaction de transestérification et sont classées en deux sous catégories (Schéma II-10) :

- La transestérification intramoléculaire (ou rétrocission) se produit au sein d'une même chaîne. Elle provoque une diminution de la longueur des chaînes et la formation d'oligomères cycliques. Il s'en suit une diminution du degré de polymérisation moyen en nombre ($\overline{DP}_n$) et un élargissement de la distribution en taille des chaînes.
- Au contraire, la transestérification intermoléculaire (ou redistribution) fait intervenir deux chaînes. Leur nombre et leur longueur moyenne restent invariables, mais leur distribution en taille est élargie.

1.3.2. Les différents amorceurs de la POC du lactide

De nombreux amorceurs ont été étudiés pour contrôler au mieux la POC du lactide . Il ne s'agit ici en aucun cas d'établir une liste exhaustive des différents types d'amorceurs, mais de discuter de leur pertinence dans le cas de notre étude. Nous nous intéresserons donc

TYPE DE POLYMERISATION	AMORCEUR
Cationique	Acides de Brönsted (ex. $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$) Agents Alkylants (ex. $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$)
Anionique	Alcoolates de métaux alcalins (complexés ou non par des éthers-couronnes) : ROM Carbanions (ex. (n, sec ou tert) – BuLi)
Coordination (Pseudo-anionique)	Alcoolates : ROM* Carboxylates : RCOOM* Halogénures et Oxydes métalliques

**(M= métal avec des orbitales p, d ou f libres et d'énergie favorable = Aluminium, métal de transition ou terres rares)*

Tableau II-6 : Exemples d'amorceurs impliqués dans la POC de lactides [17].

principalement aux amorceurs permettant un contrôle des masses molaires du polylactide et nous essaierons ainsi de justifier le choix de nos conditions opératoires.

Selon la nature de l'amorceur utilisé, trois principaux types de mécanisme interviennent lors de la POC du lactide (Tableau II-6).

I.3.2.1. Polymérisation cationique :

Ce mode de polymérisation est observé lors de l'utilisation d'amorceurs de type acide de Brönsted ou agents alkylants. La croissance des chaînes se produit via la coupure de la liaison O-alkyle (Voie II, Figure II-24). Les principaux inconvénients de ce type de polymérisation sont :

- Faible nombre de catalyseurs susceptibles de promouvoir ce mode de polymérisation [27].
- Temps de polymérisation long (48 h à 50°C pour polymériser entièrement le L,L-lactide [27]).
- Difficulté d'obtenir des masses molaires élevées.
- Non contrôle de la polymérisation en raison de nombreuses réactions de transestérifications inter- et intramoléculaires.

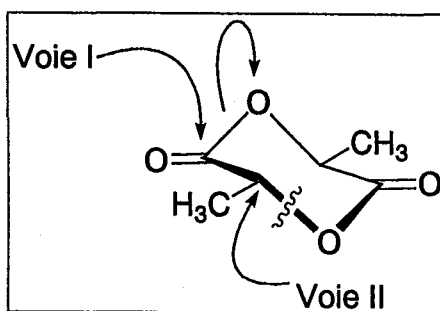


Figure II-24 : Les différentes attaques possibles sur le lactide

I.3.2.2. Polymérisation anionique :

Des amorceurs anioniques tels que le butyllithium ou les alcoolates de métaux alcalins sont classiquement employés dans le cas des polymérisations anioniques par ouverture de cycles. Dans le cas du lactide, l'ouverture du cycle se produit alors via une attaque nucléophile sur le carbonyle et une coupure de la liaison O-acyle (Voie I, Figure II-24). Bien que ce mode de polymérisation soit plus rapide que le précédent (90% de L,L-lactide sont convertis après 10 minutes à 20°C avec CH_3OK [28]), un phénomène important de transfert

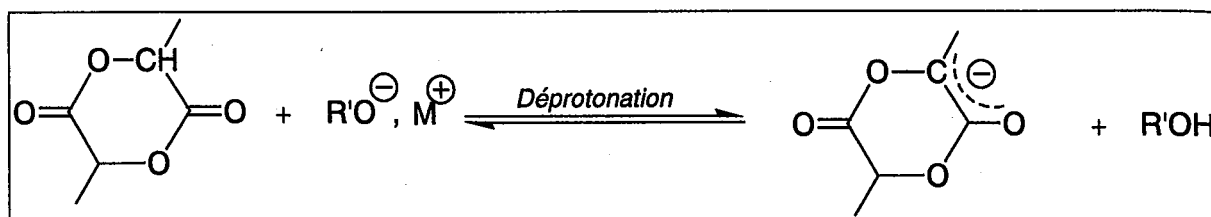


Schéma II-11 : Réaction de transfert au lactide. Déprotonation en α du carbonyle.

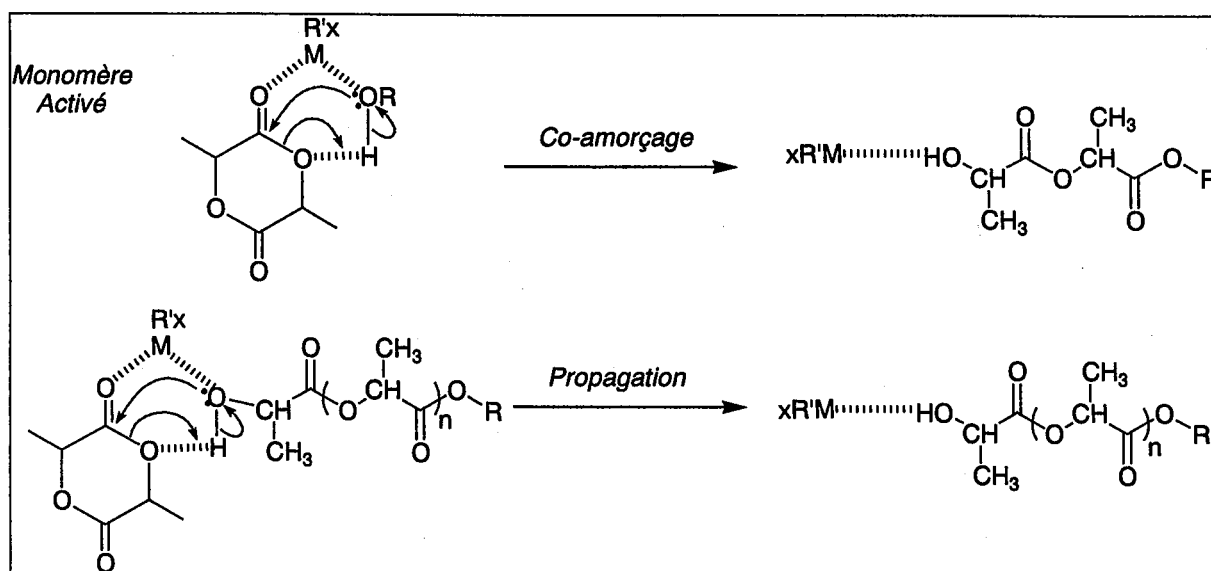


Schéma II-12 : Mécanisme de type « monomère activé ». Cas de la polymérisation du lactide à partir de fonctions alcool en présence des « co-amorceurs » de type I ($MR'x = Sn\phi_4, SnBr_4, Zn(acet)_2 \dots$).

au monomère (déprotonation) limite l'obtention de masses molaires élevées [29, 30] (Schéma II-11). La présence de très nombreuses réactions de transestérifications inter- et intramoléculaire reste encore un problème majeur [19, 20, 31].

Bien que les réactions secondaires puissent être limitées en réduisant la réactivité des espèces propageantes [20, 28-36], la synthèse contrôlée des polylactides par voie anionique est plus une exception qu'une règle et demande des conditions expérimentales bien spécifiques.

I.3.2.3. Polymérisation pseudo-anionique ou par coordination :

Comme nous venons de le voir dans les paragraphes précédents, le manque de contrôle des POC par voies ioniques provient principalement de la trop grande réactivité des espèces propageantes, ce qui génère des réactions de transestérification [19, 36].

L'emploi d'amorceurs tels que les alcoolates, carboxylates, halogénures ou oxydes de métaux de transition (*Mg, Zn, Sn, Fe, ...*), de terres rares (*Y, Sc et lanthanides comme La, Nd, Sm...*) ou d'aluminium permet de diminuer cette réactivité et d'atteindre, dans certains cas, un contrôle de la polymérisation du lactide. Cette baisse de réactivité est due à une électropositivité des métaux de transition plus faible que celle des métaux alcalins. Ceci confère alors un caractère covalent plus marqué à la liaison hétéroatome/métal de transition, d'où la dénomination de « polymérisation pseudo-anionique » ou « polymérisation par coordination » [37]. Même si certains composés organométalliques permettent d'obtenir des masses molaires élevées, le contrôle de la POC n'est pas toujours observé.

La polymérisation pseudo-anionique se déroule via la coupure de la liaison O-acyle (Voie I de la Figure II-24), mais le mécanisme exact de la polymérisation dépend du type d'amorceur employé [21, 38].

o Amorceurs de type I :

Les oxydes, les halogénures et les carboxylates de métaux « covalents » se comportent plus comme des catalyseurs (ou co-amorceurs) que comme de réels amorceurs [37, 39-45]. Dans ce cas, le mécanisme de la polymérisation fait intervenir un complexe appelé « monomère activé », formé entre le monomère (lactide), le catalyseur métallique et l'amorceur (*l'exemple des fonctions alcool est présenté dans le Schéma II-12*). Cette complexation permet d'accroître la réactivité du monomère envers une attaque nucléophile des sites d'amorçage (ici les fonctions alcool). En raison des réactions de transestérification, la plupart des catalyseurs de ce type ne permettent pas le contrôle de la POC.

o Amorceurs de type II :

Les alcoolates de métaux « covalents » sont plus nucléophiles que les composés de type I et amorcent réellement la polymérisation selon un mécanisme de « coordination insertion » [19, 20, 46, 47]) (Schéma II-13). L'amorçage s'effectue en deux étapes : dans un premier temps le monomère se coordine à l'alcoolate par l'intermédiaire de sa fonction carbonyle. Cette coordination est ensuite suivie d'un réarrangement qui aboutit au clivage de la liaison O-acyle et à l'insertion du monomère dans la liaison alcoolate de l'amorceur. Une hydrolyse acide de la chaîne en croissance permet d'obtenir des bouts de chaînes hydroxyle. Contrairement aux amorceurs de type I, les alcoolates de type II permettent d'avoir un amorçage quantitatif, d'éviter toutes réactions de terminaison et, dans certains cas, de limiter les réactions de transestérifications. Parmi les innombrables amorceurs étudiés, un contrôle remarquable a pu être obtenu dans le cas des alcoolates à base d'aluminium ($\text{Al}(\text{OiPr})_3$ [47-49], Et_2AlOR [50] ou autres [51, 52]), de certains alcoolates d'étain [53-56], ou encore de terres rares [57] comme le lanthane [58, 59] ou l'yttrium [60, 61]. Récemment, certains alcoolates de fer ont permis le contrôle de la polymérisation du lactide à 70°C dans le toluène [62]. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau II-7.

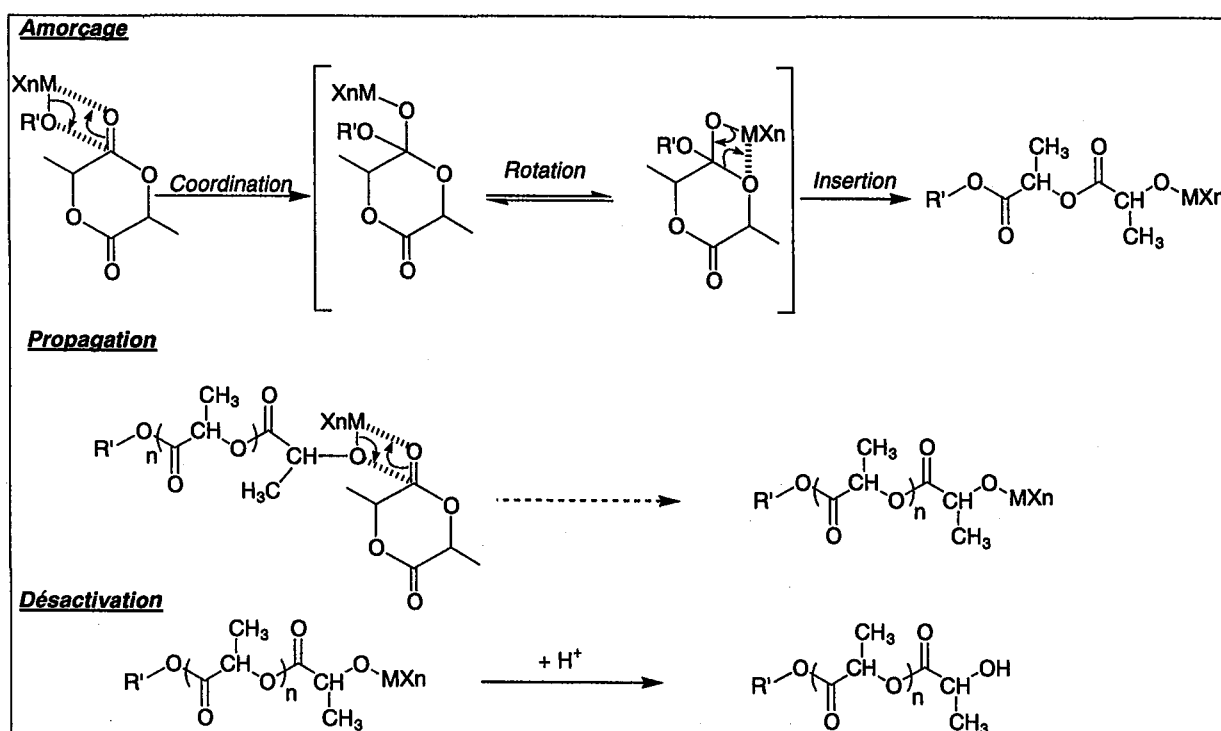


Schéma II-13 : Mécanisme de « coordination-insertion ». Cas de la polymérisation du lactide à partir de fonctions alcool en présence des alcoolates de métaux de transition et de terres rares ou d'aluminium, (type II : $\text{R}'\text{O}-\text{MXn} = \text{Al}(\text{OiPr})_3, \text{Zn}(\text{OnPr})_2, \text{Ti}(\text{OnBu})_4, \text{Bu}_2\text{Sn}(\text{OMe})_2 \dots$)

M	Amorceur	tps (h)	Solvant	T (°C)	Conv (%)	$\overline{M}_{n_{TH}}$ g/mol	$\overline{M}_{n_{EXP}}$ g/mol	$I = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$	Ref
L	Al(OiPr) ₃	17	THF	80	82	/	4500	1,2	[49]
L	[(MMPEP)AlOBn] ₂	48	Toluène	115	87	2600	3800	1,08	[52]
L	SnOR di fonctionnel *	24	Chloroforme	60	90	12800	11200	1,05	[54]
L	Sn(Obu) ₂	0,08	THF	80	91	5600	4000	1,25	[55]
L	Sn(OTf) ₂ + EtOH	1,5	Pyridine	110	90	3900	4000	1,49	[56]
	SnBu(OTf) ₂ + EtOH	24			79	3400	3500	1,09	
	SnOct ₂ + EtOH	20			90	3900	3500	1,12	
	Sc(OTf) ₂ + EtOH	10			90	3900	3300	1,15	
L	Y(μ-O)(iOPr) ₁₃	0,08	CH ₂ Cl ₂	22	98		7100	1,14	[60]
	La(iOPr) ₃	0,05			98	7200	7100	1,14	
	Y(TBPO) ₁₃ + ROH	0,08			100		6600	1,16	
D,L	Y(μ-O)(iOPr) ₁₃	66	CH ₂ Cl ₂	25	96	4100	4400	1,22	[57]
	Sm(μ-O)(iOPr) ₁₃	4,5			93	3150	3700	1,3	
	Yb(μ-O)(iOPr) ₁₃	30			82	2800	2350	1,3	
D,L	Alcoolates d'Yttrium	16	CH ₂ Cl ₂	25	97	7200	7300	1,3	[61]
D,L	La(iOPr) ₃	0,5	CH ₂ Cl ₂ /Toluène (70:30 v/v)	21	94	4900	5600	1,1	[58, 59]
D,L	AlEt ₃ + HO(CH ₂) ₂ Br	72	Toluène	70	80	3990	4200	1,2	[50]
D,L	Al(OiPr) ₃ + iPrOH	113	Toluène	70	90	9750	10250	1,2	[47, 48]
D,L	Fe ₃ ((μ-O)(OEt) ₃	0,20	Toluène	70	97	/	35000	1,17	[62]

* Alcoolate d'étain difonctionnel

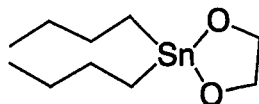


Tableau II-7 : Résultats obtenus avec les alcoolates de métaux covalents. M = monomère lactide.

I.3.2.4. Polymérisation par voie enzymatique :

Récemment, l'efficacité des lipases pour la polymérisation des lactides [63] a été démontrée. Cette polymérisation peut être effectuée sous des conditions modérées (en masse à 80°C), procède avec une grande régiosélectivité par rapport aux catalyseurs conventionnels [64] mais nécessite de longues durées de réaction (supérieures à 5 jours pour obtenir des taux de conversions d'au moins 50 %). Le mécanisme de la réaction est de type « monomère activé », proche de celui des polymérisations pseudo-anioniques.

Même si cette voie semble prometteuse, elle ne permet pas encore d'obtenir le contrôle des masses molaires et, le plus souvent, des oligomères polymoléculaires sont obtenus.

I.3.3. Cas particulier de l'octoate d'étain (2-éthylhexanoate d'étain II, SnOct₂)

L'octoate d'étain (SnOct₂) est l'un des catalyseurs les plus employés pour la polymérisation du lactide [65-67]. Le mécanisme de polymérisation en présence de SnOct₂ a longtemps été débattu. Jusqu'à ces dernières années, le mécanisme de type « monomère activé » (Schéma II-11) était couramment admis [21, 34, 68]. Mais, des études récentes remettent en cause ces résultats : Penczek et coll. ont démontré un mécanisme de « coordination insertion » lors de la polymérisation de l' ϵ -caprolactone [69] puis du lactide [70]. Il semble d'ailleurs qu'il en soit de même pour les autres carboxylates de métaux de transition [23, 33].

Le mécanisme de la POC en présence de SnOct₂ est très complexe et délicat à comprendre, en raison des nombreuses réactions qu'il met en jeu. L'existence et l'importance relative de ces différentes réactions dépendent des conditions opératoires utilisées (température, solvant, rapport [OH]/[SnOct₂], état de pureté du catalyseur et du monomère...) [70].

I.3.3.1. Mécanismes proposés pour la POC en présence de SnOct₂

L'ensemble des mécanismes proposés depuis ces trente dernières années peut-être séparé en quatre groupes distincts.

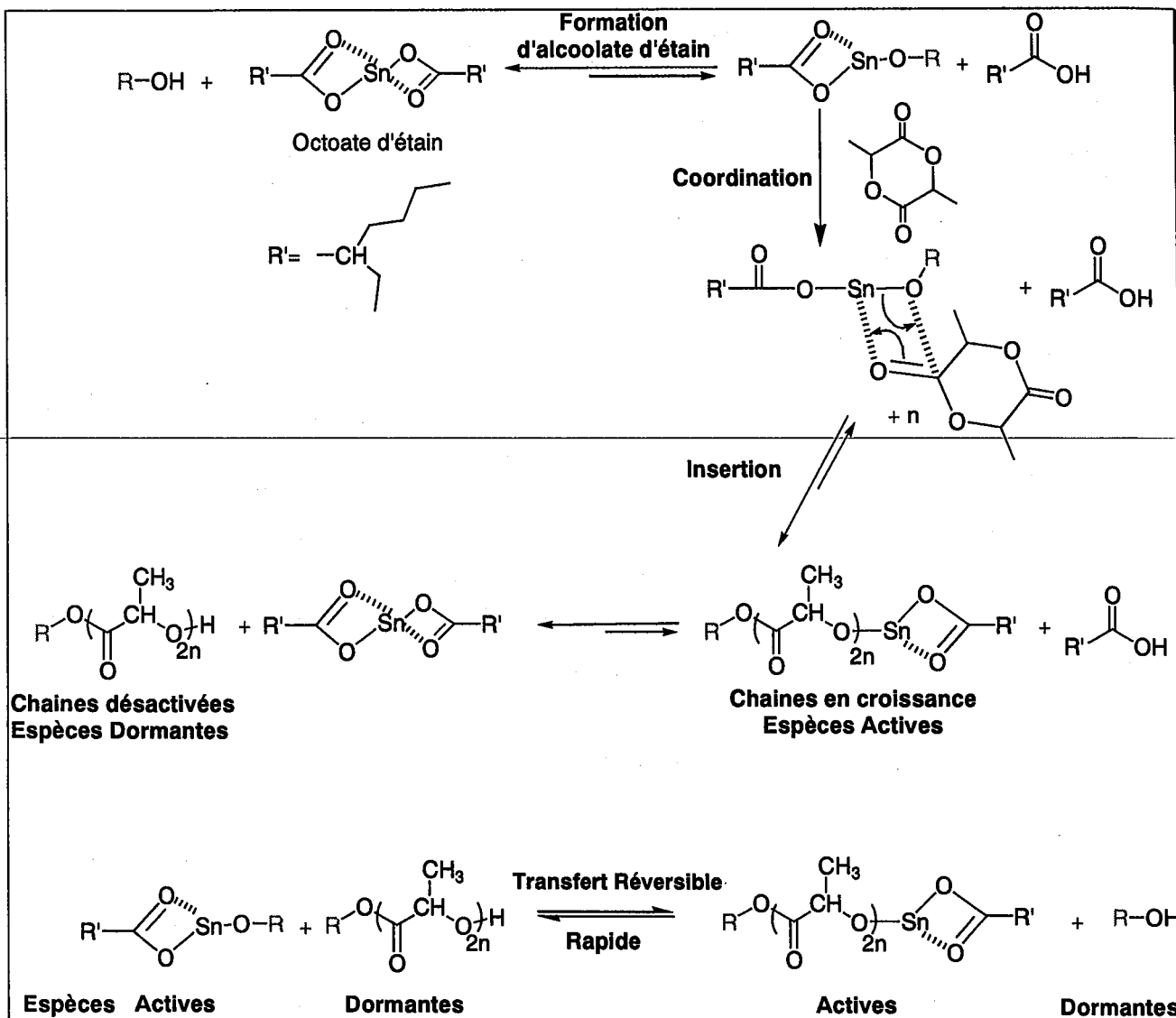


Schéma II-14 : Mécanisme de Coordination-Insertion en présence de SnOct_2 : Schéma Global.

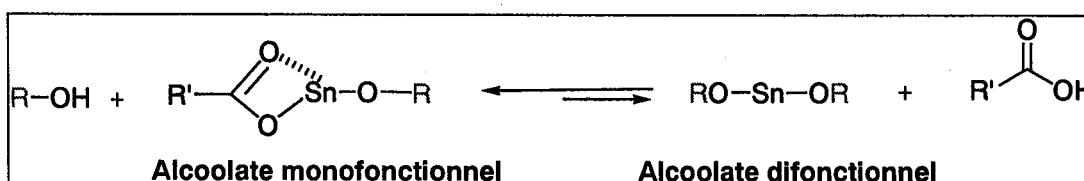


Schéma II-15 : Mécanisme de Coordination-Insertion en présence de SnOct_2 : formation du dialcoolate.

① Mécanisme cationique :

Différents mécanismes cationiques avaient été suggérés par exemple, par Nijenhuis et coll. [71]. Ces mécanismes doivent être rejetés puisque l'addition de quantité équimolaire de bases de Lewis (4-picoline, triphénylphosphine [3, 72-75] ou 2,6-di-*tert* butylpyridine [70]), susceptibles de capter d'éventuels protons présents dans le milieu, ne provoque aucun ralentissement de la polymérisation mais au contraire une accélération des cinétiques. De plus, un mécanisme purement cationique devrait provoquer la racémisation du L-lactide, ce qui n'est pas observé.

② Réaction directe entre SnOct₂ et le lactide :

Ce mécanisme a été présenté par Kricheldorf et coll. [68] comme alternative au mécanisme suivant (③). Là encore, l'existence de ce mécanisme a été démenti par la suite [70]. Voici les principaux contre-arguments :

- Les carboxylates ne sont pas assez nucléophiles pour attaquer directement le lactide et provoquer la rupture de la liaison O-alkyle (Voie II, Figure II-24).
- Toute réaction directe entre SnOct₂ et le lactide devrait se traduire par une augmentation de la vitesse de polymérisation avec la concentration initiale en octoate, ce qui n'a pas été observé pour les fortes concentrations.

③ Mécanisme du « monomère activé » :

Il a été proposé par différents auteurs [38, 68, 76, 77]. L'octoate d'étain est alors considéré comme un catalyseur (ou co-amorceur) exacerbant la réactivité des fonctions hydroxyle (amorceurs réels de la polymérisation). Ce mécanisme est semblable à celui présenté au Schéma II-11.

④ Mécanisme par « coordination-insertion » [70, 78]:

Il fait intervenir un amorçage par des alcoolates d'étain formés *in situ* par une réaction entre SnOct₂ et les fonctions hydroxyle présentes dans le milieu (à l'état d'impuretés ou volontairement ajoutées). Cette réaction préliminaire est équilibrée et permet la dissociation d'au moins une (voire deux) molécules d'acide 2-éthylhexanoïque (Schéma II-14). Il n'est pas encore clairement établi si un alcoolate monofonctionnel et/ou difonctionnel est formé (Schéma II-15), chaque fonction alcoolate pouvant alors intervenir dans le mécanisme de la

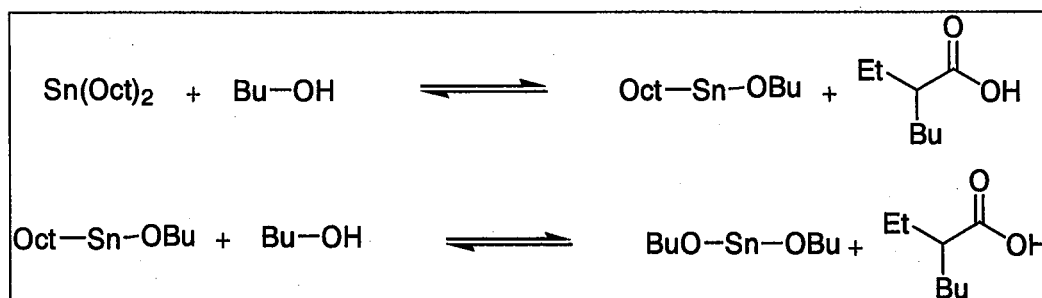


Schéma II-16 : Réaction d'interconversion pour les systèmes (SnOct₂/BuOH) et (Sn(Obu)₂/OctH).

polymérisation. La polymérisation se déroule ensuite via une coordination du monomère sur le métal, suivie de l'insertion de ce dernier dans la liaison O-Sn de l'amorceur.

Il existe divers équilibres entre espèces actives et dormantes qui contribuent à la faible concentration en espèces actives dans le milieu (Schéma II-14).

I.3.3.2. Pertinence des mécanismes ③ et ④

Dans le cas d'une polymérisation en présence d'octoate d'étain, il a été démontré que le degré de polymérisation est proportionnel au rapport $[\text{Monomère}]/[\text{OH}]$ et que, après désactivation, les chaînes sont terminées par une fonction alcool. Aussi, les deux derniers mécanismes proposés (③ et ④) sont les plus vraisemblables, puisqu'ils font intervenir les fonctions alcool dans l'étape d'amorçage et permettent d'obtenir des chaînes ω -hydroxylées. Nous allons discuter ci-dessous de la pertinence de chacun d'entre eux.

L'existence d'une possible réaction entre SnOct_2 et divers alcools a été démontrée à diverses reprises [45, 69, 79]. Penczek et coll. ont observé l'existence de macromolécules portant des espèces actives de type alcoolates d'étain [70, 80] au cours de la polymérisation du lactide amorcée par un système $\text{SnOct}_2/\text{BuOH}$, dans le THF à des températures inférieures à 100°C . De plus, des études comparatives ont été menées sur la cinétique de polymérisation du lactide en employant deux systèmes d'amorçage : $(\text{SnOct}_2/\text{BuOH})$ et $(\text{Sn}(\text{OBu})_2/\text{OctH})$. Dès que les concentrations des différentes espèces (SnOct_2 , $\text{Sn}(\text{OBu})_2$, OctSnOBu , OctH , BuOH) sont égales (soit $2[\text{SnOct}_2]_0 = 2[\text{Sn}(\text{OBu})_2]_0 = [\text{BuOH}]_0 = [\text{OctH}]_0$), des cinétiques identiques sont observées pour les deux systèmes (Schéma II-16) [55, 65, 70]. Toutes ces observations contribuent à privilégier le mécanisme de « coordination-insertion » ④ proposé. Ce mécanisme a d'ailleurs été confirmé par des calculs d'énergie potentielle de surface effectués par Albertsson et coll. [81]. Cette approche théorique du problème permet de confirmer l'existence des réactions de transfert réversibles entre les chaînes en croissance (espèces actives) et les fonctions alcool (espèces dormantes). Ces réactions de transfert, présentées dans le Schéma II-13, conduisent à des faibles indices de polymolécularité.

Lorsque la polymérisation est réalisée en solution à des températures modérées (inférieures à 120°C [45, 68, 82]) et avec de faibles proportions de SnOct_2 , les réactions de rétroscission et de redistribution sont limitées [65, 70] et la polymérisation est alors contrôlée [65, 68].

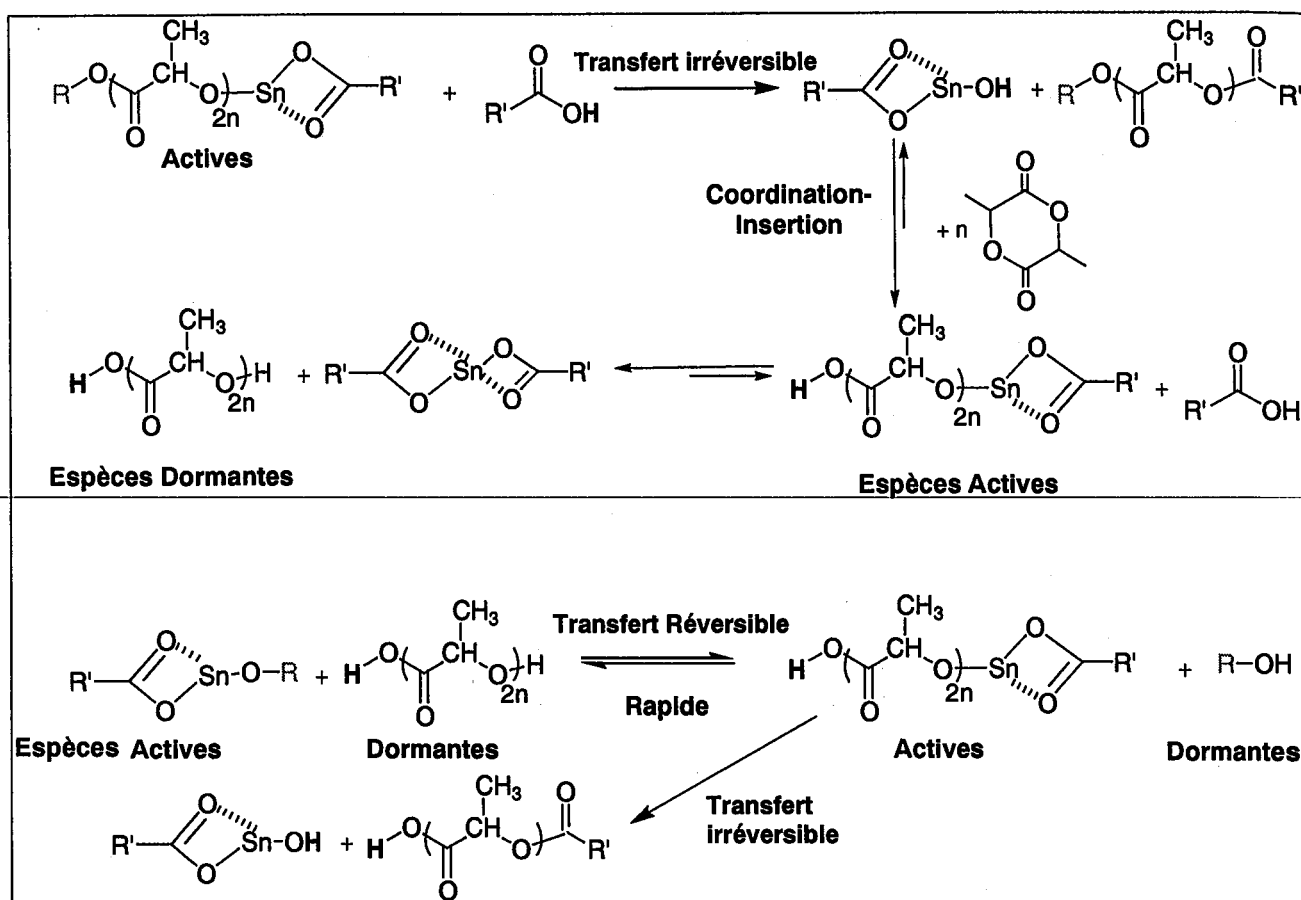


Schéma II-17 : Mécanisme de Coordination-Insertion en présence de SnOct_2 : réactions secondaires à haute température.

Pour des températures supérieures à 120°C, le mécanisme fait intervenir de nouvelles réactions de transferts irréversibles entre les espèces actives et l'acide 2-éthylhexanoïque. Il y a alors formation de nouveaux composés (hydroxyde d'étain, distanoxanes ou oxyde d'étain [45, 66]) qui peuvent amorcer de nouvelles chaînes et ainsi contribuer à la perte du contrôle de la réaction. Une partie des extrémités de chaînes sont alors des esters (Schéma II-17). Ces réactions sont surtout perceptibles dans le cas des polymérisations en masse [45, 67], et il faut remarquer que ces phénomènes sont moins importants pour le lactide que pour ϵ -caprolactone [80].

1.3.4. Paramètres de sélectivités des catalyseurs de la POC du lactide

Comme nous venons de le voir au cours des deux paragraphes précédents, les amorceurs les plus efficaces pour assurer le contrôle de la polymérisation du lactide sont les alcoolates de métaux covalents, auxquels il faut adjoindre l'octoate d'étain.

Même si beaucoup de ces amorceurs sont relatés pour assurer le contrôle de la POC, il est difficile d'affirmer qu'ils conduisent à des polymérisations sans aucune réaction secondaire [83]. De fait, les réactions de transestérifications intra et intermoléculaires (Schéma II-9) sont toujours présentes même si elles sont limitées, et induisent une certaine déviation par rapport à l'idéalité. Ces déviations minimales peuvent permettre de quantifier la sélectivité de la polymérisation pour chaque amorceur. Ainsi, Penczek et coll. [33, 55, 84-88] ont défini pour tout couple amorceur / monomère deux paramètres de sélectivités (β et γ). β et γ sont respectivement les rapports de la constante de vitesse de propagation rapportée aux constantes de vitesses de transestérification intra- ou intermoléculaires : ($\beta = k_p/k_{tr}^{(1)}$ et $\gamma = k_p/k_{tr}^{(2)}$). Plus ces paramètres sont élevés, plus la polymérisation est sélective envers la propagation. Ces paramètres de sélectivités dépendent du métal, de la taille des ligands, du solvant et de la température. D'autre part, Kricheldorf a également proposé un ordre de sélectivité pour différents alcoolates de métaux covalents selon l'importance croissante des réactions de transestérification lors de la polymérisation du L,L-lactide : $Al(OiPr)_3 < Zn(O-nPr)_2 < Ti(OnBu)_4 < Bu_3SnOMe < Bu_2Sn(OMe)_2$ [89].

Dans le cas de l' ϵ -caprolactone (ϵ -CL), les réactions de transestérifications intramoléculaires sont prépondérantes. Diverses études [84, 90, 91] ont permis de déterminer le paramètre de sélectivité β pour un certain nombre d'amorceurs (Tableau II-8). Ces valeurs

N°	Espèces actives	k_p (mol ⁻¹ . L)	$\beta = k_p/k_{tr(1)}$ (mol ⁻¹ . L.s ⁻¹)	Ref.
1	...-(CH ₂) ₅ O ⁽⁻⁾ Na ⁽⁺⁾	1,7	1,6 10 ³	[91]
2	...-(CH ₂) ₅ O-Sm[O(CH ₂) ₅ -...] ₂	2	2,0 10 ³	[85]
3	...(CH ₂) ₅ O-Al(C ₂ H ₅) ₂	0,03	4,6 10 ⁴	[92]
4	...-(CH ₂) ₅ O-Al[CH ₂ CH(CH ₃) ₂] ₂	0,03	7,7 10 ⁴	[92]
5	...-(CH ₂) ₅ O-Al[O(CH ₂) ₅ -...] ₂	0,5	3,0 10 ⁵	[85]

Tableau II-8 : Paramètre de sélectivité β pour divers amorceurs. Polymérisation de l' ϵ -caprolactone (THF, 20°C).

...= Chaîne en croissance

N°	Amorceur	k_p (mol ⁻¹ . L)	$\gamma = k_p/k_{tr(2)}$ (mol ⁻¹ . L.s ⁻¹)	Ref.
1	SnOct ₂	0,1	200	[85,87]
2	Sn(OBu) ₂	0,5	125	[55]
3	Al(OiPr) ₃	0,0047	100	[49, 87]
4	Ti(OiPr) ₄	0,022	70	[87]
5	Fe(OEt) ₃	0,10	60	[87]
6	Bu ₂ SnOEt ₂	0,015	60	[55, 87]
7	Et ₂ AlOEt	0,002	50	[87]
8	La(OiPr) ₃	0,08	40	[87]
9	Bu ₃ SnOEt	0,0005	20	[87]
10	Bu ₃ SnOMe	0,00035	20	[55, 87]
11	Sm(OiPr) ₃	0,5	10	[87]
12	Sm(OiPr) ₃ ^a	0,018	80	[87]
13	KOMe ^a	0,70	10	[87]

Tableau II-9 : Polymérisation du L-lactide, (THF, 80°C).). Paramètre de sélectivité γ pour divers amorceurs. ^a = température ambiante

confirment le manque de sélectivité des espèces ioniques (entrée 1) par rapport aux alcoolates de métaux de transition faiblement électropositif comme l'aluminium (entrées 3-5). Aussi, dans le cas d'une propagation par des espèces ioniques, une large proportion de macrocycles est observée bien avant la consommation totale du monomère [91]. Au contraire, aucun cycle n'est détecté pour les réactions réalisées en présence d'alcoolates d'aluminium, même jusqu'à de hauts taux de conversion [84]. Ainsi, les alcoolates d'aluminium sont les amorceurs qui permettent au mieux de limiter les réactions de transestérification intramoléculaire. Enfin, pour des espèces de réactivité comparable (entrées 3-5), l'encombrement stérique des substituants permet d'accroître la sélectivité de l'amorceur (*diminution de la probabilité des réactions de transfert intramoléculaire*).

Des études analogues ont été menées dans le cas de la polymérisation du L-lactide. En raison de l'encombrement stérique du groupement méthyle, les réactions de rétroscissions sont limitées, si bien que la concentration en macrocycles est faible. Les réactions de redistributions sont alors les réactions de transestérification majoritaires [55, 88, 92]. Penczek et coll. ont suivi l'augmentation de l'indice de polymolécularité liée à ces transestérifications, en fonction de la conversion en monomère. Ils ont pu déterminer, grâce à des simulations, les paramètres de sélectivité $\gamma = k_p/k^{(2)}_{tr}$ de différents amorceurs [55, 85, 86]. Les résultats sont regroupés dans le Tableau II-9.

Les divers facteurs d'influence précédemment mentionnés pour β interviennent aussi sur γ : encombrement stérique et réactivité des espèces en croissance. Jusqu'à présent, $Al(OiPr)_3$ apparaissait comme un candidat idéal pour la polymérisation du lactide car, en l'absence de fonctions alcool, il permettait un contrôle des masses molaires en adaptant le rapport $[Lactide]/[Al(OiPr)_3]$. Cependant, des études plus récentes [55, 65, 70] montrent la remarquable sélectivité de $SnOct_2$ et de $Sn(Obu)_2$. Ces composés permettent de plus d'obtenir des vitesses de polymérisation bien supérieures à celles observées lors de l'emploi d'aluminium (*plus forte polarisation de la liaison Sn-O*).

$SnOct_2$, $Sn(Obu)_2$ ainsi que $Al(OiPr)_3$ apparaissent donc comme des catalyseurs de choix pour polymériser le lactide (tout au moins pour des masses molaires respectivement comprises entre 10^2 - 10^4 g/mol pour $SnOct_2$, entre 10^3 - 10^6 g/mol pour $Sn(Obu)_2$, et inférieures à $\sim 10^5$ g/mol pour $Al(OiPr)_3$).

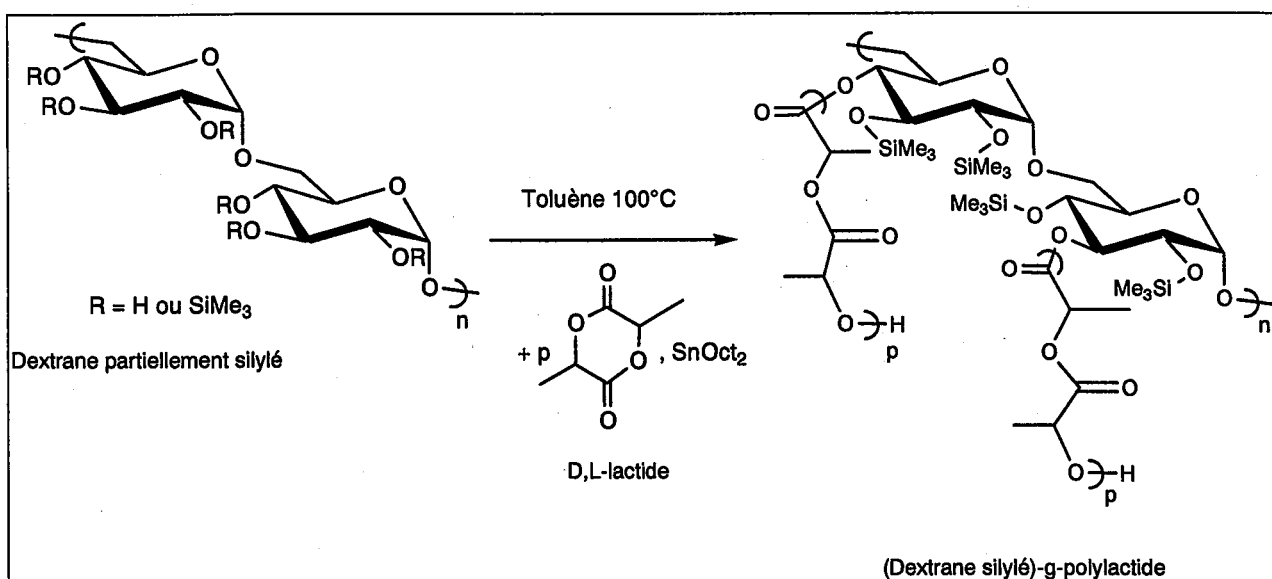


Schéma II-18 : Polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide à partir des fonctions OH résiduelles sur le dextrane hautement silylé

Le solvant et la température semblent également jouer un rôle sur les valeurs de ces paramètres de sélectivité. En effet, dans le cas de la polymérisation du L,L-lactide en présence de $\text{La}(\text{OiPr})_3$, une valeur $\gamma = 40$ est observée dans le THF à 80°C, alors qu'à température ambiante, Save et coll. [58, 59] ont trouvé une valeur comprise entre 100 et 200 (dans un mélange dichlorométhane/toluène (70 : 30 ; v : v)). Ne disposant pas de comparatif dans le cas des polymérisations effectuées dans des solvants moins polaires comme le toluène, nous avons arbitrairement gardé le classement précédent.

II. MISE AU POINT DES CONDITIONS DE POLYMERISATION

Rappelons que, dans notre étude, il s'agit de réaliser la polymérisation du D,L-lactide à partir des fonctions alcool résiduelles d'un dextrane partiellement silylé (Schéma II-18) et ainsi d'obtenir un copolymère (dextrane silylé)-g-poly lactide.

Désormais nous nommerons ces copolymères $\text{Dex}_m\text{Si}_t\text{-g-}_n\text{PLA}_p$, où Dex_mSi_t est le dextrane silylé à partir duquel est amorcée la POC du lactide ($m = \overline{M}_n$ du squelette dextrane, obtenue après déprotection du dextrane silylé (cf. Partie II Chapitre III) et exprimée en kg/mol; t = taux de silylation et où $_n\text{PLA}_p$ représente les greffons PLA (n =nombre moyen de greffons pour 100 unités glucoses et $p = \overline{M}_n$ expérimentale des greffons, déterminée par RMN et exprimée kg/mol).

II.1. Conditions opératoires

II.1.1. *Choix du catalyseur*

Après les conclusions du paragraphe précédent, les amorceurs permettant d'assurer au mieux un contrôle de la polymérisation du lactide sont les alcoolates de métaux de transition et tout particulièrement : $\text{Al}(\text{OiPr})_3$, $\text{Sn}(\text{OBu})_2$, auxquels il faut ajouter SnOct_2 .

Cependant, pour d'éventuelles applications de nos copolymères dans le domaine biomédical, la toxicité du catalyseur est un facteur qui doit également être pris en compte. Aucune étude de toxicité n'a été publiée sur les amorceurs à base l'aluminium ou de terres rares [11] comme le lanthane, mais les ions aluminium sont soupçonnés de favoriser la maladie d'Alzheimer [93]. Les amorceurs à base d'étain sont quant à eux connus pour être plus ou moins toxiques.

L'ensemble des raisons suivantes nous a conduit à sélectionner SnOct_2 comme co-amorceur. L'octoate d'étain est le catalyseur le plus utilisé. Il possède en outre l'avantage d'être accepté comme stabilisant alimentaire par la législation américaine (Food and Drug Administration = FDA) [77, 94] pour des teneurs inférieures à 100 ppm. La FDA accepte également les polylactides (ou polyglycolides) à condition qu'ils soient synthétisés par POC à l'aide de SnOct_2 [24, 95]. SnOct_2 a l'avantage d'être commercial et plus facile à utiliser que les alcoolates d'aluminium ou de lanthane, voire même d'étain, car il est beaucoup moins sensible à l'hydrolyse [65]. SnOct_2 est relativement peu toxique [67] et présente une cytotoxicité limitée à faible dose (pour des quantités inférieures à 200-300 ppm) [96].

La teneur en SnOct_2 dans nos copolymères dextrane-g-poly lactide, obtenus aux termes des trois étapes de la synthèse, a été vérifiée par analyse élémentaire. Selon la solubilité de ces produits (hydrosolubles ou organosolubles – partie II, chapitre III), la teneur mesurée varie respectivement de 50 ppm à 750 ppm. Une teneur élevée est observée dans le cas des copolymères organosolubles, ce qui est certainement lié au fait que ces produits soient plus difficile purifiable du fait de leur précipitation rapide. Néanmoins, il a déjà été relaté [97] qu'un traitement d'extractions par une solution aqueuse d'acide diéthylènetriaminopentacétique (*cette solution aqueuse rendu neutre par ajout de soude permet de complexer l'étain résiduel et de l'extraire des copolymères*) permettait de diminuer cette teneur jusqu'à environ 100 ppm.

II.1.2. Choix des conditions opératoires : solvant, température

Afin d'améliorer le contrôle de la polymérisation du lactide, il est préférable de pratiquer la polymérisation en milieu homogène et donc de la réaliser en solution. Lorsque la POC du lactide est effectuée dans le THF, ce solvant se complexe sur l'atome métallique [98] ce qui diminue à la fois la réactivité et l'efficacité de l'amorceur, mais aussi la vitesse de polymérisation. Ce phénomène est d'ailleurs accentué dans des solvants encore plus polaires comme l'hexaméthylphosphoro triamide où l'amorçage est trop lent ou n'a pas lieu [87]. Dans le cas des solvants moins polaires comme le toluène [51], cette complexation n'existe pas et la POC procède plus rapidement. De plus, comme le dextrane partiellement silylé est plus facilement soluble dans le toluène que dans le THF, le toluène a été choisi comme solvant de la polymérisation.

Comme nous l'avons vu au paragraphe I.3.3.2 de ce chapitre, la polymérisation peut être contrôlée pour des températures inférieures à 120°C. Afin d'assurer une bonne solubilité

du lactide dans le toluène (solubilisation à partir de 70°C) tout en limitant les réactions de transestérification, nous avons décidé d'effectuer les polymérisations à 100°C.

Afin d'assurer un contrôle de la polymérisation, il convient également d'opérer dans des conditions strictes. Le milieu doit notamment être exempt d'impuretés protoniques. Les réactifs et les solvants ont été préalablement purifiés et toutes les polymérisations ont été réalisées sous atmosphère d'azote.

Signalons enfin, que les polymérisations sont stoppées après trempe thermique du milieu réactionnel à température ambiante, suivie par l'ajout de quelques gouttes d'une solution d'éthanol contenant de faibles quantités d'acide acétique. L'acide acétique est en effet bien connu pour empêcher la coordination du monomère sur les espèces en croissance [70, 78, 81] et pour transformer les centres actifs alcoolates d'étain en fonctions hydroxyle. Les polymères sont ensuite récupérés par précipitation par de l'éthanol froid (cf. Partie Expérimentale).

II.2. Analyse RMN ^1H

Les divers copolymères obtenus ont été analysés en RMN ^1H (Figure II-25):

- Le spectre présente les pics caractéristiques du dextrane silylé (Hanomérique : 4,6-5ppm ; SiMe_3 : 0,1-0,2 ppm ; H glucosidiques : 3,4-4 ppm).
- Deux pics caractéristiques du PLA :
 - CH_3 : 1,56 ppm
 - $-\text{O}-\text{CH}-$: 5,16 ppm
- Selon la proportion en PLA dans le copolymère (dextrane silylé)-g-PLA, le massif correspondant au Hanomérique peut être masqué par le pic représentatif des protons méthynes ($-\text{O}-\text{CH}-$) des greffons PLA.

En se basant sur les aires relatives des différents pics, la fraction massique (F_w^{PLA}) de PLA dans le produit à analyser (et, sous réserve d'une seule population en chromatographie d'exclusion stérique (SEC) dans le copolymère (dextrane silylé)-g-PLA) est accessible :

$$F_w^{\text{PLA}} = \frac{A_{\text{PLA}} \times 72}{A_{\text{PLA}} \times 72 + \frac{A_{\text{DEX}}}{6} \times (M_{\text{UG}} + 3x \times M_{\text{SiMe}_3})} \quad (\text{II-7})$$

avec

- M_{UG} : Masse molaire d'une unité glucose (UG),
- M_{SiMe_3} : Masse molaire du groupement $SiMe_3$,
- A_{DEX} : Aire du massif correspondant aux H glucosidiques du dextrane,
- A_{PLA} : Aire du pic correspondant aux H protons méthyne (-O-CH-) du PLA,
- x : taux de silylation du dextrane silylé (exprimé en %).

S'il est admis que seuls les alcools résiduels sur le dextrane silylé ont amorcé la polymérisation et qu'ils présentent une équiréactivité, la longueur moyenne des greffons de PLA peut être obtenue par:

$$\overline{DP}_n_{REF} = \frac{6 A_{PLA}}{2 A_{DEX}} \times \frac{\overline{DP}_n_{DEX}}{N_{OH}} \quad (II-8)$$

avec

- $\overline{DP}_n_{REF}$: degré de polymérisation moyen d'un greffon polylactide = nombre moyen d'unité répétitive diester (dilactate)=p (Schéma II-17),

- $\overline{DP}_n_{DEX}$: degré de polymérisation moyen du dextrane = nombre moyen d'unité glucose,

- N_{OH} = nombre moyen de fonctions hydroxyle résiduelles portées par la chaîne de dextrane = $\overline{DP}_n_{DEX} \times 3 \left(1 - \frac{x}{100}\right)$

$$\Rightarrow \overline{DP}_n_{REF} = \frac{A_{PLA}}{A_{DEX}} \times \frac{1}{(1 - x/100)} \quad (II-9)$$

La masse molaire moyenne en nombre des greffons de PLA peut alors être évaluée par

$$\overline{M}_n_{REF} = 144 \times \overline{DP}_n_{REF} \quad (II-10)$$

II.3. Synthèses préliminaires

Les premières synthèses ont été effectuées avec une quantité équimolaire de SnOct_2 par rapport aux fonctions hydroxyle résiduelles sur le polysaccharide. Afin de limiter les phénomènes de transestérification, la réaction a été volontairement arrêtée après 5h. Les copolymères obtenus ont été analysés par RMN ^1H dans CDCl_3 et par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en milieu THF (calibration effectuée avec des polystyrènes standards). Ces premières expériences ont été effectuées afin de vérifier la faisabilité de la polymérisation : le produit obtenu précipite par de l'éthanol froid, alors que le dextrane silylé initial n'y précipite pas. Le spectre RMN ^1H du produit met en évidence à la fois du dextrane silylé et du PLA. L'existence d'un copolymère (dextrane silylé)-g-PLA est ainsi confirmée.

La présence d'un tel copolymère (et non d'un mélange dextrane silylé + polylactide) est confirmée par SEC. En effet, on observe sur le chromatogramme SEC (Figure II-26) deux pics de volumes d'élution différents de celui du dextrane silylé initial. Ce changement de volume hydrodynamique témoigne de l'efficacité du greffage sur le polysaccharide.

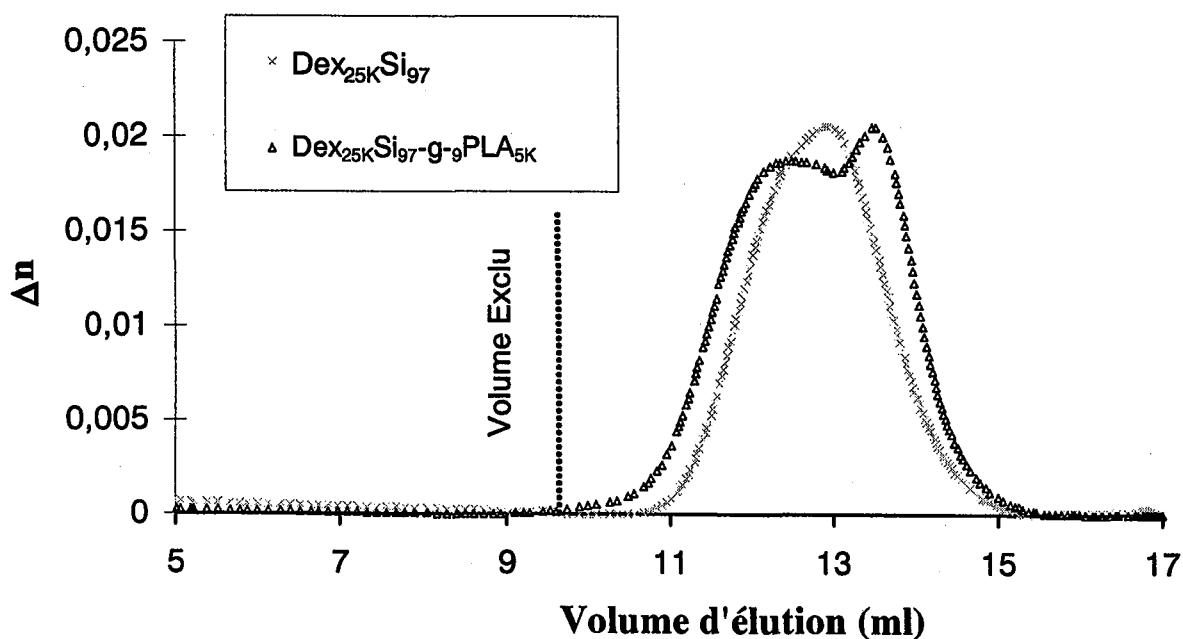


Figure II-26 : Chromatogrammes SEC du copolymère $\text{Dex}_{25\text{K}}\text{Si}_{97}\text{-g-9PLA}_{5\text{K}}$ ($F_w^{\text{PLA}} = 0,57$). Copolymère obtenu par POC du D,L-lactide dans le toluène à 100°C , pendant 5h, avec $[\text{LA}]_0 = 1,4 \text{ mol/L}$, $[\text{SnOct}_2]/[\text{OH}] = 1$ et $f_w^{\text{PLA}} = 0,56$.

Différentes hypothèses peuvent être formulées sur l'origine des deux populations observées en SEC:

① Ces deux populations peuvent être le témoin de la présence d'un copolymère (volume d'élution supérieur à celui du dextrane silylé) et d'un homopolylactide (volume d'élution inférieur à celui du dextrane silylé). Cet homopolymère pourrait avoir été formé soit par polymérisation via un amorçage parasite dû à des impuretés protoniques (trace d'eau présente dans le milieu), soit par des réactions de transestérification intramoléculaire qui conduisent à la formation d'oligolactides cycliques (Schéma II-18).

Par comparaison avec les chromatogrammes de divers polylactides ($\overline{M}_n$ variant de 9 000 à 11 000 g/mol), la $\overline{M}_n$ de cet éventuel homopolylactide peut être estimée à environ 10 000 g/mol. (Figure II-27).

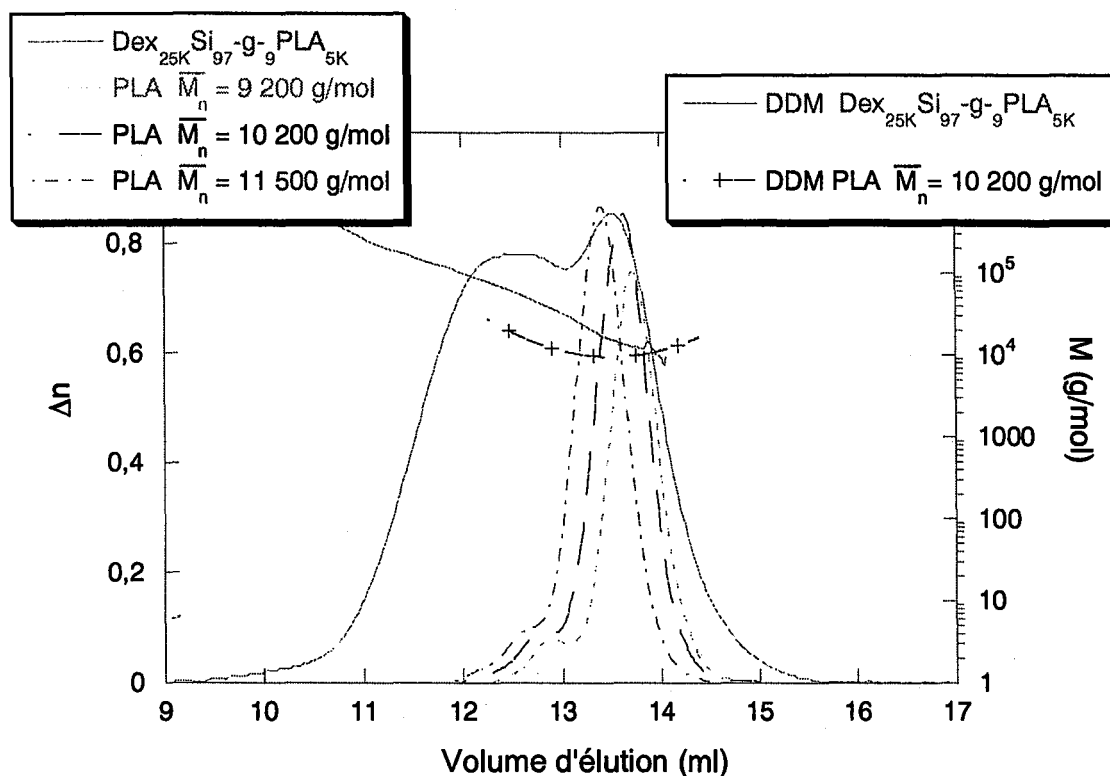


Figure II-27 : Chromatogrammes SEC du copolymère $\text{Dex}_{25K}\text{Si}_{97}\text{-g-9PLA}_{5K}$ et de trois PLA (de masses molaires moyennes respectives 9 200, 10 200 et 11 500 g/mol). (DDM = Distribution des masses molaires).

Toujours dans l'hypothèse d'une impureté homopolylactide, cette valeur de $\overline{M}_n$ serait obtenue pour une quantité d'eau qui peut être estimée à environ 200 ppm. Au vu des

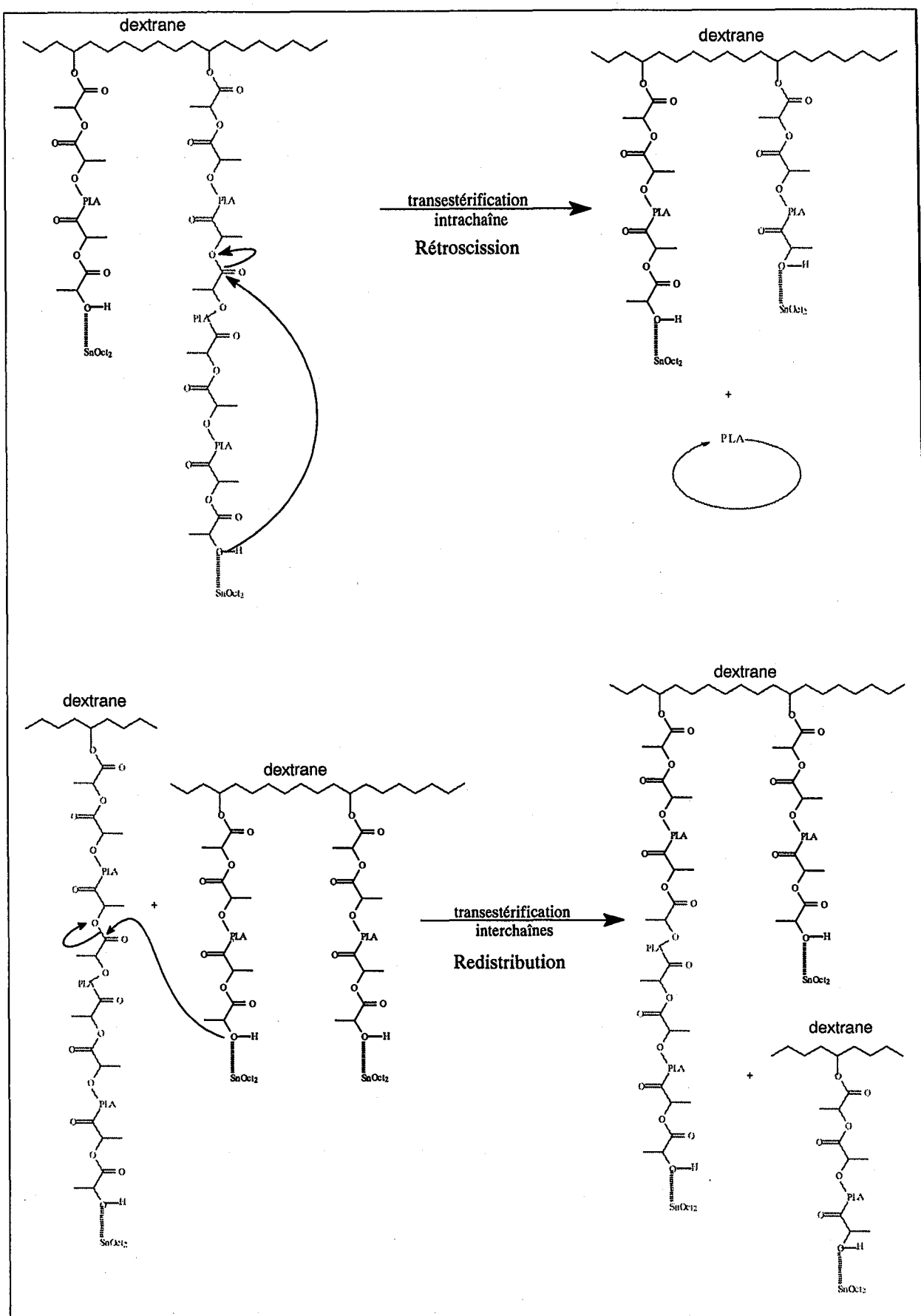


Schéma II-19 : Réactions de transestérification intra- et intermoléculaire.

protocoles de purification de tous les réactifs et solvants de polymérisation (cf. Partie Expérimentale), et compte tenu du fait que cette expérience a été renouvelée plusieurs fois, il est peu probable qu'une telle quantité d'eau ait été présente dans chaque cas. L'hypothèse que cet homopolylactide soit un macrocycle ($\overline{M}_n \approx 10\,000$ g/mol) formé lors de la rétrocission est également peu probable [91].

L'hypothèse de la présence d'homopolylactide comme produit secondaire est donc peu probable.

② Des transestérifications intermoléculaires peuvent aussi conduire à la formation de deux populations de copolymères (Schéma II-19). De tels phénomènes ont récemment été observés par Penczek et coll. dans le cas de la POC du lactide amorcée par $\text{Sn}(\text{O}i\text{Bu})_2$. Un tel phénomène est généralisable pour toute polymérisation où les réactions de transfert bimoléculaires sont très lentes ($k_p \gg k_{tr(2)}$), comme c'est le cas pour SnOct_2 [33, 88] (Tableau II-9).

C'est cette dernière hypothèse (influence non négligeable des réactions de transestérification intermoléculaire) qui semble la plus probable.

II.4. Influence de la quantité d'amorceur

En accord avec les dernières études mécanistiques effectuées par Penczek et coll. [70], il a été envisagé de diminuer le rapport molaire $R = [\text{SnOct}_2]/[\text{OH}]$ ($[\text{OH}] = [\text{fonctions OH résiduelles sur le dextrane silylé initial}]$) afin de limiter les réactions de transestérification observées dans les expériences précédentes. Le contrôle de la polymérisation est alors basé sur les réactions d'échanges très rapides entre espèces dormantes et actives (Schéma II-14) qui contribuent à diminuer la concentration en espèces actives et à limiter les réactions de transestérification.

Afin de vérifier l'influence du rapport R sur le contrôle de la polymérisation et de choisir un rapport convenable, une rapide étude cinétique a été menée. Différents polylactides ont été synthétisés à partir d'un alcool secondaire modèle (l'isopropanol) dans le toluène à 100°C avec divers rapport R ($R = 1; 0,1$ et $0,06$). Dans les deux premiers cas, et conformément aux observations de Penczek et coll., deux populations sont observées sur les chromatogrammes SEC (Figure II-28). Ces deux populations témoignent de la présence de réactions de redistribution. Dans le cas $R = 0,1$, la distribution est bimodale bien que l'indice

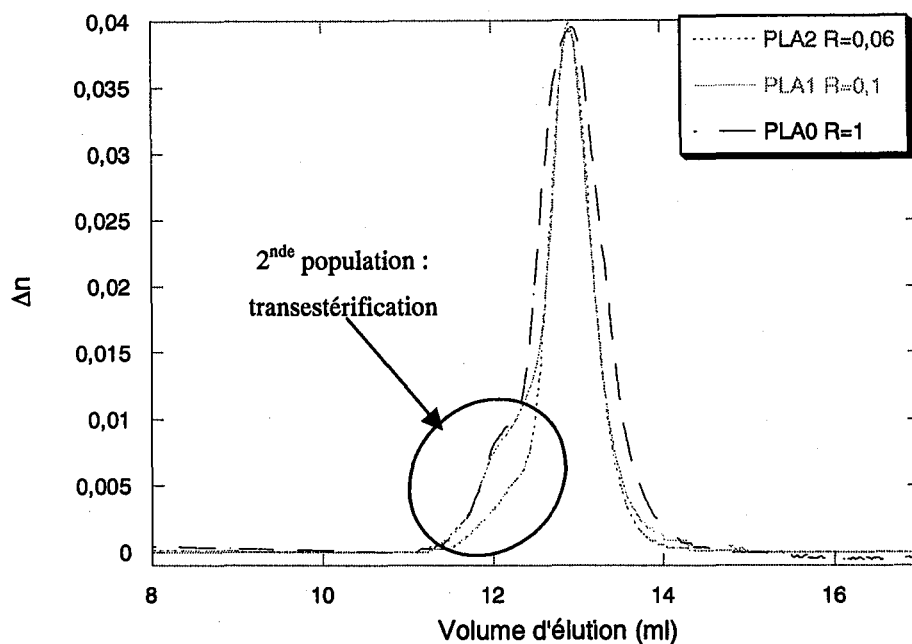


Figure II-28 : Cinétique de polymérisations du D,L-lactide amorcée par i-PrOH dans le toluène à 100°C, $[LA]_0=1,44$ mol/L, 80% de taux de conversion ($R=[SnOc]_2/[OH]$).

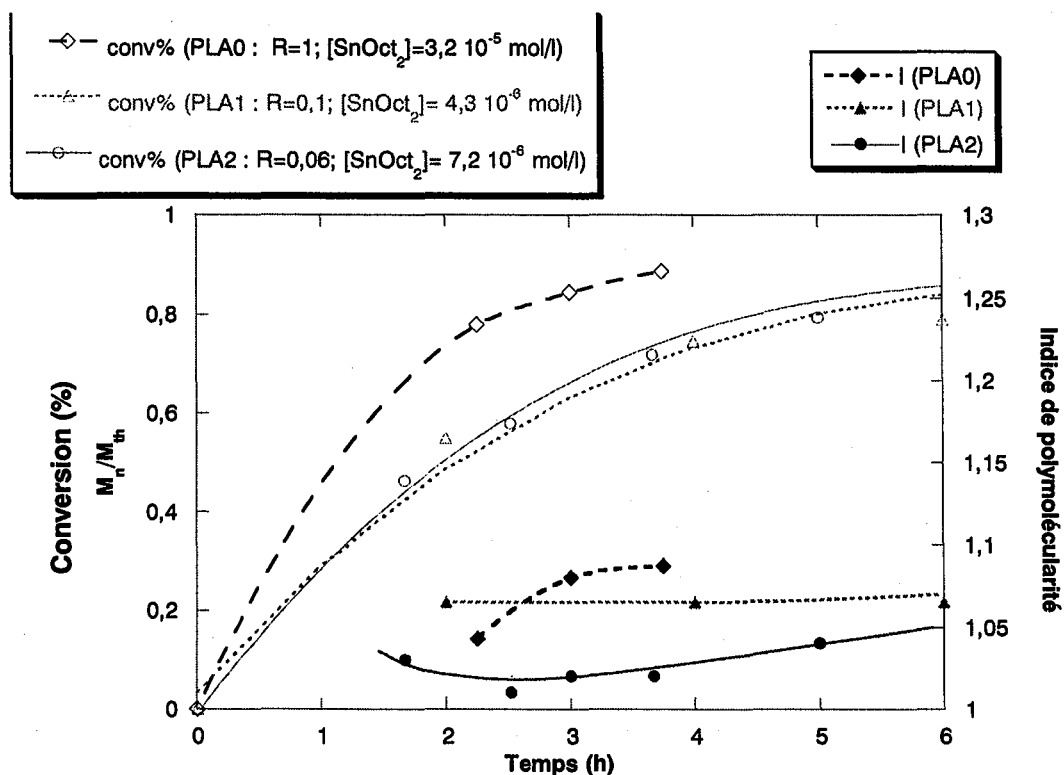


Figure II-29 : Cinétique de polymérisation du D,L-lactide amorcée par i-PrOH dans le toluène à 100°C, $[LA]_0=1,44$ mol/L, $R=[SnOct]_2/[OH]=1, 0,06$ et $0,1$. Evolutions du taux de conversion et de l'indice de polymolécularité en fonction du temps.

de polymolécularité soit faible ($I = 1,06$) jusqu'à de hauts taux de conversion (Figure II-29). A fort taux de conversion, ces deux populations se superposent mais l'indice de polymolécularité reste inférieur à 1,3. Pour un rapport encore plus faible ($R=0,06$), les réactions de transestérification sont presque indiscernables et les indices de polymolécularité sont inférieurs à 1,05 jusqu'à des taux de conversion élevés (Figure II-29).

Abaissier le rapport R permet donc de limiter l'importance des réactions de transestérification intermoléculaires par rapport à la propagation, et d'obtenir ainsi un certain contrôle de la polymérisation.

II.5. Cinétiques de polymérisation sur un dextrane silylé

Conformément aux conclusions du paragraphe précédent, pour limiter l'importance des réactions de transestérification intermoléculaires, nous avons effectué la polymérisation du D,L-lactide à partir d'un macroamorceur dextrane silylé avec de faibles quantités de catalyseur, ($R= 0,03$).

Contrairement au cas de la polymérisation préliminaire réalisée avec $R=1$ (Figure II-26), une seule population est observée sur les chromatogrammes SEC (Figure II-30). Elle présente un volume d'élution supérieur, et un indice de polymolécularité inférieur, à celui du dextrane silylé. Ce déplacement de volume d'élution traduit l'efficacité du greffage. Pour des durées de polymérisation de 48h, les réactions de redistribution commencent à se manifester : il apparaît un léger élargissement de la distribution en taille par rapport à celle observée après 20h de polymérisation, alors que les $\overline{M}_n$ obtenues dans les deux cas sont comparables .

Pour cette raison, une durée de polymérisation de 20h a été choisie pour toutes les expériences suivantes. Cette durée semble être adéquate pour obtenir un taux de conversion élevé (de l'ordre de 90%), tout en limitant les réactions de transestérifications intermoléculaires.

III. BILAN DES POLYMERISATIONS AVEC $R=0,03$

III.1. Analyses RMN 1H et SEC

Aux vues des observations précédentes, nous avons réalisé différentes polymérisations avec un rapport R égal à 0,03 et une durée de polymérisation de 20h. Divers copolymères

Entrées n°	Dextrans silylés				$[LA]_0 / [OH]_0$ (d)	Conv (%) (e)	(DexSi)-g-PLA					
	Désignation (a)	$\overline{N}_{GREF}$ (b)	$\overline{M}_n$ SEC (c)	I SEC (c)			$\overline{DP}_n^{GREF}$ Calc. (f)	$\overline{DP}_n^{GREF}$ RMN (g)	F_W^{PLA} RMN (h)	$\overline{M}_n^{GREF}$ RMN (i)	$\overline{M}_n$ SEC (c)	I SEC (c)
1	Dex _{29K} Si ₈₀	0,60	34 100	1,6	14	ND	13,2*	13,9	0,79	2000	127 600	1,3
2	Dex _{29K} Si ₉₄	0,20	30 900	2,1	1	76	1,0	0,7	0,05	100	40 700	1,8
3	Dex _{13K} Si ₉₁	0,27	14 100	1,8	14	98	13,6	16,7	0,64	2400	51 000	1,7
4	Dex _{13K} Si ₉₁	0,27	14 100	1,8	18	96	17,3	17,4	0,66	2500	54 000	1,7
5	Dex _{13K} Si ₉₁	0,27	14 100	1,8	2	92	2,2	2,3	0,20	330	21 300	1,6
6	Dex _{16K} Si ₉₅	0,15	16 600	1,7	13	95	12,3	11,4	0,40	1640	27 200	1,6
7	Dex _{13K} Si ₈₇	0,39	17 000	1,7	6	93	5,3	6,6	0,51	950	40 700	1,8
8	Dex _{29K} Si ₉₆	0,14	26 000	1,6	12	70	8,6	1,8	0,09	252	27 200	1,6
9	Dex _{13K} Si ₈₉	0,33	16 900	1,8	11	80	9,1	11,0	0,59	1584	32 600	1,7
10	Dex _{29K} Si ₉₄	0,20	30 900	2,1	12	99	11,9	11,9	0,46	1710	65 400	2,0

Tableau II-10 : Polymérisations du D,L-lactide (LA) amorcées par divers dextrans silylés (toluène, 100°C, 20h, avec $[SnOct_2]/[OH] = 0,03$ [(1) $[DexSi] = 50$ g/L ; (2-7) $[DexSi] = 200$ g/L ; (8-10) $[LA + DexSi] = 200$ g/L]).

(a) Dex_nSi_t avec $n = \overline{M}_n$ du squelette dextrane (obtenue après déprotection du dextrane silylé (cf. Partie II Chapitre III) et exprimée kg/mol, t=taux de silylation (%).

(b) $\overline{N}_{GREF}$ = nombre moyen de greffons par unité glucose = nombre moyen de OH résiduels par unité glucose.

(c) Déterminées par SEC, dans le THF à l'aide d'une calibration par des polystyrènes standards. Masses exprimées en g/mol.

(d) Rapport molaire initial lactide/ fonctions OH.

(e) Taux de conversion exprimé en % du lactide initial, déterminé par RMN ¹H

(f) $\overline{DP}_n$ théorique de chaque greffon PLA, en tenant compte du rapport initial (d) et du taux de conversion (e).

* taux de conversion arbitrairement choisi égal à 100%

(g) $\overline{DP}_n$ de chaque greffon en unité dilactate, déterminé par RMN ¹H. (Equation II-9)

(h) F_W^{PLA} : Fraction massique en polylactide dans le copolymère DexSi-g-PLA déterminée par RMN ¹H. (Equation II-7)

(i) $\overline{M}_n$ de chaque greffon, déterminée par RMN ¹H (Equation II-10)

DexSi-g-PLA, de fractions massiques variables en polylactide (F_w^{PLA}), ont été synthétisés. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau II-10.

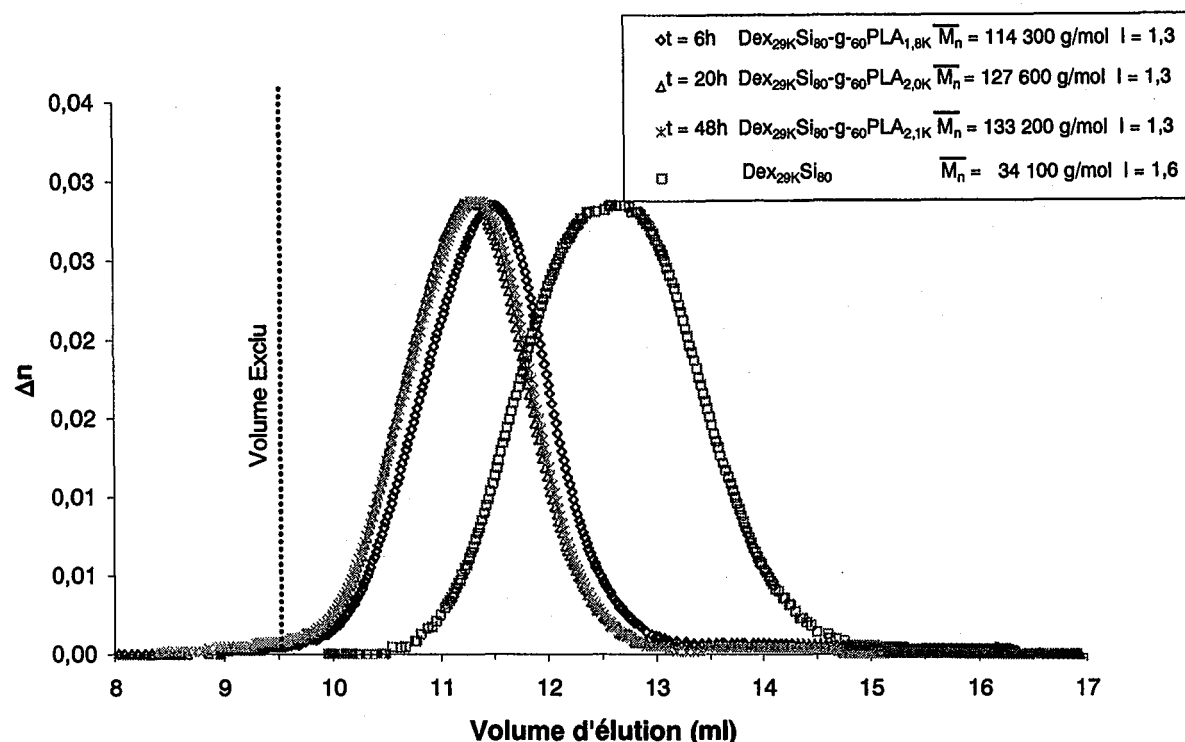


Figure II-30 : Chromatogrammes SEC du dextrane silylé initial (Dex_{29K}Si₈₀) et de copolymères obtenus lors de l'étude de la cinétique de polymérisation du D,L-lactide. (100°C, toluène, $[LA]_0 = 1,44$ mol/l, $R = [SnOct_2]/[OH] = 0,03$)

- Les taux de conversion déterminés par analyse RMN 1H du milieu réactionnel brut (cf. partie IV expérimentale) sont tous supérieurs à 70%.
- Dans chaque cas, une seule population est observée par SEC et l'indice de polymolécularité du copolymère est inférieur ou égal à celui du dextrane silylé initial. Cette observation conforte l'hypothèse que des copolymères DexSi-g-PLA ont effectivement été synthétisés. Le volume hydrodynamique des copolymères pouvant être variable selon leur composition et leur architecture (*nombre et longueur des greffons PLA*), il est assez délicat de tirer des conclusions sur la variation du volume d'élution par rapport à celui du dextrane silylé initial, ou sur les modifications de l'indice de polymolécularité.

- Rappelons que l'analyse RMN ^1H ne permet de déterminer que la fraction massique en polylactide (F_w^{PLA}) dans le copolymère. En posant diverses hypothèses (présence d'un seul copolymère et équiréactivité des fonctions alcool), les degrés de polymérisation moyen en nombre par greffon peuvent être déterminés ($\overline{\text{DP}}_{\text{n GREF}}$) (cf. paragraphe II.1.2).

Une bonne adéquation entre le $\overline{\text{DP}}_{\text{n}}$ théorique des greffons PLA et le $\overline{\text{DP}}_{\text{n GREF}}$ expérimental est observée.

- Comme nous venons de le mentionner, le spectre RMN ^1H peut nous permettre de déterminer les fractions massiques (F_w^{PLA} par exemple) du copolymère DexSi-g-PLA. Par exemple, dans le cas du copolymère Dex_{13K}Si₉₁-g-₂₇PLA_{2,5K}, la F_w^{PLA} déterminée par analyse RMN ^1H dans CDCl_3 est en accord avec la fraction massique initiale en lactide f_w^{PLA} ($f_w^{\text{PLA}} = 0,62$; $F_w^{\text{PLA}} = 0,66$). Au contraire, dans le cas des copolymères (dextrane silylé)-g-poly(ϵ -caprolactone), une surestimation de la fraction massique en polyester F_w^{PCL} a été observée [99]. Elle a été expliquée par un masquage de la dorsale de dextrane silylé par les chaînes poly(ϵ -caprolactone) (PCL) ; ce qui laisserait supposer que ces derniers copolymères adoptent dans le CDCl_3 une conformation de type cœur dextrane silylé-couronne PCL.

Pour ce qui concerne les copolymères DexSi-g-PLA, plusieurs analyses RMN ^1H ont été effectuées dans divers solvants deutérés (Tableau II-11).

CDCl_3	Toluène d_8	Acétone d_6	DMSO d_6	D_2O
0,66	0,68	0,71	1	Non soluble

Tableau II-11 : Influence du solvant deutéré sur la fraction massique en polylactide (F_w^{PLA}) du copolymère Dex_{13K}Si₉₁-g-₂₇PLA_{2,5K} : (Entrée 4, Tableau II-10) : $f_w^{\text{PLA}} = 0,62$; taux de conversion = 0,96 % d'où $F_w^{\text{PLA}} \text{ calculé} = 0,61$.

Dans le cas des solvants deutérés qui sont à la fois solvant du dextrane silylé et du polylactide (CDCl_3 , toluène- d_8 , acétone- d_6), la fraction massique (F_w^{PLA}) est assez peu influencée par la nature du solvant et est proche de la fraction massique théorique. En revanche dans un solvant comme le DMSO où le dextrane silylé n'est pas soluble, la fraction massique obtenue est très supérieure à celle initiale ($F_w^{\text{PLA}} = 1$ et $f_w^{\text{PLA}} = 0,62$).

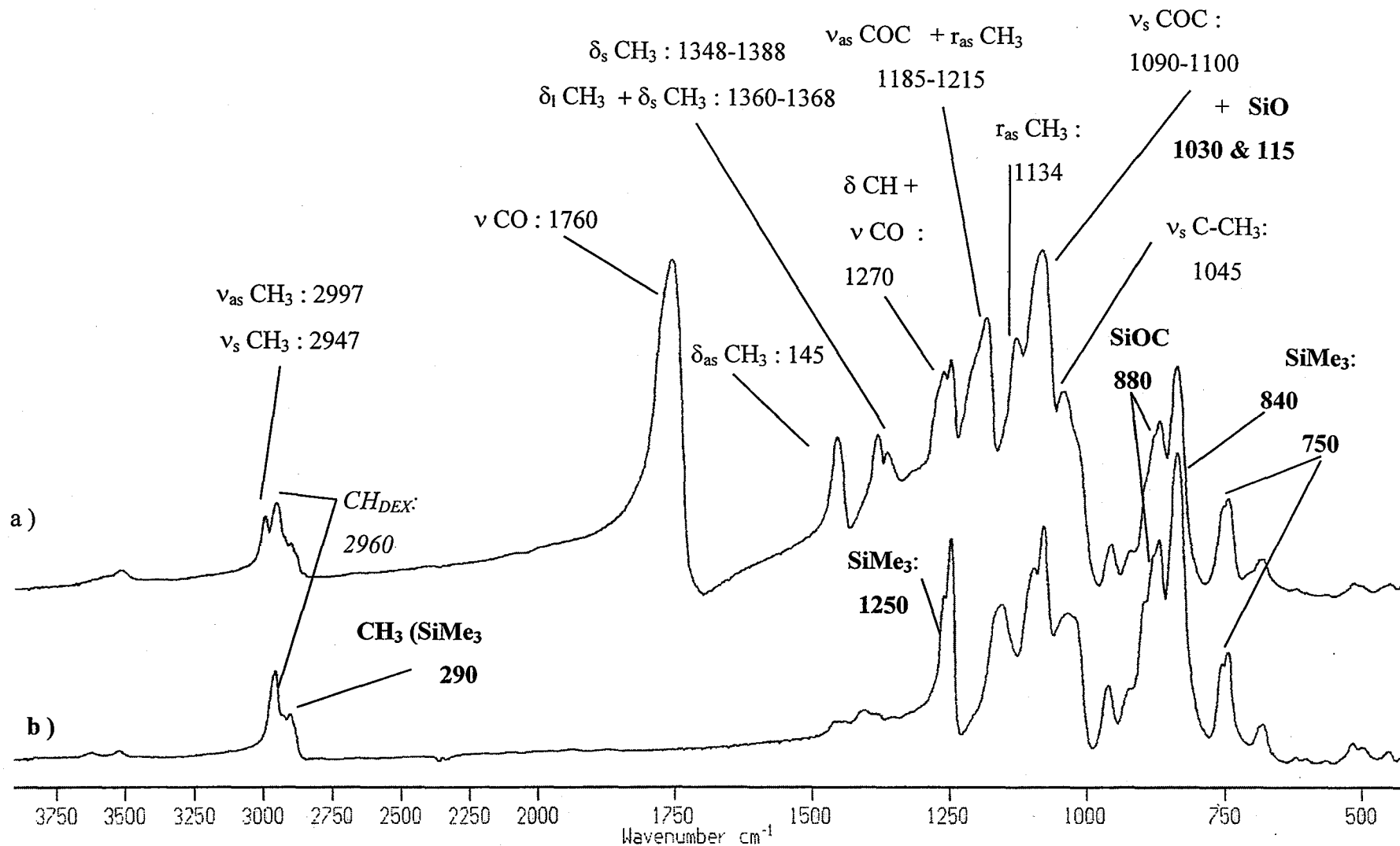


Figure II-31 : Spectres IRTF a) copolymère $\text{Dex}_{13\text{K}}\text{Si}_{91}\text{-g-27PLA}_{5,1\text{K}}$ et b) dextrane silylé $\text{Dex}_{29,8\text{K}}\text{Si}_{100}$. Attribution des bandes caractéristiques du PLA, du dextrane et des groupements silylés.

Ceci est le signe qu'en fonction de la polarité du solvant, le copolymère DexSi-g-PLA peut adopter plusieurs conformations et que, dans le cas du DMSO, il adopte une conformation cœur dextrane silylé-couronne PLA. La différence de comportement entre les copolymères DexSi-g-PLA et DexSi-g-PCL provient probablement de l'hydrophobie réduite du PLA par rapport au PCL.

- Aucune déprotection des groupements silylés n'est observée au cours de la polymérisation, comme en témoignent les taux de silylation obtenus par analyse des spectres RMN ^1H des copolymères DexSi-g-PLA (Figure II-25).
- L'analyse RMN ^1H de ces copolymères dans CDCl_3 permet également de déterminer la nature des extrémités des greffons PLA. Les pics caractéristiques des protons méthyne pénultièmes et parfois des OH terminaux sont observés² : -OCH- (4,35 ppm) et OH (2,7 ppm) [72] (Figure II-25). Néanmoins, il est assez difficile de quantifier l'aire de ces pics.

Tous ces éléments contribuent à renforcer l'hypothèse du greffage effectif du PLA sur le squelette dextrane silylé. Diverses analyses complémentaires ont été effectuées pour confirmer ce résultat.

III.2. Analyse Infra-Rouge

Les spectres infra-rouge des copolymères DexSi-g-PLA confirment la présence à la fois de polylactide et de dextrane silylé dans le produit à analyser. Les principales bandes d'absorption caractéristiques de la partie polylactide peuvent être observées : pics caractéristiques des groupements carbonyle (1760 cm^{-1}), CH_3 ou ceux de vibration des liaisons C-O-C (Figure II-31). Ces bandes se superposent parfois à celles du dextrane silylé, mais certains pics intenses du dextrane silylé (1250 , 880 , 840 et 750 cm^{-1}) demeurent visibles.

L'allure des bandes dans la zone autour de 1300 cm^{-1} confirme qu'il s'agit de greffons d'un poly(D,L-lactide) amorphe, conformément à l'étude comparative faite par Vert et coll. entre divers polylactides de stéréorégularités différentes [100].

² Les déplacements chimiques de ces pics correspondent à ceux déterminés par Dubois et coll. pour des polylactides synthétisés à l'aide d' $\text{Al}(\text{OiPr})_3$ [73].

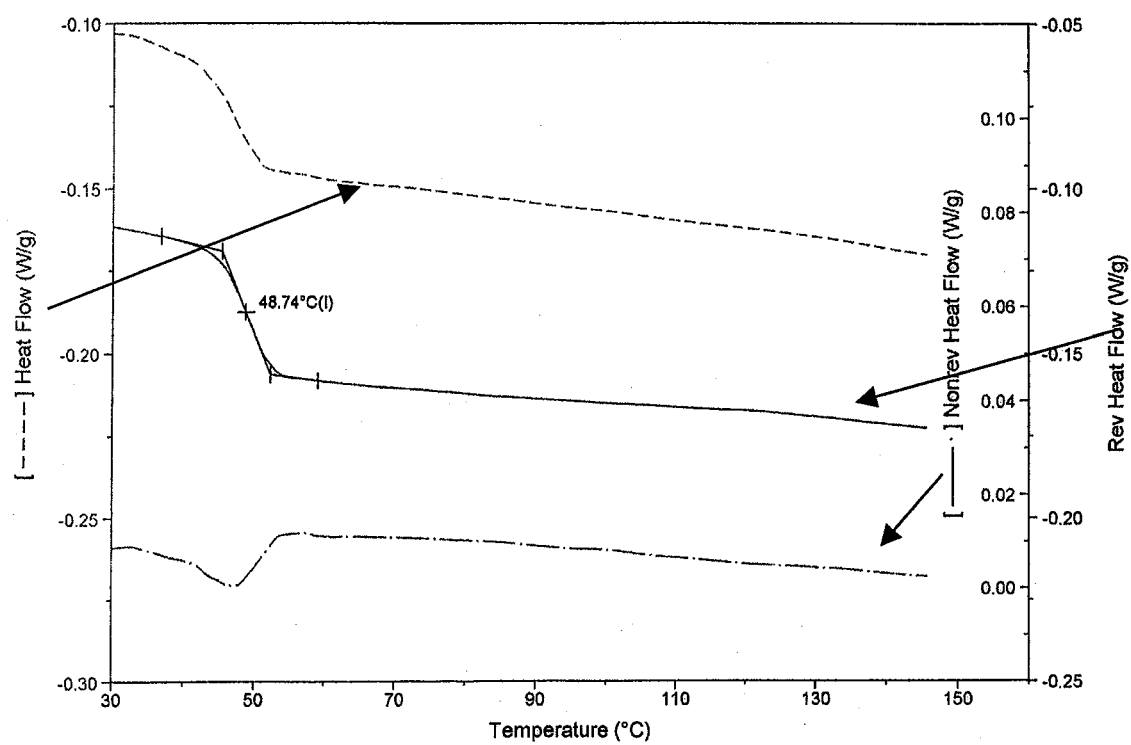


Figure II-32 : Thermogramme MDSC du copolymère $\text{Dex}_{29\text{K}}\text{Si}_{80}\text{-g-60-PLA}_{2\text{K}}$.

Malheureusement, cette analyse IR ne permet pas de confirmer ou d'infirmer l'effective liaison entre les parties dextrane silylé et PLA.

III.3. MDSC

Une rapide analyse en MDSC sur l'un des copolymères (Dex_{29K}Si₈₀-g-₆₀PLA_{2K}; Entrée 1 Tableau II-10) a été effectuée afin de déterminer les températures de transition vitreuse (T_g) caractéristiques de chaque partie (squelette dextrane silylé/greffons polylactide). Le thermogramme est présenté sur la Figure II-32. Une seule température de transition vitreuse, située à 47°C, est observée. Cette température étant proche de celle du PLA (comprise en générale entre 40 et 60°C), il est alors difficile de conclure si cette température doit être attribuée à la partie PLA du copolymère ou aux deux parties dextrane silylé et PLA miscibles entre elles.

III.4. RMN ¹³C & HMQC

Afin de confirmer le greffage du PLA sur le polysaccharide, des analyses RMN ¹³C et RMN 2D (Cosy 45° et HMQC) ont été effectuées.

III.4.1. RMN ¹³C

La comparaison des spectres RMN ¹³C des copolymères DexSi-g-PLA avec ceux du dextrane silylé initial met en évidence à la fois les pics caractéristiques des carbones CO, CH, et CH₃ des greffons de polylactide, et ceux correspondant aux unités silylées du dextrane protégé (Figure II-33). Mais des pics supplémentaires sont également mis en évidence dans la zone 65-85 ppm. Il est probable que ces pics correspondent soit à des carbones glucosidiques portant les greffons PLA, soit à des carbones silylés voisins de ces premiers. En effet, et nous l'avons déjà mentionné, une modification chimique sur un hydroxyle d'un carbone glucosique entraîne le déplacement chimique du pic correspondant à ce carbone, mais également ceux de ses voisins [101-105]. Pour confirmer cette hypothèse, l'étude suivante a été menée afin d'attribuer ces pics.

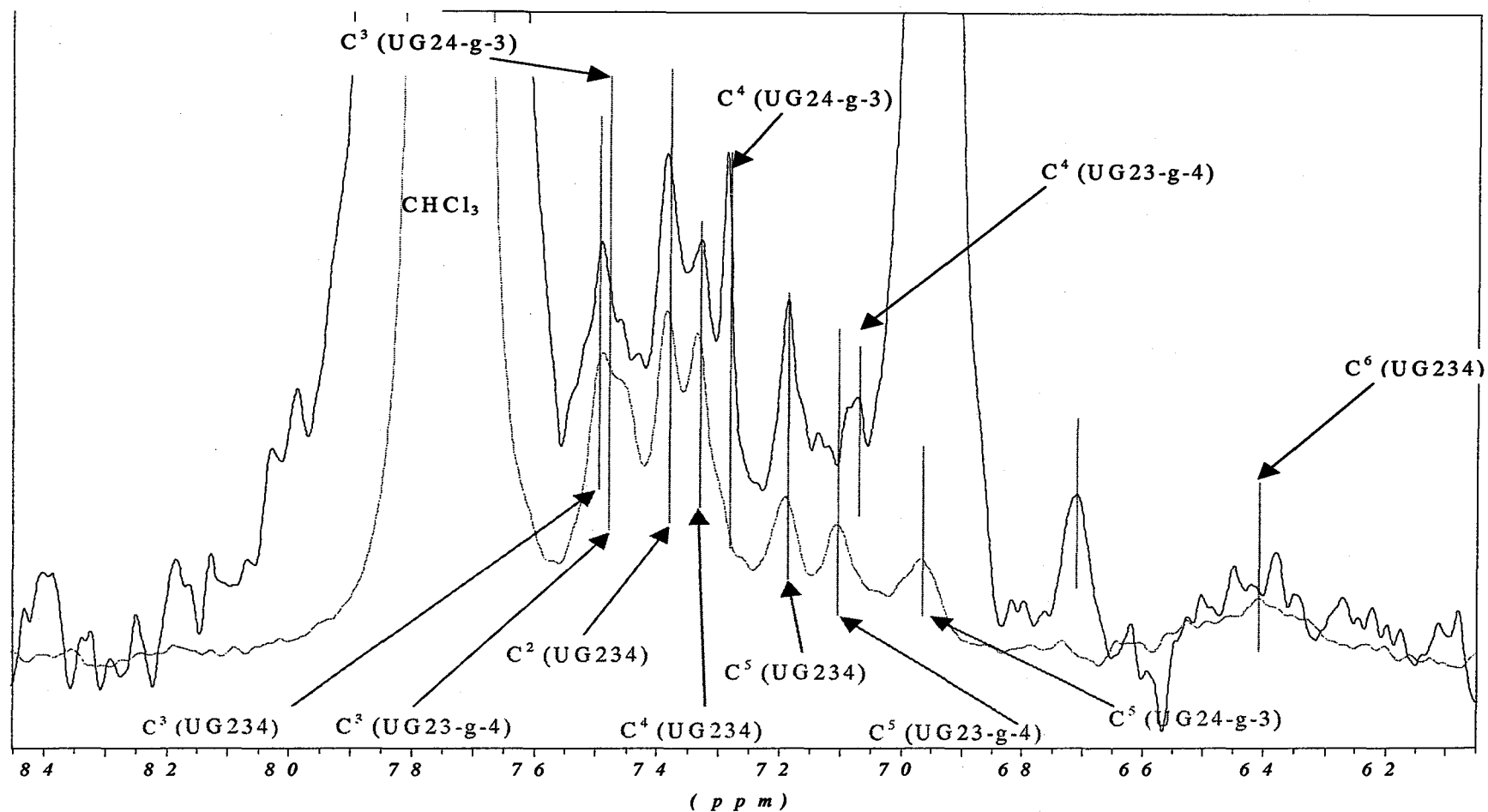


Figure II-34 : Spectres RMN ^{13}C du copolymère $\text{Dex}_{13\text{K}}\text{Si}_{91}\text{-g-PLA}_{2,5\text{K}}$ et d'un dextrane silylé $\text{Dex}_{15\text{K}}\text{Si}_{92}$ (CDCl_3)

C^x (UGXYZ) = carbone n°x situé sur une unité glucose silylée en X,Y,Z.

C^x (UGXY-g-Z) = carbone n°x situé sur une unité glucose silylée en X, Y, et portant un greffon en Z.

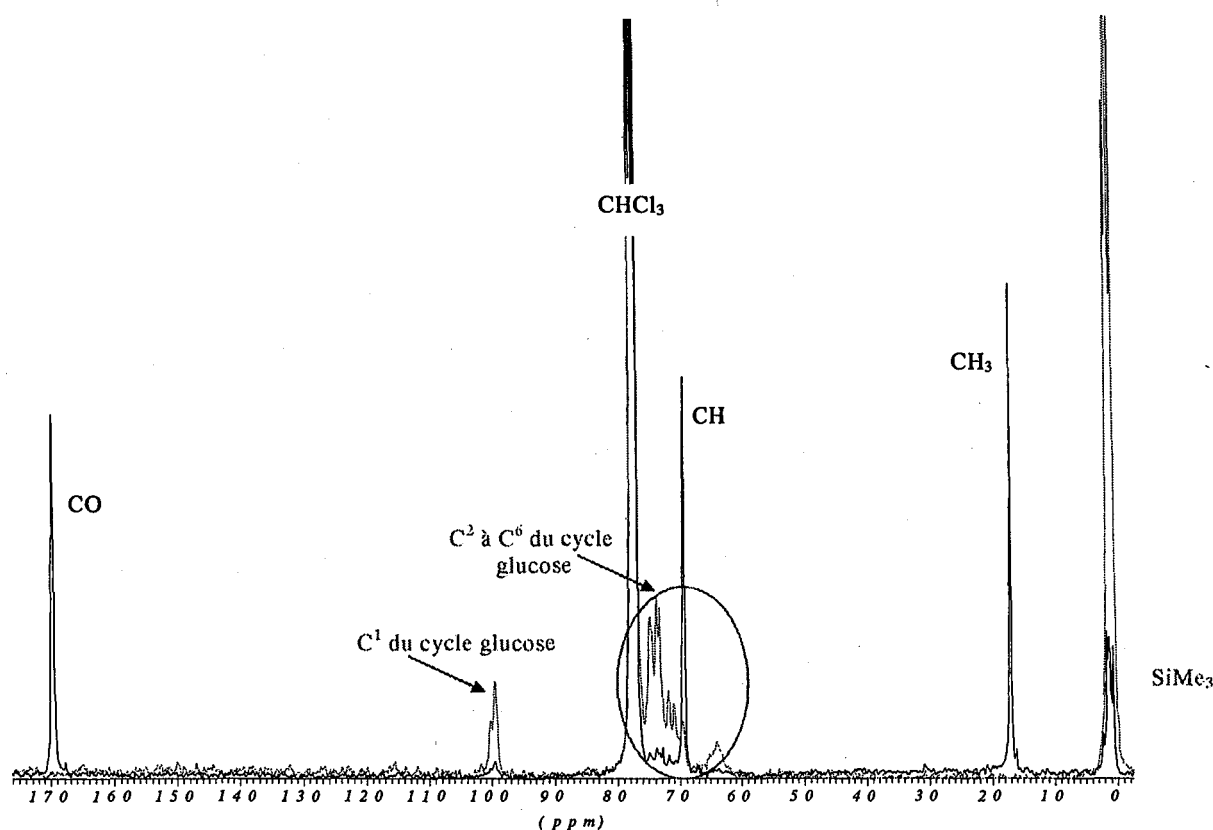


Figure II-33 : Spectres RMN ^{13}C du copolymère $\text{Dex}_{13\text{K}}\text{Si}_{91}\text{-g-27PLA}_{2.5\text{K}}$ et d'un dextrane silylé $\text{Dex}_{15\text{K}}\text{Si}_{92}$. (CDCl_3).

III.4.2. RMN 2D (HMQC)

L'analyse du spectre RMN couplé $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (Figure II-34) met en évidence le couplage entre le premier hydrogène du méthyne du PLA (celui le plus proche des unités glucoses) et certains carbones du cycle glucose silylé. Ces carbones peuvent porter des greffons PLA mais également être des carbones glucosidiques voisins aux précédents. Les principaux pics du spectre ont pu être attribués et sont présentés sur la Figure II-35. Ces différents pics confirment la présence de greffons PLA sur les carbones n°4 et n°3 (Figure II-14), en accord avec notre conclusion sur la réactivité relative des différents alcool du cycle glucose (cf. Partie II, Chapitre I, paragraphe VII. 3.3.3.).

L'hypothèse du couplage exprimée précédemment est alors démontrée comme l'est l'effective liaison entre les greffons PLA et le squelette dextrane silylé.

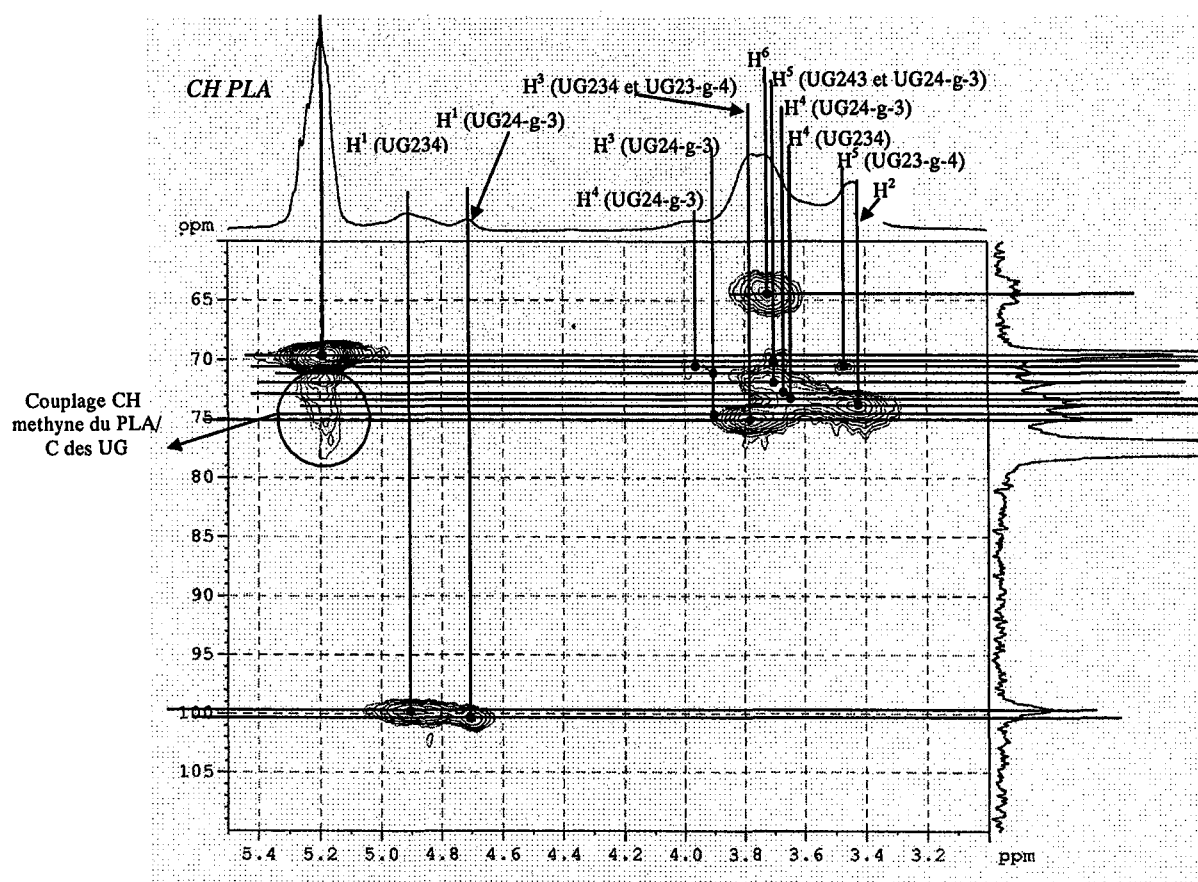


Figure II-35 : Spectre HMQC (RMN 2D) d'un copolymère Dex_{29K}Si_{94-g-20}PLA_{1,7K} (CDCl₃)

C^x (UGXYZ) = carbone n°x situé sur une unité glucose silylée en X,Y,Z.

C^x (UGXY-g-Z) = carbone n°x situé sur une unité glucose silylée en X, Y, et portant un greffon en Z.

IV. CONCLUSION

La seconde étape de notre synthèse (génération de greffons PLA à partir des fonctions alcool résiduelles sur le squelette dextrane partiellement silylé) a été réalisée en assurant un relatif contrôle de la longueur et de la polymolécularité des greffons. La polymérisation par ouverture du D,L-lactide en solution a été réalisée dans le toluène, à 100°C, pendant 20h en présence de quantité catalytique d'octoate d'étain.

La caractérisation des copolymères DexSi-g-PLA a permis de mettre en évidence le greffage effectif entre les deux parties (dextrane silylé et polylactide) et le changement de conformation des copolymères en fonction de la polarité du solvant.

Il fallait cependant vérifier que cette étape ne générât pas de dégradation du squelette polysaccharidique. Dans le chapitre III de cette partie II, nous présenterons les résultats qui nous ont permis de réaliser cette vérification. La dernière étape de notre synthèse (déprotection des groupements silylés) fera également l'objet de ce prochain chapitre.

V. BIBLIOGRAPHIE

1. Lunt J.,
Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers.
Polym. Degrad. Stabil., 1998. **59**: p. 145-152
2. Dorgan J. R., Lehermeier H. J., Palade L.-I. and Cicero J.,
Polylactides: properties and prospects of environmentally benign plastic from renewable resources.
Macromol. Symp., 2001. **175**: p. 55-66
3. Jacobsen S., Fritz H. G., Degée P., Dubois P. and Jérôme R.,
New developments on the ring opening polymerisation of polylactide.
Ind. Crops and Products, 2000. **11**: p. 265-275
4. Ikada Y. and Tsuji H.,
Biodegradable polyesters for medical and ecological applications.
Macromol. Rapid. Commun., 2000. **21**: p. 117-132
5. Ikada Y. and Tsuji H.,
Physical properties of polylactides.
Curr. Trends Polym. Sci., 1999. **4**: p. 27-46
6. Gilding D. K. and Reed A. M.,
Biodegradable polymers for use in surgery-polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers.
Polymer, 1979. **20**: p. 1459-1464
7. Vert M.,
La nécessité d'une terminologie pour les macromolécules et les matériaux polymères dégradables,
in *Les polymères naturels: structure, modifications, applications*, M. Rinaudo, Editor.
2000, GFP. p. 453-456
8. Dubois P.,
Matières plastiques de demain : l'enjeu des polyesters biodégradables?
Actualités GFP, 2002. **91**: p. 25-30
9. Wise D. L., Fellmann T. D., Sanderson J. E. and Wenworth R. L.,
Lactic/Glycolic Acid Polymers,
in *Drug Carriers in Biology and Medicine*, Gregoriadis, Editor.
1979, Academic Press: London, New York, San Francisco. p. 237-270
10. Bendix D.,
Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications.
Polym. Degrad. Stabil., 1998. **59**: p. 129-135
11. Vert M.,
Lactide polymerization faced with therapeutic application requirements.
Macromol. Symp., 2000. **153**: p. 333-342
12. Kricheldorf H. R.,
Syntheses and application of polylactides.
Chemosphere, 2001. **43**: p. 49-54
13. Kricheldorf H. and Kreiser-Saunders I.,
Polylactides- Synthesis, characterization and medical application.
Macromol. Symp., 1996. **103**: p. 85-102

14. Calandrelli L., Immirzi B., Malinconico M., Volpe M., Oliva A. and Della Ragione F.,
Preparation and characterization of composites based on biodegradable polymers for in vivo application.
Polymer, 2000. **41**: p. 8027-8033
15. Couvreur P.,
XIV. Vecteurs nanoparticulaires de médicaments,
in *Formes pharmaceutiques nouvelles.*, J.-P. Benoit, Editor.
1985, Lavoisier: Paris. p. 577-611
16. Dellacherie E., Gref R. and Quellec P.,
Les nanosphères "furtives" comme nouvelles formes galéniques injectables : espoirs et réalités.
in *médecine/sciences.* 2001. p. 619-626
17. Kwon G. S. and Kataoka K.,
Block copolymer micelles as long circulating drug vehicles.
Adv. Drug Deliv. Rev., 1995. **16**: p. 295-309
18. Zambaux M. F., Bonneaux F., Gref R., Maincent P., Dellacherie E., Alonso M. J., Labrude P. and Vigneron C.,
Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method.
J. Control. Release, 1998. **50**: p. 31-40
19. Löfgren A., Albertsson A.-C., Dubois P. and Jérôme R.,
Recent advances in Ring-Opening Polymerization of lactones and related compounds.
J. M. S.-Rev. Macromol. Chem. Phys., 1995. **C35**: p. 379-418
20. Dubois P., Degée P., Ropson N. and Jérôme R.,
Macromolecular engineering of polylactones and polylactides by ring-opening polymerization,
in *Macromolecular design of polymer materials*, O. Vogl, Editor.
1997, Marcel Dekker: New-york, Basel, Hong Kong. p. 247-272
21. Mecerreyes D., Jérôme R. and Dubois P.,
Novel macromolecular architectures based on aliphatic polyesters : relevance of the "coordination-insertion" ring-opening polymerization.
Adv. Polym. Sci., 1999. **147**: p. 2-59
22. Okada M.,
Chemical synthesis of biodegradable polymers.
Prog. Polym. Sci., 2002. **27**: p. 87-133
23. Möller M., Hedrick J. L., Degée P. and Dubois P.,
Targeted synthesis of aliphatic polyester-based architectures by ring-opening polymerization.
Encyclopedia of Polymer Science, 2001: p. Sous presse
24. Vert M., Li S., Garreau H., Mauduit J., Boustta M., Schwach G., Engel R. and Coudane J.,
Complexity of the hydrolytic degradation of aliphatic polyesters.
Angew. Makromol. Chem., 1997. **247**: p. 239-253
25. Duda A. and Penczek S.,
Thermodynamics of L-lactide polymerization. Equilibrium monomer concentration.
Macromolecules, 1990. **23**: p. 1636-1639
26. Witzke D. R., Narayan R. and Kolstad J. J.,
Reversible kinetics and thermodynamics of the homopolymerization of L-Lactide with 2-ethylhexanoic acid Tin(II) Salt.
Macromolecules, 1997. **30**: p. 7075-7085

27. Kricheldorf H. and Dunsing R.,
Polylactones. 8. Mechanism of the cationic polymerization of L, L-dilactide.
Makromol. Chem., 1986. **187**: p. 1611-1625
28. Jedlinski Z. and Watach W.,
Polymerization of lactones. 12. Polymerization of L-lactide and D,L-lactide in the presence of potassium methoxide.
Makromol. Chem., 1991. **192**: p. 2051-2057
29. Kricheldorf H. R. and Kreiser-Saunders I.,
Polylactones. 19th. Anionic polymerization of L-lactide in solution.
Makromol. Chem., 1990. **191**: p. 1057-1066
30. Kricheldorf H. and Boettcher C.,
Polylactones. 27. Anionic polymerization of L-lactide. Variation of endgroups and synthesis of block copolymers with poly(ethylene oxide).
Makromol. Chem., Macromol. Symp., 1993. **73**: p. 47-64
31. Kurcok P., Penczek J., Franck J. and Jedlinski Z.,
Anionic Polymerization of lactones. 14. Anionic Block Copolymerization of δ -valerolactone and L-lactide initiated with potassium methoxide.
Macromolecules, 1992. **25**: p. 2285-2289
32. Jérôme R. and Teyssié P.,
34. Anionic ring-opening polymerization : Lactones,
in *Comprehensive Polymer Science. The synthesis, characterization, reactions & applications of polymers.*, P. Sigwalt, Editor.
1989, Pergamon Press: Oxford, New York, Beijing, Frankfurt, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto. p. 501-510
33. Penczek J., Duda A., Szymanski R. and Biela T.,
What we have learned in general from cyclic esters polymerization.
Macromol. Symp., 2000. **153**: p. 1-15
34. Kricheldorf H. and Kreiser-Saunders I.,
Polylactides- Synthesis, characterization and medical application.
Macromol. Symp., 1996. **103**: p. 85-102
35. Jedlinski Z., Kurcok P. and Lenz R. W.,
Synthesis of potentially biodegradable polymers.
J. M. S.-Pure Appl. Chem., 1995. **A32**: p. 7976-810
36. Rozenberg B. A., Estrin Y. I. and Estrina G. A.,
Synthesis and characterization of di-triblock copolymers of ϵ -caprolactone and 1,3-butadiene.
Macromol. Symp., 2000. **153**: p. 197-208
37. Kricheldorf H. and Sumbel M.,
Polylactones. 18. Polymerization of L-lactide with Sn(II) and Sn(IV) halogenides.
Eur. Polym. J., 1989. **25**: p. 585-591
38. Dahlmann J. and Rafler G.,
Biodegradable polymers. 7th Comm. On the mechanism of ring-opening polymerization of cyclic esters of aliphatic hydroxycarboxylic acids by means of different tin compounds.
Acta Polymer, 1993. **44**: p. 103-107
39. Kohn F., Van Ommen J. and Feijen J.,
The mechanism of the ring opening polymerization of lactide and glycolide.
Eur. Polym. J., 1983. **19**: p. 1081-1088

40. Stolt M. and Södergard A.,
Use of monocarboxylic iron derivatives in the ring opening polymerisation of L-Lactide.
Macromolecules, 1999. **32**: p. 6412-6417
41. Kricheldorf H. R. and Damrau D.-O.,
Polylactones. 38^a). Polymerization of L-lactide with Fe(II) lactate and other resorbable Fe(II) salts.
Macromol. Chem. Phys., 1997. **198**: p. 1767-1774
42. Kreiser-Saunders I. and Kricheldorf H. R.,
Polylactones. 39^a). Zn lactate catalyzed copolymerization of L-lactide with glycolide or other ϵ -caprolactone.
Macromol. Chem. Phys., 1998. **199**: p. 1081-1087
43. Kricheldorf H. R. and Damrau D.-O.,
Polylactones. 37^a). Polymerization of L-lactide with Zn(II) lactate and other resorbable Zn(II) salts.
Macromol. Chem. Phys., 1997. **198**: p. 1753-1766
44. Kricheldorf H. and Boettcher C.,
Polylactones. 20. Polymerization of ϵ -caprolactone with tributyltin derivatives : A mechanistic study.
Macromolecules, 1991. **24**: p. 1944-1949
45. Kricheldorf H., Kreiser-Saunders I. and Stricker A.,
Polylactones. 48. SnOct₂-initiated polymerization of lactide : a mechanistic study.
Macromolecules, 2000. **33**: p. 702-709
46. Barakat I., Dubois P., Grandfils C. and Jérôme R.,
*Poly(ϵ -caprolactone-*b*-glycolide) and Poly(D,L-lactide-*b*-glycolide) diblock copolyesters. Controlled synthesis, characterization, and colloidal dispersions.*
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 2001. **39**: p. 294-306
47. Dubois P., Jacobs C., Jérôme R. and Teyssié P.,
Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. 4. Mechanism and kinetics of lactide homopolymerisation aluminium isopropoxide.
Macromolecules, 1991. **24**: p. 2266-2270
48. Jacobs C., Dubois P., Jerome R. and Teyssie P.,
Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. 5. Synthesis and characterization of diblock copolymers based on poly(ϵ -caprolactone) and poly (L,L or D,L-lactide) by aluminum alkoxides.
Macromolecules, 1991. **24**: p. 3027-3034
49. Kowalski A., Duda A. and Penczek J.,
Polymerization of L,L-Lactide initiated by aluminium isopropoxide trimer or tetramer.
Macromolecules, 1998. **31**: p. 2114-2122
50. Dubois P. and Teyssié P.,
Aluminium Alkoxides : a family of versatile initiators for the ring-opening polymerization of lactones and lactides.
Makromol. Chem., Macromol. Symp., 1991. **42-43**: p. 103-116
51. Jhurry D., Bhaw-Luximon A. and Spassky N.,
Synthesis of polylactides by new aluminium schoff's base complexes.
Macromol. Symp., 2001. **175**: p. 67-79
52. Liu Y.-C., Ko B.-T. and Lin C.-C.,
A highly efficient catalyst for the "Living" and "Immortal" polymerization of ϵ -caprolactone and L-lactide.
Macromolecules, 2001. **34**: p. 6196-6201

53. Ryner M., Finne A., Albertsson A.-C. and Kricheldorf H. R.,
(L-lactide) macromonomer synthesis initiated by new cyclic tin alkoxides fonctionnalized for brushlike structures.
Macromolecules, 2001. **33**: p. 7281-7287
54. Stridsberg K., Ryner M. and Albertsson A.-C.,
Dihydroxy terminated poly(L-lactide) obtained by controlled ring-opening polymerization : investigation of the polymerization mechanism.
Macromolecules, 2000. **33**: p. 2862-2869
55. Kowalski A., Libiszowski J., Duda A. and Penczek S.,
Polymerization of L,L-Lactide initiated by tin (II) butoxide.
Macromolecules, 2000. **33**: p. 1964-1971
56. Möller M., Nederberg F., Lim L. S., Kange R., Hawker C. J., Hedrick J. L., Gu Y., Shah R. and Abott N. L.,
Stannous (II) trifluoromethane sulfonate. A versatile catalyst for the controlled ring-opening polymerization of lactides. Formation of stereoregular surfaces from polylactides "Brushes".
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 2001. **39**: p. 3529-3538
57. Simic V., Spassky N. and Hubert-Pfalzgraf L. G.,
Ring-opening polymerization of D,L-lactide using rare-earth μ -oxo isopropoxides as initiators systems.
Macromolecules, 1997. **30**: p. 7338-7340
58. Save M., Schappacher M. and Soum A.,
Controlled ring-opening polymerization of lactones and lactides initiated by lanthanum isopropoxide, 1. General aspects and kinetics.
Macromol. Chem. Phys., 2002. **203**: p. 889-899
59. Save M. and Soum A.,
Controlled ring-opening polymerization of lactones and lactides initiated by lanthanum isopropoxide. 2. Mechanistic studies.
Macromol. Chem. Phys., 2002:
60. Stevels W. M., Ankoné M. J. K., Dijkstra P. J. and Feijen J.,
Kinetics and mechanism of L-Lactide polymerization using two different yttrium alkoxides as initiators.
Macromolecules, 1996. **29**: p. 6132-6138
61. Chamberlain B. M., Jazdzewski B. A., Pink M., Hillmyer M. A. and Tolman W. B.,
Controlled polymerization of DL-lactide and ϵ -caprolactone by structurally well-defined alkoxo-bridged di- and triyttrium (III) complexes.
Macromolecules, 2000. **33**: p. 3970-3977
62. O'keefe B. J., Monnier S. M., Hillmyer M. A. and Tolman W. B.,
Rapid and controlled polymerization of lactide by structurally characterized ferric alkoxides.
J. Am. Chem. Soc., 2001. **123**: p. 339-340
63. Matsumura S., Mabuchi K. and Toshima K.,
Lipase-catalysed ring-opening polymerization of lactide.
Macromol. Rapid. Commun., 1997. **18**: p. 477-482
64. Deng F., Bisht K. S., Gross R. A. and Kaplan D. L.,
Chemoenzymatic Synthesis of a multiarm poly(lactide-co- ϵ -caprolactone).
Macromolecules, 1999. **32**: p. 5159-5161
65. Duda A., Penczek S., Kowalski A. and Libiszowski J.,
Polymerizations of ϵ -caprolactone and L,L-lactide initiated with stannous octoate and stannous butoxide - a comparison.
Macromol. Symp., 2000. **153**: p. 41-53

66. Kricheldorf H.,
Tin-initiated polymerizations of lactones : mechanistic and preparative aspects.
Macromol. Symp., 2000. **153**: p. 55-65
67. Storey R. F. and Sherman J. W.,
Kinetics and mechanisms of the stannous octoate -catalysed bulk polymerization of ϵ -caprolactone.
Macromolecules, 2002. **35**: p. 1504-1512
68. Kricheldorf H., Kreiser-Saunders I. and Boettcher C.,
Poly(lactones).31. Sn(II) octoate initiated polymerization of L-lactide : a mechanistic study.
Polymer, 1995. **33**: p. 1253-1259
69. Kowalski A., Duda A. and Penczek S.,
Kinetics and mechanisms of cyclic esters polymerization initiated with tin(II) octoate. 1. Polymerization of ϵ -caprolactone.
Macromol. Rapid. Commun., 1998. **19**: p. 567-572
70. Kowalski A., Duda A. and Penczek S.,
Mechanism of cyclic ester polymerization initiated with tin(II) octoate. 3. Polymerization of L,L-lactide.
Macromolecules, 2000. **33**: p. 7359-7370
71. Nijenhuis A., Grijpma D. and Pennings A.,
Lewis acid catalyzed polymerization of L-lactide. Kinetics and mechanism of the bulk polymerization.
Macromolecules, 1992. **25**: p. 6419-6424
72. Dubois P., Degée P., Jérôme R. and Teyssié P.,
Bulk polymerization of lactides initiated by aluminum isopropoxide. I. Mechanism and Kinetics.
Macromol. Symp., 1997. **123**: p. 67-84
73. Dubois P., Degée P., Jérôme R. and Teyssié P.,
Bulk polymerization of lactides initiated by aluminium isopropoxide. 3^a. Thermal stability and viscoelastic properties.
Macromol. Chem. Phys., 1997. **198**: p. 1985-1995
74. Dubois P., Degée P., Jérôme R. and Teyssié P.,
Beneficial effect of triphenylphosphine on the bulk polymerization of L,L-lactide promoted by 2-ethylhexanoic acid tin (II) salt.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1999. **37**: p. 2413-2420
75. Dubois P., Degée P., Jérôme R. and Teyssié P.,
Bulk polymerization of lactides initiated by aluminium isopropoxide, 2^o. Beneficial effect of lewis bases and transfer agents.
Macromol. Chem. Phys., 1997. **198**: p. 1973-1984
76. In't Veld P. J. A., Velner E. M., De Witte P. V., Hamhuis J., Dijkstra P. J. and Feijen J.,
Melt Block Copolymerization of ϵ -Caprolactone and L- Lactide.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1997. **35**: p. 219-226
77. Leenslag J. and Pennings A.,
Synthesis of high molecular weight poly(L-lactide) initiated with tin 2-ethylhexanoate.
Makromol. Chem., 1987. **188**: p. 1809-1814
78. Zhang X., Mac Donalds D. A., Goosen M. F. A. and Mccauley K. B.,
Mechanism of lactide polymerization in the presence of SnOct₂. The effect of hydro- and carboxylic acid substances.
J. Polym. Sci. A. Polym. Chem., 1994. **32**: p. 2965-2970

79. Storey R. F. and Taylor A. E.,
Effect of stannous octoate on the composition, molecular weight, and molecular distribution of ethylene glycol-initiated poly(ϵ -caprolactone).
J. M. S.-Pure Appl. Chem., 1998. **A35**: p. 723-750
80. Kowalski A., Duda A. and Penczek S.,
Mechanism of cyclic ester polymerization initiated with tin(II) octoate. 2. Macromolecules fitted with tin(II) alkoxide species observed directly in MALDI-ToF spectra.
Macromolecules, 2000. **33**: p. 689-695
81. Ryner M., Stridsberg K., Albertsson A.-C., Von Schenk H. and Svensson M.,
Mechanism of ring-opening polymerization of 1,5-dioxepan-2-one and L-lactide with stannous 2-ethylhexanoate. A theoretical study.
Macromolecules, 2001. **34**: p. 3877-3881
82. Kricheldorf H., Boettcher C. and Tönnies K.-U.,
Poly lactones: 23. Polymerization of racemic and meso D,L-lactide with various organotin catalysts-stereochemical aspects.
Polymer, 1992. **33**: p. 2817-2824
83. Matyjaszewski K.,
Ranking Living Systems.
Macromolecules, 1993. **26**: p. 1787-1788
84. Penczek S. and Duda A.,
Selectivity as measure of "livingness" of the polymerization of cyclic esters.
Macromol. Symp., 1996. **107**: p. 1-15
85. Baran J., Duda A., Kowalski A., Szymanski R. and Penczek S.,
Intermolecular chain transfert to polymer with chain scission: general treatment and determination k_p/k_{tr} in L,L-lactide polymerization.
Macromol. Rapid. Commun., 1997. **18**: p. 325-333
86. Baran J., Duda A., Kowalski A., Szymanski R. and Penczek S.,
Quantitative Comparison of selectivities in the polymerization of cyclic esters.
Macromol. Symp., 1997. **123**: p. 93-101
87. Penczek S., Duda A. and Libiszowski J.,
Controlled polymerization of cyclic esters, structure of initiators and of actives species related to the selectivity of initiation and propagation.
Macromol. Symp., 1998. **128**: p. 241-254
88. Penczek S., Duda A. and Szymanski R.,
Intra- and Intermolecular chain transfert to polymer with chain scission. The case of cyclic esters.
Macromol. Symp., 1998. **132**: p. 441-449
89. Kricheldorf H., Berl M. and Scharnagl N.,
Poly lactones. 9. Polymerization mechanism of metal alkoxide initiated polymerization of lactide and various lactones.
Macromolecules, 1988. **21**: p. 286-293
90. Hofman A., Penczek S. and Slomkowski S.,
Polymerization of ϵ -caprolactone and with kinetic suppression of macrocycles.
Makromol. Rapid. Commun., 1987. **8**: p. 387-391
91. Penczek S., Duda A. and Slomkowski S.,
The reactivity-selectivity principle in polymerization. The case of ϵ -caprolactone.
Makromol. Chem., Macromol. Symp., 1992. **54-55**: p. 31-40

92. Duda A., Biela T., Libiskowski J., Penczek S., Dubois P., Mecerreyes D. and Jérôme R., *Block and random copolymers of ϵ -caprolactone*. Polym. Degr. Stabil., 1998. **59**: p. 215-222
93. Kricheldorf H., Kreiser-Saunders I. and Damrau D.-O., *Resorbable initiators for polymerizations of lactones*. Macromol. Symp., 1999. **144**: p. 269-276
94. Schwach G., Coudane J., Engel R. and Vert M., *Stannous octoate- versus zinc- initiated polymerization of racemic lactide. Effects on configurational structures*. Polym. Bull., 1994. **32**: p. 617-623
95. Vert M., Schwach G., Engel R. and Coudane J., *Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers?* J. Control. Release, 1998. **53**: p. 85-92
96. Tanzi M., Verderio P., Lampugnani M. G., Resnati M., Dejana E. and Sturani E., *Cytotoxicity of some catalysts commonly used in the synthesis of copolymers for biomedical use*. J. Mater. Sci.: Mater. Med., 1994. **5**: p. 393-396
97. Bouillot P., Babak V. and Dellacherie E., *Novel bioresorbable and bioeliminable surfactants for microsphere preparation*. Pharm. Res., 1999. **16**: p. 148-154
98. Ropson N., Dubois P., Jérôme R. and Teyssié P., *Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. 20. effect of monomer, solvent and initiator on the ring-opening polymerization as initiated with aluminium alkoxides*. Macromolecules, 1995. **28**: p. 7589-7598
99. Ydens I., Rutot D., Degée P., Six J.-L., Dellacherie E. and Dubois P., *Controlled synthesis of poly(ϵ -caprolactone)-grafted dextran copolymers as potential environmentally friendly surfactants*. Macromolecules, 2000. **33**: p. 6713-21
100. Kister G., Cassanas G. and Vert M., *Effects of morphology, conformation and configuration on the IR and raman spectra of various poly(lactic acid)s*. Polymer, 1998. **39**: p. 267-273
101. Arranz F. and Sanchez-Chaves M., *^{13}C Nuclear Magnetic Resonance spectral study on the distribution of the substituents in relation to the preparation method of partially acetylated dextran*. Polymer, 1988. **29**: p. 507-512
102. Arranz F., San Roman J. and Sanchez-Chaves M., *^{13}C NMR study of the selectivity in the modification of dextran with ethylchloroformate*. Macromolecules, 1987. **20**: p. 801-806
103. Sanchez-Chaves M. and Arranz F., *Synthesis of amidoxime containing modified dextran*. Polymer, 1996. **37**: p. 4403-4407
104. Mc Ewan T., Mc Innes A. G. and Smith D. G., *^1H - and ^{13}C -N.M.R. spectra of the methyl mono-, di-, and tri-O-acetyl- α - and - β -D-xylopyranosides*. Carbohydr. Res., 1982. **104**: p. 161-168

105. Yoshimoto K., Itatani Y. and Tsuda Y.,
¹³C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra of O-acylglucoses. Additivity of shift parameters and its application to sttructure elucidations.
Chem. Pharm. Bull., 1980. **28**: p. 2065-2076

Chapitre III :

3^{ème} étape

Déprotection & dégradation

Chapitre III : 3ème Etape

Déprotection & Dégradation

I. DEPROTECTION	130
I.1. Mise au point des conditions sur le dextrane silylé.....	130
I.1.1. Méthodes d'hydrolyse des silyléthers	130
I.1.2. Stabilité et déprotection des dextrans silylés.....	131
- Stabilité dans l'eau à 0°C	131
- Stabilité dans un milieu basique.....	131
- Stabilité dans un mélange méthanol/solvant du dextrane silylé.....	131
- Déprotection en milieu acide ou en présence d'un composé fluoré	132
I.1.3. Optimisation des conditions de déprotection. Analyse de la stabilité du dextrane et du PLA.....	132
I.1.3.1. Stabilité du dextrane.....	133
I.1.3.2. Stabilité du polylactide.....	133
I.1.3.3. Conclusion - Choix des conditions opératoires.....	134
I.2. Déprotection des copolymères (dextrane silylé-g-polylactide).....	135
I.2.1. Efficacité de la déprotection.....	135
I.2.2. Conclusions	135
II. STABILITE DU DEXTRANE AU COURS DES DEUX PREMIERES ETAPES DE LA SYNTHÈSE	136
II.1. Méthodes d'analyse	137
II.2. Première méthode (« Blancs »).....	137
II.3. Etude la dégradation lors de l'étape de silylation	138
II.3.1. Silylation par HMDS	138
II.3.2. Silylation par la BSA	139
II.4. Conclusion et conditions à retenir pour la silylation	140
III. CONCLUSION	140
IV. BIBLIOGRAPHIE	141

CHAPITRE III : 3^{ème} ETAPE

DEPROTECTION & DEGRADATION

Après les deux étapes précédentes, un certain nombre de copolymères greffés (dextrane silylé)-g-poly lactide ont pu être synthétisés. La dernière étape de la synthèse consiste à les déprotéger afin de restituer les fonctions hydroxyle à la dorsale dextrane et, par là même, de rendre le caractère hydrophile à la dorsale polysaccharide (Schéma II-20). Cette étude est traitée dans la première partie de ce chapitre. D'autre part, les problèmes de dégradation du squelette dextrane au cours des deux précédentes étapes de la synthèse seront examinés dans une seconde partie.

I. DEPROTECTION

La déprotection des copolymères (dextrane silylé)-g-poly lactide doit être totale sans pour autant dégrader le squelette dextrane ou les greffons poly lactide. Aussi des conditions expérimentales adéquates doivent être recherchées. Pour ce faire, l'hydrolyse des groupements triméthylsilyléthers a d'abord été étudiée sur des dextrans silylés. Le protocole expérimental mis au point a ensuite été appliqué aux copolymères silylés. Son efficacité, ainsi que son aptitude à respecter la liaison ester qui relie le greffon poly lactide au squelette dextrane, ont alors été examinées.

I.1. Mise au point des conditions sur le dextrane silylé

I.1.1. Méthodes d'hydrolyse des silyléthers

Classiquement, la déprotection des groupements silyléthers peut être effectuée par l'eau ou par un alcool, le plus souvent en présence d'un catalyseur [1-3]. Ce dernier peut être un acide (acide chlorhydrique, acides faibles comme l'acide acétique ou l'acide citrique, voire des acides de Lewis comme BF_3OEt_2), une base (NH_4OH [4], K_2CO_3 [5]....), ou un nucléophile (NaH ou très souvent un composé fluoré tels que KF et Bu_4NF [6-8]). Dans le cas d'une déprotection en milieu aqueux, l'hydrolyse des triméthylsilyléthers conduit à la formation de triméthylsilanol, qui s'autocondense en hexaméthylsiloxane (Schéma II-21).

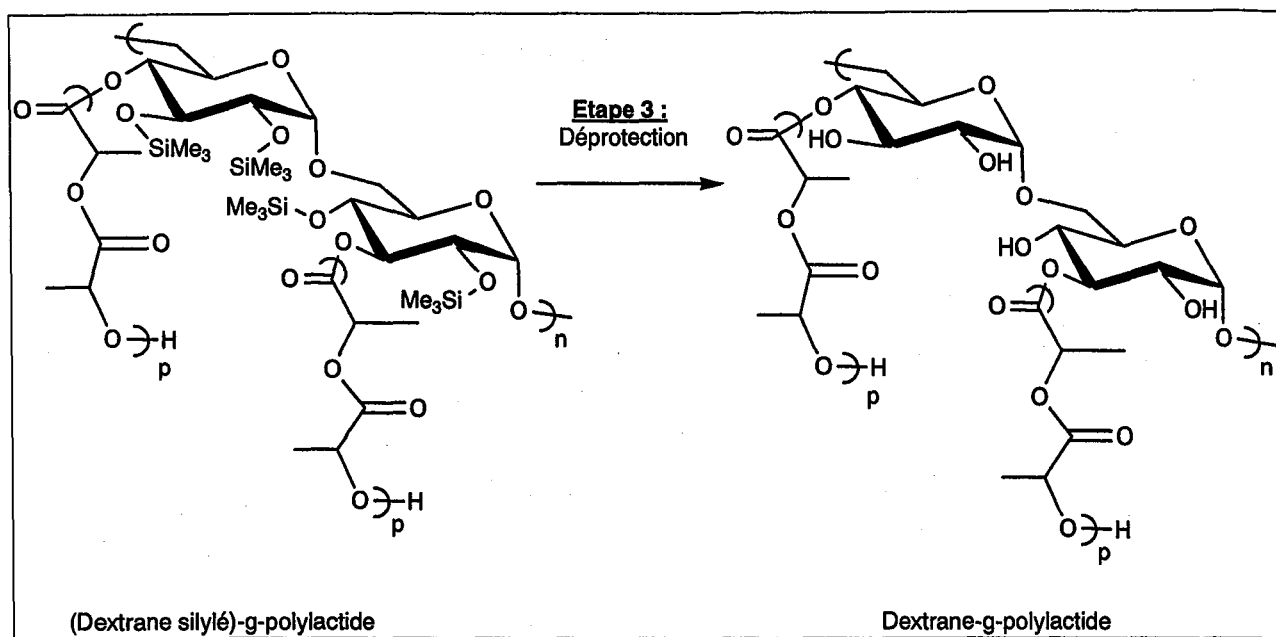


Schéma II-20 : 3^{ème} Etape - Déprotection des copolymères (dextrane silylé)-g-poly lactide.

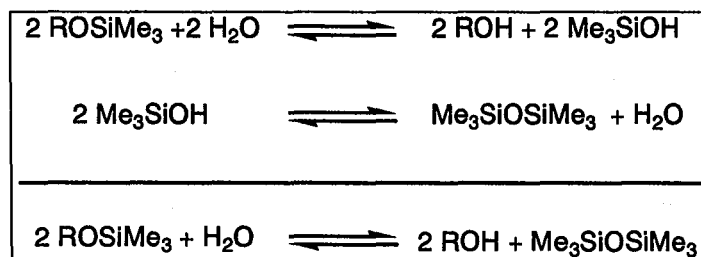


Schéma II-2119 : Schéma réactionnel de déprotection d'un éther silylé en milieu aqueux.

Entrée	Milieu / Agent	T (°C)	t (h)	Déprotection (%)
1	Eau	0	30	0
2	THF/Na ₂ CO ₃ (H ₂ O, 0,01M) ^a	22	48	0
3	MeOH/THF (1/20 : v/v)	22	48	0
4	THF / HCl (H ₂ O, 1M) ^b	22	t<<1	100
5	THF/ AcOH (H ₂ O, 1M) ^b	22	72	100
6	THF / Bu ₄ NF (THF, 1M) ^b	22	1	100

Tableau II-12 : Déprotection des dextrans silylés dans divers milieux. Rapport molaire d'agent « catalyseur »/SiMe₃ = 0,01 a), 1 b). [DexSi]=5% masse.

1.1.2. Stabilité et déprotection des dextrans silylés

Les groupements triméthylsilyles sont parmi les groupements silyléthers les plus facilement clivables. Pourtant, à cause d'un encombrement stérique important dû à la présence du saccharide autour de ces groupements, les éthers silylés secondaires situés sur des sucres sont relativement peu sensibles à l'hydrolyse dans des conditions très douces [9]. Ce phénomène est encore plus important sur les polysaccharides, si bien qu'une élévation de température peut être nécessaire pour provoquer l'hydrolyse en milieu neutre ou basique. Par exemple, la cellulose est remarquablement stable vis à vis de la désilylation en présence d'eau [4, 5, 10] ou plus couramment avec les alcools [11].

Divers résultats viennent confirmer ce phénomène dans le cas des dextrans silylés (Tableau II-12) :

– Stabilité dans l'eau à 0°C

- Lors de la première étape de la synthèse, nous avons déjà mentionné que les précipitations nécessaires à la purification du dextrane silylé étaient réalisées par l'eau à 0°C. Les taux de silylation mesurés avant et après cette précipitation ont permis de montrer que cette dernière n'entraîne aucune déprotection des silyléthers.
- Cette stabilité vis à vis de la déprotection est également observée après 30 heures dans l'eau à 0°C (entrée 1, Tableau II-12).

– Stabilité dans un milieu basique

- Un milieu basique, à température ambiante, est également inefficace pour cliver les groupements triméthylsilyléthers (entrée 2, Tableau II-12). Ce dernier résultat est d'ailleurs en accord avec les travaux de Keilich et coll. : une déprotection totale des dextrans silylés dans le méthanol en milieu basique est observée uniquement pour une température de 60°C [5].

– Stabilité dans un mélange méthanol/solvant du dextrane silylé

- Après deux jours à température ambiante dans un mélange MeOH/THF (1/20 ; v/v), les dextrans silylés, ou les copolymères (dextrane silylé)-g-poly lactide, restent entièrement protégés (entrée 3, Tableau II-12) malgré ce qu'avaient relaté Ouchi et coll. dans le cas de copolymères [pullulane (ou amylose) silylé]-g-poly lactide [12, 13]. La différence de comportement entre ces deux derniers copolymères et le dextrane silylé provient peut-être

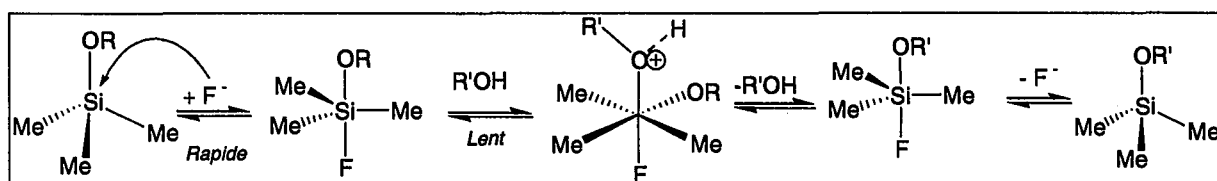


Schéma II-22 : Déprotection par les composés fluorés en présence d'eau ou de méthanol ($R'=H$ ou Me).

de leurs moindres encombrements stériques (le pullulane et l'amylose sont des polysaccharides relativement linéaires).

– Déprotection en milieu acide ou en présence d'un composé fluoré

- Contrairement aux cas précédents, l'emploi de THF comme solvant et de faibles quantités d'acide fort dilué (HCl (1M, H₂O) ; entrée 4, Tableau II-12) ou de composé fluoré (Bu₄NF (1M, THF) entrée 6, Tableau II-12) permet une déprotection rapide et totale des dextrans silylés. Lorsqu'HCl est remplacé par un acide plus faible comme l'acide acétique (AcOH (1M, H₂O), entrée 5, Tableau II-12), la déprotection totale n'est observée qu'après 3 jours.

Cette différence de réactivité entre un milieu acide et un milieu basique n'est guère étonnante. En effet, la déprotection des triméthylsilyléthers est connue pour être plus difficile en milieu basique qu'en milieu acide [1]. Dans notre cas, cet écart de réactivité est, de plus, exacerbé en raison de l'encombrement stérique (dû à la dorsale polysaccharidique) auquel est plus sensible la déprotection dans les conditions basiques.

L'efficacité des ions fluorure pour la déprotection des silyléthers est quant à elle connue [3, 6-8]. Elle est liée à la grande affinité entre le silicium et le fluorure (forte énergie de liaison Si-F=540 kJ/mol.) qui facilite le clivage des groupements silylés. Suivant le milieu (protique ou non), des fonctions alcool ou des alcoolates sont alors libérés (Schéma II-22).

Si le dextrane est plus sensible à la dégradation dans un milieu acide que dans un milieu basique, l'inverse est observé pour ce qui concerne les greffons polylactide ; si bien qu'il est a priori difficile de privilégier une condition de déprotection. A partir des résultats rassemblés dans le Tableau II-12, nous avons préféré, pour la suite de ces travaux, poursuivre l'étude en employant une catalyse acide ou un composé fluoré comme Bu₄NF.

1.1.3. Optimisation des conditions de déprotection. Analyse de la stabilité du dextrane et du PLA.

Après avoir sélectionné les conditions expérimentales qui permettent de déprotéger le dextrane silylé, il restait à étudier leur influence sur la stabilité du squelette dextrane, et sur celle des greffons polylactide.

Entrées	Conditions			Stabilité	
	Catalyseur	r (a)	Durée (h)	$\overline{M}_n$ (b)	I
1	HCl (1M)	0,1	1	17 700	1,4
2		0,01		28 300	1,3
3	HCl (0,1M)	0,1	2	26 700	1,3
4	AcOH (1M)	1	72	27 200	1,3
5	Bu ₄ NF (1M) Solution dans THF	1	2	28 600	1,3

⇒ Dégradation
 }
 ⇒ Stabilité

Tableau II-13 : Etude de la stabilité du dextrane sous diverses conditions d'hydrolyse des silyléthers. Expériences réalisées sur le dextrane D_{40}^2 ($\overline{M}_n = 28\,900$ g/mol, $I = 1,3$), à température ambiante, dans le THF. $\{DexSi\} = 50$ g/l.

a) r = rapport molaire d'agent catalyseur/OH.

b) $\overline{M}_n$ et Indice de polymolécularité (I), obtenus par chromatographie d'exclusion stérique en phase aqueuse (SEC-MALLS, (Eluant : eau, $NaNO_3$ (0,1M), NaN_3 ($6,5 \cdot 10^{-3}$ M), cf. Partie expérimentale), masses exprimées en g/mol.

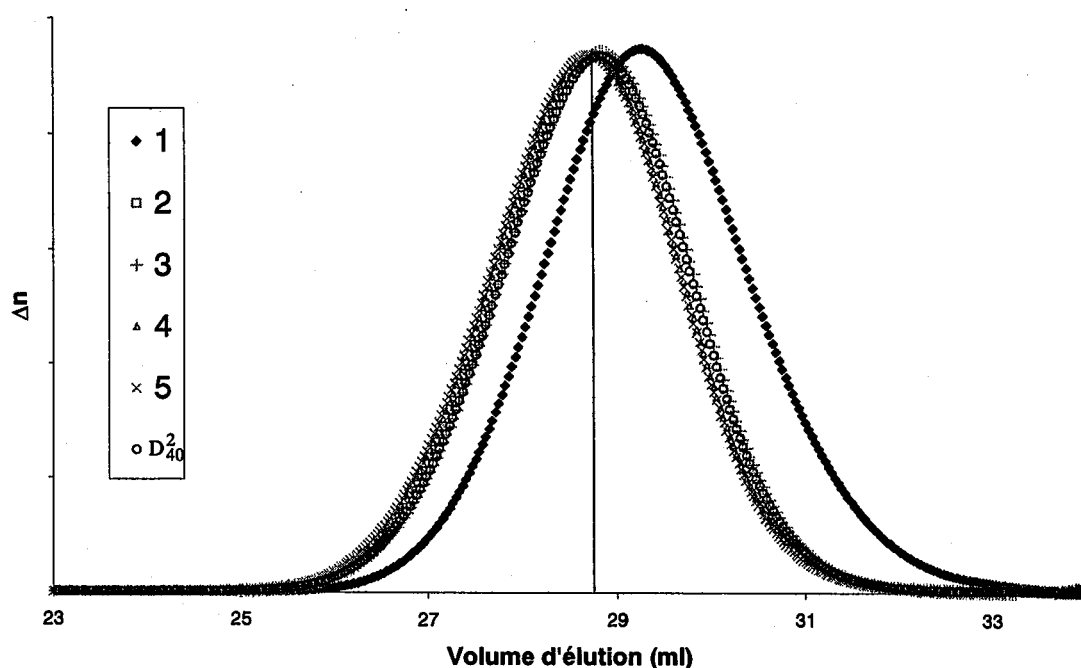


Figure II-36 : Chromatogrammes SEC. Signal réfractométrique du dextrane D_{40}^2 et échantillons ayant subi les traitements décrits au Tableau II-13.

I.1.3.1. Stabilité du dextrane

Dans ce but, les conditions correspondant aux entrées 4 à 6 du Tableau II-12 ont été appliquées au dextrane D₄₀² (Tableau II-13). Après traitement (cf. Partie expérimentale), les différents produits ainsi obtenus ont été analysés en SEC et comparés au dextrane initial. Les résultats sont regroupés dans le Tableau II-13 et dans la Figure II-36.

Il apparaît que si l'agent fluoré (Bu₄NF) n'a aucune influence sur le dextrane (Entrée 5, Tableau II-13), de trop fortes quantités d'acide fort (HCl) sont néfastes (Entrée 1, Tableau II-13). Toutefois, l'absence de dégradation du dextrane en milieu aqueux peu acide (pH ≥ 2) a déjà été relatée [14]. La dégradation du dextrane peut donc être évitée en diminuant soit la quantité d'acide employée (Entrée 2, Tableau II-13), la concentration de la solution acide (Entrée 3, Tableau II-13) ou encore en remplaçant HCl par un acide plus faible tel que l'acide acétique (Entrée 4, Tableau II-13).

I.1.3.2. Stabilité du polylactide

Le polylactide a ensuite été soumis aux conditions expérimentales correspondant aux entrées 1 à 5 du Tableau II-13. Les conditions opératoires sont analogues à celles que nous aurions prises pour un copolymère (dextrane silylé-g-polylactide) de fraction massique F_w^{PLA} égale à 0,6. Les produits obtenus après réaction ont été analysés par SEC en milieu THF. Même si le polylactide est moins sensible que le dextrane à un milieu acide, il est néanmoins légèrement dégradé après une heure de réaction aux plus fortes concentrations en HCl (Entrée 1, Tableau II-14). Mais dès lors que la concentration en acide est abaissée (Entrées 2 et 3, Tableau II-14) ou que HCl est remplacé par l'acide acétique (Entrée 4, Tableau II-14), le PLA n'est plus dégradé. Il semble donc que la concentration en protons conditionne la dégradation du polylactide. La dégradation du polylactide est d'ailleurs catalysée par les protons [15]. Au vu des résultats du Tableau II-14, une concentration en H⁺ inférieure à 4 10⁻² mol/l (ce qui équivaut à un pH de 2,1 en solution aqueuse) paraît adéquate pour assurer la stabilité du polylactide.

Lorsque des conditions neutres sont utilisées (solution de Bu₄NF (1M, dans le THF), une dégradation du polylactide a néanmoins été observée (Entrée 5 Tableau II-14). Cette dégradation étonnante peut être éventuellement expliquée par le caractère nucléophile des

Entrées	Conditions			Résultats		
	Catalyseur	r (a)	Durée (h)	DexSiMe ₃	Dextrane	Polylactide
1	[HCl] (1 M)	1	1	Déprotection	Dégradation	Dégradation
2		0,1	1			Stabilité si [H ⁺] < 4 10 ⁻² mol/ (b)
3	[HCl] (0,1 M)	0,1	2			
4		0,02	2			
5	AcOH (1 M)	1	72			
6	Bu ₄ NF (1 M) Solution dans le THF	1	1	Déprotection	Stabilité	Dégradation

Tableau II-15 : Bilan sur la déprotection des dextrane silylés.

(a) Rapport molaire catalyseur/OSiMe₃ calculé pour un dextrane 100% silylé,

(b) Concentration en H⁺ (cf. Tableau II-14)

ions fluorures : ces derniers sont connus pour favoriser certaines réactions de transestérification [6] à des températures plus élevées et sur de plus longues durées.

Entrées	Conditions				Stabilité		
	Catalyseur	r (a)	Durée (h)	[Cat] mol/l (b)	$\overline{M}_n$ (d)	I (d)	
1	[HCl] (1 M)	1	1	0,4	28 400	1,2	⇒ Dégradation
2		0,1	1	0,04	32 000	1,3	
3	[HCl] (0,1 M)	0,1	2	0,04	36 000	1,3	⇒ Stabilité
4	AcOH (1 M)	1	72	$2,5 \cdot 10^{-3} \text{ (c)}$	35 000	1,3	
5	Bu ₄ NF (1 M) Solution dans le THF	1	1	0,4	7 400	2,5	⇒ Dégradation

Tableau II-14 : Etude la stabilité d'un polylactide ($\overline{M}_n = 38\ 200$ g/mol, $I = 1,33$) sous diverses conditions d'hydrolyse des silyléthers. Expériences réalisées, à température ambiante, dans le THF, $[PLA] = 24$ g/L $\Leftrightarrow$ $[DexSi] = 50$ g/l pour $F_w^{PLA} = 0,6$

(a) Rapport molaire catalyseur/OSiMe₃ calculé pour un dextrane 100% silylé, .

(b) Concentration effective du catalyseur (H^+ pour les acides, F pour Bu₄NF).

(c) Valeur estimée à l'aide du pKa d'AcOH en solution aqueuse

(d) $\overline{M}_n$ et indice de polymolécularité (I) obtenus par SEC en phase organique (THF, cf. Partie Expérimentale), masses exprimées en g/mol .

I.1.3.3. Conclusion - Choix des conditions opératoires

Bu₄NF conduisant à la dégradation du polylactide, nous nous sommes limités à l'emploi de conditions acides suffisamment douces afin d'éviter toute dégradation à la fois du dextrane et du polylactide (Tableau II-15). Pour cela, HCl (Entrées 3 et 4, Tableau II-15) ou AcOH (Entrée 5, Tableau II-15) peuvent être utilisés. L'acide acétique nécessitant de plus longues durées d'hydrolyse, HCl a été préféré pour réaliser la déprotection des groupements triméthylsilyléthers.

Comme la déprotection totale du dextrane silylé peut être réalisée en 2 heures en utilisant seulement 0,02 mole d'HCl par mole de fonctions OSiMe₃, ces conditions opératoires ont été retenues et utilisées par la suite dans le cas des copolymères (dextrane silylé)-g-polylactide.

Copolymères DexSi-g-PLA		Copolymères Dex-g-PLA ^(a)		[H ⁺] ^(c)
Designation	F ^{PLA} (b)	F ^{PLA} (b)	Designation	x 10 ³ (mol/l)
Dex _{13K} Si ₉₁ -g-27PLA _{0,4K}	0,36	0,37	Dex _{13K} -g-27PLA _{0,4K}	6,1
Dex _{13K} Si ₈₇ -g-39PLA _{0,9K}	0,70	0,69	Dex _{13K} -g-39PLA _{0,9K}	3,6
Dex _{13K} Si ₉₁ -g-27PLA _{2,5K}	0,81	0,81	Dex _{13K} -g-27PLA _{2,5K}	1,5
Dex _{29K} Si ₉₄ -g-18PLA _{0,1K}	0,11	0,10	Dex _{29K} -g-18PLA _{0,1K}	7,0
Dex _{29K} Si _{95,5} -g-13,5PLA _{0,25K}	0,17	0,14	Dex _{29K} -g-13,5PLA _{0,2K}	7,5
Dex _{29K} Si ₉₄ -g-18PLA _{1,7K}	0,65	0,66	Dex _{29K} -g-18PLA _{1,7K}	4,2
Dex _{29K} Si ₈₀ -g-60PLA _{2,0K}	0,89	0,88	Dex _{29K} -g-60PLA _{2,0K}	1,6

Tableau II-16 : Résultats des réactions de déprotection de copolymères DexSi-g-PLA, réalisées durant 2h, en solution dans le THF, [DexSi-g-PLA] $\approx$ 50 g/l, avec 0,02mol. HCl (0,1M)/mol. OSiMe₃.

(a) : La déprotection totale est vérifiée par RMN dans DMSO-d₆

(b) : déterminées à partir des spectres RMN 1H (CDCl₃ pour DexSi-g-PLA, DMSO-d₆ pour Dex-g-PLA)

Voir Equation II-11.

(c) : Concentration utilisée lors de la déprotection.

I.2. Déprotection des copolymères (dextrane silylé-g-poly lactide)

I.2.1. *Efficacité de la déprotection*

Les conditions expérimentales sélectionnées au paragraphe précédent ont été employées pour la déprotection des copolymères (0,02 mol. d'HCl (1M) /mol. SiMe₃). Après 2 heures de réaction et précipitation par l'éthanol, le taux de silylation et les proportions en polylactide dans le copolymère final ont été évalués par son analyse RMN ¹H dans le DMSO-d₆, solvant dans lequel les deux parties du copolymère final sont parfaitement solubles. Ces résultats sont présentés dans le Tableau II-16 :

- Quels que soient le taux de silylation et les proportions en polylactide des copolymères DexSi-g-PLA, la déprotection totale est vérifiée.
- Les proportions en polylactide dans le copolymère dextrane-g-poly lactide (F^{PLA} , Equation (II-11)) observées après la déprotection des fonctions alcool correspondent à celles que l'on peut estimer pour les copolymères DexSi-g-PLA.

$$F^{PLA} = \frac{m_{PLA}}{(m_{PLA} + m_{DEX})} \quad (II-11)$$

avec :

- F^{PLA} = Fraction massique en polylactide pour le copolymère final dextrane-g-poly lactide,
- m_{PLA} : masse de polylactide dans le copolymère (DexSi-g-PLA ou Dex-g-PLA)
- m_{DEX} : masse de dextrane (non silylé) dans le copolymère (DexSi-g-PLA ou Dex-g-PLA).

I.2.2. *Conclusions*

Si l'adéquation observée des proportions en dextrane et en polylactide dans le copolymère final Dex-g-PLA avec celles calculées pour les DexSi-g-PLA permet d'assurer qu'il n'y pas de dégradation partielle des greffons polylactide au cours de la déprotection, elle ne permet pas d'écarter toute lyse éventuelle de la liaison ester entre le squelette et les greffons. Ceci est vrai notamment pour les copolymères présentant les greffons les plus longs (qui précipiteraient aussi par l'éthanol et seraient donc récupérés par filtration avec le dextrane).

Copolymères	$F^{PLA}_{(a)}$					
	Théorique	$CDCl_3$	Toluène- d_8	Acétone- d_6	DMSO- d_6	D_2O
Dex _{13K} -g- ₂₇ PLA _{2,5K}	0,81	1	1	1	0,8	Non soluble
Dex _{13K} g- ₂₇ PLA _{0,4K}	0,36	Non soluble	Non soluble	Non soluble	0,42	0

Tableau II-17 : Influence du solvant sur la fraction massique en polylactide F^{PLA} de copolymères Dex-g-PLA.

a) : Voir Equation II-11.

b) : F^{PLA} calculée pour les DexSi-g-PLA.

En faisant varier la nature du solvant employé pour l'analyse RMN ^1H , un effet de masquage d'une partie du copolymère (squelette dextrane ou greffons polylactide) peut être observé (Tableau II-17).

Dans le cas des copolymères Dex-g-PLA présentant les plus fortes proportions en PLA (Dex_{13K}-g-21PLA_{2,5K}, $F^{\text{PLA}}=0,81$), le copolymère obtenu est soluble dans des milieux organiques moyennement polaires à peu polaires (DMSO, acétone, chloroforme, toluène) et insoluble dans l'eau. Dans les solvants organiques autres que le DMSO, seule la partie PLA du copolymère est soluble et est observée par RMN ^1H ($F^{\text{PLA}}=1$). Ce comportement est probablement caractéristique d'une conformation cœur dextrane-couronne polylactide qui tend à masquer le dextrane. Lorsque l'analyse RMN ^1H est effectuée dans le DMSO- d_6 , la valeur de F^{PLA} obtenue dans le cas des Dex-g-PLA correspond à celle estimée dans le cas des DexSi-g-PLA car les deux parties du copolymère (dextrane et polylactide) y sont solubles.

Inversement, dans le cas des copolymères Dex-g-PLA présentant de plus faibles proportions en polylactide (Dex_{13K}-g-21PLA_{0,36K}, $F^{\text{PLA}}=0,36$), le copolymère est insoluble dans le chloroforme, le toluène ou l'acétone et présente un masquage de la partie polylactide dans D_2O . Dans ce dernier solvant, le copolymère adopte vraisemblablement une conformation cœur polylactide-couronne dextrane. De même que précédemment, la valeur attendue pour F^{PLA} est observée en employant le DMSO- d_6 comme solvant.

De tels comportements, caractéristiques de copolymères amphiphiles viennent confirmer la présence des liaisons ester entre le dextrane et le polylactide. Ces copolymères, qui changent de conformations avec le solvant, devraient présenter un comportement potentiellement tensioactif. Ils ont fait l'objet d'études physico-chimiques plus complètes qui seront traitées dans le Chapitre I de la Partie III.

II. STABILITE DU DEXTRANE AU COURS DES DEUX PREMIERES ETAPES DE LA SYNTHESE

Nous avons cherché à déterminer si une dégradation de la chaîne de dextrane se produisait au cours des deux premières étapes de la synthèse (silylation et polymérisation),

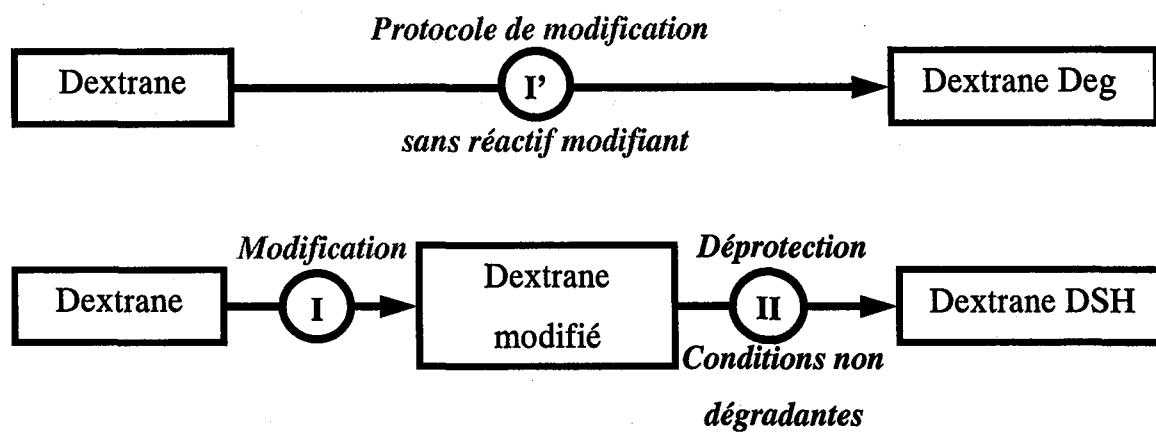


Schéma II-23 : Principe des deux méthodes d'étude de la stabilité du dextrane au cours d'une réaction de modification.

dans le but d'une part de bien connaître la structure des copolymères et d'autre part, de déterminer les conditions optimales pour réaliser ces premières étapes de la synthèse.

II.1. Méthodes d'analyse

Pour évaluer la dégradation d'un dextrane au cours d'une étape de modification, il existe différentes méthodes (Schéma II-23) :

1. Une étude peut être réalisée sur le dextrane initial dans les mêmes conditions que la modification, mais sans mettre le réactif qui provoque la réaction.
2. Si la modification est réversible, il est également possible de réaliser sur le dextrane la modification puis la déprotection (*cette dernière réaction doit être effectuée dans des conditions non dégradantes pour la chaîne polysaccharide*).

Cette seconde méthode peut être appliquée pour la première étape de notre synthèse (silylation) car elle est facilement réversible. De plus, dans le paragraphe I.1.3.3. de ce chapitre, nous avons déterminé des conditions douces pour l'étape de déprotection. En revanche, en ce qui concerne la seconde étape (polymérisation), réaliser la dépolymérisation des greffons polylactides sans dégrader le squelette dextrane s'avère une opération délicate à optimiser. Pour cette étape de polymérisation, nous nous sommes donc contentés d'effectuer la première méthode de vérification.

Dans les deux cas, la distribution en taille du dextrane « final » (Deg ou DSH – Schéma II-22), obtenue par SEC en milieu aqueux, est comparée à celle du dextrane initial.

II.2. Première méthode (« Blancs »)

Le dextrane D_{40}^1 initial a subi l'ensemble du protocole opératoire des deux premières étapes de la synthèse sans que les réactifs (agent silylant + catalyseur et/ou lactide + SnOct_2) aient été ajoutés au milieu réactionnel. Des prélèvements ont été effectués après chaque étape (cf. Partie expérimentale) :

- Deg1 : Echantillon séché sous vide à 100°C.
- Deg2 : Deg1 ayant subi les conditions opératoires de la première étape (80°C pendant 90h) puis récupéré par évaporation, précipitation par l'éthanol froid et finalement séché à l'étuve à 50°C.

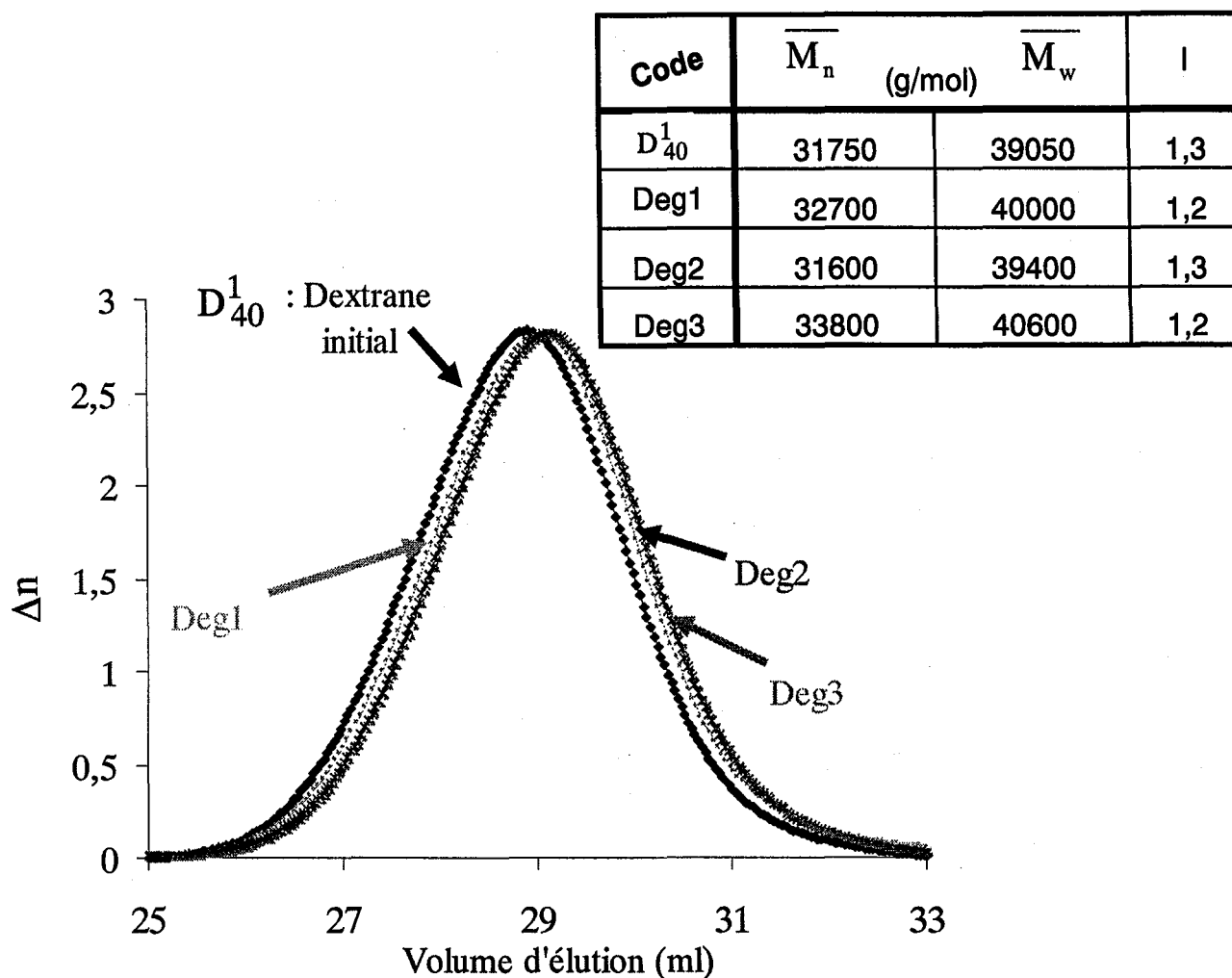


Figure II-37 : Chromatogrammes SEC (détection réfractométrique) du dextrane D₄₀¹ et des échantillons « blancs » (= dextrane ayant subi différentes conditions opératoires (voir paragraphe II.2 ci-contre pour la définition de Deg1, 2 et 3). SEC réalisée en phase aqueuse (cf. Partie expérimentale).

Code	Dextrane Final (DSH)		Conditions de silylation			
	$\overline{M}_n^a$ (g/mol)	I ^a	Solvant (30 ml solvant / g Dex)	T (°C)	Agent silylant (mol/molOH)	Temps (h)
D ₄₀ ²	28 900	1,2	/	/	/	/
DSH1	25 700	1,3	DMSO	50	HDMS (2)	90
DSH2	27 300	1,3	DMSO	50	HDMS (1,8) + TMSCI (0,2)	20
DSH3	24 000	1,4	DMSO	50	HDMS (2) + Saccharine (0,1)	20
DSH4	25 100	1,4	DMSO/Toluène (2/1) ^b	50	HDMS (2)	20
DSH5	24 000	1,3	DMSO / THF (2/1) ^(b)	50	HDMS (2)	20
DSH6	13 500	1,3	DMSO	80	HDMS (2)	20

Tableau II-18 : Paramètres macromoléculaires du dextrane D₄₀² et des échantillons obtenus après déprotection de dextrans silylés par l'HMDS (DSH) (cf. Schéma II-23).

a) Distribution en taille déterminés par SEC, phase aqueuse (cf. Partie Expérimentale)

b) Rapport volumique.

- o Deg3 : Deg2 ayant subi les conditions opératoires de la polymérisation, puis récupéré par précipitation par l'éthanol et finalement, séché.

Les distributions en taille des échantillons "Deg" alors obtenus sont très proches de celle du dextrane D_{40}^1 initial (Figure II-37). L'absence de dégradation dû au protocole opératoire (séchage, influence de la température et du solvant, protocole de récupération du produit,...) a pu ainsi être vérifiée.

Cependant, l'influence des réactifs sur la dégradation du dextrane ne peut pas être étudiée par cette première méthode. Pour ce qui concerne la seconde étape de la synthèse (polymérisation), le lactide et SnOct_2 sont probablement sans influence, ce qui permet de conclure à une absence de dégradation durant cette étape. En revanche, l'influence de l'agent silylant employé mérite d'être étudiée.

II.3. Etude la dégradation lors de l'étape de silylation

La déprotection des dextrans silylés a toujours été effectuée dans les conditions douces décrites à la fin du paragraphe I.1.3.3. (entrée 4, Tableau II-15). Les dextrans silylés, soumis à l'hydrolyse (DSH) ont été analysés en SEC (phase aqueuse). Leurs chromatogrammes ont été comparés avec celui du dextrane D_{40}^2 .

II.3.1. Silylation par HMDS

Les dextrans silylés par HMDS dans diverses conditions ont d'abord été étudiés.

Les résultats sont donnés dans le Tableau II-18 et les chromatogrammes SEC sont représentés dans la Figure II-38. Il apparaît que dans le cas de la silylation par l'HMDS à 50°C pendant 90 h (DSH 1), le dextrane obtenu après déprotection possède une distribution en taille proche de celle du dextrane initial. Par conséquent, ces conditions de silylation ne semblent pas être dégradantes. Il faut remarquer que quel que soit le catalyseur employé pour améliorer le taux de silylation (TMSCl ou catalyseur nucléophile), aucune dégradation significative n'apparaît (DSH 2 et 3). Il en est de même dans le cas de l'emploi de co-solvant comme le toluène ou le THF (DSH 4 et 5).

Code	Dextrane Final (DSH)		Conditions de silylation	
	$\overline{M}_n^a$ (g/mol)	I^a	Solvant (ml) (30 ml solvant /g Dex)	T (°C)
D ₄₀ ²	28 900	1,3	/	/
DSH7	14 800	1,3	DMSO	50
DSH8	12 600	1,3	DMSO	80
DSH9	4 900	1,3	DMSO/Toluène (2/1)	80

Tableau II-19 : Paramètres macromoléculaires du dextrane D₄₀² et des échantillons obtenus après déprotection de dextrans silylés par la BSA (1 mol/mol fonction OH) durant 20h, (DSH).

a) SEC; phase aqueuse (cf. Tableau II-18).

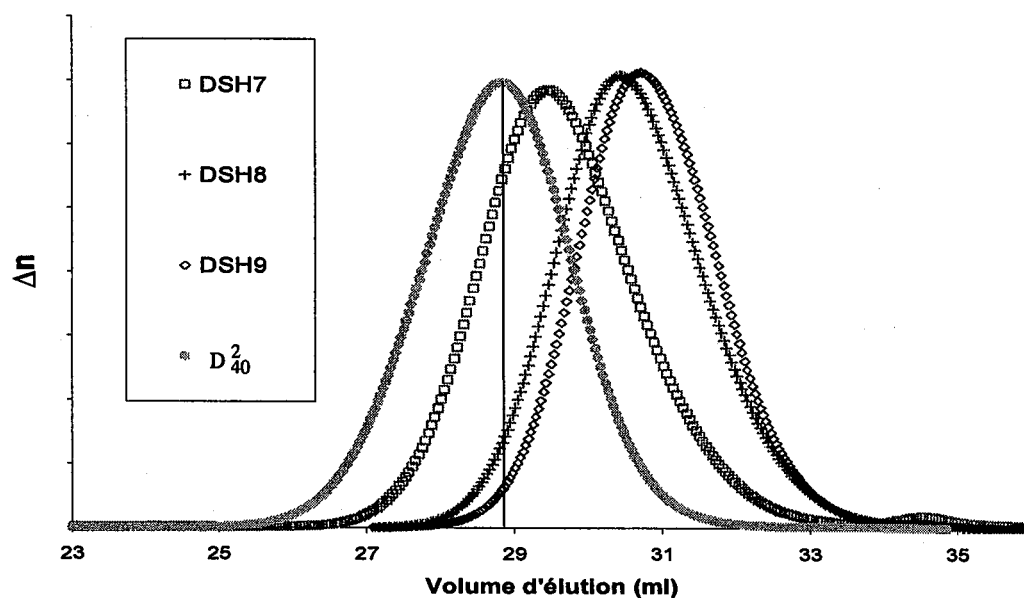


Figure II-39 : Chromatogrammes SEC du dextrane D₄₀² et des échantillons obtenus après déprotection de dextrans silylés par la BSA (DSH) (cf. Tableau II-19).

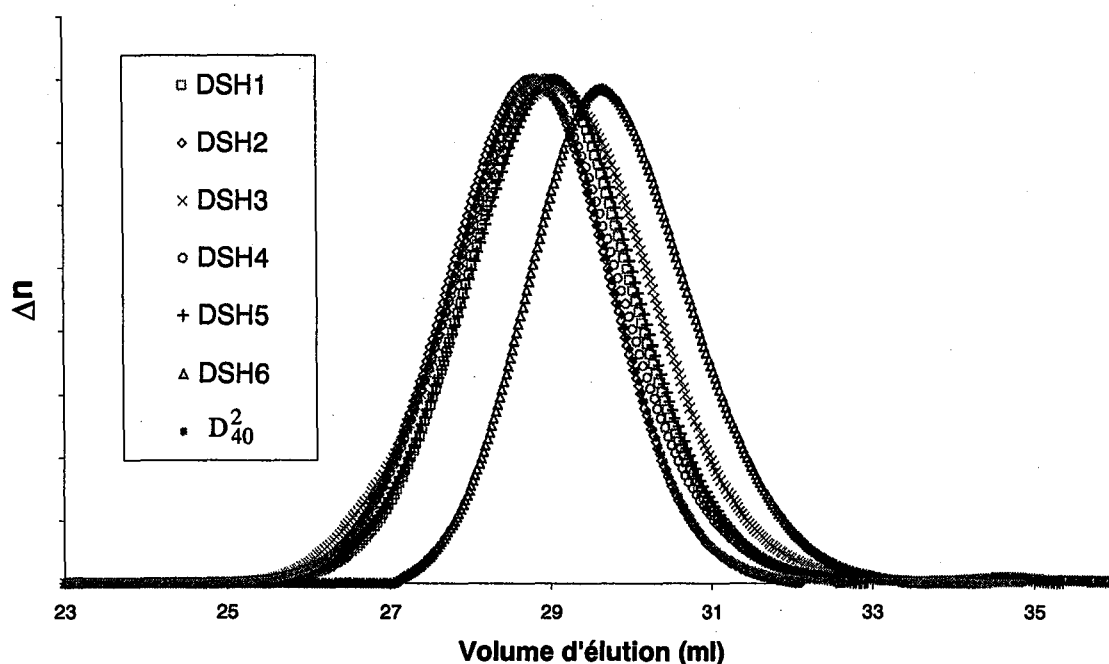


Figure II-38 : Chromatogrammes SEC du dextrane D_{40}^2 et des échantillons obtenus après déprotection de dextrans silylés par l'HMDS (DSH) (cf. Tableau II-18).

En revanche, l'augmentation de la température de silylation à 80 °C, malgré une réduction du temps de réaction, conduit à une dégradation de la chaîne polysaccharide (DSH 6). La silylation par HMDS à 80°C dégrade donc la dorsale dextrane, en dépit de la faible basicité du milieu.

II.3.2. Silylation par la BSA

Les dextrans silylés par la BSA ont été analysés de la même façon que précédemment (Tableau II-19 et Figure II-39).

Dans ce cas, les dextrans finaux (DSH) sont tous plus ou moins dégradés et ce quelles que soient les conditions expérimentales choisies (température, durée, solvant). Il faut en déduire que l'utilisation de la BSA conduit à une dégradation du dextrane au cours de la silylation.

L'importance de cette dégradation lors de la silylation par la BSA varie selon les conditions employées : si l'augmentation de la température semble peu influencer la

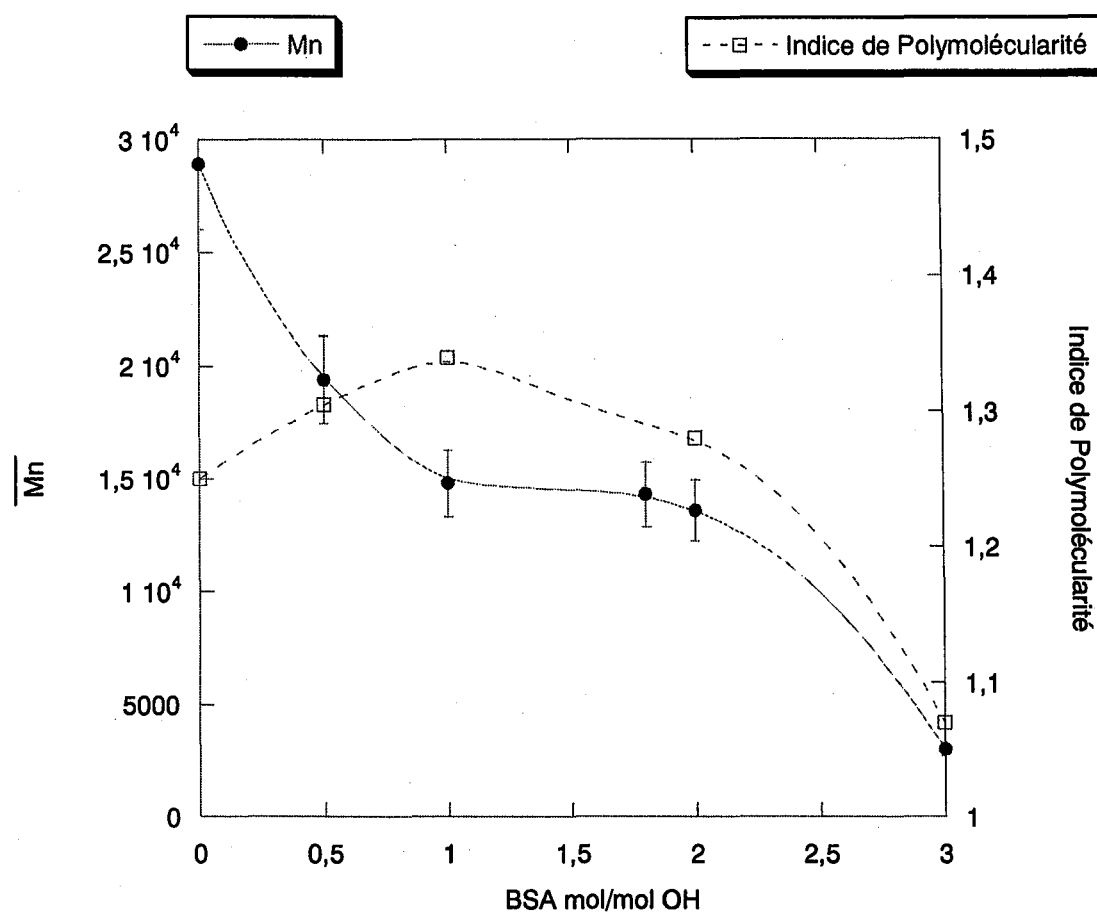


Figure II-40 : Influence du nombre de moles de BSA employées sur le $\overline{M}_n$ et l'indice de polymolécularité des dextrans DSH. Les silylations ont été effectuées à 50°C, pendant 20h, dans le DMSO (30 ml/g de dextrane).

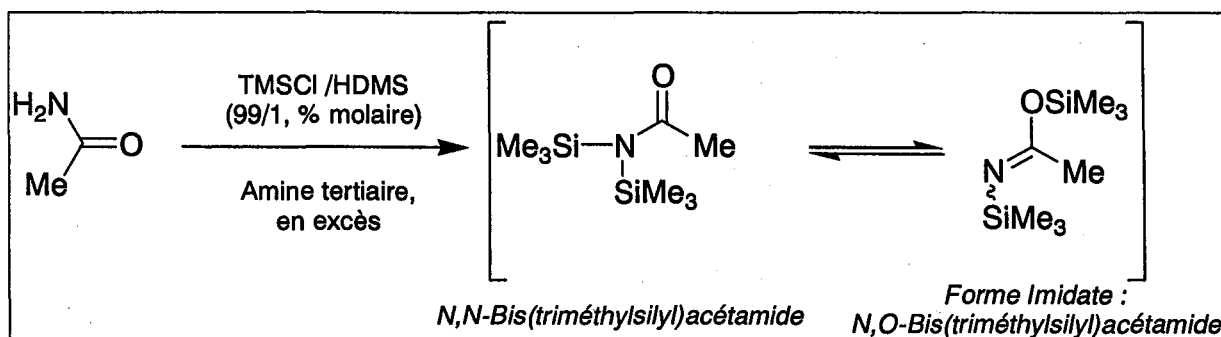


Schéma II-24 : Protocole de synthèse industrielle de la BSA [16].

dégradation, l'ajout dans le milieu d'un co-solvant (THF ou toluène) augmente la solubilité du dextrane, durant la silylation, mais favorise nettement sa dégradation. Cette dégradation est d'autant plus accrue que la quantité de BSA utilisée augmente (Figure II-40).

Compte tenu de ces résultats, il semble que la dégradation observée provienne soit de la BSA soit d'un de ses sous-produits ou encore d'une impureté présente dans la BSA (résultante de son procédé de production (Schéma II-23) [16]. Cependant, nous n'avons pu éclaircir la raison de cette dégradation.

II.4. Conclusion et conditions à retenir pour la silylation

L'étude de la dégradation lors de l'étape de silylation nous a permis de déterminer les conditions optimales quant à la stabilité du dextrane durant cette première étape de la synthèse. Seule la silylation par HMDS à 50°C, en présence ou non de co-solvant ou d'un agent catalyseur est satisfaisante.

Les conditions employées lors de la seconde étape de la synthèse (polymérisation) semblent quant à elles ne pas dégrader la dorsale dextrane.

III. CONCLUSION

Après diverses études préalables, la troisième étape de la synthèse (déprotection des copolymères (dextranes silylés)-g-poly lactide) a pu être réalisée dans des conditions non dégradantes à la fois pour le dextrane, les greffons poly lactide ou encore les liaisons entre ces deux parties. Cette déprotection est réalisée dans le THF avec de faibles proportions d' HCl, à température ambiante pendant 2 heures.

Après sélection des conditions opératoires de la déprotection, l'absence de dégradation au cours des deux premières étapes de la synthèse a été étudiée. Si la seconde étape (polymérisation du lactide) ne semble pas poser de problème, une étude approfondie menée sur l'étape de silylation a révélé la dégradation partielle du squelette polysaccharide sous certaines conditions de silylation, comme l'emploi de la BSA ou la silylation par l'HMDS à 80°C.

IV. BIBLIOGRAPHIE

1. Nelson T. D. and Crouch R. D.,
Selective deprotection of silylethers.
Synthesis, 1996: p. 1031-1069
2. Lalonde M. and Chan T. H.,
Use of organosilicon reagents as protective groups in organic synthesis.
Synthesis, 1985: p. 817-845
3. Brook M. A.,
Replacing H with Si : silicon-based reagents,
in *Silicon in organic, organometallic, and polymer chemistry*, I. John WILEY & SONS, Editor.
2000, Wiley-Interscience: New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto. p. 189-255
4. Mormann W. and Demeter J.,
Controlled desilylation of cellulose with stoichiometric amounts of water in the presence of ammonia.
Macromol. Chem. Phys., 2000. **201**: p. 1963-1968
5. Keilich V. G., Tihlarik K. and Husemann E.,
Über die herstellung von tris-O- trimethylsilylpolsacchariden.
Makromol. Chem., 1968. **120**: p. 87-95
6. Clark J. H.,
Fluoride ion as base in organic synthesis.
Chem. Rev., 1980. **80**: p. 429-452
7. Corey E. and Sneider B.,
A total synthesis of fumagillin.
J. Am. Chem. Soc., 1972. **94**: p. 2549-2550
8. Corey E. J. and Venkateswarlu A.,
Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives.
J. Am. Chem. Soc., 1972. **94**: p. 6190-6191
9. Hurst D. T. and Mcinnes A. G.,
The acoholis of trialkylalkoxysilanes. Part II. The preparation and chemistry of methyl 2,3,4-tri-O-trimethylsilyl- α -D-glucopyranose.
Canad. J. Chem., 1965. **43**: p. 2004-2011
10. Cooper G. K., Sandberg K. R. and Hinck J. F.,
Trimethylsilyl cellulose as precursor to regenerated cellulose fiber.
J. Appl. Polym. Sci., 1981. **26**: p. 3827-3836
11. Kricheldorf H. R.,
Miscellaneous modifications : silylation of polysaccharides in chap. 7 'Chemical modification of polymers and surfaces',
in *Silicon in polymer synthesis*, H.R. Kricheldorf, Editor.
1996, Springer: Paris. p. 440-443
12. Ohya Y., Maruhashi S. and Ouchi T.,
Graft polymerization of L-lactide on pullulan through the trimethylsilyl protection method and degradation of the graft copolymers.
Macromolecules, 1998. **31**: p. 4662-4665
13. Ohya Y., Maruhashi S. and Ouchi T.,
Preparation of poly(lactic acid)-grafted amylose through the trimethylsilyl protection method and its biodegradation.
Macromol. Chem. Phys., 1998. **199**: p. 2017-2022

14. Fournier C.,
Hydrophobisation de billes de polystyrène-divinylbenzène par adsorption de dérivés amphiphiles du dextrane. Préparation et caractérisations structurales de nouveaux supports pour la chromatographie des protéines. 1996, doctorat de l' INPL: Nancy
15. Vert M., Li S., Garreau H., Mauduit J., Boustta M., Schwach G., Engel R. and Coudane J.,
Complexity of the hydrolytic degradation of aliphatic polyesters.
Angew. Makromol. Chem., 1997. 247: p. 239-253
16. Köttsch H.-J. and Vahlensieck H.-J.,
Method for the preparation of persilylated carboxylic acid amides.
Patent N° 4647687, 1987
Fed. Rep. of Germany, Dynamit Nobel AG

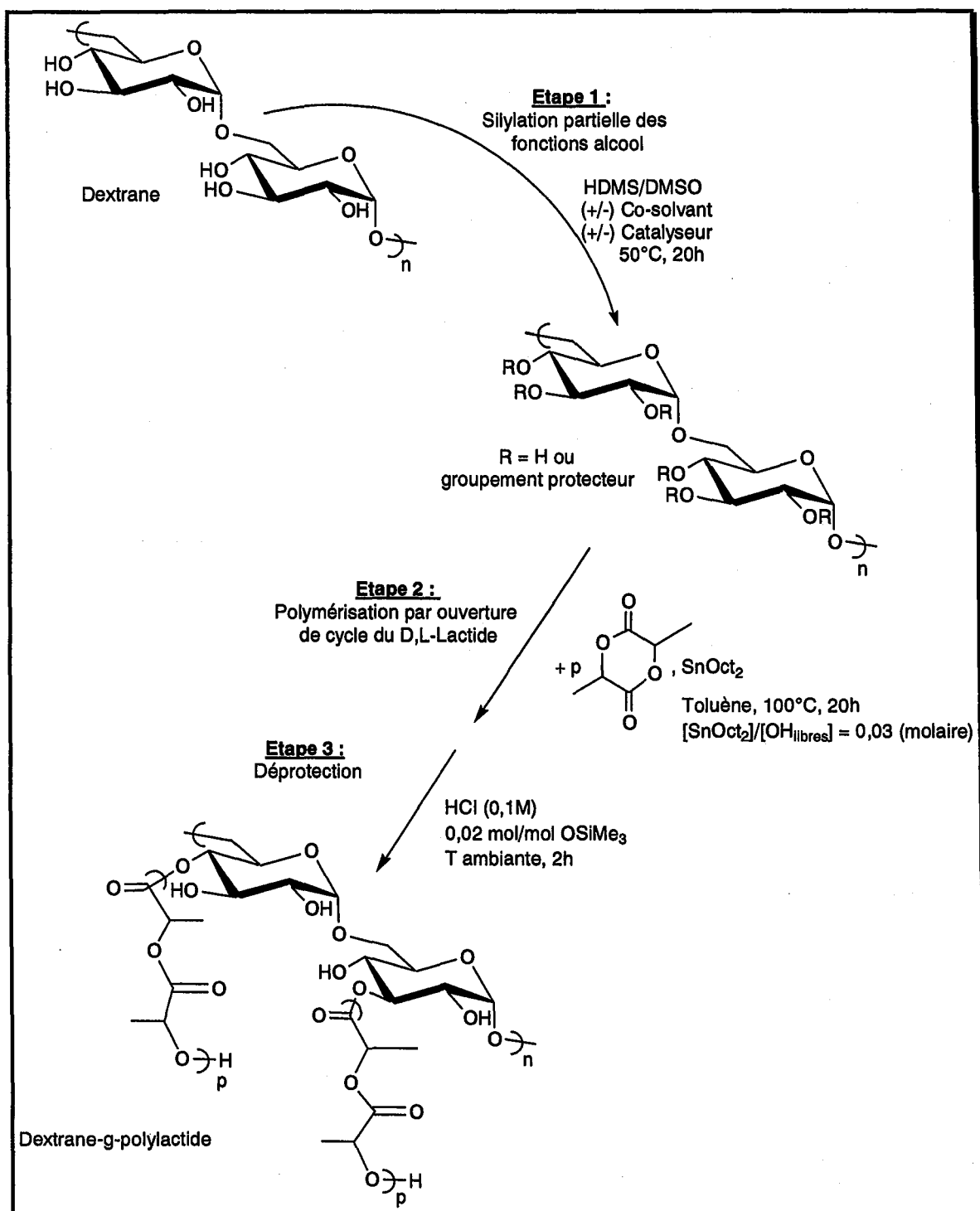


Schéma II-25 : Conditions employées pour les différentes étapes de la synthèse.

CONCLUSIONS

Chaque étape de la synthèse des copolymères dextrane-g-poly lactide a fait l'objet d'une étude détaillée et l'ensemble des conditions opératoires a ainsi été déterminé (celles-ci sont présentées au Schéma II-25). La synthèse de copolymères dextrane-g-poly lactide d'architecture et de compositions variées est désormais réalisable et contrôlée.

Au cours de cette étude, 7 copolymères différents ont pu être obtenus. Leur proportion relative en poly lactide (F^{PLA}) et leur architecture (nombre moyen et masse molaire moyenne des greffons $\overline{M}_{n\text{ GREF}}$) sont présentées dans le Tableau II-20. La masse molaire moyenne de leur dorsale dextrane est également indiquée. Celle-ci a été déterminée après déprotection du dextrane silylé utilisé lors de la seconde étape. Sur les sept copolymères synthétisés, trois ($Dex_{13K-g-27}PLA_{0,4K}$, $Dex_{13K-g-39}PLA_{0,9K}$, $Dex_{13K-g-27}PLA_{2,5K}$) ont ainsi été obtenus à partir de dextrans silylés dont la dorsale avait subi une dégradation partielle.

Copolymères	Dextrane $\overline{M}_n$ (g/mol) (a)	$\overline{N}_{GREF}$ (b)	Ngreffons /chaîne (c)	$\overline{M}_{n\text{ GREF}}$ (g/mol) (d)	F^{PLA} (e)	
$Dex_{13K-g-27}PLA_{0,4K}$	13000	0,27	21	360	0,37	« hydrosoluble »
$Dex_{13K-g-39}PLA_{0,9K}$	13000	0,27	21	360	0,37	« organosolubles »
$Dex_{13K-g-27}PLA_{2,5K}$	13000	0,27	21	360	0,37	
$Dex_{29K-g-18}PLA_{0,1K}$	28900	0,18	32	100	0,10	« hydrosolubles »
$Dex_{29K-g-13,5}PLA_{0,2K}$	28900	0,14	24	200	0,15	
$Dex_{29K-g-18}PLA_{1,7K}$	28900	0,18	32	100	0,10	« organosolubles »
$Dex_{29K-g-60}PLA_{2,0K}$	28900	0,60	98	2000	0,33	

Tableau II-20: Caractéristiques des copolymères obtenus au terme de la synthèse globale.

(a) $\overline{M}_n$ du squelette dextrane, déterminée après hydrolyse dans des conditions douces des fonctions silyléther du dextrane silylé macroamorceur.

(b) $\overline{N}_{GREF}$ = nombre moyen de greffons par unité glucose.

(c) Nombre moyen de greffons par chaîne de dextrane.

(d) $\overline{M}_{n\text{ GREF}}$ des greffons poly lactide calculées à partir de l'équation (II-10)

(e) Voir Equation II-11.

Les 7 copolymères synthétisés présentent des fractions massiques en polylactide (F^{PLA}) variables et divers degrés de substitution (nombre moyen en greffons par unité glucose, $\overline{N_{REF}}$) en greffons de différentes longueurs.

Faute de temps, nous n'avons pas pu synthétiser un nombre plus important de copolymères. Un plus grand éventail de copolymères aurait été intéressant, ce qui aurait permis d'approfondir les relations structure -propriétés.

Selon leur proportion en polylactide, les copolymères synthétisés sont solubles soit en phase aqueuse, soit en phase organique (toluène, chloroforme) (Tableau II-20) et un changement de conformation, selon le solvant, a été observé pour chaque type de copolymère.

Il nous est alors paru intéressant d'étudier le comportement aux interfaces de tels copolymères, et notamment leurs propriétés tensioactives. L'emploi des dextrane-g-PLA pour des applications biomédicales a également été envisagé : en particulier leur utilisation pour le recouvrement de nanoparticules de polylactide. L'étude de leur comportement aux interfaces et de leur aptitude à recouvrir ces nanoparticules sera présentée dans la troisième partie de ce manuscrit.

Partie III

***De l'étude des propriétés physico-
chimiques aux applications
biomédicales potentielles***

PARTIE III :

DE L'ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES AUX APPLICATIONS BIOMEDICALES POTENTIELLES

INTRODUCTION :

Dans de la partie précédente, nous avons montré comment la synthèse de copolymères greffés dextrane-g-poly lactide, d'architecture contrôlée et variable, a pu être réalisée (Tableau II-20). Ces copolymères associent une dorsale dextrane (hydrophile) et des greffons poly lactide (hydrophobe), ce qui leur confère un caractère amphiphile. Selon leurs paramètres macromoléculaires, les copolymères synthétisés sont soit hydrosolubles, soit organosolubles et, selon le solvant, un changement de conformation du copolymère a été observé. Ainsi un masquage de la dorsale dextrane (respectivement des greffons PLA) en milieu organique peu polaire (respectivement aqueux) a été mis en évidence au Chapitre III de la Partie II (Paragraphe I.II.2) dans le cas des copolymères « organosolubles » (respectivement « hydrosolubles »). Ils sont ainsi susceptibles de se révéler « adaptatifs », c'est-à-dire d'adapter leur comportement à leur environnement. De même, différents comportements aux interfaces (eau/air ou eau/huile) pourraient être obtenus. Il nous est alors paru intéressant d'étudier les propriétés physico-chimiques de ces copolymères en solution diluée, et notamment leur potentialité à être tensioactifs. Ces études sont présentées au Chapitre I de cette partie.

D'autre part, ces copolymères étant entièrement biocompatibles et biodégradables, leur utilisation pour des applications biomédicales a été envisagée et fait l'objet du second chapitre de cette partie. Des essais ont ainsi été effectués pour tester leur aptitude à modifier des propriétés de surface de particules de PLA, destinées à la vectorisation de principes actifs.

Chapitre I :

Propriétés en solution diluée- Etude des propriétés tensioactives

Chapitre I :

Propriétés en solution diluée -

Etude des propriétés tensioactives

I. TENSIOMETRIE.....	147
I.1. Généralités	147
I.1.1. Définitions et évolution en présence de surfactif.....	147
Cas d'une interface liquide /air.....	147
Cas d'une interface liquide / liquide.....	148
Efficacité / Effectivité.....	148
I.2. Application à notre étude	149
I.3. Copolymères « hydrosolubles »-Mesure des tensions superficielles.....	149
I.4. Copolymères « Organosolubles » - Mesure des tensions interfaciales eau/phase organique	153
I.5. Conclusions.....	154
II. SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE.....	154
II.1. Généralités	155
II.2. Principe d'étude en présence d'une sonde extrinsèque	155
II.3. Etude des copolymères dextrane-g-poly lactide hydrosolubles.....	156
II.3.1. Sondes utilisées.....	156
II.3.1.1. Pyrène (Py)	157
II.3.1.2. Rotor moléculaire (2)-CN : DMAC.....	157
II.3.2. Résultats.....	159
II.3.2.1. Etude de la polarité (cas du pyrène ou du DMAC).....	159
II.3.2.2. Etudes de la cohésion (cas du rotor DMAC).....	160
II.3.2.3. Conclusions.....	161
II.4. Etudes des copolymères dextrane-g-PLA « organosolubles »	162
II.4.1. Généralités sur le spectre d'émission de fluorescence de l'ANS.	163
II.4.2. Résultats.....	164
II.4.3. Conclusions.....	166
III. CONCLUSION - PERSPECTIVES.....	167
IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	168

CHAPITRE I : PROPRIETES EN SOLUTION

DILUEE -

ETUDE DES PROPRIETES TENSIOACTIVES

Les copolymères amphiphiles sont susceptibles d'adapter leur comportement à leur environnement. En milieu aqueux, ils sont soumis à des mécanismes d'organisation inter- ou intramoléculaires et peuvent s'organiser de diverses façons. Cette faculté d'organisation leur procure des propriétés spécifiques étroitement liées à leur architecture. Les copolymères amphiphiles sont ainsi susceptibles de s'organiser aux interfaces eau/huile et de favoriser la formation et la stabilisation d'émulsions. Ces divers comportements peuvent être étudiés à l'aide de plusieurs techniques : viscosimétrie [1, 2], rhéologie [3, 4], tensiométrie, spectroscopie de fluorescence, diffusion de la lumière [5], diffusion de neutrons.

Les différents copolymères dextrane-g-PLA obtenus au cours de ces travaux, qu'ils aient tendance à être solubles en milieu aqueux ou en milieu organique (toluène, chloroforme, dichlorométhane...), possèdent des solubilités limitées. Ainsi, seul le copolymère possédant la plus forte proportion en polylactide ($\text{Dex}_{29\text{K}}\text{-g-60PLA}_{2,0\text{K}}$, $F^{\text{PLA}} = 0,88$) est encore soluble dans le dichlorométhane ou le chloroforme à 10 g/L. Les copolymères « hydrosolubles » forment, quant à eux, des solutions aqueuses opalescentes au delà de 1 g/L. C'est pourquoi nous n'avons étudié leurs propriétés physico-chimiques qu'en solution diluée, et que nous avons exclu l'emploi de la rhéologie. Seules ont été utilisées les techniques les plus appropriées de ce point de vue : la tensiométrie puis la spectroscopie de fluorescence.

D'autre part, ces travaux ne constituent qu'une approche préliminaire du comportement physico-chimique de tels copolymères. Leur nombre limité et le fait qu'ils possèdent des architectures très différentes ne permettent que l'établissement partiel et incomplet des relations entre propriétés physico-chimiques et paramètres structuraux des copolymères.

I. TENSIOMETRIE

Les mesures de tension de surface (respectivement interfaciale) permettent l'étude des phénomènes d'adsorption à l'interface liquide/air (respectivement liquide/liquide) d'un composé en solution dans l'eau (respectivement dans l'une des deux phases) [6]. L'interface liquide/air (ou liquide/liquide) possède effectivement une certaine « élasticité » qui varie suivant les caractéristiques propres au(x) liquide(s).

I.1. Généralités

I.1.1. Définitions et évolution en présence de surfactif

Cas d'une interface liquide /air

Soit un soluté dissous dans la phase liquide. Si on considère l'interface liquide/air, la tension de surface du liquide (notée σ) représente le travail réversible qu'il faut fournir au système pour augmenter sa surface d'une unité (Equation (III-1)) :

$$\sigma = \left(\frac{\partial U_s}{\partial S} \right)_{T,C} \quad (\text{III-1})$$

- Avec ∂U_s : variation d'énergie interne de la région interfaciale
- ∂S : variation de surface

Si le soluté présente un caractère dit « tensioactif », son introduction dans la phase liquide permet de réduire sa tension de surface. L'évolution de la tension de surface liquide/air en fonction de la concentration de ce soluté présente habituellement trois zones distinctes (Figure III-1) :

- Aux faibles concentrations en tensioactif, le nombre de molécules en solution n'est pas suffisant pour saturer complètement l'interface liquide/air. La tension de surface ne diminue alors que très faiblement.
- A partir d'une concentration caractéristique de chaque surfactif, l'interface liquide/air est saturée. La quantité de tensioactif en solution est alors suffisante pour

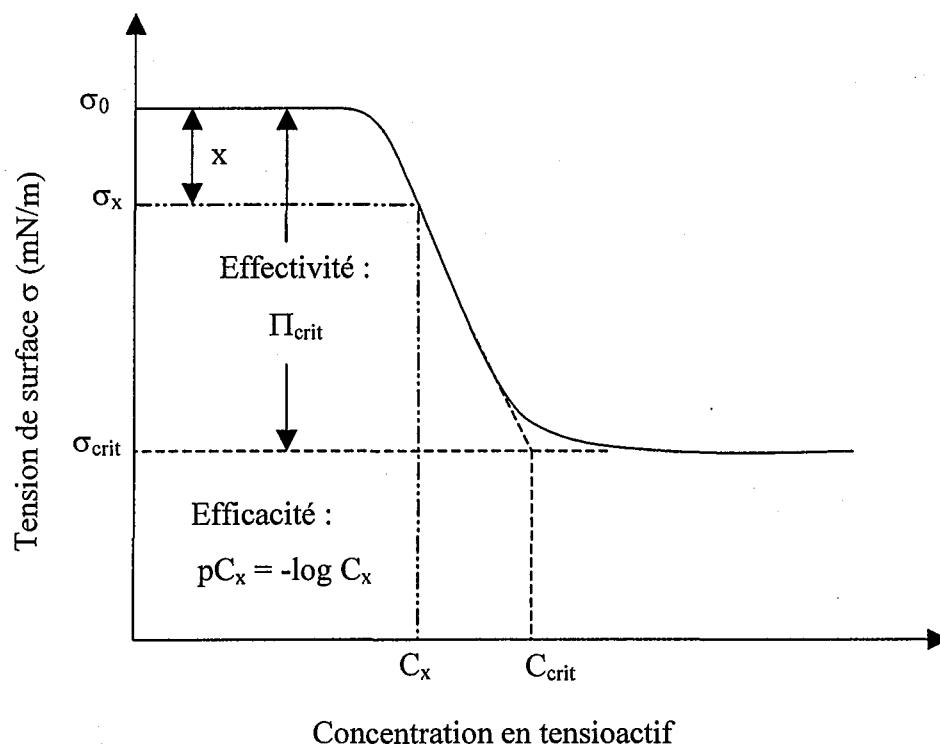


Figure III-1 : Variation de la tension de surface liquide/air en fonction de la concentration en tensioactif dans la phase liquide.

stabiliser une interface d'aire plus élevée. Plus la concentration en surfactif augmente, plus le travail à fournir pour augmenter la surface du système diminue. La tension de surface varie alors de façon linéaire avec le logarithme de la concentration. Ces variations sont décrites par la relation de Gibbs (Equation (III-2)) :

$$\partial\sigma = 2,303.R.T.\Gamma_{\max} \partial \log C \quad (\text{III-2})$$

où $\Gamma_{\max}$ est le taux de recouvrement maximal de la surface en polymère.

Cette relation, ainsi que celles qui suivent, n'est toutefois valable que si l'activité de la solution est égale à sa concentration.

- Au-delà d'une certaine concentration en surfactif, la tension de surface reste constante. La concentration micellaire critique (CMC), propre au tensioactif employé, a alors été atteinte, c'est-à-dire que la concentration en molécules de tensioactif libre ne varie plus. De ce fait, le travail à fournir pour augmenter la surface du système ne peut plus être diminué. Dans le cas des polymères amphiphiles, la concentration critique (C_{crit}) dépend essentiellement de l'énergie d'agrégation du polymère (d'où parfois la dénomination de *concentration d'agrégation critique*, C_{AC}) mais aussi, dans certains cas, de sa solubilité [7] ou encore de sa polymolécularité.

Cas d'une interface liquide / liquide

La tension interfaciale entre deux liquides peut être définie de façon analogue à la tension de surface. Sa valeur dépend de la nature des deux phases : elle est d'autant plus grande que les deux phases sont différentes. Dans le cas où un surfactif est dissous dans l'une des deux phases, l'évolution de la tension interfaciale en fonction de la concentration de ce premier est généralement similaire au cas précédent. Les phénomènes sont cependant plus complexes et peuvent mettre en jeu la solubilité partielle du surfactif dans la phase où il n'avait pas été dissous.

Efficacité / Effectivité

L'aptitude des surfactifs à s'adsorber à l'interface liquide/air ou liquide/liquide est caractérisée par leur efficacité et leur effectivité [7]. Ces notions sont définies à partir de la courbe $\sigma = f(C)$, présentée dans la Figure III-1 :

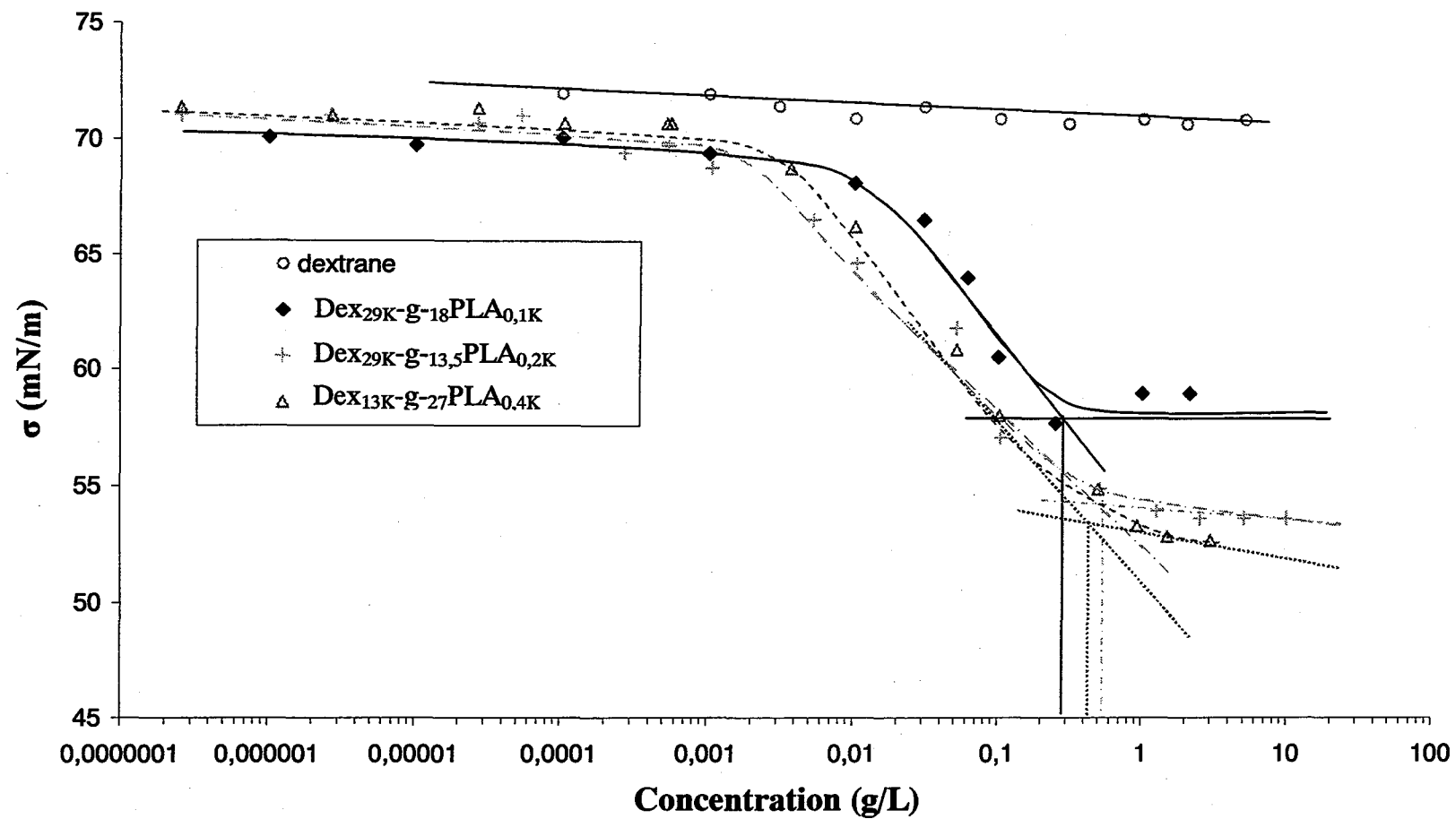


Figure III-2 : Variations de la tension superficielle en fonction de la concentration en polymère (g/L) dans la phase aqueuse. Cas des copolymères Dextrane-g-PLA hydrosolubles et du dextrane.

- L'efficacité, notée pC_x , est définie comme la valeur négative du logarithme de la concentration C_x (Equation (III-3)) qui est nécessaire pour réduire la tension de surface de x mN/m (la valeur de $\sigma_x (= \sigma_0 - x)$ est choisie dans la partie linéaire de la courbe $\sigma = f(C)$. σ_0 est la valeur de la tension de surface au plateau initial).

$$pC_x = -\log C_x \quad (\text{III-3})$$

- L'effectivité, notée Π_{crit} (en N/m), représente la réduction de la tension de surface à C_{crit} , par rapport à celle du solvant, σ_0 (Equation (4)) :

$$\Pi_{\text{crit}} = \sigma_{\text{crit}} - \sigma_0 \quad (\text{III-4})$$

où σ_{crit} correspond à la tension de surface au plateau final.

I.2. Application à notre étude

Comme nous l'avons déjà précisé, selon leur proportion en polylactide, les copolymères, obtenus au cours de ces travaux, sont solubles soit dans l'eau soit en phase organique. Les copolymères « hydrosolubles » pourront ainsi être étudiés à l'interface phase aqueuse/air. Pour les copolymères « organosolubles », il est préférable d'effectuer une étude de l'interface eau/phase organique. L'interface eau/dichlorométhane a été choisie car elle est employée lors du procédé de fabrication des nanoparticules de polylactide (procédé émulsion/évaporation de solvant) (cf. Chapitre II, Partie III).

I.3. Copolymères « hydrosolubles »-Mesure des tensions superficielles

Nous avons donc entrepris d'étudier les propriétés tensioactives de nos trois dérivés « hydrosolubles » et de suivre, à l'équilibre thermodynamique, l'évolution de la tension superficielle en fonction de leur concentration dans la phase aqueuse. La technique utilisée est celle de la plaque de Wilhelmy (cf. Partie IV Expérimentale). Ces évolutions, à 25°C, sont présentées dans la Figure III-2. Plusieurs observations peuvent être faites :

- Alors que le dextrane natif ne présente pas de propriétés surfactives, la tension de surface des solutions aqueuses de copolymères est abaissée par rapport à celle de l'eau.
- L'effectivité des différents polymères est modérée (proche de 15 mN/m) et varie assez peu d'un copolymère à l'autre. Ainsi, les copolymères Dex_{29K}-g-_{13,5}PLA_{0,2K} et

Dex_{13K}-g-27PLA_{0,4K}, qui possèdent pourtant des F^{PLA} très différentes (respectivement égales à 0,15 et 0,37), présentent des effectivités équivalentes.

○ La valeur de la pente dans la partie linéaire de la courbe varie également peu entre les différents copolymères.

Les phénomènes de tensiométrie relatifs aux polymères sont plus complexes que ceux des simples surfactifs. Ainsi, l'adsorption des copolymères amphiphiles à l'interface eau/air et leur agrégation en solution sont beaucoup plus sensibles à la nature de la partie hydrophile, laquelle peut varier considérablement en termes de flexibilité, de taille, de taux de substitution [1, 8] par exemple. Mais, pour une chaîne hydrophile de même nature [1, 8-12], la réduction de la tension de surface dépend dans tous les cas de la balance hydrophile/hydrophobe du copolymère amphiphile employé. Par ailleurs, dans le cas de copolymères greffés, certaines variations peuvent être attribuées à des effets coopératifs [1, 13]. L'adsorption d'un groupe hydrophobe à l'interface favorise alors l'adsorption d'un second groupe hydrophobe associé à la même dorsale du copolymère etc... L'effectivité augmente alors avec le taux de substitution [14] et dépend peu de la longueur des chaînes latérales hydrophobes [1].

Enfin, il convient de remarquer que les C_{crit} , dans le cas des copolymères, sont beaucoup plus difficiles à déterminer que les CMC des surfactifs simples. La rupture de pente dans l'abaissement de la tension interfaciale est beaucoup moins nette en raison d'une part, de la polydispersité des polymères en termes de masse molaire et de répartition des groupes hydrophobes le long du squelette hydrophile et d'autre part, vraisemblablement en raison d'une variation d'affinité pour l'interface des différents types d'agrégats formés.

Il est néanmoins possible de faire un certain nombre de remarques sur les résultats que nous obtenons :

Contrairement à ce qui vient d'être énoncé, il semble que, pour des $\overline{M}_n_{DEX}$ et $\overline{M}_n_{GREF}$ proches, l'effectivité à l'interface eau/air des copolymères « hydrosolubles » croisse lorsque le taux de substitution diminue (Dex_{29K}-g-18PLA_{0,1K}, σ_{crit} = 58 mN/m et Dex_{29K}-g-13,5PLA_{0,2K}, σ_{crit} = 53,6 mN/m). Ce résultat s'oppose également à ceux observés dans le cas des dérivés du dextrane modifiés latéralement par des groupements phénoxy [1] ou des groupements alkyles de différentes longueurs [15], pour lesquels l'effectivité croît avec le taux de substitution. Nos résultats pourraient être expliqués par une plus grande flexibilité de la dorsale dextrane à un

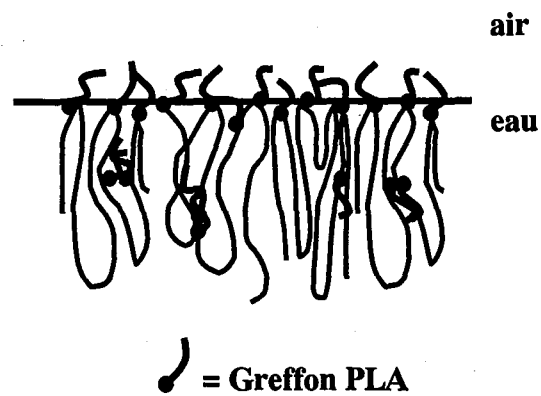


Figure III-3 : Représentation schématique des copolymères Dex-g-PLA adsorbés à l'interface eau/air.

plus faible taux de substitution. Si tel est le cas, la flexibilité de la chaîne de dextrane permet alors une forte extension de la dorsale en solution aqueuse et un important compactage des greffons PLA en surface (Figure III-3). Un autre résultat semble conforter cette hypothèse de flexibilité de la chaîne de dextrane : une réduction de la longueur de la dorsale semble permettre au copolymère Dex_{13K}-g-₂₇PLA_{0,4K} d'abaisser davantage la tension de surface que le Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{0,1K}, alors même que son taux de substitution est plus élevé.

La concentration critique des copolymères amphiphiles dextrane-g-poly lactide évolue peu en fonction de la fraction massique en poly lactide. Quel que soit le copolymère considéré, la concentration critique est comprise entre 0,3 et 0,6 g/L, comme on peut le voir sur la Figure III-2. Wollenweber et coll. ont publié des résultats similaires : les concentrations critiques des hydroxypropyl méthyl celluloses sont proches, indépendamment de la proportion de motifs hydroxypropyle [10]. Il est vraisemblable que cette concentration critique ne corresponde pas à un état d'agrégation particulier (lequel devrait normalement varier avec la nature du copolymère amphiphile considéré), mais qu'elle soit plutôt influencée par la limite de solubilité du polymère. Cette concentration critique peut correspondre simplement à un maximum de polymère déposé à l'interface, sans échanges ultérieurs possibles avec la solution, comme c'est le cas pour d'autres dérivés du dextrane [1] ou de la carboxyméthylcellulose [10]. En effet, contrairement aux surfactifs simples où l'adsorption à l'interface est contrôlée par l'équilibre de diffusion entre l'interface et la solution, un copolymère amphiphile en peigne possède plusieurs « points d'ancrage » à la surface et y est, de ce fait, vraisemblablement adsorbé de façon quasi irréversible [1, 16].

Le fait que les copolymères soient faiblement solubles en milieux aqueux peut également influencer les résultats. La limite de solubilité n'est pas aisée à définir : d'un point de vue macroscopique, elle peut être située un peu au delà de 1 g/L pour les copolymères Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{0,1K} et Dex_{29K}-g-_{13,5}PLA_{0,2K}, et autour de 0,5 g/L pour Dex_{13K}-g-₂₇PLA_{0,4K} qui possède une plus forte proportion en lactide. Mais ces problèmes d'insolubilité se manifestent certainement plus tôt au niveau microscopique. Ils influencent alors l'allure des courbes de tension superficielle et compliquent leur interprétation. Le fait que Dex_{13K}-g-₂₇PLA_{0,4K} ne conduise pas à une effectivité plus grande que Dex_{29K}-g-_{13,5}PLA_{0,2K} (malgré une $\overline{Mn}_{DEX}$ plus faible et une F^{PLA} plus élevée) laisse entrevoir l'influence du problème de solubilité de nos produits.

Pour illustrer ce problème de solubilité, des mesures de tension superficielle ont été effectuées à 46°C sur des solutions du copolymère Dex_{29K}-g-18PLA_{0,1K} solubilisé à 37°C (Figure III-4). Une augmentation de l'effectivité est alors observée, vraisemblablement due à une amélioration de la solubilité de ce copolymère avec la température. σ_{crit} obtenue à 46°C n'est toutefois pas inférieure à celles précédemment obtenues à 25°C avec les copolymères Dex_{13K}-g-27PLA_{0,4K} et Dex_{29K}-g-13,5PLA_{0,2K}. Ceci pourrait indiquer que le palier atteint dépend de l'architecture des copolymères et/ou de leur fraction massique en polylactide (et donc de leur balance hydrophile/hydrophobe), mais serait également influencé par la solubilité des copolymères.

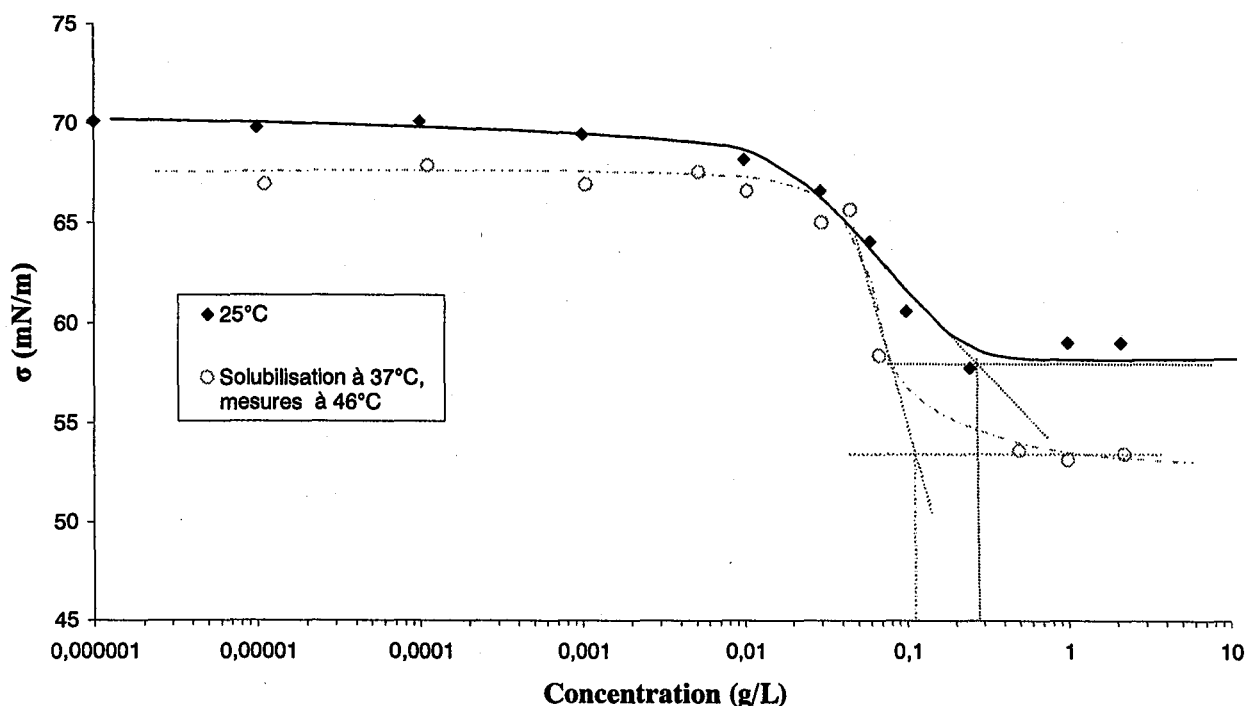


Figure III-4 : Variations de la tension superficielle en fonction de la concentration en polymère (g/L). Influence de la température de mesure dans le cas du copolymère hydrosoluble Dex_{29K}-g-18PLA_{0,1K}.

Pour conclure, notre étude qui est en contradiction avec celle concernant les dextrans substitués par des groupements phénoxy [1], mériterait d'être approfondie.

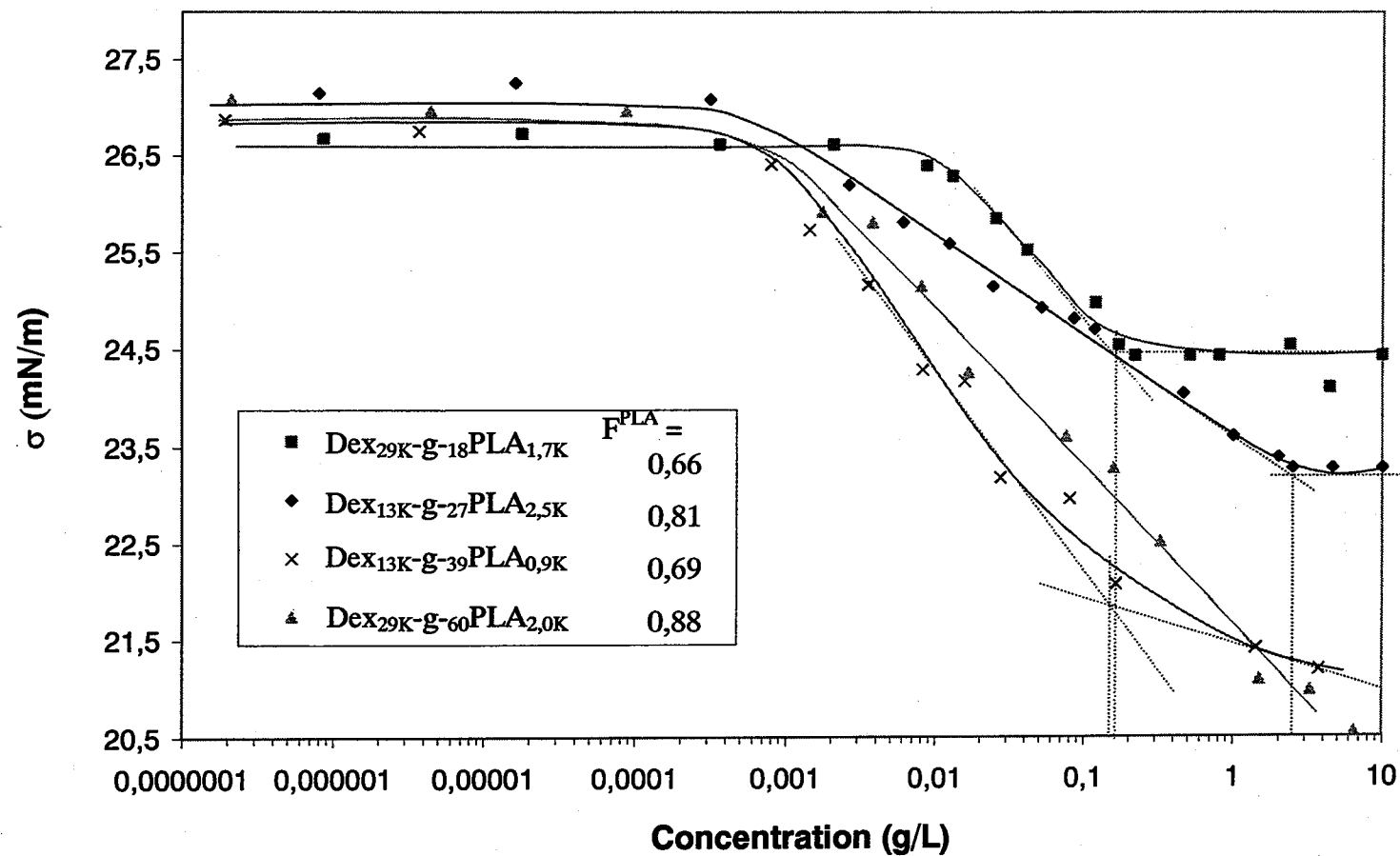


Figure III-5 : Variations de la tension interfaciale d'un système (eau/solution de dichlorométhane) en fonction de la concentration en copolymère (g/L), à 25°C. Cas des copolymères Dex-g-PLA organosolubles.

I.4. Copolymères « Organosolubles » - Mesure des tensions interfaciales eau/phase organique

La technique employée est analogue à celle utilisée pour les mesures de tension superficielle, mais la plaque de Wilhelmy est remplacée par un anneau de Du Noüy (cf. Partie Expérimentale). Les mesures sont effectuées à l'équilibre thermodynamique, mais la durée nécessaire à l'établissement de cet équilibre est cette fois-ci beaucoup plus importante. C'est pourquoi les interfaces eau/(solution de polymère dans le dichlorométhane) ont été préparées 24h à l'avance (cf. Partie expérimentale).

La Figure III-5 représente les variations de la tension interfaciale avec la concentration des différents copolymères « organosolubles » étudiés. Comme précédemment, les résultats sont délicats à interpréter. Quelques points peuvent cependant être soulignés :

- Tous les copolymères permettent un abaissement de la tension interfaciale eau/dichlorométhane de 2,5 à 6 mN/m.

- L'effectivité des différents copolymères est d'autant plus importante que leur taux de substitution augmente, indépendamment de la longueur des greffons ou de celle du dextrane. Il est alors possible que l'ancrage en surface des greffons PLA soit facilité par l'adsorption et/ou l'association coopérative, et ce malgré une réduction de flexibilité de la chaîne de dextrane. Cette variation s'oppose à celle observée dans le cas des copolymères hydrosolubles.

- La concentration critique (C_{crit}) semble varier dans de plus grandes proportions qu'en milieu aqueux. Elle semble suivre l'augmentation du caractère hydrophobe (fraction massique en polylactide) du copolymère. Mais là encore, il faut rester prudent sur l'interprétation des résultats en raison des problèmes de solubilité aux plus fortes concentrations pour ces produits. Cette évolution paraît conforme à celle prévisible dans le cas d'une organisation inverse de ces copolymères dans la phase dichlorométhane. Cependant, il faut signaler que dans le cas des tensioactifs moléculaires, la micellisation inverse se traduit par une chute de tension interfaciale progressive et non brutale. Or, les abaissments de tension interfaciale observés dans la Figure III-5 se font sur un domaine de concentration relativement étroit. Il n'est alors pas sûr que cette réduction soit représentative

de phénomènes d'agrégation inverse : il pourrait s'agir d'agrégations directes en milieu aqueux, après une répartition du copolymère entre les deux phases. Si tel est le cas, plus l'hydrophobie (F^{PLA}) du copolymère augmente, plus le coefficient de partage entre les deux phases est en faveur du milieu organique (dichlorométhane) et la proportion du copolymère en phase aqueuse diminue alors. Pour que celui-ci puisse former des organisations directes en phase aqueuse, il est alors nécessaire d'augmenter la concentration globale du copolymère dans le système dichlorométhane/eau ; ce qui est effectivement observé dans la Figure III-5.

I.5. Conclusions

Tous les copolymères Dex-g-PLA présentent un caractère tensioactif plus ou moins marqué aux interfaces eau/air (cas des « hydrosolubles ») ou eau/dichlorométhane (cas des « organosolubles »). L'interprétation des résultats en fonction de l'architecture des copolymères est relativement délicate et les éléments dont nous disposons sont insuffisants pour confirmer les différentes hypothèses que nous avons pu formulées. Il aurait été intéressant de poursuivre l'étude des copolymères « hydrosolubles » à l'interface eau/dichlorométhane pour comparer leur comportement avec ceux des copolymères « organosolubles ». Cette étude n'a pas pu être menée par manque de temps.

Dans le cas des copolymères « hydrosolubles », le caractère tensioactif est relié à la compétition entre des interactions hydrophobes en volume et l'adsorption à la surface (probablement irréversible pour certains copolymères). Cette aptitude à l'organisation en volume, propriété courante des polymères amphiphiles solubles en milieux aqueux, conduit à la formation de microdomaines hydrophobes au delà d'une certaine concentration en copolymère. Afin de confirmer les résultats de tensiométrie, la formation de ces microdomaines hydrophobes, dans le cas des copolymères « hydrosolubles », et les facultés d'organisation aux interfaces des copolymères « organosolubles » ont été étudiées par spectroscopie de fluorescence.

II. SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

Ces études ont été réalisées en collaboration avec le Département de Chimie-Physique des Réactions (DCPR, UMR7630 CNRS-INPL).

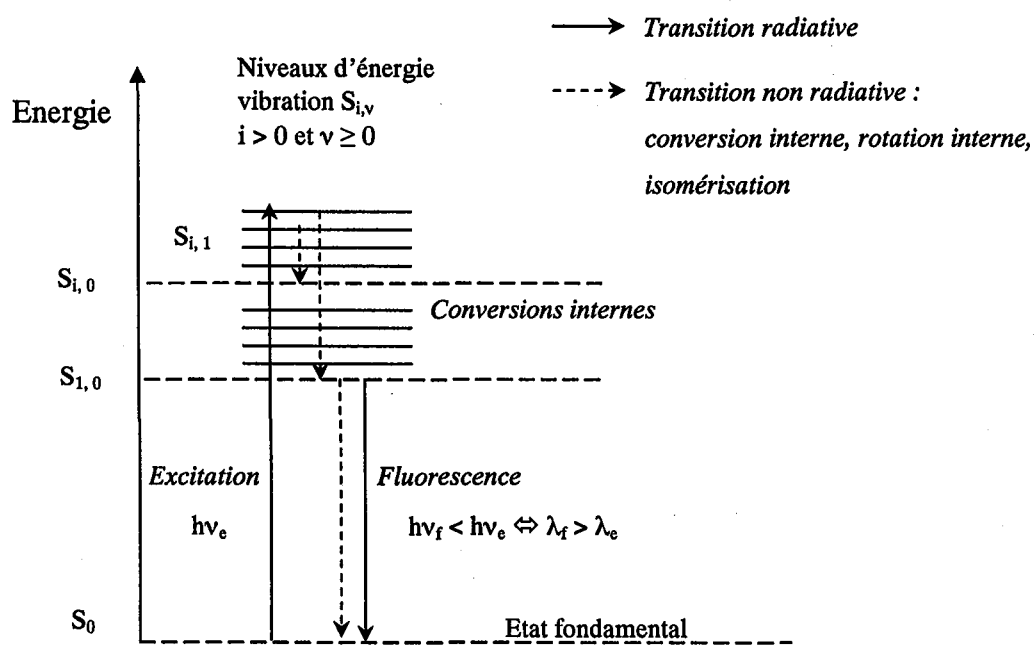


Figure III-6 : Diagramme simplifié de Jablonski. Processus de fluorescence.

$h\nu_e$, $h\nu_f$, $h\nu_0$: énergies des photons absorbés par les molécules.

$h\nu_f$: énergie des photons émis par les molécules.

$S_{i,v}$: états singulets excités.

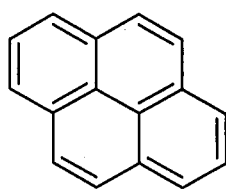
II.1. Généralités

Si la spectroscopie de fluorescence a initialement été employée dans le cas des surfactifs simples, son utilisation a ensuite été étendue à l'étude des interactions polymères/tensioactifs [17, 18], puis à celle du comportement de copolymères amphiphiles en solution [19, 20] ou aux interfaces [21-23]. Cette technique d'analyse permet, en outre, l'étude d'éventuelles organisations moléculaires notamment la formation de micelles, d'agrégats ou encore de microdomaines hydrophobes (cas des copolymères amphiphiles hydrosolubles). Un certain nombre de paramètres caractéristiques du mode de formation et de la structure de ces agrégations peuvent ainsi être obtenus : concentration d'agrégation critique (C_{AC})- ou *concentration micellaire critique CMC pour les tensioactifs simples*-, nombre d'agrégation (N_{agg} = nombre de motifs impliqués dans l'organisation - motifs hydrophobes ou hydrophiles selon le type de structure), nature du microenvironnement (polarité apparente (ϵ_{app}) et/ou viscosité effective (η_{eff}) à l'intérieur de l'organisation).

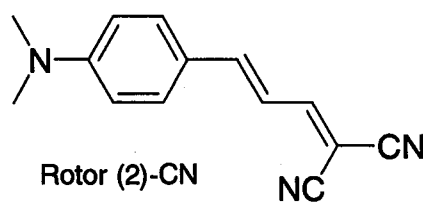
Dans tous les cas, le principe de cette méthode repose sur l'incorporation d'une sonde dans le système. Ces sondes sont des molécules fluorescentes dites fluorophores, dont les caractéristiques dépendent fortement des propriétés du milieu (polarité, viscosité) dans lequel elles se trouvent. Pour l'étude des copolymères amphiphiles, elles peuvent être soit libres dans le milieu (sondes extrinsèques), soit liées chimiquement sur les chaînes des copolymères (sondes intrinsèques). Cependant, les sondes intrinsèques présentent quelques inconvénients si bien qu'elles sont moins utilisées [24] : d'une part la synthèse de nouveaux polymères est nécessaire pour chaque étude et d'autre part l'introduction de la sonde sur les macromolécules est susceptible de modifier le comportement de ces dernières [25]. Nous n'avons donc utilisé que des sondes extrinsèques lors de notre étude du comportement des copolymères dextrane-g-poly lactide en solution aqueuse diluée (copolymères « hydrosolubles ») ou aux interfaces eau/phase organique (copolymères « organosolubles »).

II.2. Principe d'étude en présence d'une sonde extrinsèque

Soumise à une source lumineuse de longueur d'onde appropriée (λ_e), une molécule fluorescente passe de son état fondamental S_0 à un état excité $S_{i,v}$ en absorbant les photons d'énergie $h\nu_e$ ($= hc/\lambda_e$) (Figure III-6). Même s'il existe différents modes d'excitation (continu



Pyrène (Py)



Rotor (2)-CN
4-(N,N-diméthylamino)
cinnamylidiène manonitrile

Figure III-7 : Formules des deux sondes utilisées lors de notre étude sur les copolymères Dex-g-PLA hydrosolubles.

ou discontinu), nous n'emploierons ici que le mode continu pour lequel seules les valeurs moyennes dans le temps sont considérées (étude à l'état stationnaire).

Une fois excitée, la molécule se relaxe, c'est-à-dire qu'elle perd progressivement de l'énergie pour retourner à son état fondamental S_0 . Lors de ce processus de désactivation, des processus de conversions internes (non radiatifs) interviennent. L'énergie de la molécule diminue progressivement jusqu'à ce qu'elle atteigne son état singulet excité $S_{1,0}$. Les molécules reviennent alors dans leur état fondamental soit en libérant des photons d'énergie $h\nu_f (= hc/\lambda_f)$ inférieure à celles des photons absorbés lors d'excitation, soit par des processus non radiatifs (rotations internes, isomérisations...). C'est l'émission photonique qui constitue le phénomène de fluorescence.

II.3. Etude des copolymères dextrane-g-poly lactide hydrosolubles

Les composés amphiphiles hydrosolubles sont susceptibles de s'organiser en milieu aqueux. Dans le cas de copolymères greffés, les interactions intramoléculaires sont favorisées à faible concentration alors que les interactions intermoléculaires peuvent se produire à plus forte concentration. Ces deux types d'interactions donnent naissance à des microdomaines hydrophobes [26]. Différentes sondes fluorescentes peuvent être utilisées afin non seulement de mettre en évidence la présence de ces microdomaines hydrophobes au sein d'une solution de copolymère, mais également d'évaluer la concentration en copolymère à partir de laquelle apparaissent ces microdomaines [17]. Pour cela, le spectre d'émission de fluorescence des sondes employées doit être fortement dépendant de la polarité du solvant : variation relative de l'intensité des bandes, déplacement du maximum d'émission ou encore modification du rendement quantique de fluorescence¹.

II.3.1. Sondes utilisées

Les sondes utilisées lors de notre étude sont le pyrène et un rotor moléculaire [4-(N,N-diméthylamino)cinnamylidène manonitrile, DMAC ou rotor (2)-CN] synthétisé au DCPR. Ces molécules sont représentées dans la Figure III-7.

¹ Le rendement quantique de fluorescence (ϕ_f / ϕ_0) est le rapport du nombre de photons émis par fluorescence par unité de temps, au nombre de photons absorbés pendant la même unité de temps.

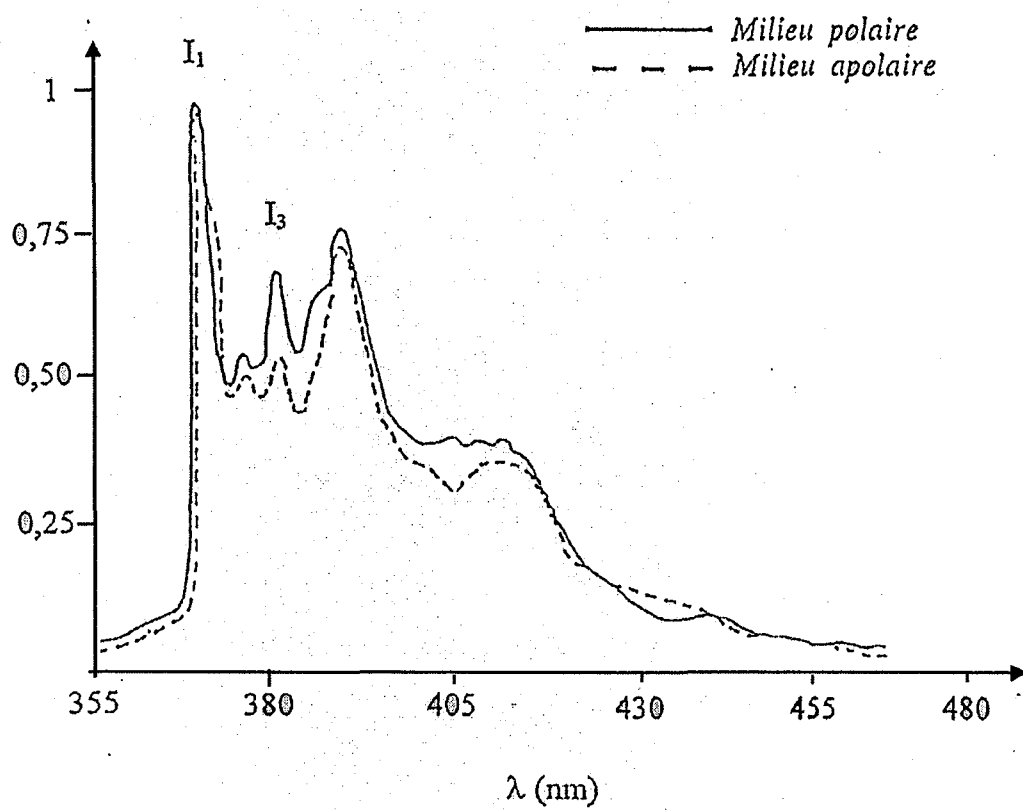


Figure III-8 : Evolution du spectre d'émission de fluorescence du pyrène en fonction de la polarité du solvant.

II.3.1.1. Pyrène (Py)

Le pyrène est la sonde la plus couramment employée pour ce type d'étude, car il présente les caractéristiques adéquates pour l'étude de systèmes amphiphiles :

- Faible solubilité dans l'eau ($4 \text{ à } 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$), si bien que le pyrène se solubilise préférentiellement dans les zones hydrophobes du milieu dans lequel il se trouve (comportement caractéristique d'une sonde apolaire).
- Longue durée de vie de fluorescence (400 ns).
- Sensibilité à la polarité de son environnement direct (microenvironnement).

Le spectre d'émission de fluorescence du pyrène présente 5 raies (bandes de transitions électroniques) situées entre 370 et 400 nm (Figure III-8). Les intensités de ces bandes évoluent avec la polarité du microenvironnement, et il a été montré que le rapport (I_1/I_3) (I_1 représentant l'intensité de la première bande ($\lambda=372 \text{ nm}$) et I_3 celle de la troisième bande ($\lambda=383 \text{ nm}$)) est un indicateur du changement de polarité [27, 28]. (I_1/I_3) est de l'ordre de 1,9 dans l'eau et de 0,6 dans les solvants apolaires non aromatiques [17, 28].

Diverses études de fluorescence en solution aqueuse ont ainsi été effectuées à l'aide de pyrène sur des tensioactifs [17, 29] ou des copolymères amphiphiles [29-31], et notamment sur des polysaccharides amphiphiles [2, 19, 20, 26, 32]. Dans chaque cas, les variations de (I_1/I_3) en fonction du logarithme de la concentration en polymère permettent de mettre en évidence la formation de microdomaines hydrophobes à partir d'une certaine concentration. Le rapport (I_1/I_3) diminue dès l'apparition de ces microdomaines hydrophobes. Et on peut ainsi déterminer la concentration d'agrégation critique (C_{AC}). Aux plus fortes concentrations, (I_1/I_3) atteint une valeur minimale constante qui caractérise la polarité de l'intérieur des agrégats, au coeur desquels le pyrène est incorporé [17].

II.3.1.2. Rotor moléculaire (2)-CN : DMAC

Les rotors moléculaires sont des sondes de fluorescence pour lesquelles le processus de relaxation (qui aboutit à la désexcitation de la molécule) peut suivre deux voies : une voie radiative avec émission de fluorescence et une voie non radiative. Les processus non radiatifs sont principalement dus aux mouvements rotatoires internes de ces molécules. En effet, ces sondes sont des systèmes conjugués dont la délocalisation électronique est fortement

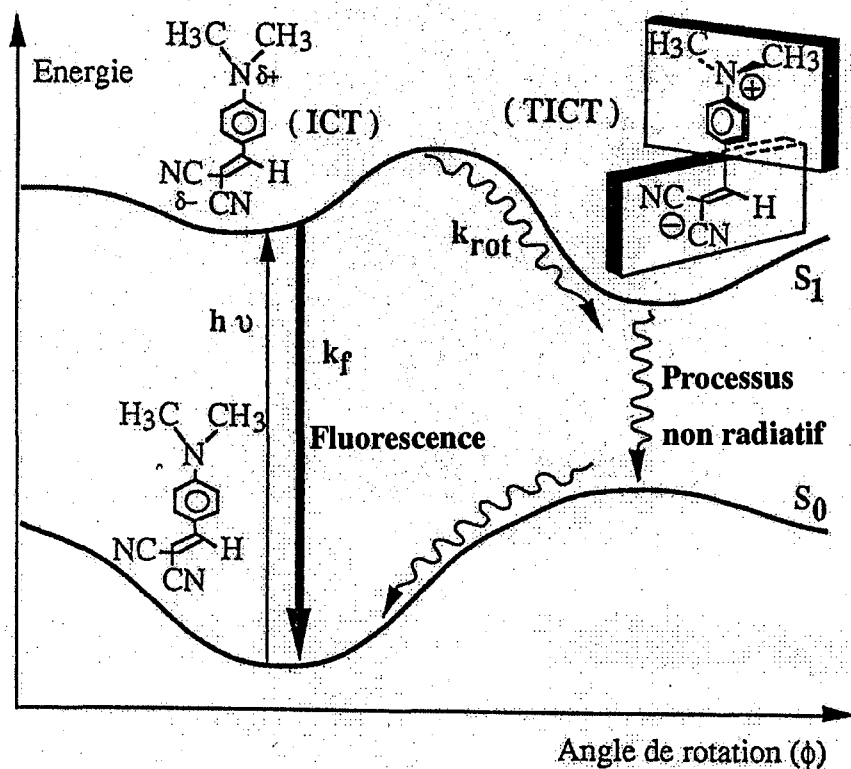


Figure III-9 : Représentation schématique du passage de l'état ICT (Intramolecular Charge Transfert) à l'état TICT (Twisted Intramolecular Charge Transfert). ($\rightsquigarrow$ = processus non radiatif.)

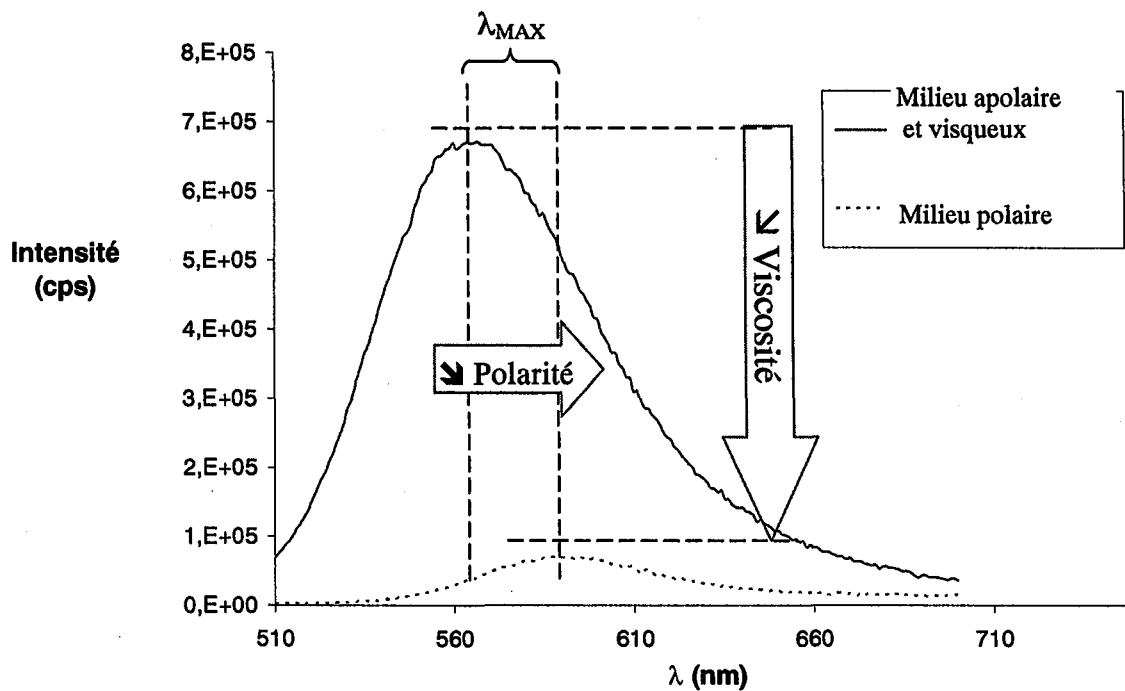


Figure III-10 : Evolution du spectre d'émission de fluorescence du DMAC en fonction de la polarité du milieu.

accentuée par la présence d'un groupe à chacune de leurs extrémités : l'un des groupes est un électrodonneur et l'autre électroattracteur. Sous l'effet d'une excitation lumineuse, un transfert de charge électronique partiel (ICT : *Intramolecular charge transfert*) se produit. Ce transfert est généralement suivi d'une rotation de la molécule formant un état où le transfert de charge électronique est complet (TICT : *Twisted Intramolecular charge Transfer*). Dans ce dernier état, l'orbitale du groupement donneur est perpendiculaire à celle de l'accepteur. Dans le cas des dérivés benzylidène ou cinnamylidène, l'état TICT n'est pas fluorescent. L'exemple des rotors de type cinnamylidène est donné dans la Figure III-9.

Le DMAC est un rotor de type cinnamylidène qui a déjà été utilisé pour l'étude de divers composés amphiphiles [29, 33]. Dans un système susceptible de donner des microdomaines hydrophobes, le DMAC est alors une sonde de polarité et de viscosité du microenvironnement. En effet, lors de la formation des microdomaines hydrophobes, ces deux paramètres influencent la fluorescence de cette sonde :

- L'augmentation de la viscosité locale autour de la sonde limite la libre rotation de la molécule. Il y a alors diminution des processus non radiatifs (population plus faible dans l'état TICT) en faveur du phénomène de fluorescence si bien que le rendement quantique de fluorescence (ϕ_f/ϕ_0), et donc l'aire du spectre d'émission, augmentent.

- Lorsque le rotor est progressivement inclus dans un environnement moins polaire, les processus non radiatifs (état TICT) sont défavorisés d'où, là encore, une augmentation du rendement quantique de fluorescence. Néanmoins, lorsque la polarité du milieu diminue, il se produit une déstabilisation de l'état ICT, si bien que ses niveaux d'énergie sont plus élevés. La longueur d'onde ($\lambda_{\max}$) maximale du spectre d'émission subit alors une diminution en accord avec la réduction de la polarité (Figure III-10).

Les variations de $\lambda_{\max}$ et (ϕ_f/ϕ_0) en fonction du logarithme de la concentration en copolymère utilisé permettent de mettre en évidence la formation de microdomaines hydrophobes. Pour chacun des paramètres précédents, une diminution est observée à partir de la concentration d'agrégation critique et, à plus forte concentration en copolymère, un plateau est atteint. Ce plateau correspond aux valeurs minimales que perçoit la sonde lorsqu'elle est complètement incorporée à l'intérieur des microdomaines et nous renseigne sur la polarité et la viscosité du microdomaine hydrophobe.

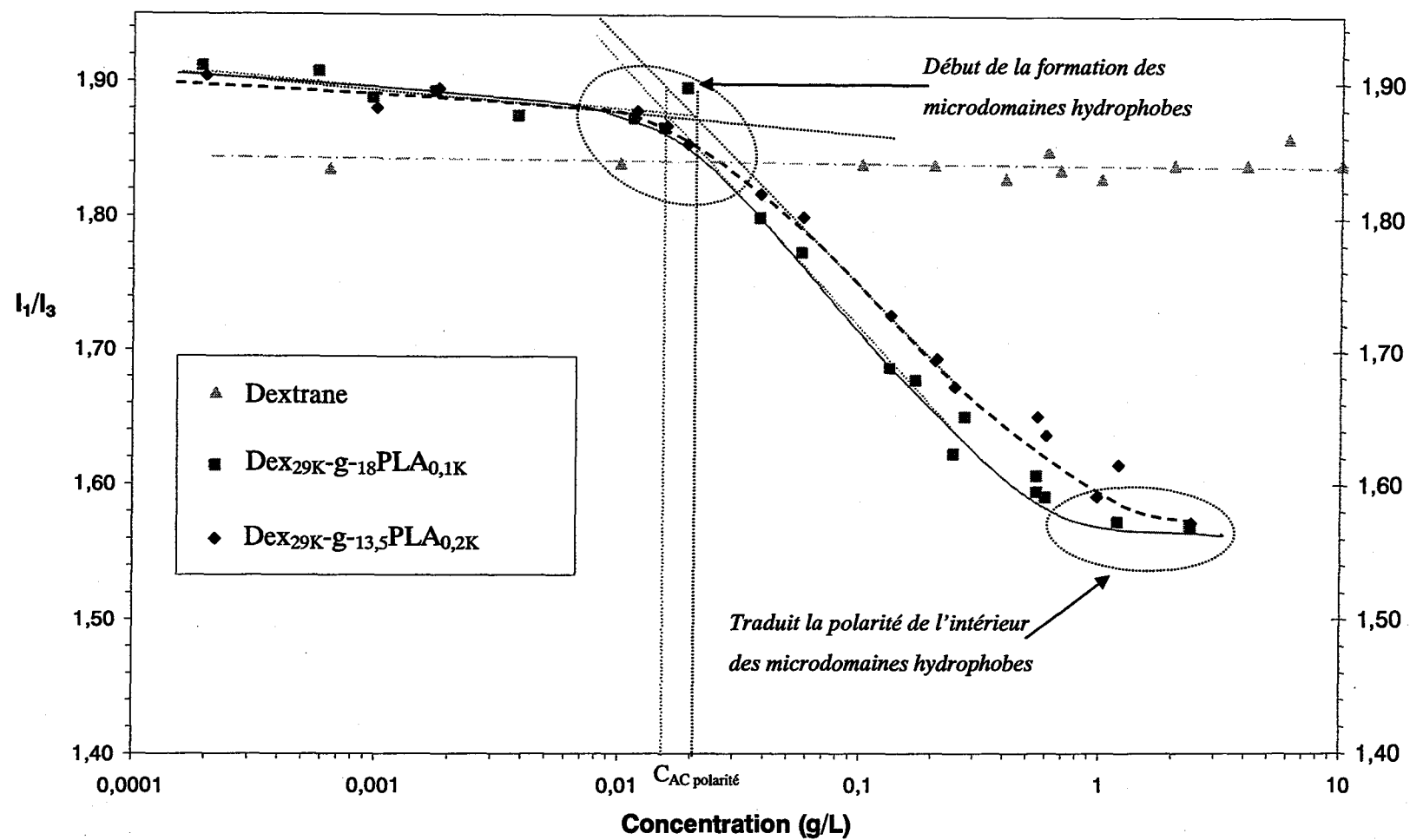


Figure III-11 : Variation du rapport (I_1/I_3) du spectre d'émission de fluorescence du pyrène. Solutions aqueuses de copolymères dextrane-g-PLA « hydrosolubles » à 25°C. $[py] = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$.

II.3.2. Résultats

Les Figures III-11 à III-13 illustrent, pour les copolymères dextrane-g-poly lactide et le dextrane, les évolutions en fonction de la concentration en copolymère dans le milieu, d'une part du rapport (I_1/I_3) dans le cas du pyrène, et d'autre part de la longueur d'onde au maximum d'adsorption ($\lambda_{\max}$) et du rendement quantique de fluorescence (ϕ_f/ϕ_0), dans le cas du rotor DMAC.

Le dextrane non modifié est un polymère très hydrophile. Quelle que soit sa concentration dans la solution aqueuse, le rapport (I_1/I_3) est élevé et proche 1,89 (*valeur de la fluorescence du pyrène dans l'eau*). Lorsque le DMAC est utilisé, ni la longueur d'onde maximale ni le rendement quantique de fluorescence n'évoluent, et les valeurs obtenues pour une solution aqueuse de dextrane correspondent à celle du spectre du DMAC dans l'eau.

Dans le cas des copolymère dextrane-g-PLA, une augmentation de leur concentration induit, aussi bien une diminution de (I_1/I_3) (cas du pyrène) ou de $\lambda_{\max}$ (cas du DMAC) qu'une élévation du rendement quantique de fluorescence [(ϕ_f/ϕ_0) , cas du DMAC]. Comme nous l'avons vu précédemment, ces phénomènes traduisent la tendance de ces copolymères à s'organiser, à partir d'une certaine concentration, en microdomaines hydrophobes par association des greffons polylactides. Les comportements des deux copolymères « hydrosolubles » étudiés sont relativement voisins.

Si les évolutions de (I_1/I_3) ou de $\lambda_{\max}$ nous informent sur le changement de polarité du microenvironnement de la sonde, l'augmentation de (ϕ_f/ϕ_0) nous renseigne sur la variation de la viscosité autour de la sonde, c'est-à-dire sur la cohésion ou la compacité des microdomaines hydrophobes.

II.3.2.1. Etude de la polarité (cas du pyrène ou du DMAC)

A l'aide des deux paramètres de polarités [(I_1/I_3) et $\lambda_{\max}$], il est possible de déterminer des concentrations d'agrégation critique que nous noterons $C_{AC\text{polarité}}$. Quel que soit le copolymère étudié, les $C_{AC\text{polarité}}$ déterminées par les deux paramètres sont du même ordre de grandeur (Tableau III-1) : pour le copolymère Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{0,1}, une $C_{AC\text{polarité}}$ égale à $1,5 \cdot 10^{-2}$ g/L est obtenue à l'aide du paramètre (I_1/I_3) alors que celle obtenue par la variation de $\lambda_{\max}$ est de $3 \cdot 10^{-2}$ g/L. Les légers écarts observés entre ces valeurs peuvent s'expliquer par la

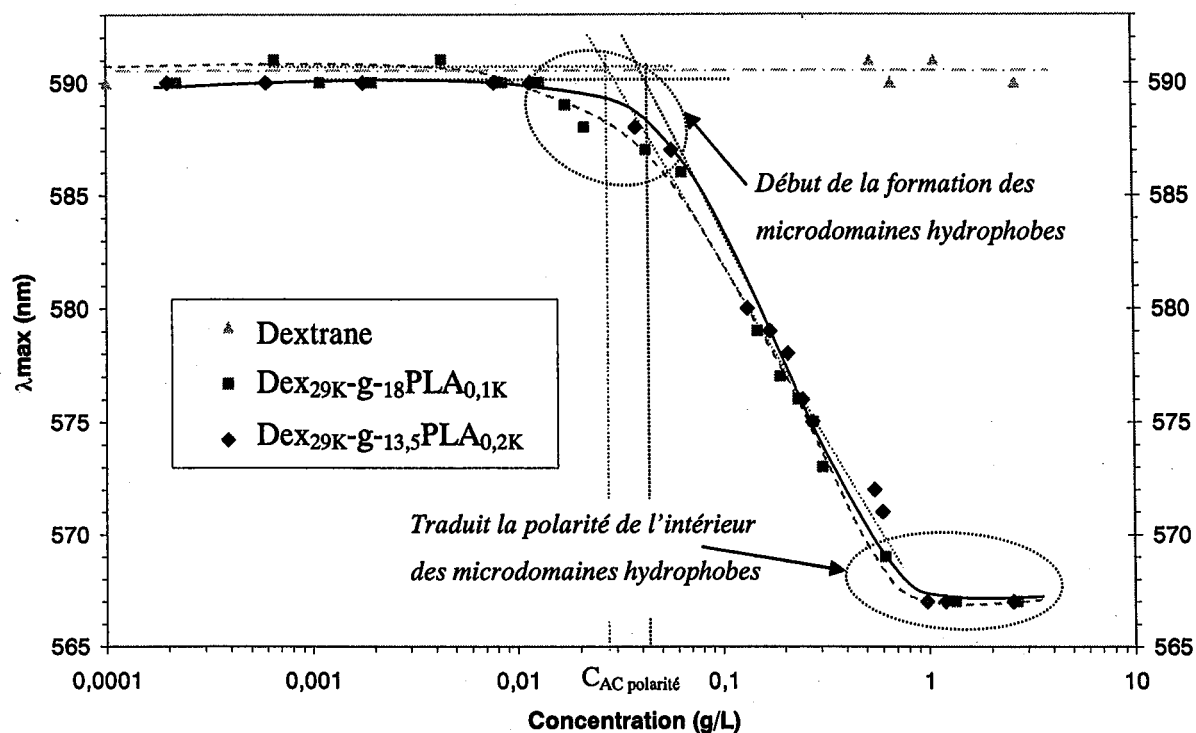


Figure III-12 : Variation de la longueur d'onde au maximum de fluorescence du spectre du DMAC dans les solutions aqueuses de copolymères dextrane-g-PLA « hydrosolubles » à 25°C. [DMAC] = $3,3 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

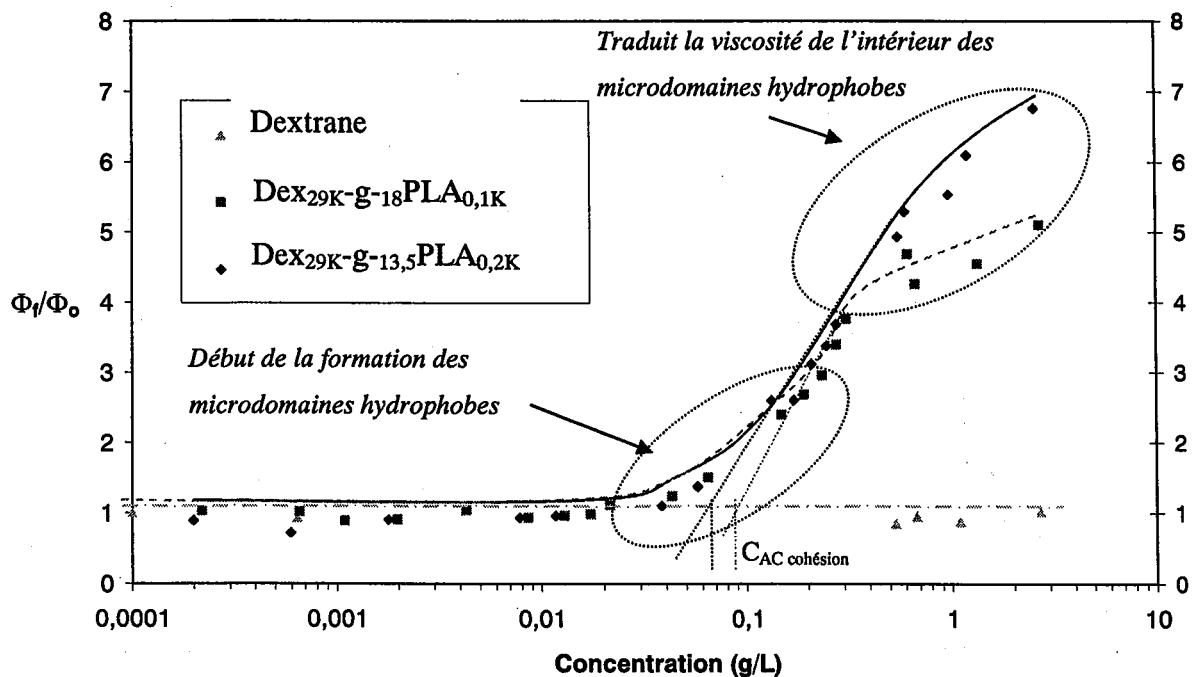


Figure III-13 : Variation du rendement quantique de fluorescence du spectre du DMAC dans les solutions aqueuses de copolymères dextrane-g-PLA « hydrosolubles » à 25°C. [DMAC] = $3,3 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

différence de comportement des deux sondes employées : le caractère hydrophobe de chaque sonde est hautement dépendant de sa propre structure chimique et influence ses propres interactions de la sonde avec les greffons hydrophobes des copolymères.

Copolymères	C _{AC} polarité selon		C _{AC} cohésion selon ϕ_f/ϕ_0	C _{crit} par tension superficielle
	I ₁ /I ₃	$\lambda_{\max}$		
Dex _{29K} -g ₋₁₈ PLA _{0,1K}	1,5 10 ⁻²	3 10 ⁻²	9 10 ⁻²	0,3
Dex _{29K} -g _{-13,5} PLA _{0,2K}	2 10 ⁻²	4 10 ⁻²	7 10 ⁻²	0,55

Tableau III-1 : Comparaison des concentrations d'agrégation critique (C_{AC}) en g /L déterminées (I₁/I₃) (cas du pyrène), $\lambda_{\max}$ ou (ϕ_f/ϕ_0) (cas du rotor DMAC).

Les paliers obtenus aux plus fortes concentrations en copolymères permettent d'évaluer la polarité du microenvironnement de la sonde employée. Pour chacune des sondes, les valeurs de ces paliers sont identiques pour les deux copolymères étudiés. Dans le cas du pyrène incorporé au coeur des microdomaines hydrophobes, la valeur observée au palier [(I₁/I₃) = 1,57; E_T (paramètre de polarité de Reichardt [34]) $\approx$ 40 kcal/mol] est proche de celle d'un milieu acétonique [(I₁/I₃) = 1,59; E_T $\approx$ 42 kcal/mol], et légèrement supérieure à celle correspondant à un milieu ester [(I₁/I₃) = 1,37 ; E_T $\approx$ 38 kcal/mol pour l'acétate d'éthyle] [28, 29].

La valeur minimale de $\lambda_{\max}$ (égale à 567 nm, E_T $\approx$ 40 kcal/mol) obtenue au palier avec le rotor DMAC est quant à elle un peu plus élevée que celle observée lorsque la sonde se trouve en milieu ester (acétate d'éthyle : λ = 562 nm, acétate de méthyle : λ = 565 nm) [33], ce qui est en accord avec le cas du pyrène.

II.3.2.2. Etudes de la cohésion (cas du rotor DMAC)

A partir de l'évolution du rendement quantique de fluorescence (ϕ_f/ϕ_0), il est également possible de déterminer une concentration d'agrégation critique que nous appellerons C_{AC}cohésion. Les valeurs obtenues sont là encore très proches pour les deux copolymères étudiés ; néanmoins, elles sont supérieures à celles précédemment obtenues (C_{AC}polarité, Tableau III-1). Notons que des différences encore plus accentuées entre C_{AC}polarité et C_{AC}cohésion avaient déjà été observées dans le cas de pectines modifiées par des groupements alkyle [19].

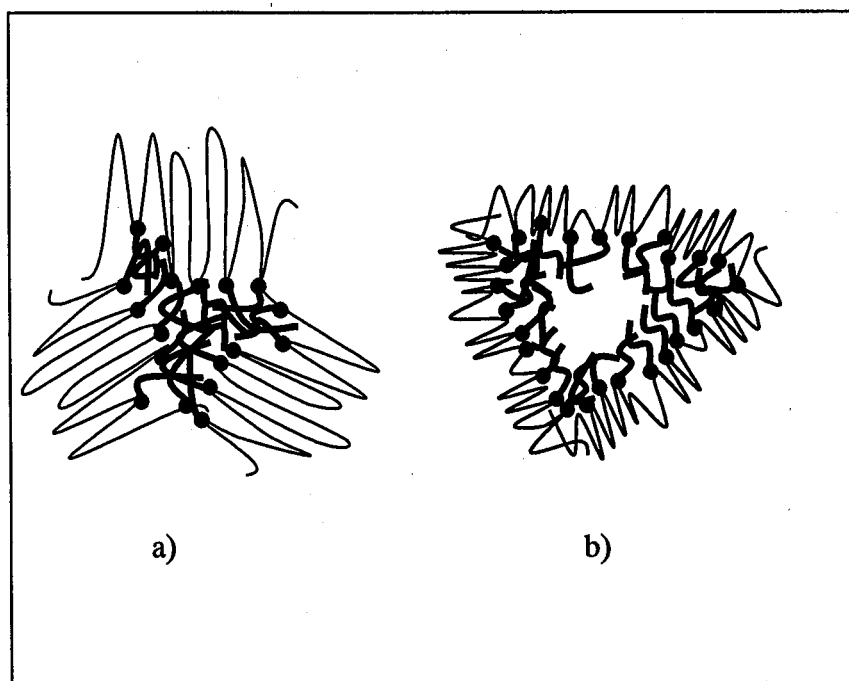


Figure III-14 : Représentation possible des microdomaines hydrophobes formés avec les copolymères « hydrosolubles » en milieu aqueux a) $\text{Dex}_{29K}\text{-g-}_{13,5}\text{PLA}_{0,2K}$ et b) $\text{Dex}_{29K}\text{-g-}_{18}\text{PLA}_{0,1K}$.

Pour expliquer cette différence entre les valeurs de $C_{\text{Accohésion}}$ et $C_{\text{Apolarité}}$, l'hypothèse formulée est la suivante : avant d'être réellement incorporée dans les microdomaines hydrophobes, la sonde DMAC peut être localisée à proximité des greffons polylactide qui ne sont pas encore regroupés en microdomaines hydrophobes. Lorsqu'ils sont situés sur une même chaîne de dextrane, ces greffons peuvent interagir entre eux par interactions intramoléculaires et contribuer à diminuer la polarité du microenvironnement de la sonde employée. Les paramètres de polarité (I_1/I_3) et λ_{max} seraient donc influencés par les greffons PLA, avant la formation réelle des microdomaines hydrophobes. Cet effet serait d'ailleurs plus prononcé dans le cas du pyrène que du DMAC. Le pyrène, plus hydrophobe que le DMAC, pénètre effectivement davantage les zones d'associations intramoléculaires. En revanche, l'évolution du rendement quantique de fluorescence (cas du DMAC) qui est le reflet de la compacité du microenvironnement, peut donc être considéré comme le seul paramètre réellement lié à la formation des microdomaines hydrophobes (Figure III-13).

Remarquons qu'aux concentrations maximales utilisées, le palier de viscosité caractéristique de la cohésion des microdomaines hydrophobes n'est parfois pas atteint (Figure III-13). En raison des problèmes de solubilité du copolymère Dex_{29K}-g-_{13,5}PLA_{0,2K}, nous n'avons pas pu réaliser des solutions de concentrations supérieures. Cependant, il semble que les microdomaines hydrophobes formés par ce copolymère soient plus compacts que ceux formés par le copolymère Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{0,1K}. Une explication, qui rejoint l'hypothèse formulée lors de l'étude par tensiométrie, pourrait être la suivante : diminuer le nombre de greffons PLA conduit à une plus grande flexibilité de la chaîne de dextrane qui lui permet de se replier en formant de grandes boucles et des microdomaines de plus petites dimensions (Figure III-14). Il est également possible que cet écart entre les paliers de viscosité traduise différents types d'organisation selon les copolymères [35]. Afin de déterminer la structure de ces organisations il faudrait réaliser d'autres analyses physico-chimiques.

II.3.2.3. Conclusions

Par spectroscopie de fluorescence, nous avons donc pu mettre en évidence la formation de microdomaines hydrophobes pour les copolymères dextrane-g-PLA « hydrosolubles ». La concentration ($C_{\text{Accohésion}}$) à partir de laquelle ces microdomaines commencent réellement à se former est comprise entre 0,07 et 0,1 g /L a été démontrée par spectroscopie de fluorescence. Elle est bien inférieure à la concentration critique déterminée en tension superficielle (comprise entre 0,3 et 0,6 g/l).

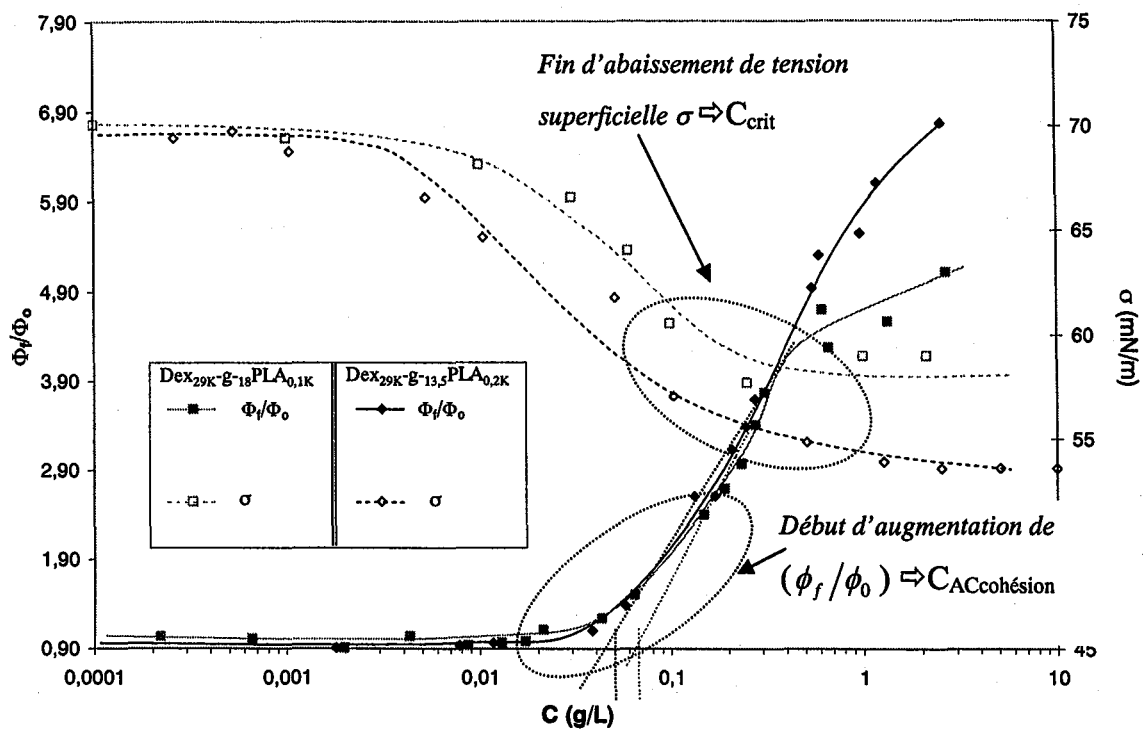


Figure III-15 : Comparaison de l'évolution de (ϕ_f/ϕ_0) (cas du DMAC) et de la tension superficielle pour les copolymères hydrosolubles Dex_{29K}-g-13.5PLA_{0.2K} et Dex_{29K}-g-18PLA_{0.1K} à 25°C.

Afin de mieux comparer les informations données par les deux méthodes, nous avons représenté les variations du paramètre (ϕ_f/ϕ_0) (cas du DMAC) qui est le seul paramètre réellement lié à la formation des microdomaines hydrophobes, et de la tension superficielle eau/air, en fonction de la concentration en copolymère dans la phase aqueuse (Figure III-15). On peut alors observer que la zone où commence l'augmentation de (ϕ_f/ϕ_0) , caractéristique de la formation des microdomaines hydrophobes, précède de peu celle où s'achève l'abaissement de la tension superficielle, caractéristique de la concentration critique. Cet écart, déjà observé pour d'autres copolymères [32], peut provenir des échelles d'observation caractéristiques des paramètres physico-chimiques considérés [σ et (ϕ_f/ϕ_0)]. Ainsi, les mesures de fluorescence nous donnent des informations sur le microenvironnement de la sonde et permettent donc d'observer la formation des microdomaines hydrophobes au niveau local. Au contraire, les informations apportées par la tensiométrie sont plutôt d'ordre « macroscopique ». Il semble ainsi logique que l'apparition des microdomaines hydrophobes, observés par spectroscopie de fluorescence, ait lieu à de plus faibles concentrations que lorsque l'observation se fait par tensiométrie.

Par ailleurs, en tensiométrie, il y a une compétition entre les phénomènes en volume et ceux aux interfaces : les groupements hydrophobes peuvent soit s'associer en solution et donner naissance à des microdomaines hydrophobes ou soit avoir une affinité pour la surface. La concentration critique déterminée par tensiométrie est donc très différente avec celle obtenue par spectroscopie de fluorescence, où seuls les phénomènes en volumes interviennent.

II.4. Etudes des copolymères dextrane-g-PLA « organosolubles »

Des techniques de fluorescence analogues à celles utilisées pour l'étude du comportement des copolymères amphiphiles en milieu aqueux, peuvent être employées pour étudier et caractériser la formation de micelles inverses. Cependant, si ces méthodes ont été employées dans le cas des surfactifs classiques ioniques, elles n'ont été que peu appliquées aux tensioactifs moléculaires non-ioniques et encore moins aux copolymères amphiphiles [36]. Des études récentes concernent néanmoins des tensioactifs à base de poly(oxyde d'éthylène) [21-23, 36, 37]. Les techniques utilisées sont de deux types :

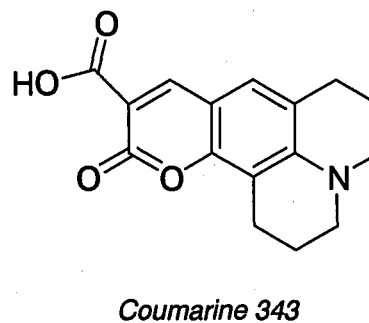
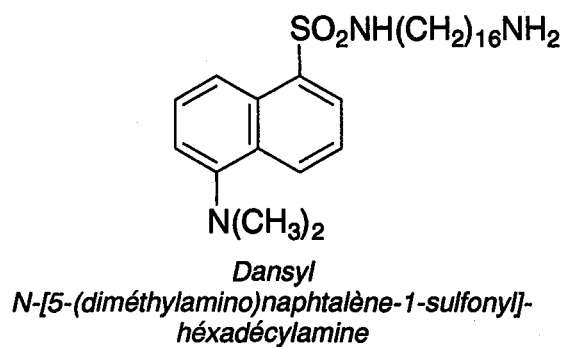
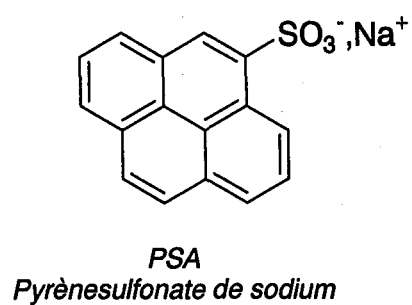
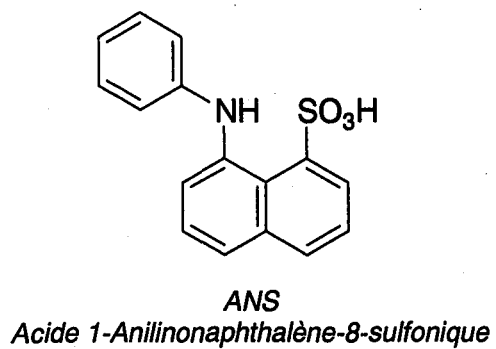
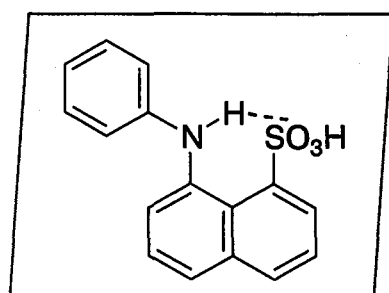
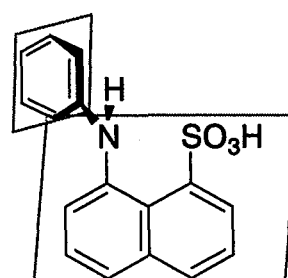


Figure III-16 : Sondes de fluorescence couramment employées pour l'étude des surfactifs en milieu apolaire.



I = Forme coplanaire



II = Forme non-plane

Figure III-17 : Représentation schématique de deux conformations possibles de l'ANS.

- des études complexes de spectroscopie de fluorescence résolue dans le temps sont effectuées sur des systèmes tensioactif/huile/eau. Elles nécessitent l'emploi d'un témoin et d'un quencher de fluorescence. La sonde la plus employée est le tris(2,2'-bipyridyl)ruthénium= $[\text{Ru}(\text{by})_3^{2+}]$, généralement associée à des quenchers comme le méthylviologène= $[\text{MV}^{2+}]$ [22, 37], le 9-méthylanthracène...
- des systèmes tensioactif/eau/huile ont également été étudiés à l'équilibre thermodynamique. Diverses sondes plus ou moins polaires, dont certaines caractéristiques évoluent avec le microenvironnement, peuvent être utilisées [21, 23, 36]. Les plus courantes sont présentées dans la Figure III-16. Le comportement de la sonde, en fonction de la quantité d'eau dans le milieu, met alors en évidence la formation de micelles inverses.

Dans notre cas, nous désirions étudier le comportement des copolymères dextrane-g-poly lactide « organosolubles » aux interfaces eau/huile, et plus particulièrement leur faculté d'organisation dans un milieu apolaire à faible teneur en eau. Pour cela, nous avons décidé d'employer les méthodes de fluorescence les plus simples, c'est-à-dire celles en régime stationnaire. Parmi les témoins de fluorescence existants, notre choix s'est porté sur l'ANS (Acide 1-anilino-naphthalène-8-sulfonique) en raison de sa sensibilité aux changements de la polarité de son microenvironnement.

II.4.1. Généralités sur le spectre d'émission de fluorescence de l'ANS.

L'ANS est une sonde de fluorescence dont le spectre d'émission dépend fortement de la polarité et de la viscosité de son microenvironnement [17]. L'ANS peut exister dans deux conformations [23, 38]: l'une où le cycle benzénique et le naphthalène sont coplanaires et l'autre où ils ne le sont pas (Figure III-17). Le spectre d'émission de l'ANS présente une large bande, laquelle peut être déconvoluée en deux bandes, chacune correspondant à l'une des deux conformations (Figure III-18). Ces deux bandes se recouvrent partiellement et leur importance relative varie selon la polarité et la viscosité du microenvironnement.

D'une part, l'accroissement de la polarité du milieu entraîne alors une perturbation des états d'excitation correspondant à chaque conformation de l'ANS, ce qui se traduit par une augmentation des longueurs d'ondes maximales (λ_1 et λ_2). D'autre part, les solvants polaires favorisent la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires entre les groupements NH et

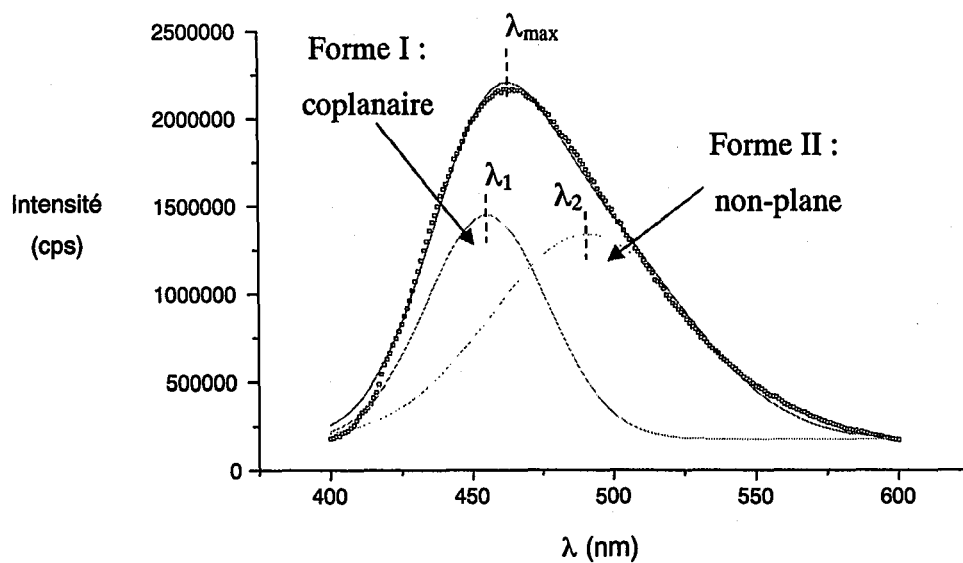


Figure III-18 : Spectre d'émission de fluorescence de l'ANS en milieu peu polaire. Bandes caractéristiques des deux conformations possibles de la molécule [23, 38].

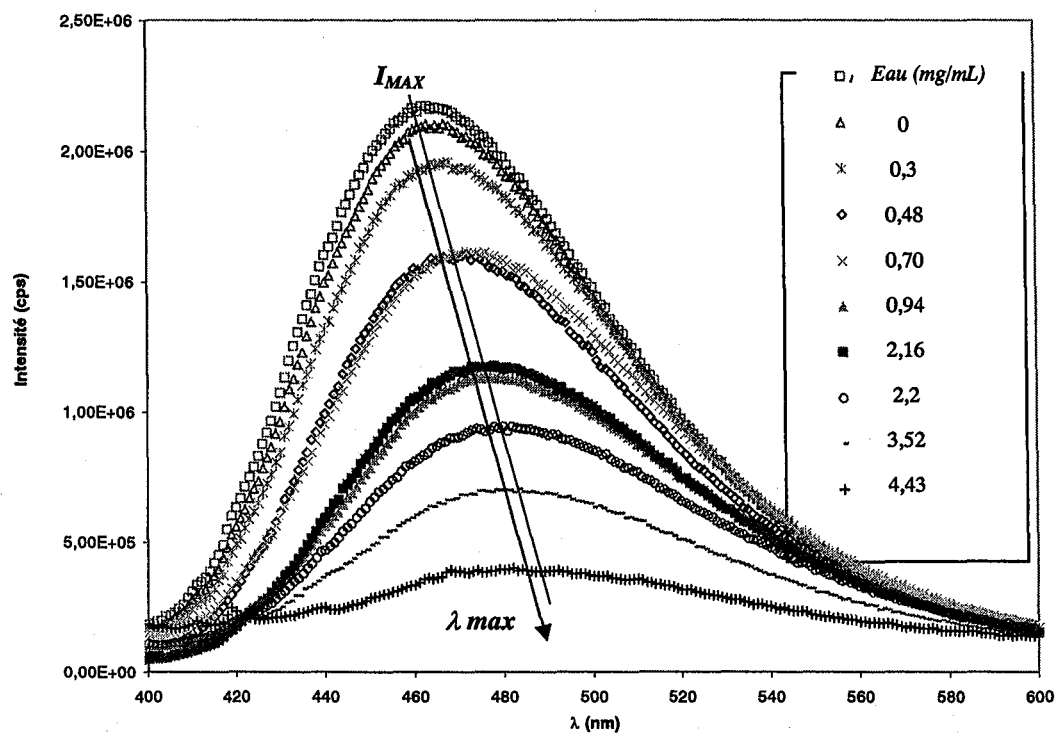


Figure III-19 : Spectres d'émission de fluorescence de l'ANS en fonction de la teneur en eau dans le système copolymère Dex_{29K}-g-PLA_{1,7K}/toluène/ eau, à 25°C.

[Copolymère] = 5 g/L et [ANS] = $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

SO₃H de l'ANS, ce qui augmente la prépondérance de la forme non coplanaire (II). Ces deux phénomènes expliquent l'augmentation de la longueur d'onde maximale (λ_{max}) et la diminution du rendement quantique de fluorescence avec la polarité du milieu. De plus, la flexibilité de la molécule et divers processus de désactivation dans l'eau induisent une baisse de rendement quantique de fluorescence des deux bandes ce qui accroît, l'abaissement du rendement quantique global. Néanmoins, la seconde bande diminue plus que la première ce qui se traduit par une augmentation du rapport R_f défini comme le rapport des intensités maximales de ces deux bandes (I_1/I_2). R_f est alors proche de 1 en milieu apolaire et sa valeur s'accroît avec la quantité d'eau dans le milieu.

Une augmentation de la viscosité du milieu accroît la rigidité de la molécule, ce qui favorise à la fois l'émission de fluorescence et la configuration coplanaire (I) (d'où l'augmentation de R_f).

II.4.2. Résultats

Nous avons effectué diverses séries d'expériences avec deux copolymères « organosolubles » (Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{1,7K} et Dex_{13K}-g-₂₇PLA_{2,5K}). De faibles quantités d'eau, en proportion croissante, sont ajoutées dans une solution de toluène contenant le copolymère à 5 g/L et de l'ANS en très faible quantité ($[ANS]=3 \cdot 10^{-6}$ mol/L). Nous avons alors suivi l'évolution du spectre d'émission de l'ANS en fonction de la quantité d'eau ajoutée, conformément aux expériences réalisées par Vasilescu et coll. [23]. A titre d'exemple, un certain nombre de spectres d'émission de fluorescence obtenus avec le copolymère Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{1,7K} sont présentés dans la Figure III-19. Pour chaque polymère et chaque solution (c'est-à-dire pour chaque teneur en eau), les valeurs de λ_{max} et de l'intensité (I_{max}) au maximum d'émission ont été relevées. Elles sont présentées en fonction de la teneur en eau dans la Figure III-20.

En fonction de la quantité d'eau introduite, il se produit d'une part, une augmentation de la longueur d'onde maximale, et d'autre part une diminution de l'intensité maximale de fluorescence. Pour chaque copolymère étudié, λ_{max} et I_{max} présentent un saut (respectivement une chute) aux mêmes teneurs en eau (entre 1 et 3 mg/mL pour Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{1,7K} et vers 4 mg/mL pour Dex_{13K}-g-₂₇PLA_{2,5K}). Des expériences parallèles ont été réalisées en ajoutant de faibles quantités d'eau à une solution d'ANS dans le toluène. Dans ce cas, aucune variation

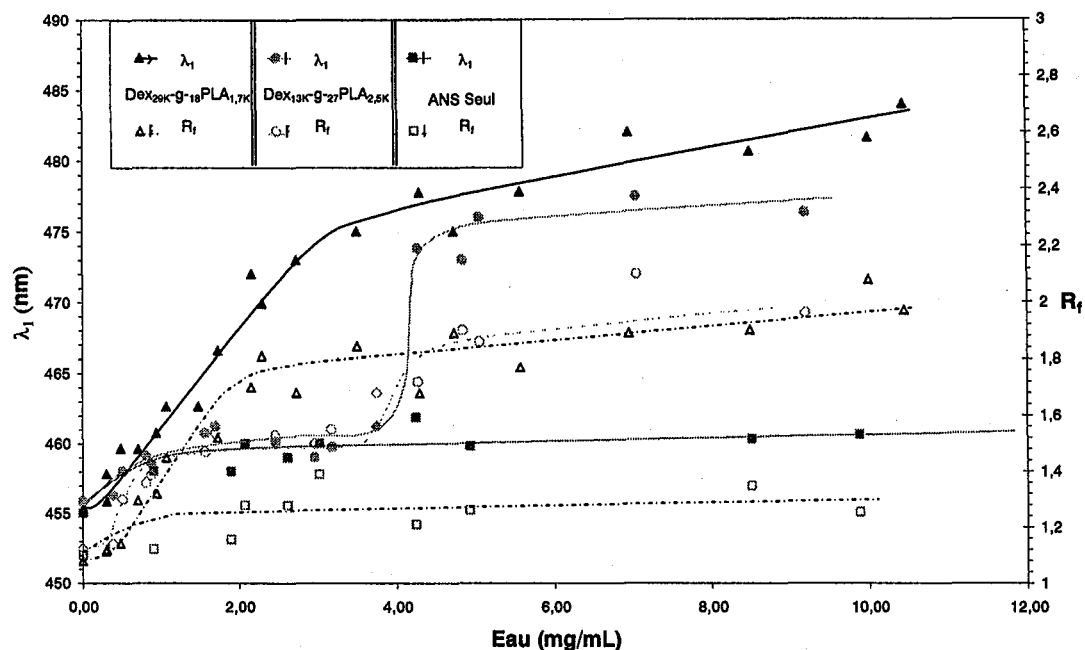


Figure III-21 : Evolution de λ_1 et R_x en fonction de la teneur en eau dans une solution de toluène (25°C). Cas des copolymères « organosolubles » Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{1,7K} et Dex_{13K}-g-₂₇PLA_{2,5K} et de l'ANS seul. [Copolymère] = 5 g/L et [ANS] = $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

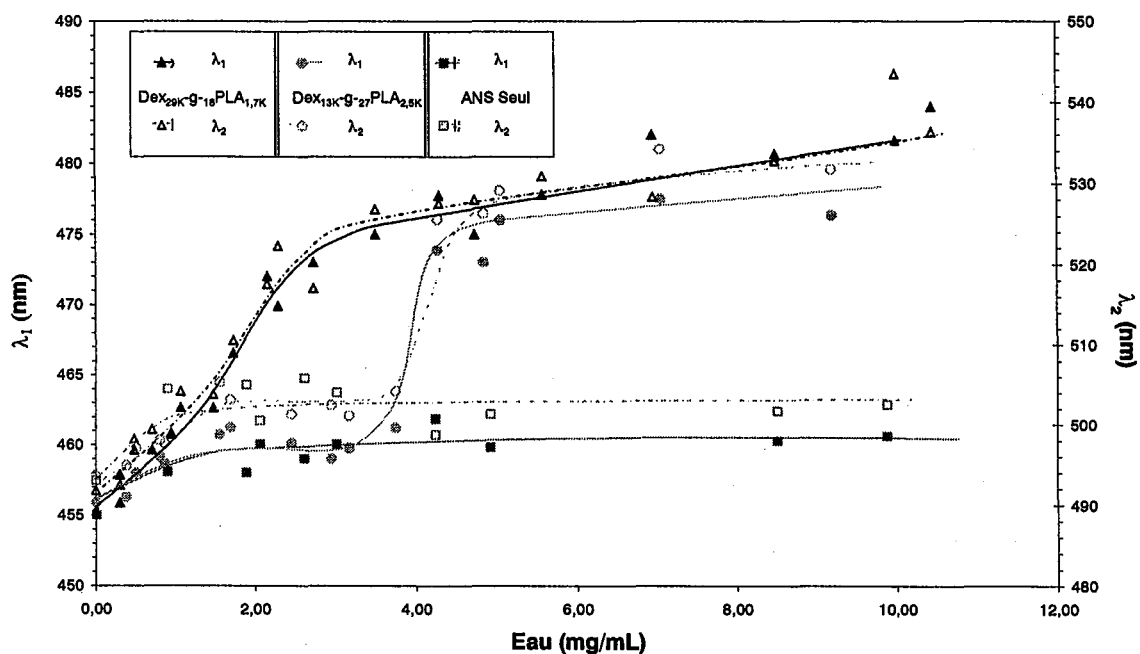


Figure III-22 : Evolution de λ_1 et λ_2 en fonction de la teneur en eau dans une solution de toluène (25°C). Cas des copolymères « organosolubles » Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{1,7K} et Dex_{13K}-g-₂₇PLA_{2,5K} et de l'ANS seul. [Copolymère] = 5 g/L et [ANS] = $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

notable des paramètres n'est observée, ce qui prouve que les variations obtenues dans le cas des copolymères ne sont pas dues à l'eau ajoutée, mais bien à des phénomènes d'organisation de ces copolymères en solution organique.

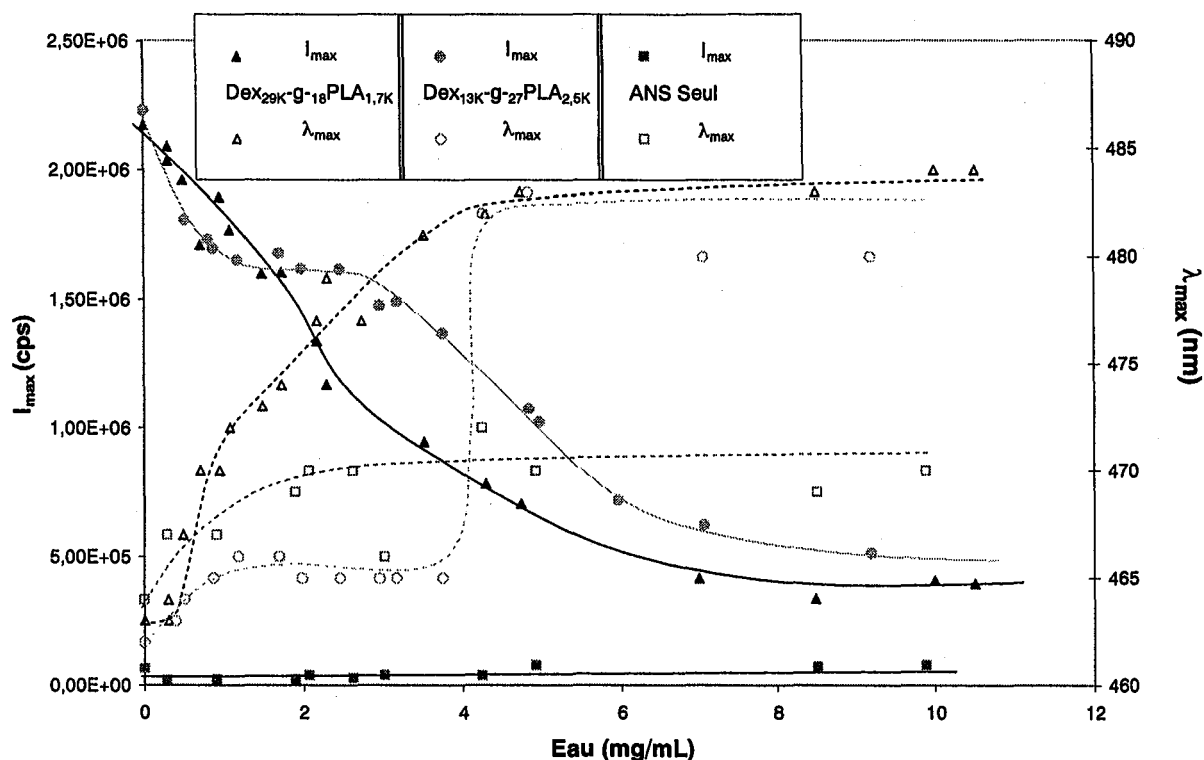


Figure III-20 : Evolution de λ_{max} et I_{max} en fonction de la teneur en eau dans une solution de toluène (25°C). Cas des copolymères « organosolubles » Dex_{29K}-g-18PLA_{1,7K} et Dex_{13K}-g-27PLA_{2,5K} et de l'ANS seul. [Copolymère] = 5 g/L et [ANS] = $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

Afin de mieux étudier ces évolutions, nous avons réalisé une déconvolution de chaque spectre d'émission en deux gaussiennes (chaque gaussienne représente une bande d'émission propre à chaque conformation (I) ou (II) de l'ANS). Nous avons ainsi pu déterminer pour chaque solution les valeurs de λ_1 et λ_2 , ainsi que le rapport de leurs intensités maximales ($R_f = I_1/I_2$). Les résultats obtenus pour chaque copolymère sont présentés sur les Figures II-21 et 22). Alors que les longueurs d'onde maximales (λ_1 et λ_2) et que le rapport R_f évoluent peu dans le cas de l'ANS employé seul, les valeurs de ces paramètres augmentent nettement pour les solutions de copolymères. Pour un copolymère donné, les valeurs de chaque paramètre varient brusquement pour une même quantité d'eau ajoutée à leur solution initiale toluénique. Les variations apparaissent entre 0 et 2 mg/mL d'eau pour le copolymère Dex_{29K}-g-18PLA_{1,7K} et 4 mg/mL pour le Dex_{13K}-g-27PLA_{2,5K}. A très faible teneur en eau, les spectres présentent

l'allure caractéristique du spectre de l'ANS en milieu peu polaire, et les intensités des deux bandes sont comparables ($R_f \approx 1$). Cependant, au fur et à mesure que la teneur en eau augmente, ces intensités diminuent progressivement mais comme I_2 diminue plus rapidement que I_1 , il se produit une augmentation progressive de R_f . Cette augmentation conjointe de λ_1 , λ_2 et du rapport R_f indique la présence d'un environnement de plus en plus polaire et visqueux au voisinage de la sonde. Ceci démontre la formation d'organisations que nous nommerons « agrégats inverses » (cœur dextrane-couronne PLA) pour chaque copolymère étudié, dès lors que la teneur en eau est suffisante. Ces organisations sont analogues aux micelles inverses obtenues avec des tensioactifs moléculaires en milieu organique.

Au delà d'une certaine quantité d'eau ajoutée au milieu, les paramètres (λ_1 , λ_2 , et R_f) n'augmentent quasiment plus, et leurs valeurs sont alors caractéristiques du milieu interne des « agrégats inverses ». Les valeurs obtenues sont les mêmes pour les deux copolymères étudiés mais sont bien inférieures à celles obtenues pour des Pluronic [23]. Il existe diverses raisons pour cela : les natures des blocs hydrophobes et hydrophiles de nos copolymères sont radicalement différentes de celles des Pluronic [23]. De plus, l'architecture greffée de nos copolymères peut induire une moindre compacité des « agrégats inverses », et par conséquent une moins grande viscosité de ces organisations par rapport à celles obtenues avec des copolymères à blocs.

II.4.3. Conclusions

Nous avons donc pu démontrer, grâce à la spectroscopie de fluorescence, la faculté qu'ont les copolymères dextrane-g-poly lactide « organosolubles » à s'organiser dans les systèmes eau/toluène et à générer des « agrégats inverses ». La quantité d'eau nécessaire à la création de telles organisations a pu être quantifiée pour chaque copolymère étudié.

De même que nous avons pu montrer par des études de tensiométrie interfaciale que les copolymères dextrane-g-PLA organosolubles s'organisent aux interfaces liquide organique/eau, nous avons démontré par fluorimétrie en présence d'ANS que l'addition d'eau à une solution de copolymères dans le toluène, provoque également leur organisation « en volume » sous forme de micelles inverses.

III. CONCLUSION - PERSPECTIVES

Après diverses études, nous avons pu établir que les copolymères Dex-g-PLA possédaient un caractère tensioactif plus ou moins marqué selon leur architecture.

Les copolymères solubles en milieu aqueux ont montré une faculté d'organisation en volume (formation de microdomaines hydrophobes) et une capacité à abaisser la tension superficielle pour des concentrations comprises entre 0,07 g/L et 0,1 g/L. Ces propriétés, même si elles ne sont pas aussi marquées que celles d'autres tensioactifs, sont toutefois notables et pourraient permettre de stabiliser des émulsions (notamment l'émulsion eau/dichlorométhane). Dans le chapitre suivant, nous rapportons les résultats d'expériences menées pour vérifier si ces copolymères peuvent être employés comme tensioactifs dans la fabrication de nanoparticules par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant.

Quant aux copolymères Dex-g-PLA « organosolubles », ils permettent d'abaisser la tension interfaciale dichlorométhane/eau. Ils possèdent également la capacité de former des organisations inverses dans des systèmes eau/toluène, dès lors qu'une faible quantité d'eau est introduite. Ces facultés d'organisation pourraient sans doute, elles aussi, être exploitées pour des applications biomédicales mais le temps nous a manqué pour le vérifier.

IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rouzes C., Durand A., Léonard M. and Dellacherie E.,
Surface activity and emulsification properties of hydrophobically modified dextrans.
J. Colloid Interf. Sci., 2002. **253**: p. 217-223
2. Zhang J., Pelton R. and Wagberg L.,
Aqueous biphasic formation by mixtures of dextran and hydrophobically modified dextran.
Colloid Polym. Sci., 1998. **276**: p. 476-482
3. Miralles-Houzelle M.-C., Hubert P. and Dellacherie E.,
Hydrophobic alkyl chains-pectin conjugates. Comparative study of some physicochemical properties in relation to covalent coupling vs ionic association.
Langmuir, 2001. **17**: p. 1384-1391
4. Pelletier S., Hubert P., Payan E., Marchal P., Choplin L. and Dellacherie E.,
Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair : rheological properties.
J. Biomed. Mater. Res., 2001. **54**: p. 102-108
5. Riley T., Stolnik S., Heald C. R., Xiong C. D., Garnett M. C., Illum L., Davis S. S., Purkiss S. C., Barlow R. J. and Gellert P. R.,
Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) block copolymers as drug delivery vehicles.
Langmuir, 2001. **17**: p. 3168-3174
6. Rosen M. J.,
Chapter 5. Reduction of surface and interfacial tension by surfactants,
in *Surfactants and Interfacial Phenomena.*
1989, Wiley & sons: New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. p. 207-239
7. Rosen M. J.,
The relationship of structure to properties in surfactants. IV. Effectiveness in surface or Interfacial Tension Reduction.
J. Colloid Interf. Sci., 1976. **56**: p. 320-327
8. Chang Y. H., Lee Y. D., Karlsson O. J. and Sundberg D. C.,
Surfactant characteristics of random block polyelectrolyte polyester emulsifier (SMTAPE) in aqueous solution and on polystyrene latex particles.
Polymer, 2000. **41**: p. 6741-6747
9. Paterson I. F., Chowdhry B. Z. and Leharne S. A.,
An investigation of adsorption at the air-water and soil-water interfaces for non-micelling ethylene oxide-propylene oxide surfactants.
Chemosphere, 2000. **40**: p. 1399-1405
10. Wollenweber C., Makievski A. V., Miller R. and Daniels R.,
Adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect on emulsion stability.
J. Colloid Interf. Sci., 2000. **117**: p. 419-426
11. Babak V. G., Lukina I. G., Vikhoreva G. A., Desbieres J. and Rinaudo M.,
Interfacial properties of dynamic association between chitin derivatives and surfactants.
Colloid Surface. A. Physicochem. Eng. Aspects, 1999. **147**: p. 139-148
12. Zhang T. and Marchant R. E.,
Novel polysaccharide surfactants : the effect of hydrophobic and hydrophilic chain length on the surface active properties.
J. Colloid Interf. Sci., 1996. **177**: p. 419-426

13. Babak V. G., Skotnikova E. A., Lukina I. G., Pelletier S., Hubert P. and Dellacherie E.,
Hydrophobically associating alginate derivatives : surface tension properties of their mixed aqueous solutions with oppositely charged surfactants.
J. Colloid Interf. Sci., 2000. **225**: p. 505-510
14. Reinhart T. and Bauer K. H.,
Untersuchungen zum hämolyse- und solubilisationsverhalten einiger nichtionischer polymerer tensidklassen.
Pharmazie, 1995. **50**: p. 403-407
15. Rouzes C.,
Nanosphères à coeur poly(acide lactique) et couronne de dextrane : élaboration, propriétés et applications biomédicales. 2001, *doctorat de l' INPL*: Nancy
16. Millet F., Nedyalkov M., Renard B., Perrin P., Lafuma F. and Benattar J.-J.,
Adsorption of hydrophobically modified poly(acrylic acid) sodium salt at air/water interface by combined surface tension and X-ray reflectivity measurements.
Langmuir, 1999. **15**: p. 2112-2119
17. Winnik F. M. and Regismond S. T. A.,
Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants with polymers.
Colloid Surface. A. Physicochem. Eng. Aspect, 1996. **118**: p. 1-39
18. Evertsson H. and Nilson S.,
Microstructures formed in aqueous solutions of a hydrophobically modified nonionic cellulose derivative and sodium dodecyl sulfate : a fluorescence probe investigation.
Carbohydr. Polym., 1999. **40**: p. 293-298
19. Fischer A., Houzelle M.-C., Hubert P., Axelos M. A. V., Geoffroy-Chapotot C.-G., Carré M.-C. and Viriot M.-L.,
Detection of intramolecular association in hydrophobically modified pectin derivatives using fluorescent probes.
Langmuir, 1998. **14**: p. 4482-4488
20. Fournier C., Léonard M., Le Coq-Leonard I. and Dellacherie E.,
Coating polystyrene particles by adsorption of hydrophobically modified dextran.
Langmuir, 1995. **11**: p. 2344-2347
21. Pant D. and Levinher N. E.,
Polar solvation dynamics in nonionic reverse micelles and model polymer solutions.
Langmuir, 2000. **16**: p. 10123-10130
22. Vasilescu M. and Caragheorgheopol A.,
Structure and dynamics of nonionic polyoxyethylenic reverse micelles by time-resolved fluorescence quenching.
Langmuir, 1995. **11**: p. 2893-2398
23. Vasilescu M., Caragheorgheopol A., Caldararu H. and Bandula R.,
Micropolarity and order in the reverse micelles of L62 and L64 pluronic copolymers, as studied by molecular probe techniques.
J. Phys. Chem. B, 1998. **102**: p. 7740-7751
24. Morishima Y.,
Photophysics in amphiphilic polyelectrolyte systems.
Prog. Polym. Sci., 1990. **15**: p. 949-997
25. Paczkowski J.,
Cinnamates. 5. Light-sensitive polycinnamates with internal charge transfert. The study of the local dielectric constant and viscosity.
Macromolecules, 1991. **24**: p. 2171-2177

26. Sinquin A., Hubert P. and Dellacherie E.,
Amphiphilic derivatives of alginate : evidence for inter- and intermolecular hydrophobic associations in aqueous solution.
Langmuir, 1993. **9**: p. 3334-3337
27. Kalyanasundaram K. and Thomas J. K.,
Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in the studies of micellar systems.
J. Am. Chem. Soc., 1977. **99**: p. 2039-2044
28. Karpovich D. S. and Blanchard G. J.,
Relating the polarity-dependent fluorescence response of pyrene to vibronic coupling. Achieving a fundamental understanding of the pyrene polarity scale.
J. Phys. Chem., 1995. **99**: p. 3951-3958
29. Damas C., Adibnejad M., Benjelloun A., Brembilla A., Carré M.-C., Viriot M.-L. and Lochon P.,
Fluorescent probes for detection of amphiphilic polymer hydrophobic microdomains : a comparative study between pyrene and molecular rotors.
Polymer, 1997. **37**: p. 364-371
30. Kuo P.-L. and Un M.-N.,
Functional polymers for colloidal applications. IV. Aggregate formation of lipophile-grafted water-soluble copolymers in aqueous solutions.
J. Appl. Polym. Sci., 1993. **48**: p. 1571-1578
31. Anthony O. and Zana R.,
Fluorescence investigation of the binding of pyrene to hydrophobic microdomains in aqueous solutions of polysoaps.
Macromolecules, 1994. **27**: p. 3885-3891
32. Sinquin A., Houzelle M.-C., Hubert P., Choplin L., Viriot M.-L. and Dellacherie E.,
Amphiphilic derivatives of propylene glycol alginate : a revisit of their physicochemical behavior in dilute aqueous solution.
Langmuir, 1996. **12**: p. 3779-3782
33. Benjelloun A., Brembilla A., Lochon P., Adibnejad M., Viriot M.-L. and Carré M.-C.,
Detection of hydrophobic microdomains in aqueous solutions of amphiphilic polymers using fluorescent molecular rotors.
Polymer, 1996. **37**: p. 879-883
34. Macquarrie D. J., Tavener S. J., Gray G. W., Heath P. A., Rafelt J. S., Saulzet S. I., Hardy J. J. E., Clark J. H., Sutra P., Brunel D., Renzo F. and Fajula F.,
The use of Reichardt's dye as an indicator of surface polarity.
New J. Chem., 1999. **23**: p. 725-731
35. Frochot C., Muller C., Brembilla A., Carré M.-C., Lochon P. and Viriot M.-L.,
Fluorescent probes for detection of amphiphilic polymer hydrophobic microdomains : a comparative study between pyrene and molecular rotors.
Int. J. Polym. Anal. Charact., 2000. **6**: p. 109-122
36. Vasilescu M., Caragheorgheopol A. and Caldararu H.,
Aggregation numbers and microstructure characterization of self-assembled aggregates of poly(ethylene oxide) surfactants and related block-copolymers, studied by spectroscopic methods.
Adv. Colloid Interface Sci., 2001. **89-90**: p. 169-194
37. Almgren M., Van Stam J., Swarup S. and Löfroth J.-E.,
Structure and transport in the microemulsion phase of the system triton X-100 -toluene -water.
Langmuir, 1986. **2**: p. 432-438

38. Penzer G. R.,
1-Anilinonaphthalene-8-sulphonate. The dependence of emission spectra on molecular conformation studied by fluorescence and proton-magnetic resonance.
Eur. J. Biochem., 1972. **25**: p. 218-228

Chapitre II :

Potentiel des dex-g-PLA dans la formation de nanosphères

Chapitre II : Potentiel des dex-g-PLA dans la formation de nanosphères

I. LA VECTORISATION DES MEDICAMENTS	172
I.1. Les différents types de vecteurs	173
I.2. Intérêts de la vectorisation	174
I.3. Processus de libération et de dégradation	175
II. PROCEDES DE FABRICATION DES NANOSPHERES	176
II.1. Nature des polymères utilisés	176
II.2. Réticulation de macromolécules naturelles amphiphiles.....	176
II.3. Polymérisation de monomères.....	177
II.4. Précipitation de polymères synthétiques.	177
II.4.1. Emulsion /Evaporation de solvant	178
II.4.2. Nanoprécipitation (déplacement de solvant)	178
II.4.3. « Salting-out »	179
II.4.4. Conclusions	179
III. LES NANOPARTICULES DANS L'ADMINISTRATION INTRA VEINEUSE.....	179
III.1. Devenir « <i>in vivo</i> »	180
III.2. Processus de phagocytose	180
III.3. Particules furtives	180
IV. OBJECTIFS DE NOTRE ETUDE	182
IV.1. Intérêt de l'utilisation du dextrane à la place des POE.....	182
IV.2. Intérêts respectifs des recouvrements par du dextrane et du POE	183
IV.3. Taille des particules	185
V. RESULTATS OBTENUS AVEC LES COPOLYMERES DEX-G-PLA HYDROSOLUBLES	185
V.1. Influence des conditions opératoires sur la taille des nanosphères	186
V.1.1. Influence du ratio R.....	187
V.1.2. Influence de la concentration en copolymère dans la phase aqueuse.....	188
V.2. Propriétés de surface des nanosphères	188
V.2.1. Taux de dextrane en surface	188
V.2.2. Charge de surface et épaisseur du recouvrement (Δ_{PZ})	189
V.2.2.1. Notion de potentiel zéta (ζ)	189
V.2.2.2. Evolution du potentiel zéta (ζ)	190
V.2.2.3. Epaisseur de la couche de dextrane (Δ_{PZ})/Densité du recouvrement (d).....	190
VI. CONCLUSIONS	191
VII. BIBLIOGRAPHIE	192

CHAPITRE II : POTENTIEL DES DEX-G-PLA DANS LA FORMATION DE NANOSPHERES

Le concept de vectorisation des médicaments via des systèmes de libération contrôlée date déjà d'une trentaine d'années. Les premières applications furent d'abord réalisées avec des liposomes, puis le domaine des vecteurs médicamenteux s'est progressivement étendu à d'autres systèmes particuliers, notamment macromoléculaires [1]. La recherche est très active dans ce domaine si bien qu'une large variété de vecteurs est actuellement proposée dans la littérature. Elle vise d'une part à contrôler la libération dans le corps humain de l'agent thérapeutique encapsulé, et d'autre part, dans le cas des vecteurs à administrer par voie intraveineuse, à réduire l'élimination prématurée des particules injectées par le système des phagocytes mononucléés (MPS) [2].

Comme les copolymères Dex-g-PLA possèdent un certain pouvoir tensioactif, l'objet de ce chapitre est de décrire les potentialités de ces copolymères dans la fabrication de nanoparticules via le procédé « d'émulsion/évaporation de solvant ». En effet, comme nous le verrons plus loin, ce procédé nécessite dans une première étape, la formation d'une émulsion, laquelle pourra alors être stabilisée par nos copolymères. Après une présentation rapide du concept de vectorisation et de son application aux nanoparticules, nous expliciterons les différentes techniques de préparation de ces vecteurs et l'intérêt de leur recouvrement par une surface hydrophile, en particulier par le dextrane. Nous décrirons alors les résultats des essais préliminaires que nous avons réalisés à l'aide des différents copolymères.

I. LA VECTORISATION DES MEDICAMENTS

La vectorisation consiste à transporter en quantité suffisante le principe actif, à l'aide d'une matrice inactive d'un point de vue thérapeutique, vers la cible à atteindre. Cette vectorisation permet d'une part d'éviter l'injection directe du médicament dans le corps humain, et d'autre part d'augmenter la biodisponibilité du dit principe actif.

I.1. Les différents types de vecteurs

Les vecteurs d'agent thérapeutique peuvent revêtir des formes très différentes selon la nature de la macromolécule utilisée pour la vectorisation et la mise en forme effectuée [3]. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux systèmes particuliers insolubles : les hydrogels, les micro- et nanoparticules, les liposomes et les micelles macromoléculaires. Compte-tenu du foisonnement d'articles dans ce domaine, nous nous limiterons aux exemples les plus significatifs.

- Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels de polymères hydrosolubles, obtenus soit par réticulation physique (*par exemple, gélification de pectines ou d'alginates en présence de cations divalents [4, 5] ou auto-assemblage par des interactions intermoléculaires d'alginates hydrophobisés par des chaînes alkyle [6]*), soit par réticulation chimique [7-11]. Selon leur formulation, les particules obtenues présentent des tailles millimétriques ou micrométriques. Une de leurs qualités essentielles est leur sensibilité à l'environnement qui se traduit par un gonflement en présence d'eau. Ce comportement peut alors être exploité pour contrôler la libération de principe actif. Les hydrogels à base de polysaccharides sont des systèmes particulièrement adaptés pour l'encapsulation de macromolécules d'intérêt biologique, telles que les peptides, les protéines [12-14] ou encore les oligonucléotides.
- Les micelles macromoléculaires sont constituées par l'association de copolymères à blocs amphiphiles en milieu aqueux. Les copolymères amphiphiles les plus utilisés sont à base de poly(oxyde d'éthylène) (POE). Ces systèmes permettent la solubilisation et la stabilisation de principes actifs hydrophobes [15, 16].
- Les liposomes sont des vésicules constituées d'une bicouche de phospholipides qui délimite une cavité centrale contenant une phase aqueuse. Selon la nature hydrophile ou hydrophobe de la molécule thérapeutique, elle se place soit dans la cavité aqueuse, soit dans la double paroi lipophile. Les liposomes possèdent une bonne biocompatibilité et sont susceptibles de constituer des systèmes à libération contrôlée. Cependant, ces vésicules sont instables chimiquement (oxydation et hydrolyse des phospholipides) et physiquement (agrégation, fusion, perte du

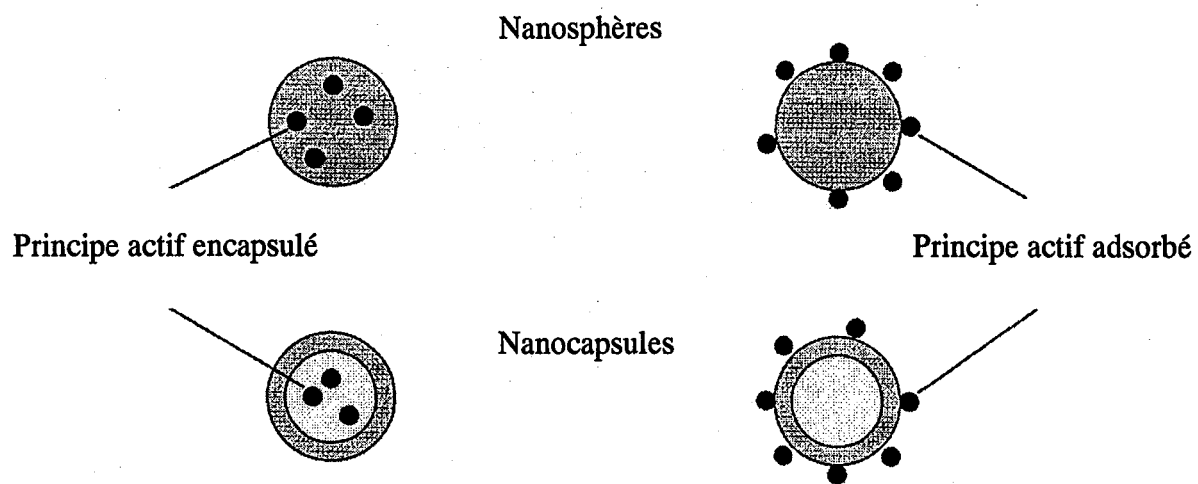


Figure III-23 : Les différentes formes de vecteurs particuliers

contenu). C'est pourquoi, elles sont parfois recouvertes de poly(oxyde d'éthylène) [17], de polysaccharides [18] comme le dextrane [19] ou le chitosane [20].

- Les émulsions sèches [21, 22] sont des nanocapsules (de type réservoir), à structure sphérique dont la paroi est constituée de molécules tensioactives qui peuvent être des macromolécules amphiphiles comme des protéines ou des polysaccharides. Elles se présentent sous forme de poudre qu'il est possible de redisperser facilement dans l'eau, ce qui permet de reformer l'émulsion (huile/eau) dont elles résultent.
- Les micro- ou nanoparticules [3, 22-25] sont soit des sphères pleines, soit des capsules (Figure III-23). Les nanosphères sont des structures de type matriciel de forme sphérique. Les nanocapsules sont quant à elles des structures sphériques creuses avec des parois en polymère. Elles forment des réservoirs comportant généralement un cœur huileux. L'agent thérapeutique est soit incorporé à l'intérieur de la matrice macromoléculaire (ou du cœur huileux), soit adsorbé à la surface des particules grâce à des liaisons hydrophobes, électrostatiques ou covalentes, qu'il établit durant ou après la formation des particules.

I.2. Intérêts de la vectorisation

La vectorisation présente de nombreux avantages [1, 2, 26-28], parmi lesquels on trouve principalement :

- La protection du principe actif contre l'inactivation chimique, enzymatique ou immunologique. Ainsi, la biodisponibilité du médicament est améliorée. Ceci est particulièrement intéressant pour les principes actifs à faible durée de vie *in vivo*.
- Pour assurer l'efficacité thérapeutique d'un principe actif, il est souvent nécessaire d'injecter une quantité importante de médicament et/ou de répéter l'injection, ce qui peut provoquer certains effets secondaires. La libération progressive d'un principe actif encapsulé dans une particule permet alors une diminution du nombre d'injections et améliore le confort du patient.

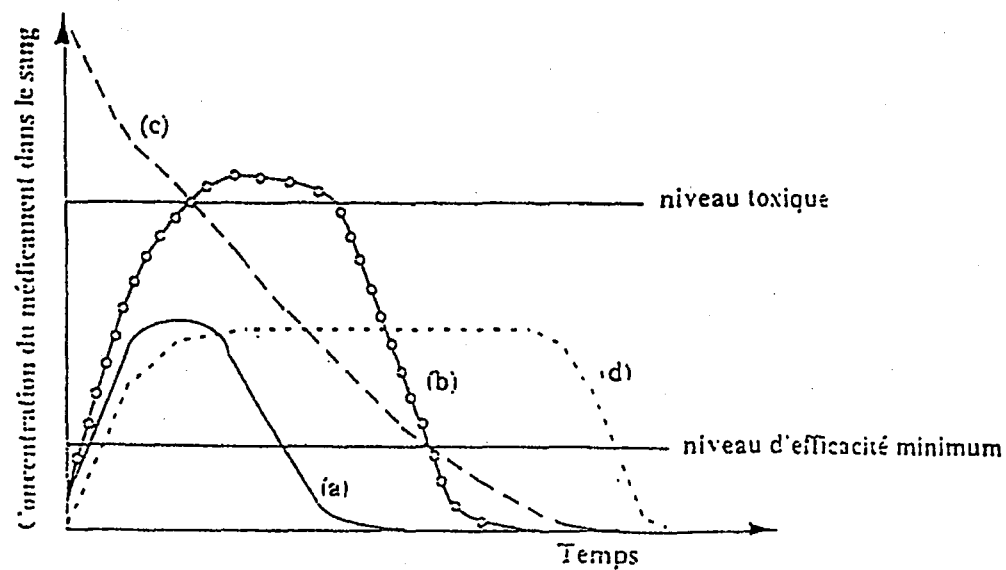


Figure III-24 : Evolution de la concentration du principe actif dans le sang en fonction du temps et du mode d'administration : (a) Dose standard orale ; (b) Overdose orale ; (c) Injection intraveineuse ; (d) Système à relargage contrôlé.

- La vectorisation permet l'obtention de profils pharmacologiques plus favorables : les fluctuations de concentration en principe actif peuvent être réduites en contrôlant la libération de celui-ci, et maintenue dans la zone d'efficacité thérapeutique (Figure III-24). En effet, la concentration du médicament doit dépasser le niveau minimum d'efficacité, tout en restant inférieure au niveau toxique. Le contrôle de la vitesse de libération du principe actif encapsulé dans un vecteur matriciel peut alors permettre d'assurer une concentration quasi-constante, comprise entre ces deux niveaux, pendant une durée bien supérieure à celle obtenue avec une dose standard.
- Si le vecteur est un système à libération ciblée, la concentration du principe actif au voisinage de certains sites d'action peut être accrue. Ceci permet à la fois de limiter la distribution du médicament entre les différents organes et de réduire les effets secondaires indésirables pour les organes sains. Pour cela, les particules doivent être conçues afin de ne libérer les médicaments que sous l'effet de certains facteurs précis (pH, température, présence de certaines enzymes, magnétisme), ou qu'au voisinage de certaines cellules spécifiques (anticorps [29] fixés à la surface de particules et reconnaissables uniquement par la cellule cible etc....). On attend alors que grâce à la sélectivité et la spécificité de ces particules envers la cible, l'efficacité et la biodisponibilité du principe actif soient augmentées.

I.3. Processus de libération et de dégradation

Les systèmes à libération contrôlée sont des entités qui doivent délivrer le principe actif à une vitesse déterminée et constante, pendant une longue durée. Il existe deux mécanismes fondamentaux de libération de principe actif qui interviennent dans le cas de vecteurs nanoparticulaires, et qui permettent de contrôler la vitesse de libération du médicament :

- **Diffusion.** C'est la migration et donc la libération du médicament au travers de la membrane polymère (cas des systèmes réservoirs tels que les capsules) ou de la matrice macromoléculaire (cas des systèmes matriciels comme les nanosphères). Selon la porosité de la membrane ou de la matrice en particulier, la vitesse de libération du principe actif est plus ou moins rapide.

- **Dégradation de la particule.** Il peut s'agir d'une réelle dégradation du polymère matriciel (hydrolyse par l'eau ou par une enzyme) ou encore du clivage d'une liaison entre le polymère et le principe actif (cas des prodrogues).

II. PROCEDES DE FABRICATION DES NANOSPHERES

Le choix d'une méthode de préparation de nanosphères de polymères dépend principalement des propriétés physico-chimiques du polymère et du principe actif à encapsuler [3, 22, 23, 30]. Il ne s'agit pas ici de faire une liste exhaustive des procédés, mais d'explicitier les principaux.

II.1. Nature des polymères utilisés

Les polymères constituant les vecteurs sont des polymères hydrophobes, hydrophiles ou encore des macromolécules amphiphiles. Ces macromolécules doivent être biocompatibles, non toxiques, non immunogènes, non cancérigènes. Il est également souhaitable qu'elles soient biodégradables et/ou bioéliminables, afin d'éviter leur accumulation dans le corps humain, après libération du principe actif.

Dans la famille des polymères hydrophobes, on trouve tout d'abord les polyesters (PCL, PLA, PGA) et leurs copolymères, mais aussi d'autres polymères synthétiques comme les poly(cyanoacrylate)s [29]. Parmi les polymères hydrophiles employés, on peut citer des macromolécules naturelles telles que les polysaccharides [8, 12-14, 31, 32] ou les protéines [33] mais aussi des polymères de synthèse comme le POE [16, 24].

En dehors de tous ces critères, il faut également tenir compte des conditions de préparation des nanoparticules, de la compatibilité chimique entre polymère et principe actif, du profil de libération... Tous ces critères peuvent être atteints en modifiant les caractéristiques des polymères utilisés.

II.2. Réticulation de macromolécules naturelles amphiphiles

Dans ce cas, les macromolécules constituant la matrice des particules sont généralement des polysaccharides ou des protéines. Les nanoparticules sont alors préparées par agrégation de polymères amphiphiles, réalisée à l'aide d'une émulsion eau /huile ou d'une

séparation de phase en milieu aqueux. Cette séparation est générée par une désolvatation de la macromolécule [33], provoquée soit par un changement de pH ou de température, soit par l'addition de contre-ions [34]. Après agrégation, les nanoparticules sont stabilisées par réticulation chimique ou dénaturation thermique.

Les principaux inconvénients de cette technique sont d'une part le risque de dégradation du principe actif lors de la dernière étape de réticulation, et d'autre part, dans le cas d'une réticulation chimique, soit la toxicité de l'agent de réticulation soit la possibilité d'une réaction de ce dernier avec le médicament.

II.3. Polymérisation de monomères

La polymérisation se produit couramment en milieu dispersé dans l'eau [35], ce qui évite l'emploi de solvant d'organique (potentiellement toxique). Elle peut également avoir lieu à l'interface eau/huile, ce qui permet de générer des nanosphères à cœur hydrophile [36]. Les particules ainsi formées sont en général contaminées par les amorceurs utilisés et par les monomères n'ayant pas réagi. La toxicité éventuelle de ces deux produits et/ou leur réactivité envers le principe actif employé limitent le potentiel de cette méthode.

Cette technique a été largement appliquée aux monomères acryliques : des particules de poly(alkylcyanoacrylates) ont ainsi pu être fabriquées [35-37]. Ce type de méthode a été plus récemment appliqué à la fabrication de nanoparticules de polyesters par polymérisation par ouverture de cycle [30, 38-40].

II.4. Précipitation de polymères synthétiques.

Ces méthodes sont les plus employées pour la fabrication de nanosphères [3]. De façon générale, il s'agit d'effectuer la dissolution d'un polymère dans un solvant organique, puis de réaliser sa dispersion dans une phase externe continue dans laquelle le polymère est insoluble. Cette phase externe est souvent une solution aqueuse qui contient (ou non) un tensioactif.

Contrairement aux procédés de réticulation dans lesquels la stabilisation des particules est assurée à l'aide de liaisons covalentes, les interactions mises en jeu dans les procédés de précipitation sont des liaisons de plus faible énergie, comme les liaisons hydrogène et de Van der Waals.

Parmi les différentes méthodes existantes nous ne présenterons ici que les plus courantes : « émulsion/évaporation de solvant », nanoprécipitation, « salting-out ».

II.4.1. Emulsion /Evaporation de solvant

Cette technique consiste à réaliser une émulsion (simple ou double) puis à éliminer le solvant organique par évaporation. Lors de cette élimination, le polymère précipite, ce qui conduit à la formation de sphères. Dans le cas de la simple émulsion (huile/eau), le principe actif hydrophobe et le polymère sont dissous dans la phase organique. Lors de l'émulsion, ils se retrouvent au coeur des gouttelettes huileuses, ce qui permet d'encapsuler le médicament au sein de la matrice [31]. Un des inconvénients de cette méthode est la faible efficacité d'encapsulation pour un principe actif hydrophile. La méthode de double émulsion (eau/huile/eau) permet alors d'y remédier [41]. Pour ce faire, une première émulsion (eau/huile) est réalisée à partir d'une phase aqueuse contenant le principe actif et d'une phase organique renfermant le polymère. Une double émulsion est ensuite formée par dispersion de cette première émulsion dans une phase aqueuse contenant un tensioactif. Après évaporation du solvant organique, il se forme des sphères contenant le principe actif hydrosoluble. Celui-ci est supposé être encapsulé à l'intérieur de domaines hydratés situés dans la matrice polymère.

Lors de ce type de procédé, il est nécessaire d'employer des tensioactifs pour faciliter la formation et la stabilité des émulsions [2]. Le poly(alcool vinylique) (PVA) ou le cholate de sodium sont couramment employés pour le procédé de simple émulsion. Le principal inconvénient est alors l'éventuelle toxicité du tensioactif, ce qui oblige à les éliminer par plusieurs étapes de purification. Mais le plus souvent, la surface des particules reste recouverte par une quantité non négligeable de ces tensioactifs, particulièrement quand il s'agit de PVA [42].

II.4.2. Nanoprécipitation (déplacement de solvant)

Cette technique requiert l'utilisation d'une phase organique polaire contenant le polymère et le principe actif organosolubles. Cette phase doit être entièrement miscible dans la phase aqueuse dans laquelle est dissous un tensioactif. Ainsi, ni l'évaporation, ni l'extraction de solvant ne sont nécessaires à la précipitation du polymère. Dès son ajout dans le milieu aqueux, le solvant organique diffuse instantanément dans la phase aqueuse externe, et provoque la co-précipitation du polymère et du principe actif. Là encore, ce procédé nécessite des étapes de purification pour éliminer le tensioactif. De plus, ce mode de fabrication est limité aux principes actifs hydrophobes, qui sont bien solubles en solvant polaire, mais faiblement dans l'eau [43].

II.4.3. « Salting-out »

Le procédé de «salting-out» consiste à ajouter, sous agitation, une solution aqueuse saturée en sel et contenant un tensioactif (par exemple : le poly(alcool vinylique)) à une solution acétonique de polymère. Dans ce cas, la miscibilité des deux phases est empêchée par la saturation en sels, ce qui conduit à la formation d'une émulsion de type huile/eau. De l'eau pure est ensuite ajoutée au système, ce qui permet la diffusion complète de l'acétone dans la phase aqueuse. Ceci provoque la précipitation du polymère et la formation des sphères. Cette technique permet l'encapsulation de principes actifs hydrophobes, solubles dans des solvants polaires [44].

La méthode émulsification/diffusion peut être considérée comme une modification du procédé du « salting-out ». Dans ce cas, le solvant organique utilisé n'est que partiellement soluble dans l'eau. Ce solvant, dans lequel est dissous le polymère, est initialement saturé en eau pour assurer l'équilibre thermodynamique des deux phases. Puis il est émulsifié dans une phase aqueuse contenant un surfactif. L'addition d'eau, après avoir obtenu l'émulsion, provoque la diffusion du solvant dans la phase aqueuse et entraîne la précipitation du polymère.

II.4.4. Conclusions

La principale limite commune à la plupart de ces techniques de précipitation de polymère, est la nécessité d'utiliser des solvants organiques. Si le solvant n'est pas éliminé convenablement, les nanoparticules peuvent se révéler inadaptées pour une application biomédicale. Mais, contrairement aux procédés de polymérisation et de réticulation, l'utilisation de polymères préformés élimine ici le problème de la toxicité des résidus monomères et des molécules réticulantes.

III. LES NANOPARTICULES DANS L'ADMINISTRATION INTRAVEINEUSE

Il existe de nombreux modes d'administration des vecteurs médicamenteux parmi lesquels on distingue les voies parentérales (dont l'administration intraveineuse) et la voie orale. Chacun de ces modes impose des contraintes diverses à ces vecteurs : taille, propriétés

d'adhésion, de furtivité... Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux nanoparticules destinées à une administration intraveineuse.

III.1. Devenir « in vivo »

Après administration intraveineuse, les particules injectées sont véhiculées par le système sanguin avant d'atteindre l'organe cible. Une fois à l'intérieur de la circulation sanguine, les particules se distribuent dans l'organisme en fonction entre autre de leur taille. Ainsi, les particules de taille importante sont filtrées et éliminées par le foie ou la rate, alors que les particules de faible diamètre restent dans la circulation générale. Cependant, dès lors qu'elles sont reconnues comme corps étrangers par le système immunitaire, elles sont rapidement éliminées du corps humain par un processus de phagocytose [2].

III.2. Processus de phagocytose

La phagocytose conduit à l'élimination des substances étrangères, âgées ou anormales du sang et des tissus. Les substances à éliminer sont alors reconnues par le système des phagocytes mononucléés (MPS) composé essentiellement des macrophages et des cellules polymorphonucléaires (PMN). Ce phénomène se déroule en trois étapes : phase de contact, d'ingestion, puis de digestion. Durant la première étape, la substance est recouverte par des protéines appelées opsonines (immunoglobulines, protéines du complément...). Ces opsonines, identifiées par les récepteurs situés à la surface des PMN, facilitent la reconnaissance des particules par le système immunitaire. Les particules, ainsi reconnues comme étrangères, sont ensuite intégrées aux membranes des PMN puis digérées. Ce processus conduit à l'élimination prématurée des particules du système sanguin.

III.3. Particules furtives

A cause de la capture rapide des nanoparticules par le MPS, leur ciblage vers des sites spécifiques autres que le foie et la rate est extrêmement difficile. Ainsi, une forte proportion de particules injectées disparaît très rapidement après leur injection, ce qui diminue énormément l'effet thérapeutique du principe actif. Les chercheurs ont tenté de limiter ce processus de phagocytose en essayant de bloquer le système immunitaire avant l'injection elle-même [45]. Mais ceci affaiblit les défenses de l'organisme, si bien que la méthode ne peut être appliquée en thérapeutique.

Une autre solution consiste à concevoir des particules qui échappent au MPS. De telles particules sont alors dites "furtives". Comme la phagocytose résulte de l'établissement d'interactions (ioniques et/ou hydrophobes) entre les vecteurs nanoparticulaires et les opsonines, on a envisagé de réduire ces interactions. Pour cela, on a proposé d'élaborer des nanosphères à propriétés de surface contrôlées, en particulier en réalisant des recouvrements hydrophiles et neutres [2].

Ce recouvrement hydrophile peut être effectué par différentes méthodes :

- L'adsorption de polymères amphiphiles sur une particule hydrophobe préformée via leur(s) partie(s) apolaire(s) est un procédé très utilisé. Cependant, il n'offre pas de garantie quant à la stabilité de la couche adsorbée laquelle peut être déplacée par les protéines [46].
- Une seconde voie consiste à former une liaison chimique entre un polymère hydrophile et la surface de la particule. Si, dans ce cas, la stabilité à la surface de la couche hydrophile est efficace, le couplage entre polymère et particule peut se révéler délicat et le recouvrement peu homogène [47].
- Enfin, un copolymère amphiphile peut être employé dès la préparation des vecteurs par la méthode d'émulsion/évaporation de solvant [2]. Lorsque les copolymères sont insolubles dans l'eau (copolymères diblocs monométhoxypoly(oxyde d'éthylène)-b-poly lactide (MPOE-b-PLA), ou encore MPOE-b-PLGA, MPOE-b-PCL [48, 49]), ils sont dissous dans la phase organique de l'émulsion qui est alors stabilisée par des tensioactifs classiques. Mais on peut également utiliser des copolymères amphiphiles hydrosolubles pour stabiliser l'émulsion. Dans ce cas, après l'évaporation du solvant, on a montré que le copolymère reste ancré à la surface des particules, en présentant sa partie hydrophile à l'extérieur. Ceci a été réalisé avec des copolymères à blocs MPOE-b-PLA hydrosolubles (chaînes courtes de PLA) [50] et avec des dextrans amphiphiles (porteurs de groupements phénoxy [31] ou de chaînes aliphatiques [51]).

Un des polymères hydrophiles les plus utilisés pour ce type de recouvrement est le POE. On a constaté que sa présence à la surface des vecteurs colloïdaux prolongeait leur

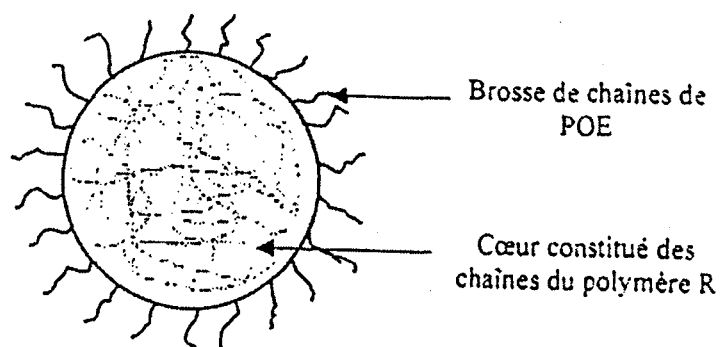


Figure III-25 : Structure supposée d'une nanosphère de PLA, recouverte par un copolymère PLA-b-POE

temps de circulation [47] et que la "brosse" générée par ces chaînes de POE (Figure III-25) engendrait, dans une certaine mesure, une gêne stérique limitant l'adsorption des opsonines. De très nombreuses publications font état des propriétés de ce recouvrement par du POE et leur analyse est encore sujet à controverse [52, 53].

IV. OBJECTIFS DE NOTRE ETUDE

Le laboratoire s'intéresse, depuis de nombreuses années, à l'élaboration de nanosphères à propriétés de surface contrôlée, obtenus par le procédé d'émulsion/évaporation de solvant. Les premiers essais utilisèrent des copolymères diblocs MPOE-b-PLA insolubles dans l'eau [54, 55] et montrèrent que les nanosphères obtenues étaient furtives. Par la suite, des résultats analogues furent obtenus en remplaçant les tensioactifs classiques de l'émulsion par des MPOE-b-PLA hydrosolubles. Dans ce dernier cas, le cœur des particules n'est plus constitué que de PLA [50] et la couronne de POE. Enfin récemment, nous avons mis au point un procédé d'élaboration de nanosphères de PLA recouvertes par du dextrane en remplaçant le MPOE-b-PLA hydrosoluble par des dextrans amphiphiles (substitués par des groupes phénoxy ou des chaînes aliphatiques [50, 51]). Le principal problème rencontré dans ces derniers travaux est « l'incompatibilité » entre le PLA du cœur de la particule et les chaînes hydrophobes présentes sur le polysaccharide, ce qui n'assure pas une stabilité optimale à la couche superficielle de dextrane. Pour surmonter cette difficulté, nous avons alors envisagé de remplacer ces groupements phénoxy/aliphatiques par des greffons de PLA.

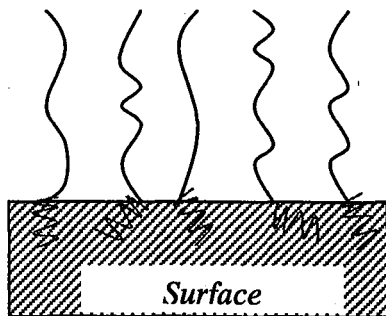
IV.1. Intérêt de l'utilisation du dextrane à la place des POE

L'intérêt premier de remplacer un polymère dibloc MPOE-b-PLA par un polymère greffé de type polysaccharide amphiphile est de diversifier les qualités du recouvrement. De plus, un polysaccharide comme le dextrane peut présenter plusieurs avantages par rapport au POE :

- Le dextrane se dégrade totalement en unités glucose *in vivo* [56], alors que le POE n'est que bioéliminable (*les macromolécules de POE s'éliminent du corps humain si leur masse molaire est inférieure à 20000 g/mol* [57]).
- Le dextrane est largement utilisé dans le domaine médical comme substitut au plasma sanguin [56].

Copolymère dibloc

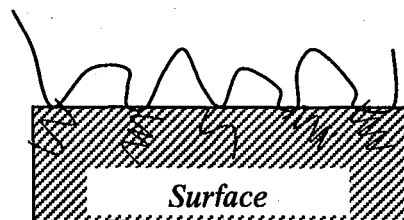
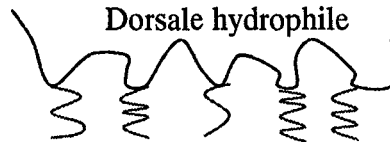
Bloc hydrophile Bloc hydrophobe



End-on

Copolymère greffé

Dorsale hydrophile
Greffon hydrophobe



Side-on

Figure III-26 : Deux modes d'ancrage supposé des chaînes de polymère à l'interface (d'une émulsion ou des particules). Cas des copolymères diblocs ou greffés.

- Enfin sur le plan chimique, le dextrane présente, par rapport au MPOE, l'avantage de pouvoir être facilement fonctionnalisé.

IV.2. Intérêts respectifs des recouvrements par du dextrane et du POE

Comme cela a été évoqué, l'encombrement des chaînes hydrophiles constituant le recouvrement des particules provoque une gêne stérique à l'approche et à l'adsorption des protéines responsables de l'opsonisation. Ces chaînes réalisent aussi un masquage de la charge et de l'hydrophobie de la matrice des particules. Selon Österberg et coll. [58], le recouvrement hydrophile doit être suffisamment épais et dense pour prévenir l'adsorption des opsonines.

Il existe deux modes de recouvrement des particules (« end-on ») et « side-on » (Figure III-26) selon que le polymère est adsorbé sur la particule par un site unique (cas d'un copolymère amphiphile dibloc) ou par de multiples points (cas de copolymères en peigne).

Si on considère un recouvrement « end-on », la gêne stérique engendrée par des copolymères dibloc, dont le bloc hydrophile est un dextrane, sera plus faible et d'une moins grande efficacité que celle observée lorsque des copolymères à bloc hydrophile POE sont employés, car la mobilité et la flexibilité des chaînes de dextrane sont moindres par rapport à celles de POE [59, 60]. Cependant, un recouvrement de type "side-on", obtenu lorsqu'un copolymère en peigne est employé, peut être aussi efficace que le recouvrement "end-on" des diblocs précédents. [58]. En effet, la dorsale du copolymère en peigne peut présenter différentes topographies à la surface de la particule (Figure III-27) [61] :

- Lorsque le copolymère s'aplatit fortement sur la surface, les boucles sont de très faible amplitude et ce type de recouvrement est nommé "all-trains" (Figure III-28 modèle a).
- Dans le cas contraire, les boucles peuvent être d'amplitude variable (Figure III-28 modèles b, c).

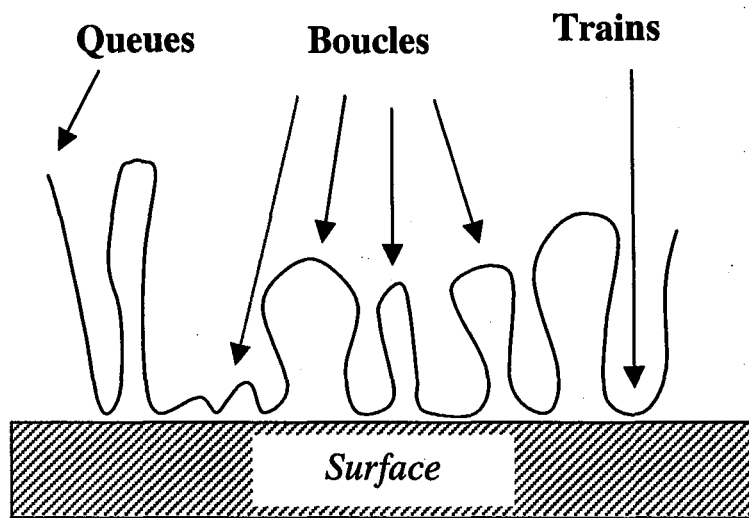


Figure III-27 : Conformation générale d'une chaîne de polymère adsorbée à l'interface solide-liquide.

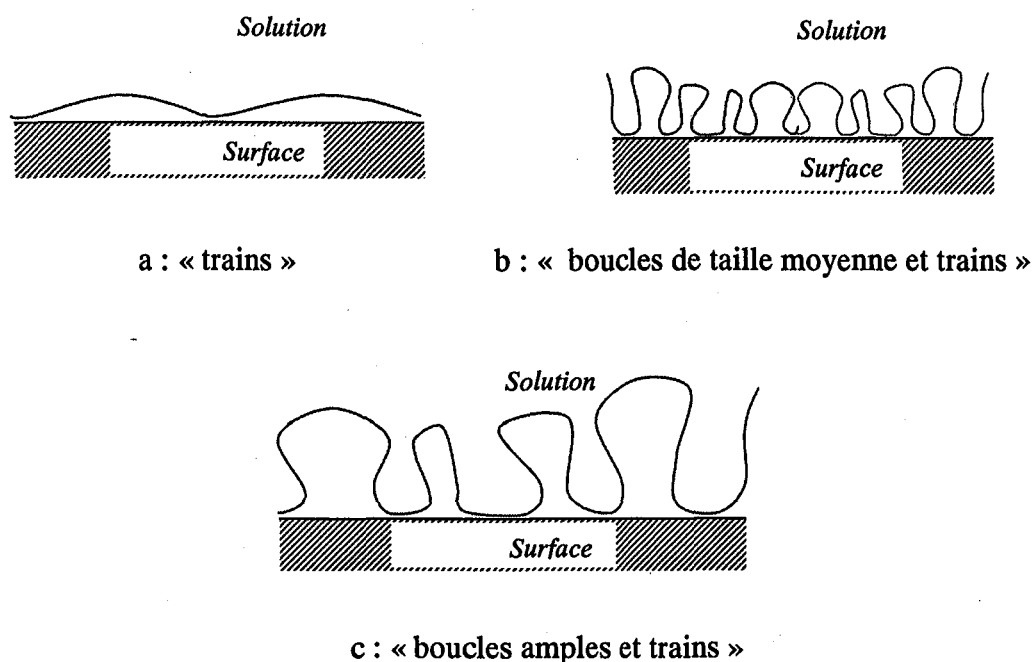


Figure III-28 : Les différentes topographies du squelette d'un copolymère à l'interface solide-liquide. Cas d'un recouvrement "Side-on".

C'est la topographie du copolymère à la surface qui détermine la qualité du recouvrement. Ainsi, à concentration interfaciale constante du copolymère, lorsque l'ampleur des ondulations du polymère adsorbé à la surface croît, l'épaisseur du recouvrement augmente. Dans le même temps, la densité de recouvrement diminue, ce qui facilite l'accès des protéines à des zones de surface des particules. Selon ces hypothèses, un modèle de recouvrement de type b apparaît comme le plus adapté. Des études récentes, faites au laboratoire, sur la réactivité de particules de polystyrène recouvertes par adsorption de dextrans modifiés par des groupements phénoxy ont confirmé ces hypothèses et montré que le nombre de points d'ancrage du polymère hydrophile à la surface des particules est un paramètre déterminant pour prévenir l'adsorption des protéines [62]. De la même façon, les études réalisées également au laboratoire sur des nanosphères de PLA recouvertes par ces mêmes copolymères, ont montré l'efficacité du recouvrement de dextrane envers l'adsorption de diverses protéines modèles. D'autres auteurs sont parvenus à abaisser le taux de capture de particules de PMMA recouvertes par du dextrane, par les macrophages [63].

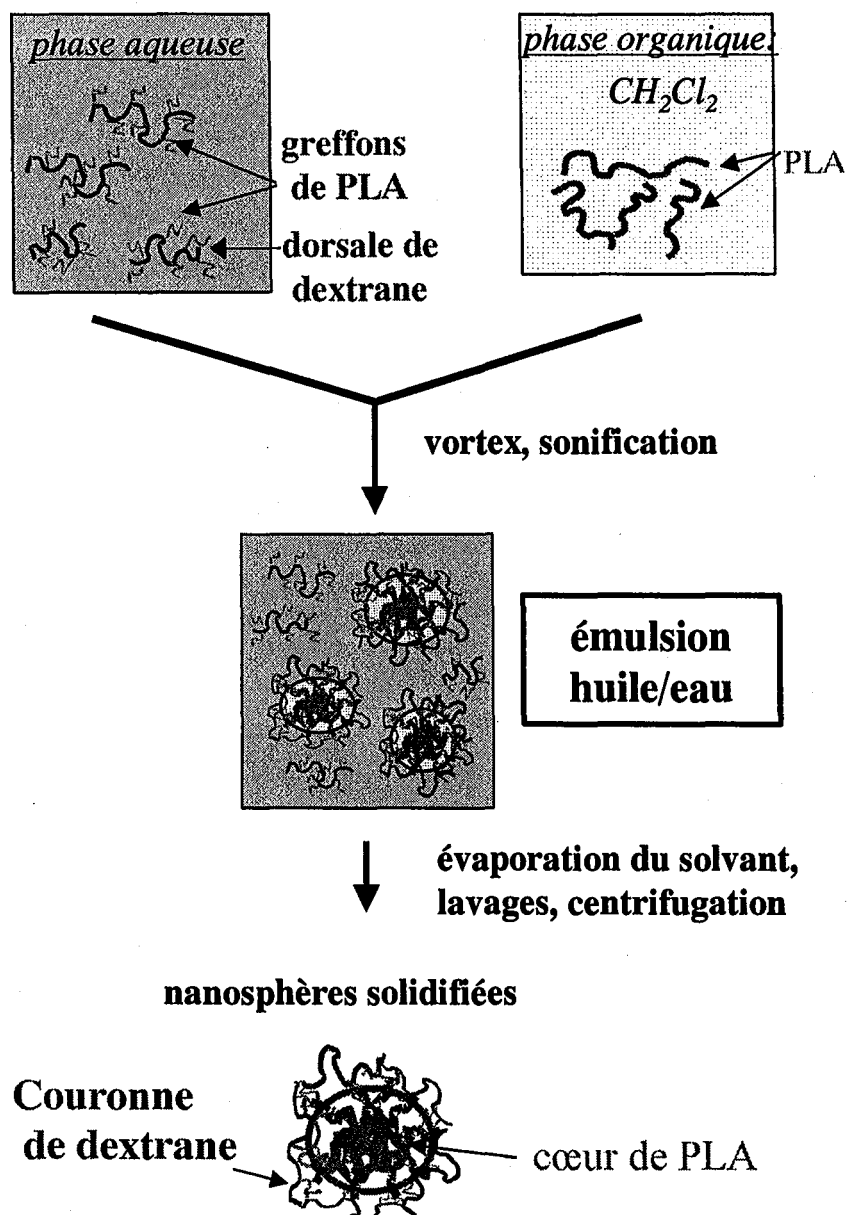


Figure III-29 : Procédé de préparation des particules à l'aide des copolymères Dex-g-PLA hydrosolubles suivant le protocole « émulsion simple/évaporation de solvant ». La structure supposée pour les nanosphères solides est également présentée.

IV.3. Taille des particules

La taille des particules est également un paramètre crucial dans la vectorisation. Pour un usage intravasculaire, les particules doivent avoir une taille inférieure au micromètre afin d'éviter les problèmes d'embolisation (obstruction des voies vasculaires). De plus, l'amplitude de leur capture par les phagocytes croît avec leur taille. Par ailleurs, d'un point de vue pratique, des nanoparticules de taille très faible sont difficiles à manipuler lors des opérations de récupération et de lavages. Classiquement nous avons donc orienté nos préparations pour obtenir des nanosphères de taille comprise entre 200 et 300 nm.

V. RESULTATS OBTENUS AVEC LES COPOLYMERES DEX-G-PLA HYDROSOLUBLES

Notre objectif était donc d'étudier l'obtention, par le procédé «émulsion/évaporation», de nanosphères de PLA recouvertes par du dextrane. Ce recouvrement a été réalisé à l'aide des copolymères dextrane-g-poly lactide, utilisés comme tensioactifs macromoléculaires dans l'émulsion huile/eau nécessaire à l'obtention de ces particules (Figure III-29). Nous nous sommes intéressés au cas des copolymères hydrosolubles et organosolubles.

Dans le cas des copolymères Dex-g-PLA organosolubles, leur présence dans la phase organique discontinue n'est a priori guère favorable à la stabilisation de l'émulsion. Nous avons néanmoins envisagé de rechercher des conditions opératoires qui permettent la formation des nanosphères. Au vu des études préliminaires, il semble que des nanosphères puissent être obtenues à partir d'un mélange Dex-g-PLA organosoluble /PLA qu'il restera à formuler correctement. En effet, les agrégats obtenus présentent de larges distributions de taille (un exemple est donnée dans la Figure III-30). Faute de temps, des essais complémentaires n'ont pas pu être réalisés.

Dans le cas des copolymères hydrosolubles, la présence du copolymère tensioactif (Dex-g-PLA) dans la phase aqueuse continue peut permettre de stabiliser l'émulsion (huile/eau), dès lors que la quantité de copolymère est suffisante. L'organisation du Dex-g-PLA à l'interface huile/eau doit alors assurer la présence du dextrane à la surface des gouttelettes huileuses puis, après évaporation du solvant, à la surface des particules.

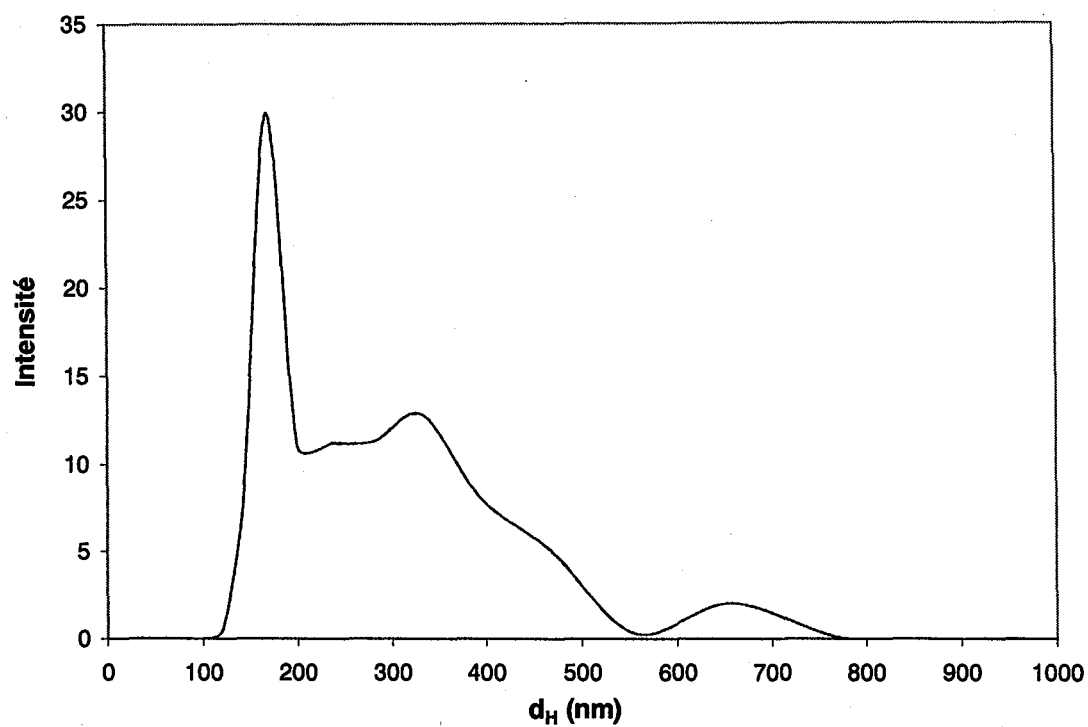


Figure III-30: Distribution de la taille des nanosphères obtenues avec le $\text{Dex}_{13K}\text{-g-27PLA}_{2.5K}$ organosoluble (13 g/L) et du PLA (12g/L) dans la phase organique de l'émulsion.

copolymère est alors ancré à la surface des particules par l'intermédiaire des segments hydrophobes (PLA), alors que sa dorsale hydrophile (dextrane) est exposée à la solution aqueuse. Cette technique a déjà été utilisée avec succès dans le cas de copolymères hydrosolubles dibloc POE-b-PLA [50] ou greffés (dextrane modifié latéralement par des groupements phénoxy ou alkyle) [31, 51].

Nous rapportons ci-après les résultats obtenus avec les copolymères hydrosolubles.

Les nanosphères ont été préparées en employant du poly(D,L-lactide) PLA commercial ($\overline{M}_n \approx 35\,000$ g/mol) et les copolymères Dex-g-PLA hydrosolubles utilisés comme tensioactifs, selon le protocole décrit dans la partie expérimentale (cf. Partie IV). Certaines conditions opératoires (temps et puissance de sonification, volumes des phases organique $-\text{CH}_2\text{Cl}_2-$ et aqueuse) avaient été optimisées lors de travaux précédents effectués au laboratoire portant sur des copolymères POE-b-PLA et dextrans amphiphiles [31]. Nous les avons gardées comme base de départ pour notre étude.

Dans un premier temps, les conditions opératoires permettant l'obtention de nanosphères ont été optimisées pour obtenir un diamètre de l'ordre de 200 nm. Le diamètre moyen des particules (d_H) a été déterminé par spectroscopie à corrélation de photons (PCS). Cette technique de diffusion de la lumière est particulièrement adaptée à l'étude des milieux colloïdaux constitués de particules suffisamment petites pour que l'effet de l'agitation thermique y soit prédominant voire prépondérant (cf. Partie expérimentale). Les nanosphères obtenues ont ensuite été caractérisées en termes de quantité de copolymère déposé à la surface, d'épaisseur de couche et de charge de surface.

V.1. Influence des conditions opératoires sur la taille des nanosphères

La stabilité de l'émulsion (huile/eau) initiale dépend des conditions opératoires mises en œuvre, mais également des propriétés tensioactives et de la concentration du copolymère employé pour stabiliser la dite émulsion. Compte tenu de la relative solubilité des copolymères en phase aqueuse, nous avons choisi de travailler à des concentrations inférieures ou égales à 1 g/L. Des essais préliminaires ont été effectués sur deux des copolymères hydrosolubles ($\text{Dex}_{29\text{K}}\text{-g-}_{13,5}\text{PLA}_{0,2\text{K}}$ et $\text{Dex}_{29\text{K}}\text{-g-}_{18}\text{PLA}_{0,1\text{K}}$) solubilisés à

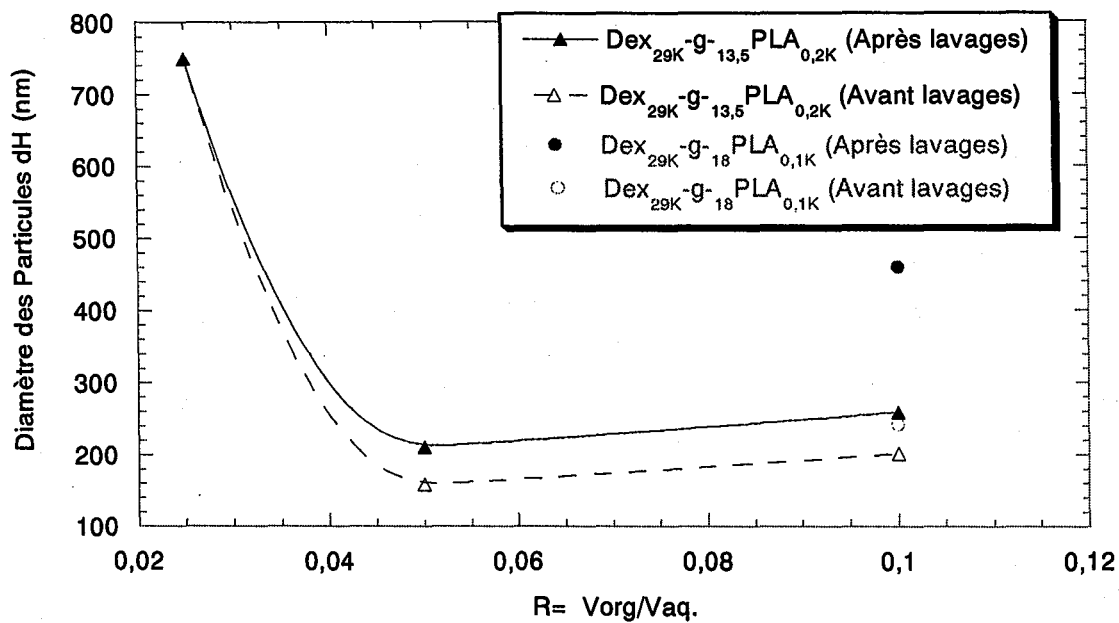


Figure III-31: Influence du ratio R ($R = \text{Volume de phase organique} / \text{Volume de phase aqueuse}$) sur le diamètre des particules obtenues avec des Dex-g-PLA hydrosolubles ($[\text{Dex-g-PLA}] = 1 \text{ g/L}$; $[\text{PLA}] = 25 \text{ g/L}$).

concentration qui nous semblait a priori la plus favorable à la stabilité de l'émulsion, compte-tenu des études antérieures. Nous avons utilisé pour le ratio R ($R = \text{Volume de la phase organique} / \text{Volume de la phase aqueuse}$) une valeur égale à 0,1, habituelle au laboratoire (Figure III-31). Le diamètre moyen des nanosphères obtenues avant lavages est assez proche dans les deux cas. En revanche après lavages, si les particules préparées avec Dex_{29K}-g-_{13,5}PLA_{0,2K} ne subissent qu'une légère augmentation de taille (avant lavages $d_H = 201$ nm. Après lavages, $d_H = 259$ nm), celles préparées avec Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{0,1K} ne sont guères stables (avant lavages $d_H = 241$ nm et $d_H = 459$ nm après lavages). Une faible augmentation de taille moyenne, avant et après lavages, peut éventuellement s'expliquer par l'élimination de petites particules au cours de la centrifugation. Dans le cas d'une forte augmentation (cas des nanosphères préparées en présence de Dex_{29K}-g-₁₈PLA_{0,1K}), il faut supposer qu'au cours des lavages, une partie du dextrane en surface est éliminée. Ceci provoque alors une réduction de la répulsion stérique entre les nanosphères et favorise leur agrégation. Ce phénomène ne se produit pas dans le cas du Dex_{29K}-g-_{13,5}PLA_{0,2K}, probablement pour que ses greffons de PLA sont plus longs (3 motifs lactate en moyenne contre 1,5 pour l'autre copolymère) et s'ancrent plus profondément dans la matrice de PLA de la nanosphère.

Par la suite, nous nous sommes exclusivement intéressés au cas du copolymère Dex_{29K}-g-_{13,5}PLA_{0,2K}.

V.1.1. Influence du ratio R

Nous avons étudié l'influence de R (rapport Volume de la phase organique/Volume de la phase aqueuse) sur la taille des nanosphères obtenues, en maintenant un volume constant de la phase aqueuse (10 mL). Les résultats sont présentés dans la Figure II-31.

Diminuer R de 0,1 à 0,05 permet d'abaisser légèrement le diamètre hydrodynamique des particules (d_H). En revanche, un rapport R inférieur à 0,05 entraîne une nette augmentation de la taille des nanosphères. Ce type d'évolution de la taille des nanosphères en fonction de R a souvent été observé au cours des travaux antérieurs.

Pour la suite de nos expériences, nous avons alors employé un ratio R égal à 0,05.

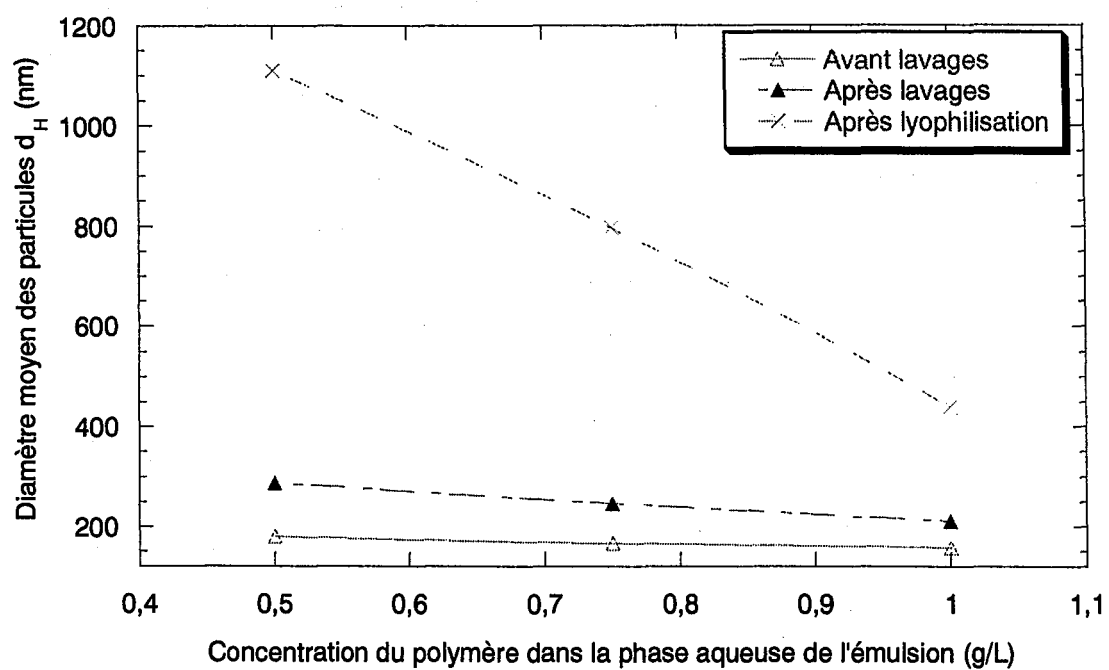


Figure III-32 : Evolution du diamètre des particules en fonction de la concentration du copolymère $Dex_{29K}G_{-13,5}PLA_{0,2K}$ dans la phase aqueuse. $R=0,05$ ($[PLA] = 25$ g/L).

V.1.2. Influence de la concentration en copolymère dans la phase aqueuse

L'influence de la concentration en copolymère Dex-g-PLA dans la phase aqueuse sur le diamètre hydrodynamique d_H des particules, avant et après lavages, a été ensuite étudiée (Figure II-32). Conformément aux études précédentes réalisées sur des dextrans hydrophobisés [31], augmenter la concentration en tensioactif (dans la gamme de concentration considérée) permet de diminuer le d_H des particules. Cette réduction du diamètre suit l'amélioration du pouvoir tensioactif du copolymère en fonction de sa concentration. En effet, comme le montre la Figure III-2 (cf. Chapitre I, Partie III), plus la concentration du copolymère augmente, plus la tension de surface est diminuée et donc plus la dispersion de la phase organique dans la phase aqueuse est facilitée.

Des nanosphères de taille voisine de 200 nm ont ainsi pu être obtenues après lavages, pour une concentration en Dex_{29K}-g-_{13,5}PLA_{0,2K} de 1 g/L en solution aqueuse. Cependant, contrairement à certaines nanosphères obtenues précédemment en présence de dextrans hydrophobisés par des groupements phénoxy/alkyles, ces particules ne sont pas stables lors de leur lyophilisation et leur taille augmente de façon notable (Figure II-32). Comme cette augmentation est particulièrement élevée lorsque la concentration en Dex-g-PLA utilisée est faible, on peut supposer que même à 1 g/L le recouvrement en dextrane n'est pas suffisant.

V.2. Propriétés de surface des nanosphères

Les propriétés de surface des nanosphères ont ensuite été analysées. Pour cela, nous avons d'une part déterminé la quantité de dextrane adsorbé à la surface des particules, et d'autre part mesuré la « charge de surface » des particules et calculé l'épaisseur du recouvrement hydrophile.

V.2.1. Taux de dextrane en surface

La quantité de dextrane adsorbé à la surface des particules a été déterminée par dosage du dextrane libéré (méthode à l'anthrone), après lyophilisation et dégradation des particules en milieu basique (cf. Partie expérimentale).

Δ_{PZ} (nm)	Γ (mg/m ²)	Densité d (g/cm ³)	Concentration [Polymère] (g/l)	
23	4,6	0,2	0,50	} $\Rightarrow$ Dex _{29K} -g- _{13,5} PLA _{0,2K}
31	4,0	0,1	0,75	
34	5,4	0,2	1,00	
9	4,6	0,5	1,00	$\Rightarrow$ DexP ₁₅

Tableau III-2 : Taux de recouvrement (Γ), épaisseur (Δ_{PZ}) et densité (d) de la couche de dextrane à la surface des particules pour diverses concentrations en polymère dans la phase aqueuse. Nanoparticules de PLA préparées en présence de Dex_{29K}-g-_{13,5}PLA_{0,2K} ou de DexP₁₅ (dextrane comportant en moyenne 15 groupements phénoxy pour 100 unités glucose) ($R = 0,05$).

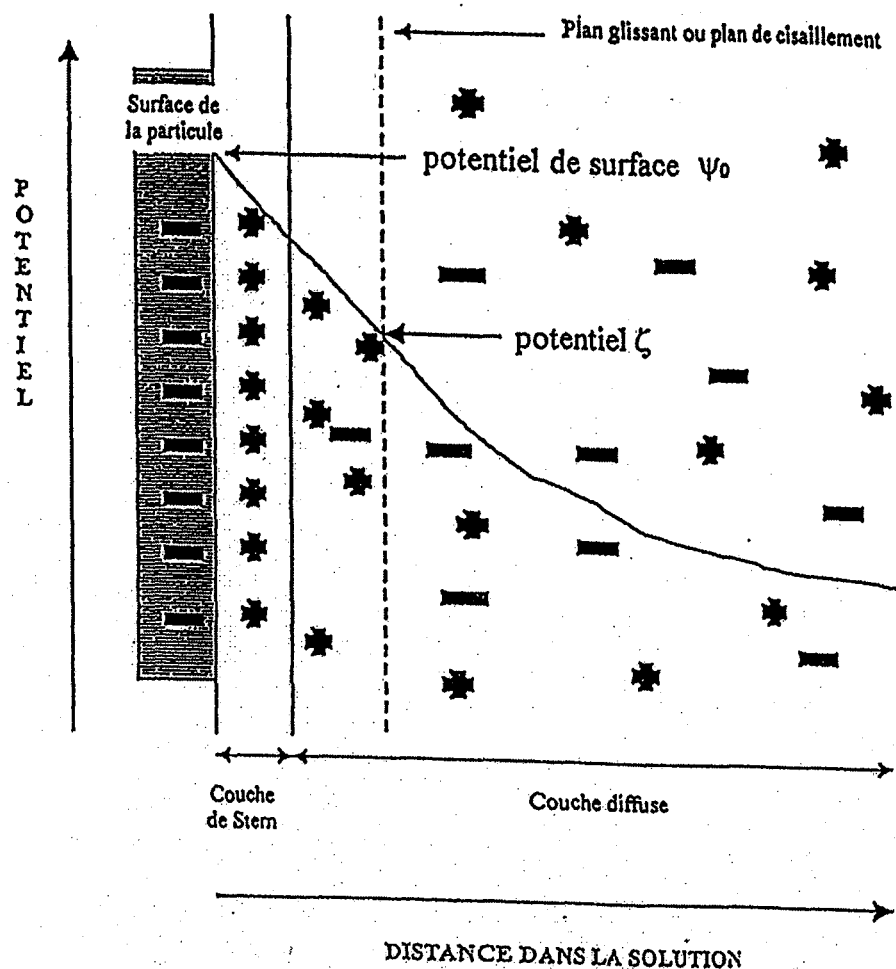


Figure III-33 : Modélisation de la double-couche électrostatique autour d'une particule chargée

Les résultats sont regroupés dans le Tableau III-2. Quelles que soient les conditions opératoires utilisées, le taux de recouvrement Γ ne varie pas de façon significative. Les valeurs sont analogues à celles obtenues lors du recouvrement des nanoparticules par des dextrans phénoxy [31]. Il aurait néanmoins été intéressant de vérifier si ce taux Γ avait atteint sa valeur optimale, en suivant son évolution en fonction de la concentration en Dex-g-PLA dans la phase aqueuse lors de la préparation de l'émulsion. Mais, cela n'a pu être fait, faute de pouvoir augmenter cette concentration au delà de 1 g/L.

V.2.2. Charge de surface et épaisseur du recouvrement (Δp_z)

La charge de surface des particules peut être estimée par mesure de leur potentiel zéta (ζ).

V.2.2.1. Notion de potentiel zéta (ζ)

La présence de groupements chargés à la surface d'une particule affecte la distribution ionique dans la région interfaciale entre la particule et le liquide environnant. Il en résulte une augmentation de la concentration en contre-ions près de la surface de la particule. Cette augmentation peut être modélisée sous la forme d'une double-couche électrostatique comme le montre la Figure II-33. La première couche, appelée couche de Stern, correspond à la région la plus proche de la surface et comporte des contre-ions fortement liés. La seconde couche, appelée couche de Gouy-Chapman, est plus diffuse et son épaisseur dépend de la force ionique du milieu. Au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface de la particule, le potentiel de la couche diffuse décroît.

Quand un champ électrique est appliqué à travers un électrolyte contenant des particules en suspension, ces dernières, qui possèdent une charge électrique sont attirées vers l'électrode de charge opposée et la force de frottement subie par les particules s'oppose à ce mouvement. Quand l'équilibre entre ces deux forces est atteint, les particules se déplacent à vitesse constante. Leur vitesse dépend du champ électrique, du milieu et de la charge de la particule. Sous l'effet des forces de frottement, la couche diffuse est arrachée jusqu'à un certain plan appelé plan de cisaillement. Le potentiel mesuré au niveau de ce plan de cisaillement est appelé potentiel zéta (ζ).

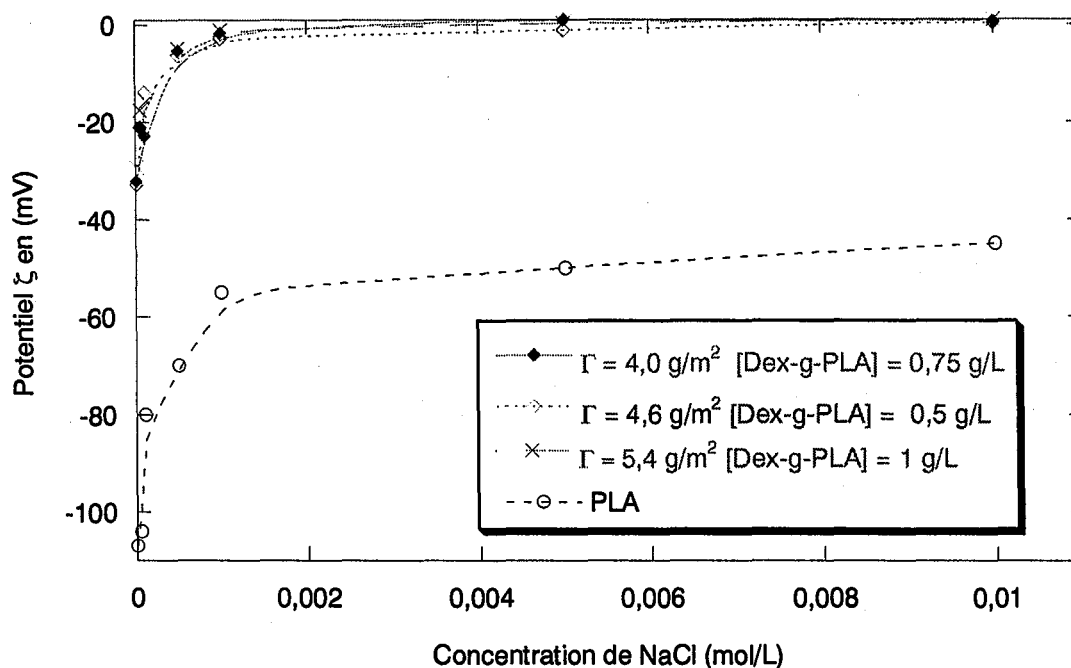


Figure III-34 : Evolution du potentiel ζ des particules après lavages en fonction de la concentration en NaCl de la solution aqueuse. Cas des particules de PLA préparées en présence de Dex_{29K}-g-13,5PLA_{0,2K} à différentes concentrations ou de cholate de sodium (solution aqueuse à 0,3%, en masse). R=0,05

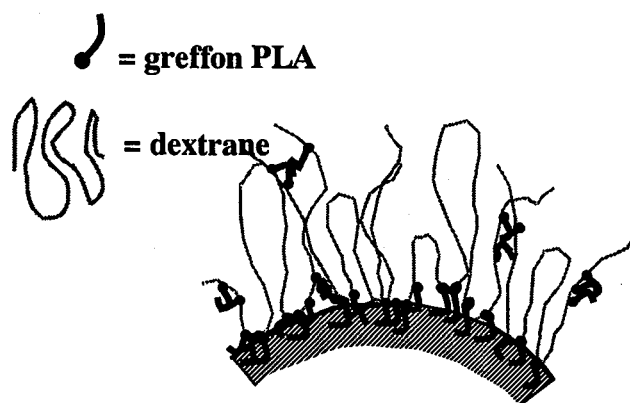


Figure III-35 : Conformation supposée des chaînes de dextrane-g-PLA à la surface de particules.

V.2.2.2. Evolution du potentiel zéta (ζ)

Les évolutions de ζ en fonction de la concentration en électrolyte (NaCl) dans la phase aqueuse sont représentées dans la Figure II-34. Les nanosphères de PLA non recouvertes par du dextrane, et préparées en présence de cholate de sodium, présentent une valeur du potentiel ζ qui évolue entre -120 et -60 mV selon la concentration en sel. L'absence de cholate sodium à la surface des particules de PLA a été vérifiée lors d'études précédentes par ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) et SSIMS TOF (Spectroscopie de masse ionique statique secondaire par temps de vol) [51]. La présence d'une charge négative sur ces nanosphères de PLA est alors due à la présence de carboxylates terminaux sur les chaînes de PLA. En revanche, les particules recouvertes par le copolymère dextrane-g-PLA ont un très faible potentiel ζ dès les plus faibles concentrations en sel, et ceci quelle que soit la concentration en Dex-g-PLA utilisée. Ce masquage important du potentiel de surface de la particule est donc le témoin du recouvrement de la surface de la particule par le dextrane.

V.2.2.3. Epaisseur de la couche de dextrane (Δ_{PZ}) / Densité du recouvrement (d)

L'épaisseur de la couche hydrophile de dextrane à la surface des particules peut être évaluée à l'aide de l'évolution du potentiel ζ en fonction de la force ionique du milieu (cf. Partie Expérimentale). Le taux de recouvrement en dextrane (Γ) étant connu, la densité du recouvrement peut alors être calculée. Les résultats sont regroupés dans le Tableau II-2. Il apparaît que l'épaisseur du recouvrement (Δ_{PZ}) est très grande, en tout cas bien supérieure (valeur environ double) à celle déterminée dans le cas des dextrans phénoxy ou alkyle [51]. Pour des taux de recouvrement analogues, dans tous les cas, la densité de recouvrement par les Dex-g-PLA est alors bien plus faible que pour le DexP₁₅ (15 groupements phénoxy/100 unités glucose ce qui correspond aux 13,5 greffons de PLA du copolymère Dex_{29K}-g-_{13,5}PLA_{0,2K}).

Ce résultat laisse supposer que la dorsale du copolymère Dex-g-PLA n'est maintenue que par quelques greffons à la surface de la particule, si bien que le dextrane forme de grandes boucles (Figure II-35). Ce comportement semble a priori étonnant compte-tenu de la meilleure compatibilité des greffons de polylactide avec la matrice PLA par rapport aux groupements hydrophobes alkyle ou phénoxy.

VI. CONCLUSIONS

Après l'étude des propriétés tensioactives des copolymères Dex-g-PLA, nous avons tenté de préparer des nanosphères composées d'une matrice polylactide et recouvertes d'une couronne hydrophile de dextrane. Pour cela, le caractère tensioactif des copolymères, et donc leur capacité à stabiliser des émulsions, ont été mis à profit. Le mode de fabrication des nanoparticules que nous avons sélectionné repose sur la réalisation d'une émulsion (huile/eau), puis sur l'évaporation du solvant organique.

Dans le cas des copolymères Dex-g-PLA hydrosolubles, leur présence dans la phase aqueuse continue permet d'obtenir une émulsion suffisamment stable pour la fabrication des nanosphères. Des conditions expérimentales permettant la formation de particules stables et de diamètre voisin de 200 nm ont été mises au point. Le recouvrement à la surface de ces particules a alors été analysé en termes de quantité de dextrane adsorbé, charge de surface et épaisseur du recouvrement. Si la quantité de dextrane adsorbé est voisine de celles obtenues lors d'études précédentes réalisées avec des dextrans modifiés par des groupements phénoxy [51], l'épaisseur du recouvrement obtenu dans le cas de Dex-g-PLA est bien plus grande, ce qui laisse supposer un faible ancrage des greffons PLA dans la matrice et la formation de boucles amples de dextrane en surface des particules. Une représentation possible de ce recouvrement a été proposée. Bien que ce recouvrement permette d'obtenir des nanosphères à très faible charge de surface, il n'est pas sûr qu'il soit suffisamment efficace pour limiter l'adsorption des opsonines, protéines responsables de la capture des particules par le système immunitaire, lors d'une administration intraveineuse. Tous ces résultats sont bien sûr préliminaires et des analyses supplémentaires seront nécessaires pour mieux caractériser les nanosphères ainsi préparées.

Dans le cas des copolymères organosolubles, un certain nombre d'essais ont été réalisés mais l'obtention de particules s'avère plus délicate dans ce cas. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant un mélange copolymère Dex-g-PLA organosoluble et PLA, dissous dans du chloroforme. Par ailleurs, il serait peut-être plus judicieux d'utiliser des copolymères organosolubles présentant une plus faible solubilité dans la phase organique que ceux que nous avons utilisés.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Couvreur P.,
XIV. Vecteurs nanoparticulaires de médicaments,
in *Formes pharmaceutiques nouvelles.*, P. Buri, F. Puisieux, E. Doelker and J.-P. Benoit, Editors.
1985, Lavoisier: Paris. p. 577-611
2. Dellacherie E., Gref R. and Quéllec P.,
Les nanosphères "furtives" comme nouvelles formes galéniques injectables : espoirs et réalités.
in *médecine/sciences*. 2001. p. 619-626
3. Quintar-Guerrero D., Allemann E., Fessi H. and E. D.,
Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers.
Drug Dev. Ind. Pharm., 1998. **24**: p. 1113-1128
4. Aslani P. and Kennedy R. A.,
Studies on diffusion in alginate gels. I. Effects of crosslinking with calcium or zinc ions diffusion of acetaminophen.
J. Control. Release, 1996. **42**: p. 75-82
5. Aydin Z. and Akbuga J.,
Preparation and evaluation of pectin beads.
Int. J. Pharm., 1996. **137**: p. 133-136
6. Rastello-De Boisseson M.,
Microparticules d'alginate associatifs: élaboration, caractérisation et encapsulation de molécules actives. 2002, *doctorat de l'INPL*: Nancy
7. Cadee J. A., De Kerf M., De Groot C. J., Den Otter W. and Hennink W. E.,
Synthesis, characterization of 2-(methacryloyloxy)ethyl-(di-) L-lactate and their application in dextran-based hydrogels.
Polymer, 1999. **40**: p. 6877-6881
8. Cadee J. A., Van Lyun M. J. A., Brouwer L. A., Plantiga J. A., Van Wachen P. B., De Groot C. J., Den Otter W. and Hennink W. E.,
In vivo compatibility of dextran-based hydrogels.
J. Biomed. Mater. Res., 2000. **50**: p. 397-404
9. Van Dijk-Wolthuis W. N. E., Hoogeboom J. A. M., Van Steengergen M. J., Tsang S. K. Y. and Hennink W. E.,
Degradation and release behavior of dextran-based hydrogels.
Macromolecules, 1997. **30**: p. 4639-4645
10. Van Dijk-Wolthuis W. N. E., Tsang S. K. Y., Kettenes-Van Den Bosch J. J. and Hennink W. E.,
A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups : hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer.
Polymer, 1997. **38**: p. 6235-6242
11. Park H. and Park H.,
Issues of implantable drug delivery systems.
Pharm. Res., 1996. **13**: p. 1770-1776
12. Cadee J. A., De Groot C. J., Jiskoot W., Den Otter W. and Hennink W. E.,
Release of recombinant human interleukin-2 from dextran-based hydrogels.
J. Control. Release, 2002. **78**: p. 1-13

13. Franssen O., Vandervennet L., Roders P. and Hennink W. E.,
Degradable dextran hydrogels: controlled release of a model protein from cylinders and microspheres.
J. Control. Release, 1999. **60**: p. 211-221
14. Hennink W. E., Franssen O., Van Dijk-Wolthuis W. E. and Talsma H.,
Dextran hydrogels for the controlled release of proteins.
J. Control. Release, 1997. **48**: p. 107-114
15. Kabanov A. V., Batrakova E. V., Melik-Nubarov N. S., Fedoseev N. A., Dorodnich T. Y., Alakhov V. Y., Chekhonin V. P., Nazarova I. R. and Kabanov V. A.,
A new class of drug carriers : micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain.
J. Control. Release, 1992. **22**: p. 141-158
16. Kwon G. S. and Kataoka K.,
Block copolymer micelles as long circulating drug vehicules.
Adv. Drug Deliv. Rev., 1995. **16**: p. 295-309
17. Martin J. M.,
Future prospects for stealth liposomes in cancer therapy.
Oncology, 1997. **11**: p. 63-68
18. Kang E., Akiyoshi K. and Sunamoto J.,
Surface coating of liposomes with hydrophobized polysaccharides.
J. Bioact. Compat. Polym., 1997. **12**: p. 14-26
19. Cansell M., Parisel C., Jozefonvicz J. and Letourneur D.,
Liposomes coated with chemically modified dextran intract with human endothelial cells.
J. Biomed. Mater. Res., 1999. **44**: p. 140-148
20. Henriksen I., Smistad G. and Karlsen J.,
Interaction between liposomes and chitosan.
Int. J. Pharm., 1994. **101**: p. 227-236
21. Christensen K. L., Perderon G. P. and Kristensen H. G.,
Preparation of redispersable dry emulsions by spray drying.
Int. J. Pharm., 1994. **212**: p. 187-184
22. Benoit J.-P., Marchais H., Rolland H. and Vande Velde V.,
3. Biodegradable Microspheres : advances in production technology.,
in *Microencapsulation. Methods and industrial applications.*, S. Benita, Editor.
1996, Dekker, M.: New York, Basel, Hong Kong. p. 35-72
23. Alonso M. J.,
7. Nanoparticulate drug - Carrier technology.,
in *Microparticulate systems for delivery of proteins and vaccines.*, S. Cohen and H. Bernstein, Editors.
1996, Dekker, M.: New York, Basel, Hong Kong. p. 203-242
24. Kwon G. S.,
Block copolymer nanoparticles for Drug Delivery.
CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 1998. **15**: p. 481-512
25. Jain R. A.,
The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide - glycolide) (PLGA) devices.
Biomaterials, 2000. **21**: p. 2475-2490
26. Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., Fujioka S. and Hino T.,
Nanoparticulate systems for improved drug delivery.
Adv. Drug Deliv. Rev., 2001. **47**: p. 1-2

27. Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., Fujioka S. and Hino T.,
Pulmonary delivery of insulin with nebulized DL-lactide/glycolic copolymer nanospheres to prolong hypoglycemic effect.
J. Control. Release, 1999. **62**: p. 279-287
28. Lambert G., Fattal E. and Couvreur P.,
Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides.
Adv. Drug Deliv. Rev., 2001. **47**: p. 99-112
29. Brigger I., Dubernert C. and Couvreur P.,
Nanoparticulate in cancer therapy and diagnosis.
Adv. Drug Deliv. Rev., 2002. **54**: p. 631-651
30. Stolt M. and Södergard A.,
Use of monocarboxylic iron derivatives in the ring opening polymerisation of L-Lactide.
Macromolecules, 1999. **32**: p. 6412-6417
31. Rouzes C., Gref R., Léonard M., Delgado A. D. and Dellacherie E.,
Surface modification of poly(lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in an o/w emulsion/evaporation technique.
J. Biomed. Mater. Res., 2000. **50**: p. 557-565
32. Akiyoshi K., Kobayashi S., Schichibe S., Mix D., Baudys M., Kim S. W. and Sunamoto J.,
Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs : Complexation and stabilization of insulin.
J. Control. Release, 1998. **54**: p. 313-320
33. Krause H. J. and Rohdewald P.,
Preparation of gelatin nanocapsules and their pharmaceutical characterization.
Pharmaceut. Res., 1985. **2**: p. 239-243
34. Rajaonarynovy M., Vauthier C., Couarraze G., Puisieux H. and Couvreur P.,
Development of new drug carriers made from alginate.
J. Pharm. Sci., 1993. **82**: p. 912-917
35. Couvreur P., Rolland M. and Speier P.,
Biodegradable submicronic particles containing a biologically active substance and compositions containing them.
Patent N° US 4 329 332, 1982
US,
36. Gasco M. R., Morel S., Trotta M. and Viano I.,
Doxorubicine englobed in polybutylcyanoacrylate nanocapsules : behavior in vitro and in vivo.
Pharm. Acta Helv., 1991. **66**: p. 47-49
37. Couvreur P. and Vautier C.,
Poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles as drug carrier : present states and perspectives.
J. Control. Release, 1991. **17**: p. 187-198
38. Sosnowski S., Gadzinowski M. and Slomkowski S.,
Poly(L,L-lactide) microspheres by ring opening polymerization.
Macromolecules, 1996. **29**: p. 4556-4564
39. Slomkowski S., Sosnowski S. and Gadzinowski M.,
Polyesters from lactides and ϵ -caprolactone. Dispersion polymerization versus polymerization in solution.
Polym. Degrad. Stabil., 1998. **59**: p. 153-160

40. Slomkowski S., Sosnowski S., Gadzinowski M., Pichot C. and Elaissari A.,
Tailored synthesis of polyesters by dispersion ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone and lactides.
Macromol. Symp., 2000. **150**: p. 259-268
41. Zambaux M. F., Bonneaux F., Gref R., Maincent P., Dellacherie E., Alonso M. J., Labrude P. and Vigneron C.,
Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method.
J. Control. Release, 1998. **50**: p. 31-40
42. Zambaux M. F., Bonneaux F., Gref R., Dellacherie E. and Vigneron C.,
Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles.
J. Control. Release, 1999. **60**: p. 179-188
43. Bamford C., Middleton I., Al-Lamee K., Parprotny J. and Satake Y.,
Routes to bioactive hydrophilic polymers.
Polym. J., 1987. **19**: p. 475-483
44. Allemann E., Gurny R. and Doelker E.,
Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by irreversible salting-out process: influence of process parameters on particle size.
Int. J. Pharm., 1992. **87**: p. 247-253
45. Souhami R. L., Patel H. M. and Ryaman B. E.,
The effect of reticuloendothelial blockage on the blood clearance and tissue distribution of liposomes.
Biochim. Biophys. Acta, 1981. **674**: p. 374-371
46. Petrak K.,
Design and properties of particulate system carriers for intravascular administration.,
in *Pharmaceutical particulate carriers.*, A. Roland, Editor.
1993, Dekker, M.: New York
47. Müller B. G. and Kissel T.,
Camouflage nanospheres : a new approach to by-passing phagocytic blood clearance by surface modified particulate carriers.
Pharm. Pharmacol. Lett., 1993. **3**: p. 67-70
48. Peracchia M. T., Desmaële D., Couvreur P. and D'angelo J.,
Synthesis of novel poly(MePEG cyanoacrylate-co-alkyl cyanoacrylate) amphiphilic copolymer for nanoparticle technology.
Macromolecules, 1997. **30**: p. 846-851
49. Gref R., Minamitake Y., Peracchia M. T., Trubetskoy V. and Langer R.,
Biodegradable long-circulating nanospheres.
Sciences, 1994. **263**: p. 1600-1603
50. Bouillot P., Babak V. and Dellacherie E.,
Novel bioresorbable and bioeliminable surfactants for microsphere preparation.
Pharm. Res., 1999. **16**: p. 148-154
51. Rouzes C.,
Nanosphères à coeur poly(acide lactique) et couronne de dextrane : élaboration, propriétés et applications biomédicales. 2001, **doctorat de l' INPL**: Nancy
52. Jeong B., Choi Y., Bae Y., Zentner G. and Kim S.,
New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems.
J. Control. Release, 1999. **62**: p. 109-114

53. Jeong B., Bae Y. H. and Kim S. W.,
Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers.
J. Control. Release, 2000. **63**: p. 155-163
54. Quellec P., Gref R., Dellacherie E., Sommer F., Tran M. D. and Alonso M. J.,
Protein encapsulation within poly(ethylene glycol)-coated nanospheres. II. Controlled release.
J. Biomed. Mater. Res., 1999. **47**: p. 388-395
55. Quellec P., Gref R., Perrin L., Dellacherie E., Verbavatz J. and Alonso M. J.,
Protein encapsulation within poly(ethylene glycol)-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization.
J. Biomed. Mater. Res., 1998. **42**: p. 45-54
56. Dellacherie E.,
17. Polysaccharides in oxygen-carrier blood substitutes,
in Polysaccharides in medicinal applications, S. Dumitriu, Editor.
1996, Marcel Dekker, Inc: N. Y., Basel, Hong-Kong. p. 525-544
57. Yamaoka T., Kurooda M., Tabata Y. and Ikada Y.,
Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weight after intravenous administration to mice.
J. Pharm. Sci., 1994. **83**: p. 601-606
58. Osterberg E., Bergstrom K., Holmberg K., Scuman T., Riggs J., Burns N., Van Alstine J. and Harris J.,
Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations : comparison to PEG.
J. Biomed. Mater. Res., 1995. **29**: p. 741-747
59. Torchilin V.,
Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals.
J. Microencapsul., 1998. **15**: p. 1-19
60. Torchilin V. and Papisov M. I.,
"Hypothesis : why do poly(ethyleneglycol)-coated liposomes circulate so long?
J. Liposome Res., 1994. **4**: p. 725-739
61. Osterberg E., Bergstrom K., Holmberg K., Riggs J., Van Alstine J., Schuman T., Burns N. and Harris M.,
Comparison of polysaccharide and poly(ethylene glycol) coatings for reduction of protein adsorption on polystyrene surfaces.
Colloids Surfaces A. Physichem. Eng. Aspects, 1993. **77**: p. 159-169
62. Delgado A. D., Léonard M. and Dellacherie E.,
Surface modification of polystyrene nanoparticles using dextrans and dextran-POE copolymers : polymer adsorption and colloidal characterization.
J. Biomat. Sci. Polym. Ed., 2000. **11**: p. 139-1410
63. Jaulin N., Appel M., Passirani C., Bararatt G. and Labarre D.,
Reduction of uptake by macrophagic cell line of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methyl methacrylate).
J. Drug Target, 2000. **8**: p. 165-172

Partie IV

Partie expérimentale

Partie IV : Partie Expérimentale

I. PROTOCOLES OPERATOIRES DE SYNTHESSES	197
I.1. Matériels	197
I.2. Silylation du dextrane	198
I.3. Polymérisation du lactide.....	198
I.4. Déprotections	199
I.5. Test de stabilité du dextrane	200
II. ANALYSES INFRA-ROUGE (IRTF).....	201
III. CALORIMERIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE MODULE (MSDC).....	201
III.1. Principe	201
III.2. Mesure de la température de transition vitreuse (Tg)	202
III.3. Spécificité de la MDSC.....	202
III.4. Appareillage et conditions expérimentales :	203
IV. DETERMINATION DES MASSES MOLAIRES MOYENNES PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (SEC)	204
V. SPECTROSCOPIE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE, RMN	205
V.1. Conditions	205
VI. MESURE DES TENSIONS SUPERFICIELLES ET INTERFACIALES.....	207
VI.1. Tension superficielle	207
VI.2. Mesure des tensions interfaciales eau/dichlorométhane	208
VII. SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE.....	209
VII.1. Appareillage.....	209
VII.2. Protocole expérimental :	210
VIII. PREPARATION DES PARTICULES ET ETUDE DE LEURS CARACTERISTIQUES.....	213
VIII.1. Protocole de préparation des particules par le procédé « émulsion/évaporation » de solvant.	213
VIII.2. Caractérisation des particules.....	214
VIII.3. Détermination du taux de recouvrement des particules (Γ):	219
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	222

PARTIE IV :

PARTIE EXPERIMENTALE

I. PROTOCOLES OPERATOIRES DE SYNTHESSES

I.1. Matériels

Le dextrane T40 ($\overline{M}_w = 40\,000$ g/mol) utilisé est fourni par Pharmacia Biotech. Il est séché pendant une nuit sous vide dynamique à 100°C, directement dans le réacteur. Les réactifs suivants, fournis par Aldrich, sont utilisés sans purification : HDMS (hexaméthylidisilazane, 99 %), TMSCl (triméthylchlorosilane, 99 %), BSA (N,O-bis(triméthylsilyl)acétamide), NMI (N-méthylimidazaole), saccharine (99 %), HMPA (hexaméthylphosphoramide, 99 %), Bu_4NF (fluorure de tétrabutylammonium, solution à 1 mol/L dans le THF). La triéthylamine (NEt_3 , 99,5 %) a été séchée sur oxyde de baryum (BaO) pendant 72 heures, puis distillée sous pression réduite et stockée sous atmosphère inerte. Le D,L-lactide (97%) est un produit par Lancaster (U.K.). Avant chaque manipulation, il est recristallisé deux fois dans du toluène préalablement distillé, puis séché sous vide dynamique pendant une nuit dans le ballon où sera effectuée la polymérisation. L'octoate d'étain (2-éthylhexanoate d'étain II, SnOct_2) a été fourni par Aldrich. Il est rapidement stocké dans un ballon sous atmosphère inerte et dilué avec du toluène sec fraîchement distillé sur paroi froide. Cette solution (environ 10^{-2} mol/L) est utilisée sans purification ultérieure. L'isopropanol est mis à reflux sur le complexe sodium/benzophénone puis distillé et stocké sous atmosphère inerte.

Compte tenu de la réactivité des agents silylants et des centres actifs de la polymérisation, les réacteurs et les autres verreries utilisées lors de ces travaux sont séchées et flambées sous vide dynamique. Les manipulations ont lieu sous atmosphère inerte. Tous les solvants [toluène, diméthylsulfoxyde (DMSO), et le tétrahydrofurane (THF)] utilisés sont préalablement séchés à reflux sur CaH_2 . Après distillation, les solvants sont stockés sous atmosphère inerte et sur agent desséchant (polystyryl lithium pour le toluène, CaH_2 pour le

DMSO et complexe sodium/benzophénone pour le THF). Juste avant utilisation, ils sont à nouveau distillés sur paroi froide.

I.2. Silylation du dextrane

Un exemple de mode opératoire dans le cas de l'HDMS est donné ici :

25 ml de DMSO stockés sur CaH_2 et fraîchement distillés sur paroi froide, sont ajoutés par canule sous N_2 , sur 0,845g de dextrane ($5,2 \cdot 10^{-3}$ mol d'unités glucose) préséchés. Le dextrane est alors dissous en chauffant cette solution à la température désirée. 6,6 ml (2 mol/mol OH) de HDMS sont ensuite ajoutés sous azote par l'intermédiaire d'une seringue. Au besoin, la quantité désirée de TMSCl ou d'un autre catalyseur nucléophile (HMPA, NMI, Saccharine ou encore NEt_3) est ajoutée sous flux d'azote, à l'aide d'une seringue préflambée. La réaction s'effectue sur une période de 20 heures ou plus selon l'expérience réalisée. Dans le cas de l'utilisation d'un co-solvant, celui-ci est fraîchement distillé sur paroi froide puis introduit dans le réacteur, sous N_2 , par l'intermédiaire d'une canule. Cet ajout est réalisé dès le début de la réaction ou après précipitation effective du dextrane partiellement silylé. Après une nuit de réaction, le maximum de DMSO est évaporé. Le résidu jaune et visqueux obtenu est alors solubilisé dans du THF (10 ml/g de dextrane initial) puis reprécipité deux fois par de grandes quantités d'eau glacée (25 ml/ml de THF). On filtre alors le précipité blanc obtenu puis celui-ci est séché durant 48 heures sous vide dynamique.

Pour une silylation par la BSA, le protocole est identique au précédent en remplaçant l'HDMS par la BSA. Dans ce cas une gélification est rapidement observée (sous une $\frac{1}{2}$ h) en l'absence de co-solvant dans le milieu.

I.3. Polymérisation du lactide

Les polymérisations sont effectuées sous atmosphère inerte.

Le dextrane partiellement silylé est introduit dans un ballon préflambé puis subit trois distillations azéotropiques avec du toluène. Il est ensuite séché sous vide dynamique, dans ce même ballon à 50°C pendant une nuit.

Suivant les synthèses que nous avons réalisées, la quantité de toluène a été fixée à 5ml soit par g de lactide + dextrane silylé (Entrées 8 à 10, Tableau II-11, Chapitre II, Partie II) soit par g de lactide (toutes les autres expériences).

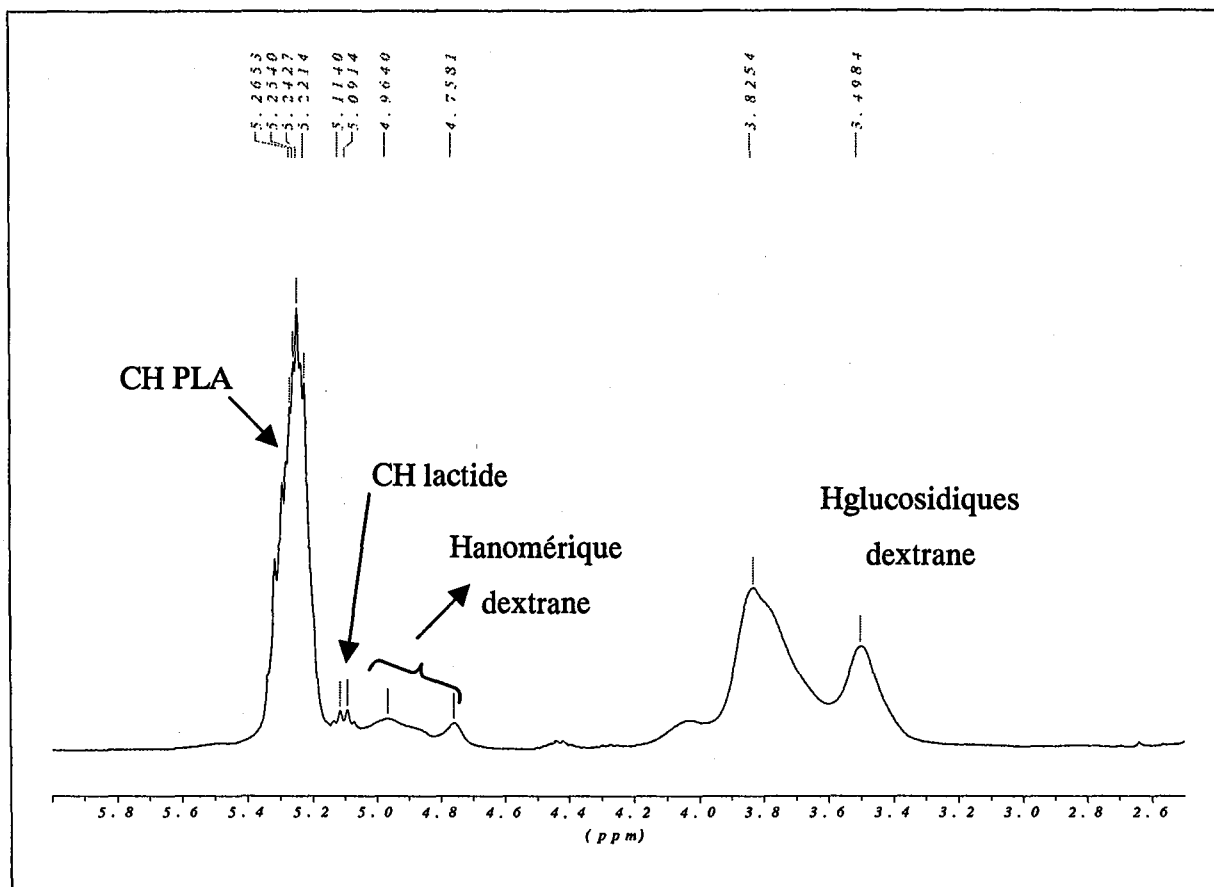


Figure IV-1 : Spectre RMN ^1H du brut de la polymérisation du D,L-lactide à partir du dextrane silylé.
Zone [2,6 -6] ppm

Une quantité nécessaire de toluène fraîchement distillée sur paroi froide est transférée par canule flambée sur ce dextrane silylé séché. La solution obtenue est ensuite introduite par canule, sous N₂, dans le ballon contenant le lactide. Le mélange est porté à 100°C. Une solution de concentration connue en SnOct₂, est ajoutée dans le réacteur de façon à obtenir le rapport relatif $R = [\text{SnOct}_2]/\text{OH}$ désiré. La polymérisation est poursuivie à cette température. Si nécessaire un prélèvement du brut est effectué pour déterminer le taux de polymérisation. Le système est refroidi et quelques gouttes d'une solution d'éthanol, contenant un peu d'acide acétique pur, sont ajoutées. Le polymère est précipité par de l'éthanol froid, puis séché sous vide dynamique à 50°C pendant une nuit.

Le taux de conversion en polymère est déterminé par analyse RMN ¹H du brut. Il est obtenu en comparant les aires respectives des signaux correspondant aux protons méthyne du polylactide (A_{CHPLA} , [5,15-5,4] ppm) avec ceux du monomères lactide ($A_{\text{CHlactide}}$, 5,1 ppm) (Figure IV-1 et Equation IV-1).

$$\text{Conv}(\%) = \frac{A_{\text{CHPLA}}}{A_{\text{CHPLA}} + A_{\text{CHlactide}}} \times 100 \quad (\text{IV-1})$$

I.4. Déprotections

I.4.1. *Dextrane silylé*

La quantité requise d'agent catalyseur est ajoutée à 1g de dextrane silylé dissous dans 20 ml de THF (5% en masse). Après 2 heures sous agitation à température ambiante, la solution est précipitée par de l'éthanol froid puis séchée sous vide à 50°C durant une nuit.

I.4.2. *Copolymère*

1g de copolymère (dextrane silylé)-g-polylactide est préalablement dissous dans 20 ml de THF (5% en masse). Une solution aqueuse (0,1 M) de HCl (0,02 moles/SiMe₃) est ajoutée et le mélange est laissé à température ambiante sous agitation durant 2 h. Le copolymère Dex-g-PLA est précipité par de l'éthanol froid, puis séché une nuit sous vide à 50°C.

Selon la proportion de PLA (F^{PLA}) qu'il comporte, le copolymère précipite, ou non, lors de son étape de déprotection.

I.5. Test de stabilité du dextrane

I.5.1. Blancs

3 g de dextrane sont séchés durant une nuit sous vide à 100°C. Une partie est prélevée pour analyse (**Deg1**).

Le dextrane restant est mis en solution dans le DMSO (30 ml/g de dextrane) à 80°C pendant 90 h. Le DMSO est ensuite évaporé sous vide durant quelques heures à 100 °C. Le produit obtenu est dissous dans du THF puis précipité 2 fois par de l'éthanol froid. Enfin, la poudre obtenue est séchée sous vide à 50°C durant deux jours. Une partie est alors réservée pour analyse. (**Deg 2**).

Le produit restant est solubilisé dans du toluène et trois distillations azéotropiques sont effectuées. Après redissolution dans du toluène, il est ensuite chauffé pendant 20h sous agitation à 100°C, précipité à nouveau par de l'éthanol froid et séché une nuit sous vide à 50°C. Le composé alors obtenu (**Deg 3**) ainsi que les deux précédents sont finalement analysés en chromatographie d'exclusion stérique (SEC-MALLS, phase aqueuse).

I.5.2. Dextrane

1 g de dextrane est mis en suspension dans le THF (5% en masse). Le rapport r d'une solution d'agent catalyseur ($r = \frac{[Catalyseur]}{[SiMe_3]}$), calculé dans l'hypothèse d'un dextrane totalement silylé, est alors ajouté. Après 2h sous agitation à température ambiante, le dextrane gonflé par l'eau du milieu est prélevé, redissous dans de l'eau puis précipité par l'éthanol froid. Il est ensuite séché une nuit sous vide à 50°C.

I.5.3. PLA

1 g de polylactide est mis en suspension dans le THF (5% en masse). L'influence des différents agents catalyseurs de la réaction de déprotection peut être testée.

Pour calculer la quantité de catalyseur à introduire, on prend comme référence un copolymère silylé présentant une fraction massique moyenne en polylactide (F_w^{PLA}) de 0,66 (ce qui comporterait alors une masse de dextrane silylé égale à $\frac{1 - F_w^{PLA}}{F_w^{PLA}} \times m_{PLA}$ = 0,52×1 = 0,52 g). Si ce dextrane est supposé entièrement silylé, la quantité maximale

d'agent catalytique à ajouter dans les conditions considérées peut alors être calculée par $0,52 \times 3/162,142 \times r$ moles de catalyseur.

Après 2h sous agitation à température ambiante, le polylactide est précipité par l'éthanol froid. Il est ensuite séché une nuit sous vide à 50°C.

II. ANALYSES INFRA-ROUGE (IRTF)

Les mesures ont été réalisées par transmission, à travers des pastilles de KBr, à l'aide d'un spectromètre Bruker IFS 25. Le système de mesure est maintenu sous atmosphère sèche et exempt de dioxyde de carbone à l'aide d'un flux d'azote.

Ces pastilles de KBr ont été réalisées à l'aide d'un mélange de 2 mg de produit et de 200 mg de KBr sec compressé à 2 bars.

Les spectres sont enregistrés 5 minutes après l'introduction de la pastille dans la cellule de mesure afin d'éliminer le dioxyde de carbone et l'humidité ainsi introduite. 64 scans sont réalisés. Avant chaque série de mesure une pastille de KBr est analysée afin de mesurer le bruit de fond, lequel est soustrait aux spectres des produits analysés.

III. CALORIMÉRIE DIFFÉRENTIELLE À BALAYAGE MODULE (MSDC)

III.1. Principe

La calorimétrie différentielle à balayage (ou Differential Scanning Calorimetry) est une technique permettant de suivre le débit de chaleur (variation d'enthalpie) d'un échantillon, en fonction du temps ou de la température, tout en contrôlant la température de cet échantillon sous une atmosphère donnée (Hélium pour l'appareil que nous utilisons).

Cette méthode repose sur l'aspect différentiel de la mesure : on place dans une enceinte calorimétrique deux fours jumeaux, l'un contenant une substance référence et l'autre l'échantillon. La comparaison des températures des deux fours, fournies par thermocouple, permet à un générateur de puissance de moduler le flux thermique pour maintenir identiques

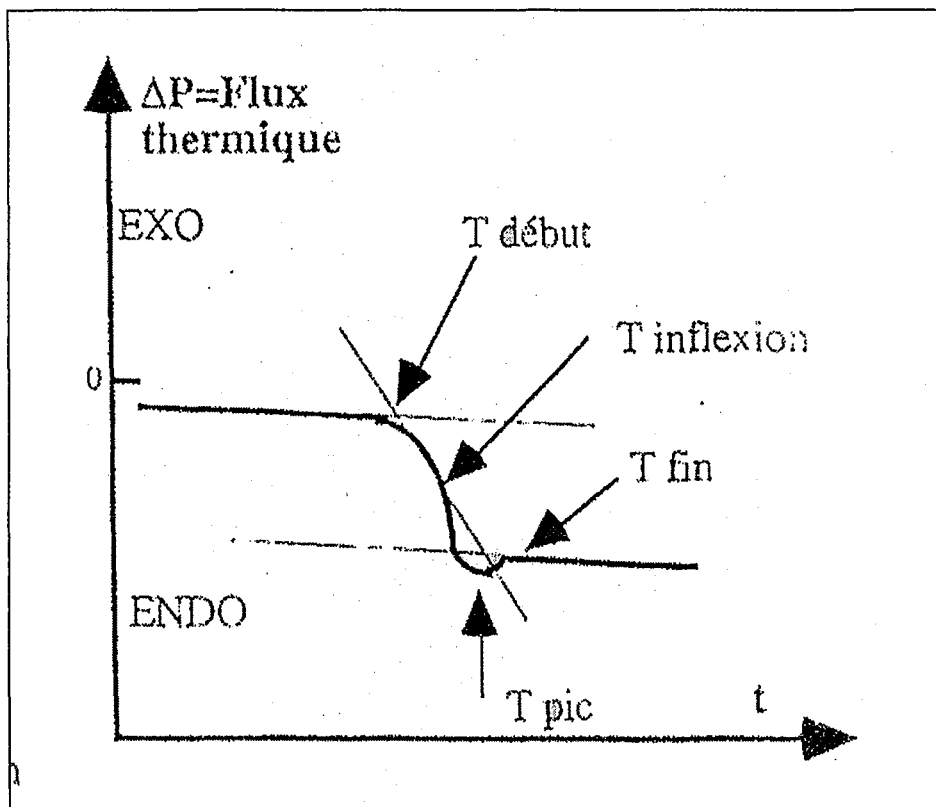


Figure IV-2 : Thermogramme type d'une température de transition vitreuse

les températures des deux fours. On peut ainsi mesurer l'énergie absorbée ou dégagée par l'échantillon à analyser.

Il est alors possible de mettre en évidence et de quantifier certains phénomènes physiques (fusion, cristallisation, déshydratation) ou chimiques (variation d'enthalpie ΔH et de la chaleur spécifique C_p). Ainsi, la pureté ou/et les caractéristiques de changement d'état d'un composé donné peuvent être étudiées. Pour les polymères, il est notamment possible d'analyser la compatibilité d'un mélange de polymères de natures différentes ou encore de déterminer leur température de transition vitreuse, l'existence de phases cristallines....

La mesure calorimétrique correspond donc à la mesure d'un échange de chaleur, et deux types de phénomènes peuvent être observés :

- exothermique : l'échantillon fournit de la chaleur au système (ex : la cristallisation),
- endothermique : l'échantillon absorbe de la chaleur du système (ex : la fusion).

III.2. Mesure de la température de transition vitreuse (T_g)

Cette transformation correspond au passage de l'état vitreux à l'état caoutchoutique. Sur un thermogramme obtenu par DSC, elle est caractérisée par un décalage de la ligne de base dû aux changements de capacité calorifique entre ces deux états.

Elle peut être déterminée par trois méthodes (Figure IV-2) :

- Température du pic T_{pic}
- Température du point d'inflexion
- Température du début ou de fin de la transition

Nous utiliserons la température du point d'inflexion. La T_g peut être influencée par de nombreux paramètres : masse molaire moyenne et polymolécularité de l'échantillon, présence d'un plastifiant, vitesse de refroidissement, taux de cristallinité de l'échantillon, l'histoire thermique et chimique de l'échantillon.

III.3. Spécificité de la MDSC

Lorsque la température à laquelle sont soumis les deux fours augmente linéairement, la DSC présente l'inconvénient de donner des résultats en général assez loin de l'équilibre thermodynamique. De plus, le flux de chaleur obtenu comporte souvent des contributions dues à des phénomènes irréversibles indésirables. Ainsi, dans le cas des polymères, ces

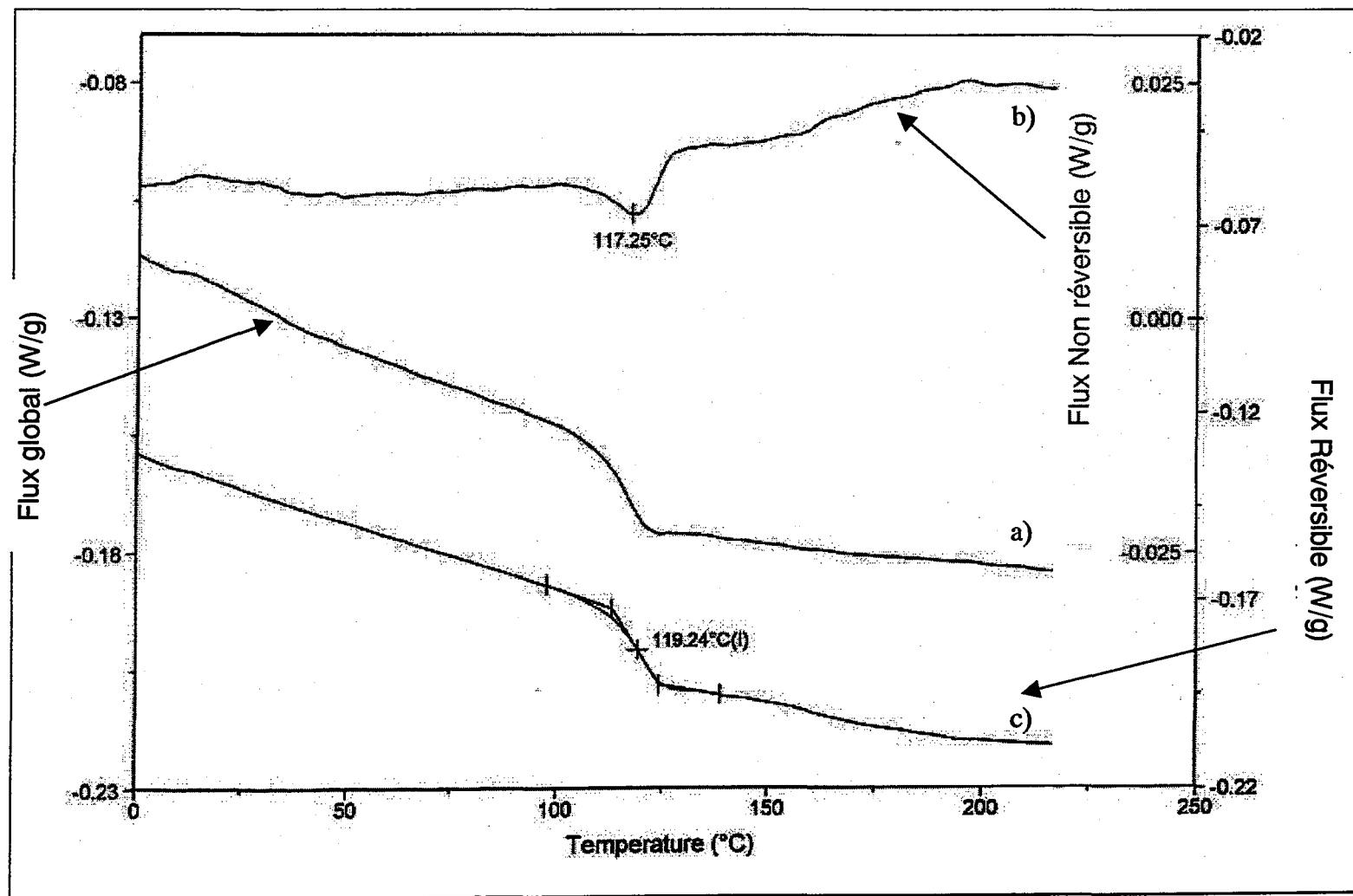


Figure IV-3: Thermogramme MDSC- Détermination de la T_g

a) Flux Global

b) Flux Non réversible

c) Flux Réversible

transformations irréversibles peuvent être des fusions de zones cristallines (intéressantes lors de l'étude de la cristallinité d'un échantillon), mais également les phénomènes de relaxations de chaînes ou d'autres contributions liées à l'histoire de l'échantillon. Ces contributions viennent perturber la détermination des phénomènes réversibles comme celle de la Tg.

Afin de résoudre ces problèmes, il est possible d'utiliser une programmation discontinue de température selon la loi (Equation IV-2).

$$T = T_0 + B \cdot t + A \times \sin(\omega t) \quad (IV-2)$$

avec

t temps,

T température,

T₀ température initiale

B gradient de température

A amplitude de la modulation

ω fréquence des oscillations

Ceci permet de créer une modulation de température de l'échantillon et donc du signal calorimétrique. Par calcul simple, il est alors possible d'extraire trois informations [1, 2] (Figure IV-3) :

- A l'aide du niveau continu (augmentation simple de température, (T₀ + B t) correspond à loi de température en DSC classique), il est possible d'obtenir le flux de chaleur apparent (flux global), obtenu habituellement sans modulation de température.

- Avec la modulation de température, il est possible de séparer les contributions dues à des phénomènes réversibles de celles provenant de transformations irréversibles. Ainsi dans le cas de l'étude d'une Tg (phénomène réversible), les phénomènes irréversibles tels que les relaxations de chaînes dues à l'histoire de l'échantillon peuvent être éliminés. L'étude se limite alors à celle du thermogramme réversible, à partir duquel on peut déterminer nettement la valeur de la Tg.

III.4. Appareillage et conditions expérimentales :

Ces mesures ont été effectuées au Service des Matériaux Polymères et Composites (SMPC, Université de Mons Hainaut). L'appareil utilisé préalablement étalonné est un appareil de DSC modulé fabriqué, par T. A. Instruments (2920 CE).

Les mesures calorimétriques sont réalisées de -50°C à 200°C dans des creusets en aluminium sous une atmosphère contrôlée d'hélium. Un gradient de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et une modulation d'amplitude de 1°C effectuée sur une période de 60 s caractérisent l'augmentation de température. Avant la mesure, un cycle complet (montée en température et retour à la température initiale) est effectué afin d'effacer "l'histoire thermique" de l'échantillon.

IV. DETERMINATION DES MASSES MOLAIRES MOYENNES PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (SEC)

Selon la nature hydrosoluble ou organosoluble des produits, deux systèmes (en phase aqueuse ou en phase organique) ont été employés.

IV.1.1. SEC-MALLS Phase aqueuse

IV.1.1.1. Système

Le système de chromatographie d'exclusion stérique (SEC-MALLS) est constitué d'une pompe Waters 590 (débit = $0,7\text{mL}/\text{min}$), d'un dégazeur (Degazys DG 1310, Uniflow), d'une boucle d'injection de $200\ \mu\text{l}$, d'une vanne rhéodyne reliée à une boucle d'injection de $20\ \mu\text{l}$ et d'un système « by-pass » et d'une série de colonnes Shodex (SB-806, 805, 804 HQ) avec une pré-colonne de même type. Un photodiffusiomètre de modèle miniDawn (Wyatt Technology Corporation) ($\lambda = 690\ \text{nm}$) est situé à la sortie des colonnes. Il est constitué de trois photodiodes qui mesurent l'intensité diffusée à 45° , 90° et 140° . Un réfractomètre différentiel de type Waters 410 est également installé en série.

Les valeurs des rapports (dn/dC) ont été calculées directement par le logiciel après injection de quantités connues et intégration du pic obtenu par le signal réfractométrique. Les valeurs de dn/dC obtenues pour chaque produit analysé par ce système sont proches de $0,146$ [(dn/dC) du dextrane]. Cette valeur a été utilisée pour l'étude des copolymères hydrosolubles.

IV.1.1.2. Mode opératoire:

L'éluant (eau, NaNO_3 ($0,1\text{M}$), NaN_3 ($6,5 \cdot 10^{-3}\ \text{M}$)) est préparé avec de l'eau milliQ (système de filtration Millipore), puis filtré sur membrane Millipore de $0,1\ \mu\text{m}$. Les solutions de polymères ($10\ \text{g/L}$) sont préparées la veille dans l'éluant, puis filtrées sur des filtres Millex

HA de 0,45 μm . Les solutions sont injectées trois fois et les courbes sont traitées selon la méthode du Zimm.

IV.1.2. SEC -Phase organique

IV.1.2.1. Système

Excepté l'absence du photodiffusiomètre par la lumière, le système est analogue au précédent. Il comprend une pompe Merck L-6200 A (débit = 0,7 mL/min) équipée d'un dégazeur, d'une vanne rhéodyne reliée à une boucle d'injection de 20 μL , d'un système « bypass », et d'une série de colonnes Polymer Laboratories (PLgel mixed D 5 μm) précédées d'une précolonne. Un réfractomètre différentiel Merck (RI-71) se trouve en sortie des colonnes.

IV.1.2.2. Mode opératoire:

L'éluant utilisé est du THF (Merck, AnalaR). Il est régulièrement récupéré et distillé. Après ajout de stabilisant (2,6-Di-tert-butyl-4-méthylphénol, 250 ppm), l'éluant est filtré sur Anodisc 47 (0,2 μm , Whatmann). Les solutions à analyser (20 g/L) sont préparées la veille, puis filtrées sur filtres Nylaflo 13 mm (0,2 μm , Pall Gelman Sciences).

Une courbe de calibration à l'aide de polystyrènes standards est employée pour calculer les masses molaires moyennes.

V. SPECTROSCOPIE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE, RMN

V.1. Conditions

Les spectres RMN ont été réalisés à 25°C à l'aide d'un spectromètre Brüker Avance 300. Les champs utilisés sont 300,13 Mhz pour les expériences RMN ^1H et 75,47 Mhz pour les RMN ^{13}C . Les concentrations en produits sont respectivement de 45 g/l pour la RMN ^1H et la RMN 2D et de 200 g/L pour la RMN ^{13}C .

V.1.1. RMN 1D

^1H

Nombre de scans : 64 scans

Points d'acquisition : 64 Ko.

Fréquence utilisée : 300,13 MHz

Fenêtre d'apodisation : exponentielle décroissance. LB=0,3 Hz.

¹³C

[Polymère]=200 g/L

Découplage des protons

Nombre de scans : 4096 scans (6144 scans si le spectre est réalisé dans des conditions quantitatives)

Points d'acquisition : 64 Ko.

Fréquence utilisée : 75,47 MHz

Fenêtre d'apodisation : exponentielle décroissance. LB=15 Hz.

t relaxation : 6s (pour les conditions quantitatives)

V.1.2. RMN 2D

H-COSY 45° (Proton Correlation spectroscopy)

Cette méthode permet de mettre en évidence les corrélations entre des protons voisins. Les spectres (64 scans) ont été réalisés avec 2048 points dans le domaine d'acquisition dont 128 en t_1 (première dimension). Avant le traitement par Transformée de Fourier, un « zero-filling » sur t_1 est effectué jusqu'à 512 et les données ont ensuite été traitées avec une fonction sine sur les deux dimensions.

HMOC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)

Cette méthode permet de mettre en évidence les corrélations entre hydrogènes et carbones. Les spectres ont été enregistrés sur 32 scans avec 1024 points dont 256 en t_1 . Un « zero-filling » sur t_1 a été effectué jusqu'à 512 et les données ont été corrigées avec des fonctions cosinus dans les deux dimensions.

VI. MESURE DES TENSIONS SUPERFICIELLES ET INTERFACIALES

VI.1. Tension superficielle

La technique de la plaque de Wilhelmy est l'une des plus simples et des plus utilisées. Ce système consiste en une plaque rectangulaire mince et verticale, suspendue au bras d'une balance tarée. Il s'agit d'immerger une partie de la plaque dans la solution à étudier, puis de la remonter jusqu'à la position limite où la plaque est uniquement retenue par les molécules présentes à la surface de la solution. La tension de surface de la solution se manifeste alors par la formation d'un ménisque de solution suspendu à la plaque. La force de rétention F de ce ménisque est mesurée et est liée à la tension superficielle par la relation donnée dans l'équation IV-3:

$$F = p \cdot \sigma \cdot \cos \theta \quad (IV-3)$$

où p est le périmètre immergé,

σ la tension superficielle du liquide

et θ est l'angle de contact.

VI.1.1. Mode opératoire utilisé à 25 °C :

Une solution mère du polymère à étudier est préparée 48h avant la mesure (solubilisation pendant 24h à température ambiante). Les solutions de polymères à différentes concentrations sont préparées la veille directement dans les piluliers de mesure par dilution de la solution mère avec de l'eau osmosée (système de filtration Millipore), puis laissées au repos pendant la nuit à 4 °C. Pour cela, les piluliers sont préalablement nettoyés avec de l'acide sulfochromique (afin d'éliminer toute trace organique) puis abondamment rincés à l'eau et séchés.

Les mesures de tension superficielle sont effectuées à l'aide d'un tensiomètre K-10 ST (Kruss). Le pilulier contenant la solution à étudier est maintenu à 25°C dans un bain thermostaté. La plaque rectangulaire utilisée est constituée de platine. Entre chaque mesure, la plaque est nettoyée avec de l'eau osmosée, rincée à l'acétone, passée sous une flamme et réutilisée après refroidissement. Après calibration, l'appareil permet d'obtenir directement la

valeur de la tension superficielle σ d'après la valeur mesurée M , selon la relation présentée dans l'équation (IV-4) :

$$\sigma \text{ (mN/m)} = 6,5007 \cdot 10^{-3} + 3,1717 \times M \quad (\text{IV-4})$$

Pour chaque solution, une étude cinétique préalable est indispensable afin de déterminer le temps nécessaire à la solution pour atteindre l'équilibre thermodynamique après immersion de la plaque. Ce temps varie de quelques secondes à quelques minutes selon la nature et la concentration en polymère. Une durée de 5 min a été choisie après avoir vérifié, dans chaque cas, que l'équilibre était bien atteint (invariance des mesures de σ).

VI.1.2. Mode opératoire utilisé à 47°C :

Le mode opératoire est le même qu'auparavant. Les solutions sont solubilisées à 37°C et maintenues à cette même température pendant leur période de repos et d'attente (la température utilisée durant ces deux jours ne conduit pas à une dégradation du copolymère qui commence à être observée après 4 jours à 37°C). Les piluliers sont ensuite placés dans l'appareil thermostaté à 47°C. Les mesures sont effectuées après 10 minutes.

VI.2. Mesure des tensions interfaciales eau/dichlorométhane

La technique employée est identique à celle utilisée pour les mesures de tension superficielle. Seul le dispositif change : en effet, la plaque de Wilhelmy est remplacée par un anneau (*Méthode de l'anneau de Du Noüy*) qui, tout comme la plaque, est suspendu au bras d'une balance tarée. Dans ce cas, la force de rétention F mesurée est liée à la tension interfaciale par une équation identique à IV-2, où σ représente alors la tension interfaciale.

VI.2.1.1. Mode opératoire utilisé :

Une solution mère est préparée 3 jours à l'avance (solubilisation pendant 24h à 4°C pour éviter une évaporation). Les solutions du copolymère (10^{-7} à 10g/L) sont préparées par dilution avec du dichlorométhane pur (récemment distillé et conservé à l'abri de la lumière), dans des piluliers préalablement nettoyés. Elles sont agitées pendant la journée à 4°C et à l'abri de la lumière, puis laissées au repos pendant la nuit à 4°C.

Le lendemain, les interfaces sont préparées en introduisant 20 ml de phase organique puis 10 mL d'eau osmosée. 24h sont ensuite attendues pour atteindre l'équilibre thermodynamique avant chaque mesure.

Les mesures de tension interfaciale sont toujours effectuées à l'aide d'un tensiomètre K-10 ST (Kruss). L'anneau est délicatement placé dans la phase aqueuse. Après avoir attendu quelques minutes que la stabilisation thermique soit assurée, l'anneau est poussé vers la phase organique. La valeur mesurée M est corrigée par un facteur G déterminé par l'équation IV-5 et par le ratio R (Equation IV-6) :

$$G = 0,71827 * \left(\frac{M}{D - d} \right)^{0,077012} \quad (\text{IV-5})$$

où D représente la densité de l'eau et d celle du dodécane.

$$R = \frac{\sigma_{\text{eau / air}}}{72} \quad (\text{IV-6})$$

$\sigma_{\text{eau/air}}$: tension superficielle de l'eau mesurée le même jour à l'aide de l'anneau et exprimée en mN/M , (valeur théorique : 72mN/M).

La tension interfaciale est donc obtenue grâce la formule (IV-7) :

$$\sigma = M \times G \times R \quad (\text{IV-7})$$

VII. SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

Ces études ont été réalisées en collaboration avec le Département de Chimie-Physique des Réactions (DCPR, UMR7630 CNRS-INPL).

VII.1. Appareillage

VII.1.1. Spectrofluorimètre

Les spectres de fluorescence en excitation continue sont enregistrés sur un spectrofluorimètre SPEX (Fluorolog-2). Cet appareil est équipé d'une lampe xénon (450W) dont l'image est focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur d'excitation (de type 1681 ; bande passante (nm) = largeur de la fente (mm) x 3,77) : le monochromateur permet

de sélectionner la longueur de la lumière d'excitation (λ_{ex}). Afin de compenser les fluctuations et les variations d'intensité dues au vieillissement de la lampe, un système de référence est utilisé : il contient une cuve de référence (solution de Rhodamine B dans l'éthylène glycol, (0,02M). Les spectres sont alors enregistrés par rapport au signal de cette référence.

L'appareil comporte également un monochromateur d'analyse (de même de type que celui d'excitation). Il permet de choisir la longueur d'onde d'analyse et de sélectionner la lumière qui provient de la cellule positionnée à 90°C. Les largeurs de fentes ont été fixées à 0,5 mm (soit une bande passante=1,885 nm).

Le système de détection utilisé est un photomultiplicateur de type Hamamatsu R928 utilisé en compteur de photons. Placé à la sortie du monochromateur d'analyse, il détecte la quantité de lumière correspondant à la longueur d'onde d'émission (λ_{em}) et génère un signal qui est stocké puis analysé. L'intensité émise en coups par seconde (cps) peut ainsi être obtenue en fonction de la longueur d'onde d'émission. On obtient alors le spectre d'émission de fluorescence.

Les expériences sont réalisées à 25°C dans la cellule de mesure qui est placée à l'abri de la lumière.

VII.2. Protocole expérimental :

La mesure de l'intensité émise par fluorescence est une mesure relative qui est liée à l'appareillage (lampe, monochromateur, fentes,...). C'est pourquoi le spectre d'émission de fluorescence d'une solution de référence (solution aqueuse de fluorescéine à 0,16mg/L) est réalisé avant chaque série de mesure ($\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$ et intensité mesurée à $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$).

Des mesures quantitatives (mesures de l'intensité émise en sortie à 90°C) ne sont réalisables que pour de faibles absorbances ($\text{DO} < 0,2$). Pour vérifier cela, un spectre UV des solutions à analyser est réalisé à λ_{ex} sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 2. De faible concentration en sonde de fluorescence ont été utilisées ($C \approx 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$).

VII.2.1. Analyse des copolymères hydrosolubles

VII.2.1.1. Sondes de fluorescence

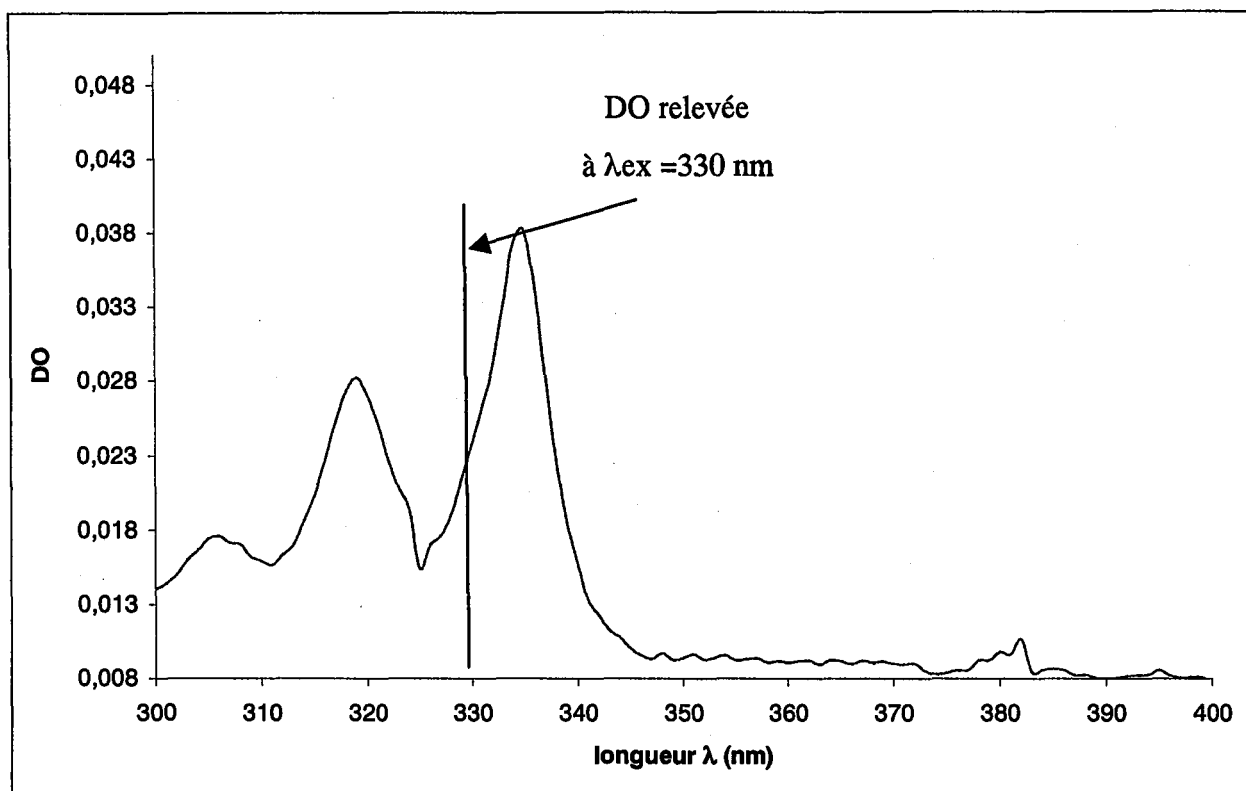


Figure IV-4 : Spectre d'adsorption du pyrène dans l'eau.

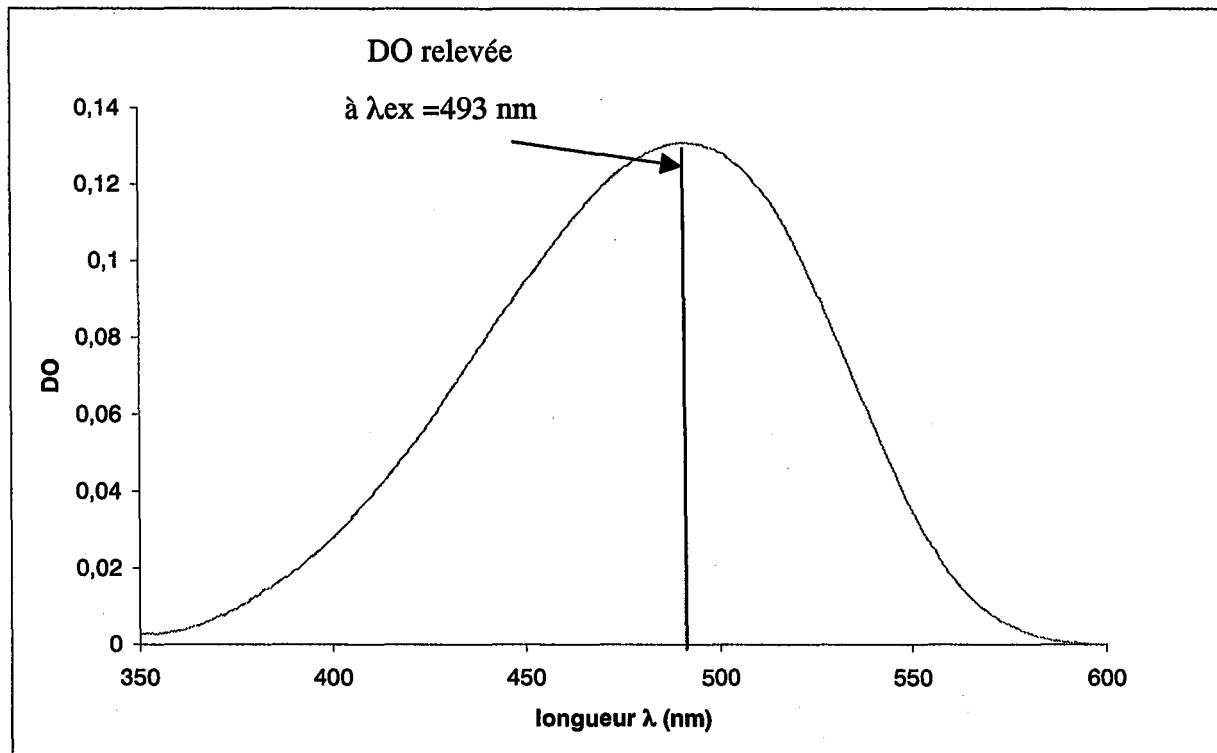


Figure IV-5 : Spectre d'adsorption du DMAC dans l'eau.

Le pyrène utilisé est de haute pureté (> 99,9 % - n°177 - Community Bureau of Reference - Bruxelles). Le rotor DMAC (4-(N,N-diméthylamino)-cinnamylidène) a été synthétisé au DCPR par la méthode de Knoevenagel [3]. Des solutions « mère » de sondes à 1 mmol/L ont été préparées dans de l'éthanol absolu puis stockées au frigo.

VII.2.1.2. Préparation des solutions de polymères

Des solutions mères de copolymère (de 0,5 à 10 g/L) sont préparées dans de l'eau osmosée et maintenues sous agitation à 20°C. Au bout de 24 heures, des solutions filles de diverses concentrations (5 ml) sont préparées par dilution des solutions mères avec de l'eau osmosée. 5 µL, de la solution mère de pyrène, (respectivement 18 µL, dans le cas du rotor DMAC) sont ensuite ajoutées à chaque solution de polymère, ce qui permet d'assurer une concentration finale en sonde constante et égale à $1,1 \cdot 10^{-6}$ mol/L pour le pyrène (respectivement $3,3 \cdot 10^{-6}$ mol/L pour le DMAC). Toutes les solutions sont réalisées à 20 °C, à l'abri de la lumière.

VII.2.1.3. Mesures effectuées

L'absorbance des solutions de polymère a été mesurée avec et sans témoin de fluorescence par spectrophotométrie UV-Visible. Aux plus fortes valeurs d'absorbance, son effet d'absorbance sur le spectre de fluorescence a ainsi pu être corrigée (Equation IV-8). L'absence d'émission de fluorescence notable pour les solutions de polymère (sans ajout de sonde) a également été vérifiée.

Pyrène :

Un spectre d'adsorption du pyrène dans l'eau pure est donné dans la Figure IV-4. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 330 nm. Les spectres d'émission (cf. Chapitre I, Partie III) sont obtenus à 25 °C, et enregistrés entre 350 et 500 nm. Les valeurs des intensités des bandes à 372 nm (I_1) et 383 nm (I_2) sont relevées pour chaque solution.

Rotor DMAC

Un spectre d'adsorption du DMAC dans l'eau pure est donné dans la Figure IV-5. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 493 nm. Les spectres d'émission de fluorescence sont obtenus à 25 °C et enregistrés entre 510 et 700 nm (cf. Chapitre I, Partie III). Pour chaque solution, les valeurs de la longueur d'onde au maximum de fluorescence (λ_{max}) et de l'aire d'intégration (après correction de la ligne de base) sont déterminées. Une solution témoin

contenant uniquement le rotor est mesurée avant chaque série de mesure. Elle sert de référence afin de déterminer le rendement quantique de fluorescence (ϕ_f/ϕ_0) selon la formule donnée à l'équation IV-8.

$$\frac{\phi_f}{\phi_0} = \frac{A \times (DO)_0}{A_0 \times (DO)} \quad (IV-8)$$

avec (ϕ_f/ϕ_0) = rendement quantique de fluorescence

A = aire sous la courbe d'émission de fluorescence (entre 510 et 700 nm) après correction de la ligne de base,

(DO) = densité optique à la longueur d'onde d'excitation de la solution (polymère + témoin de fluorescence), mesurée au spectrophotomètre UV.

$(DO)_0$ = densité obtenue pour la solution témoin (rotor seul).

VII.2.2. Analyse des copolymères organosolubles

VII.2.2.1. Matériel

L'ANS (acide 1-anilidonaphthalène-8-sulfonique) de haute pureté provient de Molecular Probes (Leiden, Pays Bas). Une solution mère (2,5 mmol/L) est préparée dans de l'éthanol absolu (qualité spectrophotométrique). Le toluène utilisé est de qualité spectrophotométrique (pureté > 99,5% et [eau] < 0,3%) et l'eau est osmosée.

VII.2.2.2. Préparation des solutions

Une solution de polymère dans le toluène (5 g/L) est préparée 48h à l'avance et laissée sous agitation pendant 24h à 25°C. Dans un pilulier propre et sec, une faible quantité de solution éthanolique du témoin de fluorescence (environ 30µL) est introduite. L'éthanol s'évapore à l'abri de la lumière durant une heure. La solution de polymère (y mL) est ensuite introduite dans le pilulier, de telle sorte que la concentration d'ANS dans la solution soit alors de $2,8 \cdot 10^{-6}$ mol/L. La solution A ainsi obtenue est maintenue sous agitation durant une heure à l'abri de la lumière.

Une solution B, contenant la quantité maximale d'eau ajoutée dans le milieu pour ces expériences, est réalisée à partir d'une partie de la solution A précédente : par exemple une solution B contenant 10 mg d'eau /mL est réalisée en introduisant 90,5 mg d'eau (90,5 µL) dans 7,8 g (soit 8,96 mL) de solution A. A partir des solutions A et B sont réalisées diverses

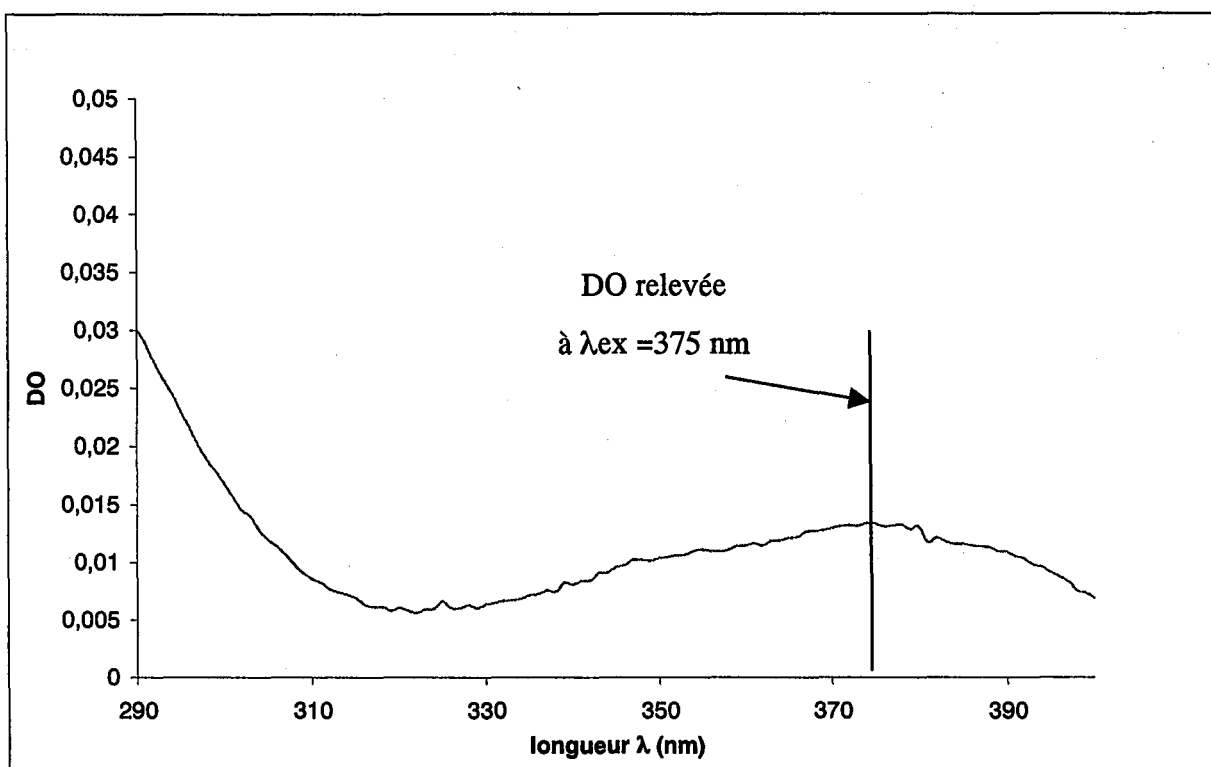


Figure IV-6 : Spectre d'adsorption de l'ANS.

solutions (1,5 mL) contenant la quantité voulue d'eau (x mL de A et $1,5-x$ mL de B). Les quantités exactes d'eau de ces solutions sont recalculées à partir des masses exactes pesées lors de leur réalisation. Les solutions obtenues sont alors agitées à l'abri de la lumière pendant $\frac{1}{2}$ heure puis laissées au repos toute la nuit.

VII.2.2.3. Mesures effectuées

Les mesures sont réalisées dans des cuves en quartz de longueur 1cm.

Un spectre d'absorption de l'ANS a été effectué et une longueur d'onde d'excitation de 375 nm a été choisie (Figure IV-6). L'absorbance et la fluorescence des solutions de polymère (sans ANS) ont été mesurées afin de vérifier que le polymère n'absorbe et ne fluorescence pas de façon notable à cette longueur d'onde d'excitation. Si nécessaire, l'absorption et l'émission de fluorescence des solutions (polymère + ANS) sont corrigées.

Les spectres d'émission sont obtenus à 25 °C et enregistrés entre 400 et 600 nm. Pour chaque solution, $\lambda_{\max}$ est déterminée et une déconvolution en deux composantes (correspondant à deux bandes, cf. Partie III, Chapitre I) est effectuée (Figure IV-7). La déconvolution est réalisée en considérant chaque bande comme une gaussienne. Les valeurs des maxima de ces bandes (λ_1 et λ_2) et de leurs aires (A_1 et A_2) peuvent alors être obtenues.

VIII. PREPARATION DES PARTICULES ET ETUDE DE LEURS CARACTERISTIQUES.

VIII.1. Protocole de préparation des particules par le procédé « émulsion/évaporation » de solvant.

Le PLA employé pour réaliser la matrice des nanoparticules est un poly (D,L-lactide) (Sigma, $\overline{M}_w$ fournisseur $\approx 100\,000$ g/mol). Ses caractéristiques ont été déterminées par SEC-MALLS (Eluant : THF, $dn/dc=0,054$) : $\overline{M}_n \approx 35\,000$ g/mol et indice de polymolécularité= 1,4.

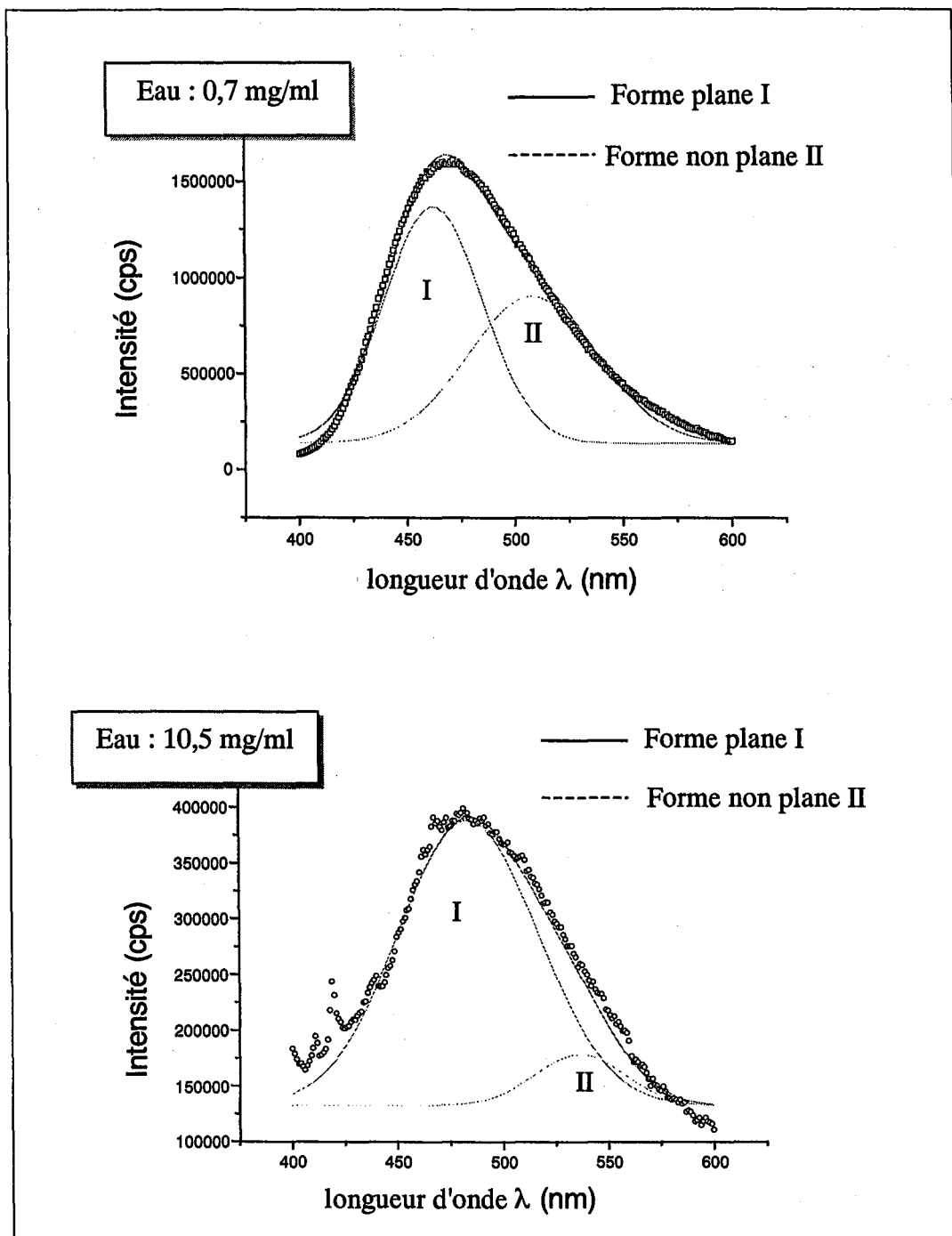


Figure IV-7 : Exemples de déconvolution du spectre d'émission de fluorescence de l'ANS

VIII.1.1. Préparation de particules « nues »

10 ml de solution de cholate de sodium (0,3% en masse) sont préparés. 25 mg de PLA sont dissous dans 1 ml de dichlorométhane. Une émulsion huile/eau de ces deux solutions est réalisée par l'utilisation d'un vortex pendant 30 s suivi par une sonification d'une puissance 10 W en mode pulsé (50% de cycle actif, pulse de 1s) pendant 1mn. Le solvant organique est ensuite évaporé, à température ambiante, à l'aide d'un évaporateur rotatif pendant 20 mn. La suspension de particules est lavée par 3 centrifugations successives de 10 mn à 12000 tr/mn.

VIII.1.2. Copolymères hydrosolubles

(10×R) mL d'une solution de PLA dans le dichlorométhane (25 g/L) (où R=Volume phase organique /Volume phase aqueuse) sont versés sur 10 mL d'une solution aqueuse de dextrane-g-poly lactide. Les particules sont alors obtenues par le même protocole que précédemment.

VIII.1.3. Copolymères organosolubles

Une solutions mère de dextrane-g-PLA (ou de copolymère + PLA) à 25 g/L est préparée dans le chloroforme. 0,5 mL de cette solutions est ajouté à 5 ml d'eau MilliQ. Les particules sont ensuite obtenues comme précédemment.

VIII.2. Caractérisation des particules

VIII.2.1. Spectroscopie à corrélation de photons

VIII.2.1.1. Principe :

La Spectroscopie à Corrélation de Photons permet de mesurer la taille des particules submicroniques. Cette technique est basée sur l'existence du mouvement brownien des particules. La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du milieu dispersant. La vitesse de déplacement des particules est définie par le coefficient de diffusion de translation D_t , qui d'après la loi de Stokes-Einstein est inversement proportionnel au diamètre hydrodynamique d_H de la particule (Equation IV-9).

$$d_H = \frac{k_B T}{3\eta \pi D_t}$$

(IV-9)

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue du milieu dispersant et η sa viscosité.

VIII.2.1.2. Conditions opératoires :

L'appareil utilisé est un Malvern 4600 (Malvern Instruments Ltd). Le montage optique est constitué d'une source laser (Argon, 488 nm), d'une cellule de mesure thermostatée et d'un photomultiplicateur qui permet de mesurer les très faibles intensités diffusées générées par les particules (de très petite taille). Le laser est équipé d'un filtre et d'une optique de focalisation du faisceau au milieu de la cellule. Le photomultiplicateur est placé sur un goniomètre afin d'obtenir un angle d'incidence variable de 8 à 150 °.

Une solution de NaCl (10^{-3} M) constitue le milieu dispersant. La concentration en particules dans le milieu dispersant est de l'ordre de 0,005 % (w/w). L'échantillon est placé dans le bain thermostaté à 30 °C et l'angle d'observation est fixé à 90 °. Les mesures sont effectuées après stabilisation de l'échantillon (vibrations, température). Le diamètre moyen des particules est déterminé d'après une moyenne sur 10 mesures consécutives.

VIII.2.1.3. Traitement du signal

Le signal mesuré par le photomultiplicateur correspond aux fluctuations d'intensité de la lumière diffusée dues au mouvement brownien des particules. Ce signal est traité par un corrélateur numérique afin d'obtenir la fonction d'auto-corrélation $G(\tau)$ du signal. Cette fonction $G(\tau)$ représente la probabilité de retrouver une particule à un instant $(t+dt)$ au même endroit. Plus une particule est petite, plus son mouvement brownien est rapide, et plus cette probabilité est faible. La fonction d'auto-corrélation $G(\tau)$ est une exponentielle décroissante (Equation IV-10), traduisant la réduction de corrélation de l'intensité du signal en fonction du temps.

Le corrélateur multiplie les intensités I aux instants t et $(t+\tau)$, et additionne le tout sur une période de temps égale au temps de la mesure.

$$G(\tau) = \sum_1^n [I(t) \times I(t + dt)] \quad (\text{IV-10}).$$

où τ est le temps d'échantillonnage.

La méthode de calcul des cumulants, traitement mathématique utilisé pour une distribution monomodale des particules, consiste à étudier la fonction d'auto-corrélation $G(\tau)$

dans un repère semi-logarithmique. Le principe de cette analyse consiste à effectuer un développement en série de Taylor limité à l'ordre 2, du logarithme de $G(\tau)$ selon l'équation IV-11.

$$\ln (G(\tau)-1) = a + b\tau + c\tau^2 \quad (\text{IV-11})$$

b est proportionnel au diamètre moyen des particules (correspondant à la taille des particules diffusant avec la plus forte intensité), et $(2c/b^2)$ est la variance de la distribution ou polydispersité en taille.

Cette méthode permet de déterminer le diamètre moyen (en intensité de lumière diffusée) des particules. L'échantillon est considéré comme monodisperse quand sa « polydispersité » est inférieure à 0,08. Dans le cas des distributions polymodales (« polydispersité » supérieure à 0,08). La fonction exponentielle d'auto-corrélation est décomposée en 24 sous-exponentielles, caractéristiques de 24 classes de particules. C'est cette méthode de calcul que nous avons choisi d'utiliser.

VIII.2.2. Principe des mesures du potentiel zéta

La valeur du potentiel zéta (ζ) donnée par le zétamètre est calculé à partir de la mobilité électrophorétique μ_E des particules, selon la loi de Henry (Equation IV-12).

$$\mu_E = \left(\frac{2 \cdot \varepsilon \cdot \zeta}{3\eta} \right) f(k_H \cdot r) \quad (\text{IV-12})$$

où $\varepsilon = \varepsilon_R \times \varepsilon_0$ (avec ε_R = la constante diélectrique du milieu et ε_0 = la permittivité du vide), η est la viscosité du milieu, k_H est le paramètre de Debye-Hückel, r est le rayon des particules et f est la fonction de Henry.

La valeur de la fonction $f(k_H \cdot r)$ est fixée à 1,5 par l'appareil. Cette approximation, dite de Smoluchowski, n'est cependant valable que pour des valeurs de $(k_H \cdot r)$ très supérieures à 1, et suppose que le champ électrique soit uniforme et parallèle à la surface.

VIII.2.2.1. Position du plan de cisaillement :

Pour une particule donnée, dans un champ électrique donné, quelle que soit la composition ionique du milieu, la distance de la surface au plan de cisaillement ne varie pas.

En pratique, le potentiel ζ que nous avons utilisé n'est pas celui mesuré par l'appareil, mais a été recalculé à partir de la mobilité électrophorétique μ_E des particules (exprimée en $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), selon l'équation modifiée de Booth [4] (Equation IV-13):

$$\zeta (mV) = 25,7 \left[\frac{E}{f_1} - \frac{C_3 \left(\frac{E}{f_1} \right)^3 + C_4 \left(\frac{E}{f_1} \right)^4}{f_1 + 3C_3 \left(\frac{E}{f_1} \right)^2 + 4C_4 \left(\frac{E}{f_1} \right)^3} \right] \quad (\text{IV-13})$$

où $E = 7520 \mu_E$ et f_1 est le facteur de correction de Henry qui tient compte de la déformation du champ électrique autour des particules. Les effets de relaxation sont pris en compte par les coefficients C_3 et C_4 .

Une méthode permettant de déterminer de f_1 , C_3 , C_4 en fonction de la concentration saline du milieu, a été décrite par Deshiikan et Papadopoulos [4]. Cette méthode permet alors le calcul du potentiel ζ , quelles que soient les valeurs du paramètre k_H de Debye-Hückel et du rayon r des particules.

De plus, l'épaisseur de la couche diffuse est égale à l'inverse du paramètre de Debye-Hückel k_H et dépend de la force ionique du milieu (Equation IV-14).

$$k_H (nm^{-1}) = 10^9 \left[\left(1000 \cdot e^2 \cdot N_A \cdot \sum_i (C_i Z_i^2) \right) / \epsilon \cdot k_B \cdot T \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{IV-14})$$

où e est la charge élémentaire de l'électron, N_A le nombre d'Avogadro,

C_i la concentration de l'ion considéré dans le milieu et Z_i sa valence,

k_B est la constante de Boltzmann et T est la température absolue du milieu.

Selon la théorie de Debye-Hückel, la décroissance du potentiel en fonction de la distance à la surface suit une loi exponentielle du type de celle de l'équation (IV-15) :

$$\psi = \psi_0 \exp(-k_H \cdot x) \quad (\text{IV-15})$$

où ψ_0 est le potentiel de surface de la particule, et ψ le potentiel à une distance x de la surface.

Le potentiel ζ est le potentiel au plan de cisaillement. Par conséquent, si on considère que la distance de la surface au plan de cisaillement est constante et égale à x , on obtient l'équation (IV-16) :

$$\boxed{\zeta = \psi_0 \exp(-k_H \cdot x)} \quad (IV-16)$$

Cette équation, qui prend en compte un certain nombre d'approximations, n'est valable que lorsque $\psi < 25,7$ mV. Par contre, la relation de Gouy-Chapman (Equation IV-17) exprime l'évolution du potentiel ζ en fonction de k_H , sans les limitations de Debye-Hückel:

$$\boxed{\tanh\left(\frac{Z.e.\zeta}{4k_B.T}\right) = \tanh\left(\frac{Z.e.\psi_0}{4k_B.T}\right) \exp(-k_H \cdot x)} \quad (IV-17)$$

Cette théorie implique une variation continue du potentiel ψ depuis la surface vers la solution. Par conséquent, la mesure du potentiel ζ à différentes forces ioniques permet, en reportant $\ln\left[\tanh\left(\frac{Z.e.\zeta}{4k_B.T}\right)\right]$ en fonction de k_H , d'obtenir une droite de pente égale à x (distance de la surface au plan de cisaillement). Enfin, si on considère l'existence de la couche de Stern, d'épaisseur Δ_s et de potentiel ψ_s , l'équation de Gouy-Chapman devient alors :

$$\boxed{\tanh\left(\frac{Z.e.\zeta}{4k_B.T}\right) = \tanh\left(\frac{Z.e.\psi_s}{4k_B.T}\right) \exp[-k_H \cdot (x - \Delta_s)]} \quad (IV-18)$$

où la valeur $(x - \Delta_s)$ est la distance de la couche de Stern au plan de cisaillement.

VIII.2.2.2. Conditions opératoires utilisées :

L'appareil utilisé est un Zetasizer 4 (Malvern Instruments) muni d'un laser Hélium-Néon à 633 nm. Les mesures sont effectuées à 25 °C, dans des solutions de NaCl (10^{-4} à 10^{-2} mol/L). La concentration des particules dans le milieu est d'environ 0,005 % (w/w).

En pratique, l'intersection de deux faisceaux laser cohérents donne naissance à une série de franges d'interférence. Sous l'influence d'un champ électrique et selon leur charge, les particules circulant perpendiculairement à ces raies diffractent la lumière avec une

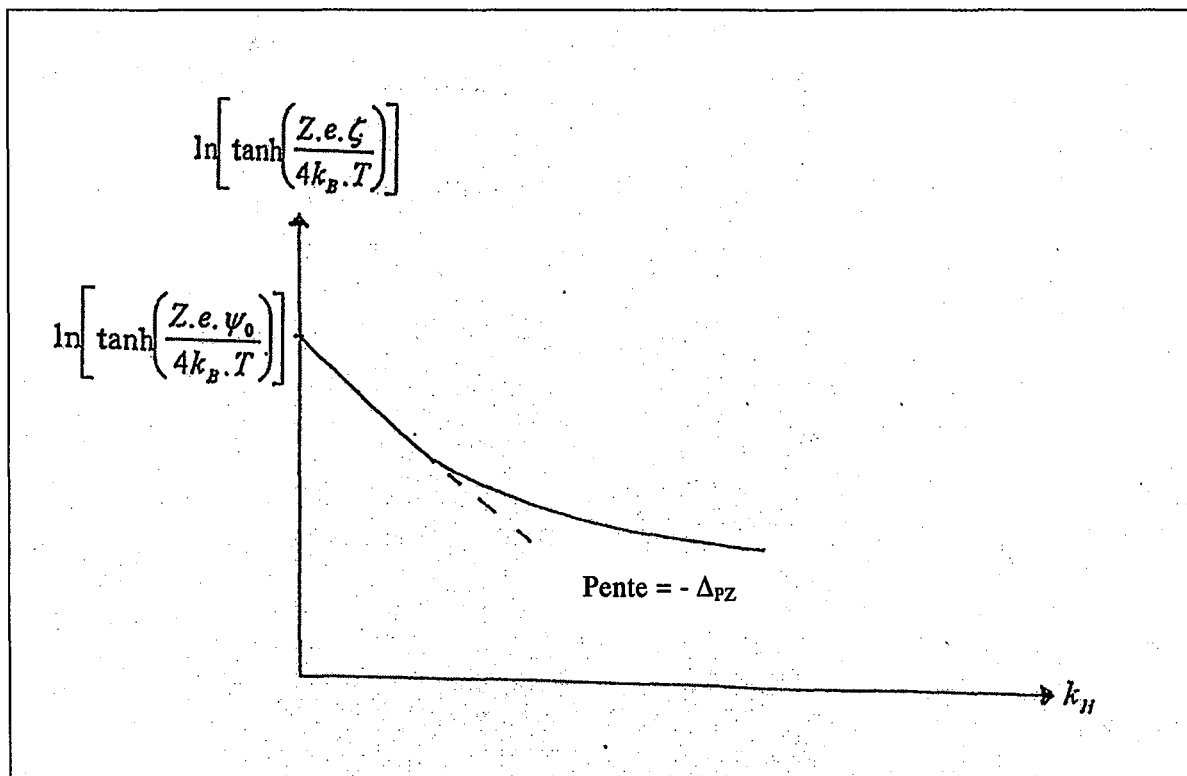


Figure IV-8 : Détermination de Δ_{pz} .

fréquence qui dépend de leur vitesse et de l'espacement des raies. La vitesse des particules est évaluée par mesure de la fluctuation temporelle de l'intensité diffusée par la particule en mouvement dans le réseau d'interférences. Le potentiel ζ est la moyenne issue de 3 mesures consécutives.

VIII.2.3. Mesure de l'épaisseur de couche de dextrane par mesure du potentiel zeta (Δ_{PZ})

VIII.2.3.1. Détermination de l'épaisseur de couche :

Lorsqu'une particule chargée est recouverte d'un polymère neutre et que la couche de polymère, d'épaisseur Δ_{PZ} , est supérieure à une distance x , il y a déplacement du plan de cisaillement de la particule, de la distance x à une distance de la surface notée Δ_{PZ} . On observe alors une diminution du potentiel ζ qui tend vers zéro au fur et à mesure que la quantité de polymère déposé et que l'épaisseur Δ_{PZ} de la couche interfaciale augmentent.

L'équation précédente de Gouy-Chapman (IV-18) qui relie l'épaisseur Δ_{PZ} au potentiel ζ devient celle de l'équation (IV-19) dont un exemple de représentation graphique est donné dans la Figure IV-8.

$$\ln \left[\tanh \left(\frac{Z.e.\zeta}{4k_B.T} \right) \right] = \ln \left[\tanh \left(\frac{Z.e.\psi_0}{4k_B.T} \right) \right] - k_H \times \Delta_{PZ} \quad (IV-19)$$

Pour de faibles forces ioniques, c'est-à-dire lorsque l'épaisseur Δ_{PZ} est inférieure à celle de la couche diffuse ($1/k_H$), l'évolution de cette courbe en fonction de k_H est linéaire et la pente de la droite correspond à la valeur de Δ_{PZ} . Par contre, lorsque Δ_{PZ} est supérieure à ($1/k_H$), la droite s'incurve et les valeurs tendent vers zéro. A des forces ioniques plus élevées, l'épaisseur Δ_{PZ} ne peut donc plus être déterminée simplement à partir des valeurs du potentiel ζ mesurées.

VIII.3. Détermination du taux de recouvrement des particules (Γ):

La quantité de dextrane à la surface des particules de PLA a été déterminée après dégradation en milieu basique des nanosphères liophilisées et dosage du dextrane libéré.

VIII.3.1. Dosage du dextrane par l'anthrone :

Cette technique est basée sur la réaction de l'anthrone avec les motifs glucose du dextrane qui conduit, en milieu acide et chaud, à la formation d'un complexe vert, quantifiable par spectroscopie dans le visible.

Une solution d'anthrone est préalablement préparée : 1 g d'anthrone et 150 ml d'eau osmosée sont introduits dans une grande fiole de 1 litre que l'on place alors dans un bain d'eau froide. 350 ml d'acide sulfurique concentré (95-98 %) sont additionnés petit à petit sous agitation manuelle. L'anthrone se dissout au fur et à mesure pour conduire à un mélange visqueux de couleur jaune. Après homogénéisation et retour à température ambiante, le mélange est stocké à 4 °C jusqu'à utilisation (dans un délai maximum d'environ 1 mois).

200 µl de solution de polymère sont additionnés à 5 ml de solution d'anthrone dans des tubes en verre qui, après fermeture, sont vigoureusement agités à l'aide d'un vortex. Les tubes sont placés pendant 45 minutes dans un bain-marie maintenu à 80 °C. Après retour à température ambiante (pendant au moins une heure) et réhomogénéisation au vortex, les densités optiques des solutions sont mesurées par spectrophotométrie visible à 625 nm.

Chaque dosage nécessite un étalonnage effectué en simultané avec des solutions de dextrane de concentrations connues dans le milieu aqueux concerné, contre un blanc préparé avec 200 µl d'eau osmosée. La concentration en dextrane ne doit pas excéder 0,8 g/l (soit DO < 1).

VIII.3.2. Aire des particules

A partir du diamètre des particules déterminé par PCS et de la masse de PLA initialement introduite, il est possible de calculer la surface spécifique des nanosphères. En négligeant l'augmentation du rayon des particules liée à la présence du dextrane en surface, on peut estimer le nombre (N_{part}) et l'aire totale (S) des particules présentes dans la suspension (Equations IV-20 et IV-21).

$$V = \frac{m_{PLA}}{d_{PLA}} = \frac{4}{3} \pi R_{part}^3 N_{part} \quad (IV-20)$$

$$S = 4 \pi R_{part}^2 N_{part} \quad (IV-21)$$

où V est le volume occupé par les particules,

m_{PLA} et d_{PLA} sont respectivement la masse et la densité du PLA initialement introduit, ($d_{PLA} = 1,26$),

N_{part} et R_{part} est le nombre et le rayon des particules présentes dans la suspension, déterminé par PCS ($R_{part} = \frac{d_H}{2}$),

S est l'aire totale des particules.

VIII.3.3. Calcul du taux de recouvrement

Connaissant l'aire totale des particules, le taux de recouvrement Γ peut être estimé de façon directe après destruction des nanosphères lyophilisées en milieu basique, et dosage du dextrane libéré.

Une fois les particules lyophilisées, une masse connue de nanosphères est remise en suspension dans une solution de soude (1 M) à une concentration de 5 mg de particules/mL de NaOH. Après 5 heures d'agitation, les nanoparticules sont détruites, ainsi que les greffons PLA des copolymères Dex-g-PLA. La concentration de glucose (et donc de dextrane initialement présent dans le milieu) est alors dosée par l'anthrone. Ces méthodes exigent une grande précision et tous les volumes prélevés ont été pesés puis calculés à partir de la densité des solutions ou suspensions.

Le taux de recouvrement Γ est calculé à partir de la concentration du dextrane mesurée (Equation IV-22).

$$\Gamma \text{ (mg / m}^2\text{)} = \frac{C_{surf} \cdot V_{NaOH}}{m \cdot S} \quad \text{(IV-22)}$$

où V_{NaOH} est le volume de soude utilisé,

C_{surf} est la concentration en dextrane dans la solution de soude mesurée,

m et S sont la masse et l'aire totale de particules analysée.

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Claudy P.,
L'analyse calorimétrique différentielle (DSC). Application à la chimie.,
in *L'Actualité Chimique*. 1999. p. 13-22
2. Sauer B., Kampert W., Neal Blanchard E., Threefoot S. and Hsiao B.,
Temperature modulated DSC studies of melting and recrystallization in polymers exhibiting multiple endotherms.
Polymer, 2000 (41): p. 1099-1108
3. Benjelloun A., Brembilla A., Lochon P., Adibnejad M., Viriot M.-L. and Carré M.-C.,
Detection of hydrophobic microdomains in aqueous solutions of amphiphilic polymers using fluorescent molecular rotors.
Polymer, 1996. 37: p. 879-883
4. Deshiikan S. R. and Papadopoulos K. D.,
Modified booth equation for the calculation of zeta potential.
Colloid. Polym. Sci., 1998. 276: p. 117-124

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les problèmes mondiaux de pollution ont, depuis plusieurs années, contraint les chercheurs à orienter leurs recherches vers de nouveaux procédés propres de production, de recyclage, de traitement des déchets.... Certaines recherches ont ainsi porté sur l'utilisation de nouvelles ressources renouvelables et naturelles. Parmi celles-ci, l'emploi de polysaccharides pour obtenir de nouveaux matériaux non polluants ont plus particulièrement attiré notre attention. Les polysaccharides biodégradables avaient été, dans un premier temps, mélangés à des polymères de grande diffusion dans le but d'améliorer leur resorption. Hélas, des problèmes de miscibilité n'ont pas permis à la fois de réduire les déchets et de conserver de bonnes propriétés. La synthèse de nouveaux matériaux (glycopolymères), constitués d'une partie polysaccharide et d'une autre synthétique, a alors suscité un vif intérêt. Les modes d'obtention de ces produits ont été exposés dans la première partie de ce manuscrit. Classés selon les méthodes de synthèse, les glycopolymères décrits dans la littérature ne présentent pas, pour la grande majorité, une architecture contrôlée.

Le travail exposé ici avait pour objectif la synthèse, puis l'étude des propriétés physico-chimiques, de nouveaux copolymères biodégradables et amphiphiles, associant le dextrane et le polylactide. Il s'agissait alors de réaliser des copolymères dextrane-g-polylactide, d'architecture contrôlée. Ce contrôle devait permettre d'établir les relations structure/propriétés tensioactives, puis d'évaluer leur potentiel d'utilisation dans le domaine des vecteurs particuliers de principes actifs. Afin de contrôler les paramètres macromoléculaires de ces copolymères, nous avons développé une stratégie de synthèse en trois étapes selon la méthode "grafting from" : protection partielle et contrôlée des fonctions hydroxyle du polysaccharide, polymérisation par ouverture du D,L-lactide et enfin clivage des groupements protecteurs.

La première étape de cette synthèse, qui consiste à protéger une partie des fonctions hydroxyle du polysaccharide par l'intermédiaire d'une silylation, permet de limiter le nombre de ces fonctions, et par voie de conséquence de contrôler le nombre de greffons polyester du copolymère final. La silylation partielle du dextrane a été optimisée en faisant varier différents paramètres. Nous avons montré que le taux de silylation du dextrane pouvait être modulé et, sous certaines conditions, quantitatif. Nous avons également mis en évidence que certaines conditions de silylation entraînaient la dégradation de la chaîne de dextrane.

Les fonctions hydroxyle résiduelles du dextrane partiellement silylé ont ensuite été mises à contribution pour amorcer la polymérisation du D,L-lactide, à l'aide du bis (2-éthylhexanoate) d'étain (SnOct_2). Les paramètres expérimentaux de cette seconde étape ont été adaptés pour limiter la polymolécularité des greffons et éviter la formation d'impuretés macromoléculaires.

Enfin, pour assurer un caractère amphiphile au copolymère greffé final, il était nécessaire de restituer au dextrane son caractère hydrophile lors d'une étape de clivage des groupements silyléther. Des conditions douces, à la fois pour la chaîne dextrane mais également pour les greffons polylactide ont été sélectionnées.

Tout au long de cette synthèse, les produits obtenus ont été caractérisés et l'ordre de réactivité des fonctions hydroxyle du dextrane vis à vis d'une silylation a été déterminé par études RMN. Ceci a ainsi permis d'identifier la position des sites d'amorçage de la polymérisation du D,L-lactide et le positionnement des greffons sur le polysaccharide. Les copolymères obtenus diffèrent selon la longueur de la dorsale dextrane, mais également selon le nombre et la longueur des greffons polylactide. Ils présentent alors différents comportements en solution selon leur teneur respective en polylactide. A faible teneur, ils sont plutôt solubles en milieu aqueux, et en milieu organique à plus forte proportion. Un changement de conformation de ces copolymères a été mis en évidence par RMN. Selon les cas, des conformations cœur-couronne peuvent être observées.

Le pouvoir tensioactif de ces nouveaux copolymères amphiphiles a été examiné par tensiométrie et leur capacité d'organisation en solution a été étudiée par spectroscopie de fluorescence. Il apparaît que ces copolymères présentent des capacités d'organisation aux

interfaces, mais également la faculté de s'organiser en solution par formation de micro-domaines hydrophobes ou hydrophiles selon le copolymère considéré et le solvant utilisé.

Ces observations ont permis d'envisager l'utilisation ultérieure de ces copolymères dans des formulations de vecteurs particulières. Ainsi dans un troisième temps, nous avons évalué la potentialité de ces copolymères dans la formulation de nanosphères par le procédé « émulsion/évaporation de solvant ». Dans le cas des copolymères hydrosolubles, des nanoparticules de 200 nm de diamètre et présentant une couronne hydrophile de dextrane ont pu être formulées. Des mesures préliminaires ont été effectuées afin d'étudier la qualité de ce recouvrement en termes d'épaisseur de couche et de quantité de dextrane.

PERSPECTIVES

Les travaux décrits ont montré que la synthèse de copolymères dextrane-g-poly lactide d'architecture contrôlée pouvait être réalisée. L'obtention d'un panel plus varié de ce type de copolymères devrait permettre à la fois de confirmer (ou d'infirmer) les propriétés observées et d'établir correctement les relations structure/propriétés.

L'emploi de ces produits dans la formulation de vecteurs particuliers a permis d'obtenir des nanosphères recouvertes d'une couronne de dextrane qui semble être assez lâche. L'efficacité d'un tel recouvrement devra être testé dans le futur en terme de « furtivité » des particules. L'influence du dextrane sur leur vitesse de dégradation (et ainsi sur la vitesse de libération d'un éventuel principe actif encapsulé) devrait être prochainement étudiée via l'étude du mécanisme de dégradation de ces copolymères.

Le caractère amphiphile de ces produits permet également d'envisager leur utilisation ultérieure dans d'autres applications biomédicales (hydrogels, biocompatibilisation de surface...), mais également dans diverses applications de compatibilisation, pour l'élaboration de matériaux composites de type glycomatériaux.

Enfin, ces travaux de recherche ouvrent la possibilité d'adapter la stratégie de synthèse que nous avons sélectionnée à la réalisation d'autres glycopolymères de type polysaccharide-g-polymère.

LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : Polysaccharides les plus abondants à l'état naturel : amidon, glycogène, cellulose.....	5
Figure I-2 : Structure de la chitine et du chitosane.....	5
Figure I-3 : Structure de l'alginate.....	6
Figure I-4 : Structure de la pectine.....	6
Figure I-5 : Structure de l'acide hyaluronique.....	6
Figure I-6 : Exemples d'exopolysaccharides : Cas du xanthane et du gellane.....	7
Figure I-7 : Structure du dextrane quasi-linéaire, issu de la souche B-512 F.....	7
Figure I-8 : Exemples de glycopolymères.....	10
Figure I-9 : Structure du pullulane.....	11
Figure I-10 : Méthodes de synthèse des copolymères greffés.....	16
Figure I-11 : Exemples de glycopolymères obtenus par la méthode « grafting through ».....	18
Figure I-12 : Formation de carbonate intramoléculaires.....	27
Figure II-1 : Stabilité relative des groupements trialkylsilyléthers et triarylsilyléthers.....	63
Figure II-2 : Quelques agents silylants.....	65
Figure II-3 : Cinétiques des silylations effectuées sur D_{40}^1 dans le DMSO avec HMDS/OH (rapport molaire)= 2. (●) à 50°C et (○) à 80°C.....	69
Figure II-4 : Cinétiques des silylations effectuées dans le DMSO avec HMDS/OH = 2 à 50°C (• D_{40}^1 , ◆ D_{40}^2).....	71
Figure II-5 : Spectres ^{13}C RMN des lots de dextranses D_{40}^1 et D_{40}^2 , effectués dans D_2O	72
Figure II-6 : Représentation d'un dextrane T40 avec branchement $\alpha 1 \rightarrow 3$	72
Figure II-7 : Formule des agents nucléophiles employés.....	73
Figure II-8 : Influence de la quantité de TMSCl sur le taux de substitution. Expériences réalisées sur D_{40}^2 , avec 2 moles de réactif silylant par mole de fonction OH (x % mol. TMSCl et (100-x) % mol. HMDS dans le mélange silylant), pendant 20h, à 50°C dans le DMSO.....	74
Figure II-9 : Représentations de la Bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA).....	75
Figure II-10 : Influence de la quantité d'agent silylant sur le taux de substitution. Expériences réalisées sur D_{40}^2 , pendant 20h, à 50°C dans le DMSO : (●) avec la BSA (x) avec l'HMDS.....	76

Figure II-11 : Spectrogrammes Infra-Rouge de divers dextrans silylés avec des degrés de substitutions variables	77
Figure II-12 : Thermogrammes du dextrane natif et d'un dextrane silylé (DS=2,9).....	78
Figure II-13 : Spectre RMN ^1H du dextrane (DMSO- d_6)- Attribution Globale.....	78
Figure II-14 : Unité Anhydroglucose répétitive du dextrane.....	78
Figure II-15 : Spectre Cosy 45° du Dextrane D_{40}^2 (DMSO- d_6).....	79
Figure II-16 : Spectre HMQC du Dextrane D_{40}^2 (DMSO- d_6).....	79
Figure II-17 : Spectres RMN ^1H des Dextrans Silylés (CDCl_3).....	80
Figure II-18 : Spectre RMN ^1H d'un dextrane partiellement silylé après réaction avec le trichloroacétylisocyanate (CDCl_3 , 74% de silylation).....	81
Figure II-19 : Spectres RMN ^1H de différents dextrans silylés.....	84
Figure II-20 : Spectre $^1\text{H}/^1\text{H}$ Cosy 45° d'un dextrane silylé à 99% (CDCl_3).....	85
Figure II-21 : Spectre $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC d'un dextrane silylé à 99% (CDCl_3).....	85
Figure II-22 : Structure chimique des polyesters de synthèse (a) ou naturels (b).....	94
Figure II-23 : Stéréo-isomères du lactide.....	96
Figure II-24 : Les différentes attaques possibles sur le lactide.....	98
Figure II-25 : Spectre RMN ^1H du copolymère $\text{Dex}_{13\text{K}}\text{Si}_{87-\text{g}-39}\text{PLA}_{0,95\text{K}}$ (CDCl_3).....	108
Figure II-26 : Chromatogrammes SEC du copolymère $\text{Dex}_{25\text{K}}\text{Si}_{97-\text{g}-9}\text{PLA}_{5\text{K}}$	110
Figure II-27 : Chromatogrammes SEC du copolymère $\text{Dex}_{25\text{K}}\text{Si}_{97-\text{g}-9}\text{PLA}_{5\text{K}}$ et de trois PLA	111
Figure II-28 : Cinétique de polymérisations du D,L-lactide amorcée par i-PrOH dans le toluène à 100°C	113
Figure II-29 : Cinétique de polymérisation du D,L-lactide amorcée par i-PrOH dans le toluène à 100°C , $[\text{LA}]_0=1,44 \text{ mol/L}$, $\text{R}=[\text{SnOct}_2]/[\text{OH}]=1, 0,06 \text{ et } 0,1$. Evolutions du taux de conversion et de l'indice de polymolécularité en fonction du temps.....	113
Figure II-30 : Chromatogrammes SEC du dextrane silylé initial ($\text{Dex}_{29\text{K}}\text{SI}_{80}$) et de copolymères obtenus lors de l'étude de la cinétique de polymérisation du D,L-lactide. (100°C , toluène, $[\text{LA}]_0 = 1,44 \text{ mol/l}$, $\text{R} = [\text{SnOct}_2]/[\text{OH}] = 0,03$).....	114
Figure II-31 : Spectres IRTF a) copolymère $\text{Dex}_{13\text{K}}\text{Si}_{91-\text{g}-27}\text{PLA}_{5,1\text{K}}$ et b) dextrane silylé $\text{Dex}_{29,8\text{K}}\text{Si}_{100}$. Attribution des bandes caractéristiques du PLA, du dextrane et des groupements silylés.....	116
Figure II-32 : Thermogramme MDSC du copolymère $\text{Dex}_{29\text{K}}\text{Si}_{80-\text{g}-60}\text{PLA}_{2\text{K}}$	117

Figure II-33 : Spectres RMN ^{13}C du copolymère Dex _{13K} Si ₉₁ -g-27PLA _{2,5K} et d'un dextrane silylé Dex _{15K} Si ₉₂ .(CDCl ₃).	118
Figure II-34 : Spectres RMN ^{13}C du copolymère Dex _{13K} Si ₉₁ -g-27PLA _{2,5K} et d'un dextrane silylé Dex _{15K} Si ₉₂ .(CDCl ₃).	118
Figure II-35 : Spectre HMQC (RMN 2D) d'un copolymère Dex _{29K} Si ₉₄ -g-20PLA _{1,7K} (CDCl ₃).	119
Figure II-36 : Chromatogrammes SEC. Signal réfractométrique du dextrane D ₄₀ ² et échantillons ayant subi les traitements décrits au Tableau II-13.	133
Figure II-37 : Chromatogrammes SEC (détection réfractométrique) du dextrane D ₄₀ ¹ et des échantillons « blancs »	138
Figure II-38 : Chromatogrammes SEC du dextrane D ₄₀ ² et des échantillons obtenus après déprotection de dextrans silylés par l'HMDS (DSH)	139
Figure II-39 : Chromatogrammes SEC du dextrane D ₄₀ ² et des échantillons obtenus après déprotection de dextrans silylés par la BSA (DSH).	139
Figure II-40 : Influence du nombre de moles de BSA employées sur le $\overline{M}_n$ et l'indice de polymolécularité des dextrans DSH.	140
Figure III-1 : Variation de la tension de surface liquide/air en fonction de la concentration en tensioactif dans la phase liquide.	147
Figure III-2 : Variations de la tension superficielle en fonction de la concentration en polymère (g/L) dans la phase aqueuse. Cas des copolymères Dextrane-g-PLA hydrosolubles et du dextrane	149
Figure III-3 : Représentation schématique des copolymères Dex-g-PLA adsorbés à l'interface eau/air.	151
Figure III-4 : Variations de la tension superficielle en fonction de la concentration en polymère (g/L). Influence de la température de mesure dans le cas du copolymère hydrosoluble Dex _{29K} -g-18PLA _{0,1K}	152
Figure III-5 : Variations de la tension interfaciale d'un système (eau/solution de dichlorométhane) en fonction de la concentration en copolymère (g/L), à 25°C. Cas des copolymères Dex-g-PLA organosolubles	153
Figure III-6 : Diagramme simplifié de Jablonski. Processus de fluorescence.	155
Figure III-7 : Formules des deux sondes utilisées lors de notre étude sur les copolymères Dex-g-PLA hydrosolubles.	156

Figure III-8 : Evolution du spectre d'émission de fluorescence du pyrène en fonction de la polarité du solvant.....	157
Figure III-9: Représentation schématique du passage de l'état ICT (Intramolecular Charge Transfert) à l'état TICT (Twisted Intramolecular Charge Tranfert).....	158
Figure III-10: Evolution du spectre d'émission de fluorescence du DMAC en fonction de la polarité du milieu.....	158
Figure III-11 : Variation du rapport (I_1/I_3) du spectre d'émission de fluorescence du pyrène. Solutions aqueuses de copolymères dextrane-g-PLA « hydrosolubles » à 25°	159
Figure III-12 : Variation de la longueur d'onde au maximum de fluorescence du spectre du DMAC dans les solutions aqueuses de copolymères dextrane-g-PLA « hydrosolubles »	160
Figure III-13 : Variation du rendement quantique de fluorescence du spectre du DMAC dans les solutions aqueuses de copolymères dextrane-g-PLA « hydrosolubles »	160
Figure III-14 : Représentation possible des microdomaines hydrophobes formés avec les copolymères « hydrosolubles » en milieu aqueux	161
Figure III-15 : Comparaison de l'évolution de (ϕ_f / ϕ_0) (cas du DMAC) et de la tension superficielle pour les copolymères hydrosolubles	162
Figure III-16 : Sondes de fluorescence couramment employées pour l'étude des surfactifs en milieu apolaire.....	163
Figure III-17 : Représentation schématique de deux conformations possibles de l'ANS.....	163
Figure III-18 : Spectre d'émission de fluorescence de l'ANS en milieu peu polaire. Bandes caractéristiques des deux conformations possibles de la molécule.....	164
Figure III-19 : Spectres d'émission de fluorescence de l'ANS en fonction de la teneur en eau dans le système copolymère Dex _{29K} -g- ₁₈ PLA _{1,7K} /toluène/ eau, à 25°C.....	164
Figure III-20 : Evolution de λ_{max} et I_{max} en fonction de la teneur en eau dans une solution de toluène (25°C). Cas des copolymères « organosolubles » et de l'ANS seul.....	165
Figure III-21 : Evolution de λ_1 et R_f en fonction de la teneur en eau dans une solution de toluène (25°C). Cas des copolymères « organosolubles » et de l'ANS seul.....	165
Figure III-22 : Evolution de λ_1 et λ_2 en fonction de la teneur en eau dans une solution de toluène (25°C). Cas des copolymères « organosolubles » et de l'ANS seul.....	165
Figure III-23 : Les différentes formes de vecteurs particuliers	174
Figure III-24 : Evolution de la concentration du principe actif dans le sang en fonction du temps et du mode d'administration	175
Figure III-25 : Structure supposée d'une nanosphère de PLA, recouverte par un copolymère PLA-b-POE.....	182

Figure III-26 : Deux modes d'ancrage supposé des chaînes de polymère à l'interface (d'une émulsion ou des particules). Cas des copolymères diblocs ou greffés.	183
Figure III-27 : Conformation générale d'une chaîne de polymère adsorbée à l'interface solide-liquide.	184
Figure III-28 : Les différentes topographies du squelette d'un copolymère à l'interface solide-liquide. Cas d'un recouvrement "Side-on".	184
Figure III-29 : Procédé de préparation des particules à l'aide des copolymères Dex-g-PLA hydrosolubles suivant le protocole « émulsion simple/évaporation de solvant ».	185
Figure III-30: Distribution de la taille des nanosphères obtenues avec le Dex _{13K} -g- ₂₇ PLA _{2,5K} organosoluble (13 g/L) et du PLA (12g/L) dans la phase organique de l'émulsion.	186
Figure III-31: Influence du ratio R (R = Volume de phase organique/ Volume de phase aqueuse) sur le diamètre des particules obtenues avec des Dex-g-PLA hydrosolubles	187
Figure III-32 : Evolution du diamètre des particules en fonction de la concentration du copolymère Dex _{29K} -g- _{13,5} PLA _{0,2K} dans la phase aqueuse. R=0,05 ([PLA] = 25 g/L).	188
Figure III-33 : Modélisation de la double-couche électrostatique autour d'une particule chargée.	189
Figure III-34 : Evolution du potentiel ζ des particules après lavages en fonction de la concentration en NaCl de la solution aqueuse.	190
Figure III-35 : Conformation supposée des chaînes de dextrane-g-PLA à la surface de particules.	190
Figure IV-1 : Spectre RMN ¹ H du brut de la polymérisation du D,L-lactide à partir du dextrane silylé.	199
Figure IV-2 : Thermogramme type d'une température de transition vitreuse	202
Figure IV-3: Thermogramme MDSC- Détermination de la Tg	203
Figure IV-4 : Spectre d'adsorption du pyrène dans l'eau.	211
Figure IV-5 : : Spectre d'adsorption du DMAC dans l'eau.	211
Figure IV-6 : Spectre d'adsorption de l'ANS.	213
Figure IV-7 : Exemples de déconvolution du spectre d'émission de fluorescence de l'ANS	214
Figure IV-8 : Détermination de Δp_z .	219

LISTE DES SCHEMAS

Schéma I-1 : Conversion du saccharose en dextrane.....	8
Schéma I-2 : Synthèse de copolymère dibloc amylose-b-poly(propylène glycol) et amylose-b-polybutadiène.....	12
Schéma I-3 : Obtention de dextrans triméthylsilylés ω -acyllactame.....	13
Schéma I-4: Stratégie de synthèse des copolymères cellulose-b-polytétrahydrofurane.....	13
Schéma I-5 : Synthèse de maltoheptaose acétylée et ω -esterbromée.....	14
Schéma I-6 : Equilibre entre les deux formes de l'unité terminale d'un polysaccharide	14
Schéma I-7 : Réaction de couplage entre un polysaccharide et une amine. Cas du dextrane.....	15
Schéma I-8 : Exemple de synthèse de copolymère dibloc amylose-b-polystyrène.....	15
Schéma I-9 : Couplage entre une amine et un polysaccharide par amination réductrice.....	15
Schéma I-10 : Synthèse de copolymères alginate-b-poly(éthylène glycol).	16
Schéma I -11 : Synthèse de poly(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopyranose (dextrane) par polymérisation par ouverture de cycle cationique de anhydroglucose benzylé.....	18
Schéma I-12 : Copolymère poly(styrène-co-acrylamide)-g-amylose obtenu à partir d'un macromonomère α -styrylamylose.....	18
Schéma I-13 : Synthèse de copolymères polyvinyle-g-dextrane (PNVDA) et de copolymères poly(N-vinyl dextrane aldoamide-co-N-vinylhexamide) (PNVDA-co-PNVH) par aminolyse de dextrane ω -lactone (1) et/ou de N-(hexanoyloxy)succinimide (2).....	19
Schéma I-14 : Synthèse d'un copolymère polylysine-g-acide hyaluronique. Couplage réalisé par amination réductrice.....	20
Schéma I-15 : Obtention de cellulose-g-polystyrène par réaction d'estérification.	21
Schéma I-16 : Stratégie de synthèse des copolymères dextrane-g-poly(L,L-lactide). Couplage par « estérification ».....	21
Schéma I-17 : Schéma de synthèse de copolymères dextrane-lactate-HEMA (a) ou dextrane-HEMA (b).....	22
Schéma I-18 : Synthèse de copolymères dextrane-g-poly lactide par photoréticulation.....	23
Schéma I-19: Couplage entre dextrane et polyacrylamide par amidification.....	24
Schéma I-20 : Couplage entre le chitosane et le poly(éthylène glycol) par amidification.	25
Schéma I-21 : Activation d'un PEG ω -carboxylé par une carbodiimide et hydroxybenzotriazole (BtOH).....	25
Schéma I-22 : Couplage entre le chitosane et du polyhydroxybutyrate.....	25
Schéma I-23 : Couplage d'un PEG ω -carbonate avec le chitosane.	26

Schéma I-24 : Méthodes de synthèse des dextrane-g-POE par réaction entre le dextrane carbonaté et un POE ω -aminé.	26
Schéma I-25 : Couplage d'amidon et de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) ou poly(oxyde de propylène) (PPO).	27
Schéma I-26 : Fixation du MPOE sur le dextrane par l'intermédiaire d'un dérivé époxyde.	28
Schéma I-27 : Obtention de dextrane-g-POE après activation du dextrane par l'épichlorhydrine.	28
Schéma I-28 : Synthèse de copolymère dextrane-g-polyamide par désactivation de polyamides « vivants ».	29
Schéma I-29 : Synthèse de copolymère chitosane-g-polydiméthylsiloxane par désactivation de silanolates de PDMS.	29
Schéma I-30 : Stratégie de synthèse des copolymères cellulose-g-polystyrène.	30
Schéma I-31 Synthèse de précurseurs polystyryle ω -carboxylate	30
Schéma I-32: Synthèse de copolymères chitine-g-polyoxazoline	30
Schéma I-33 : Voies de synthèse de polystyrène-g- amylose par les méthodes «grafting through » et « grafting from ».	32
Schéma I-34 : Synthèse de chitosane-g-polyaniline à l'aide d'un amorçage par le persulfate d'ammonium en milieu acide.	33
Schéma I-35 : Mécanisme d'amorçage par l'ion cérique. Cas de la cellulose.	34
Schéma I-36 : Amorçage par le système de Fenton (H_2O_2/Fe^{2+}) sur les polysaccharides.	34
Schéma I-37 : Amorçage radicalaire à partir de polysaccharides thiocarbonates par le peroxyde d'hydrogène.	35
Schéma I-38 : Formation d'un macroamorceur dextrane-peroxyde.	35
Schéma I-39 : Synthèse des copolymères Chitosane –g-PMMA.	36
Schéma I-40 : Mécanisme d'amorçage du couple redox dérivé halogéné/ $Mn_2(Co)_{10}$	36
Schéma I-41: Obtention de chitine-g-polystyrène par transfert radicalaire sur des groupes mercaptan	37
Schéma I-42 : Synthèse de chitine-g-polystyrène à partir de chitine iodée.	37
Schéma I-43 : Greffage de poly(acrylate de méthyle) sur les fibres en cellulose du papier	37
Schéma I-44 : Synthèse de copolymères cellulose-g-poly(éthylène imine) par polymérisation cationique par ouverture d'oxazolines	38
Schéma I-45 : Polymérisation par ouverture de cycle d'anhydrides de Leuchs à partir des fonctions amine d'une chitine partiellement désacétylée.	39
Schéma I-46 : Synthèse par polycondensation de chitosane-g-oligolactide	39
Schéma I-47 : Synthèse d'(hydroxyéthyl cellulose)-g-PCL par polymérisation enzymatique	40

Schéma I-48 : Synthèse d'amidon-g-PCL à l'aide de divers co-amorceurs.....	41
Schéma I-49 : Stratégie de synthèse des copolymères pullulane-g-poly(L-lactide).....	42
Schéma II-1 : Stratégie de synthèse des copolymères dextrane-g-poly lactide.....	60
Schéma II-2 : Réaction de HMDS sur le dextrane - Mécanisme global.....	65
Schéma II-3 : Silylation avec un mélange silylant HMDS/TMSCl	73
Schéma II-4 : Mécanisme de silylation en présence de catalyseurs nucléophiles	73
Schéma II-5 : Echange intramoléculaire sous la forme Imidate.....	75
Schéma II-6 : Réaction entre la BSA et le dextrane.....	75
Schéma II-7 : Transformation des fonctions hydroxyle en fonctions uréthane.....	81
Schéma II-8 : Réaction de l'eau et du trichloroacétylisocyanate.....	82
Schéma II-9 : Voies de synthèse du PLA.....	96
Schéma II-10 : Equilibres intervenant lors la polymérisation par ouverture du lactide.....	97
Schéma II-11 : Réaction de transfert au lactide. Déprotonation en α du carbonyle.	99
Schéma II-12 : Mécanisme de type « monomère activé ». Cas de la polymérisation du lactide à partir de fonctions alcool en présence des « co-amorceurs » de type I	99
Schéma II-13 : Mécanisme de « coordination-insertion ». Cas de la polymérisation du lactide à partir de fonctions alcool en présence des alcoolates de métaux de transition et de terres rares ou d'aluminium	100
Schéma II-14 : Mécanisme de Coordination-Insertion en présence de SnOct_2 : Schéma Global.....	102
Schéma II-15 : Mécanisme de Coordination-Insertion en présence de SnOct_2 : formation du dialcoolate.....	102
Schéma II-16 : Réaction d'interconversion pour les systèmes (SnOct_2 / BuOH) et ($\text{Sn}(\text{OBu})_2/\text{OctH}$).....	103
Schéma II-17 : Mécanisme de Coordination-Insertion en présence de SnOct_2 : réactions secondaires à haute température.....	104
Schéma II-18 : Polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide à partir des fonctions OH résiduelles sur le dextrane hautement silylé.....	106
Schéma II-19 : Réactions de transestérification intra- et intermoléculaire.	112
Schéma II-20 : 3 ^{ème} Etape - Déprotection des copolymères (dextrane silylé)-g-poly lactide.....	130
Schéma II-21 : Schéma réactionnel de déprotection d'un éther silylé en milieu aqueux.....	130
Schéma II-22 : Déprotection par les composés fluorés en présence d'eau ou de méthanol	132
Schéma II-23 : Principe des deux méthodes d'étude de la stabilité du dextrane au cours	

d'une réaction de modification.....	137
Schéma II-24 : Protocole de synthèse industrielle de la BSA	140
Schéma II-25 : Conditions employées pour les différentes étapes de la synthèse.....	143

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II-1 : Effet du rapport molaire HMDS/OH sur le taux de silylation et le degré de substitution (DS).....	70
Tableau II -2 : Effet du co-solvant sur le taux de silylation et le DS.	70
Tableau II-3 : Paramètres macromoléculaires des dextrans T40	71
Tableau II -4 : Silylation par l'HMDS. Effets de l'addition de différents catalyseurs sur le taux de silylation et le degré de substitution (DS).	74
Tableau II-5 : Comparaison des deux agents silylants HMDS et BSA.	76
Tableau II-6 : Exemples d'amorceurs impliqués dans la POC de lactides	98
Tableau II-7 : Résultats obtenus avec les alcoolates de métaux covalents.	101
Tableau II-8 : Paramètre de sélectivité β pour divers amorceurs.	
Polymérisation de l' ϵ -caprolactone (THF, 20°C).....	105
Tableau II-9: Polymérisation du L-lactide, (THF, 80°C).). Paramètre de sélectivité γ pour divers amorceurs.	105
Tableau II-10 : Polymérisations du D,L-lactide (LA) amorcées par divers dextrans silylés	114
Tableau II-11 : Influence du solvant deutéré sur la fraction massique en polylactide (F_w^{PLA}) du copolymère Dex _{13K} Si ₉₁ -g-27PLA _{2,5K} :	115
Tableau II-12 : Déprotection des dextrans silylés dans divers milieux. Rapport molaire d'agent « catalyseur »/SiMe ₃ = 0,01 a), 1 b).....	131
Tableau II-13 : Etude de la stabilité du dextrane sous diverses conditions d'hydrolyse des silyléthers.	133
Tableau II-14 : Etude la stabilité d'un polylactide sous diverses conditions d'hydrolyse des silyléthers.	134
Tableau II-15 : Bilan sur la déprotection des dextrane silylés.....	134
Tableau II-16 : Résultats des réactions de déprotection de copolymères DexSi-g-PLA.....	135
Tableau II-17 : Influence du solvant sur la fraction massique en polylactide F_w^{PLA} de copolymères Dex-g-PLA.....	136
Tableau II-18 : Paramètres macromoléculaires du dextrane D_{40}^2 et des échantillons obtenus après déprotection de dextrans silylés par l'HMDS (DSH)	138
Tableau II-19 : Paramètres macromoléculaires du dextrane D_{40}^2 et des échantillons obtenus après déprotection de dextrans silylés par la BSA (DSH).....	139
Tableau II-20: Caractéristiques des copolymères obtenus au terme de la synthèse globale.....	143

Tableau III-1 : Comparaison des concentrations d'agrégation critique (C_{AC}) déterminées par (I_1/I_3) (cas du pyrène), λ_{max} ou par (ϕ_f/ϕ_0) (cas du rotor DMAC).....	160
--	-----

Tableau III-2 : Taux de recouvrement (Γ , épaisseur (Δ_{PZ}) et densité (d) de la couche de dextrane à la surface des particules pour diverses concentrations en polymère dans la phase aqueuse. Nanoparticules de PLA préparées en présence de Dex _{29K} -g ^{-13,5} PLA _{0,2K} ou de DexP ₁₅	189
--	-----

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur DUBOIS Philippe, Professeur, Université de Mons-Hainaut UMH, Mons Belgique

Monsieur VERT Michel, Directeur de Recherche, Université de Montpellier 1 Faculté de pharmacie, Montpellier

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame NOUVEL Cécile

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

«Synthèse contrôlée de copolymères adaptatifs, dextrane-g-poly lactide : de leur utilisation comme surfactifs biodégradables à la mise en œuvre de systèmes de vectorisation particuliers».

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

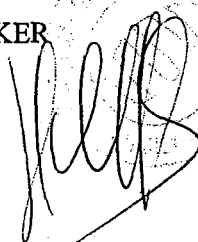
Spécialité : «GENIE DES PROCEDES»

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDOEUVRE CEDEX

Fait à Vandoeuvre le, 2 décembre 2002

Le Président de l'IN.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



Résumé:

De nouveaux copolymères amphiphiles en peigne de type dextrane-g-poly lactide ont été obtenus. Pour contrôler les paramètres macromoléculaires de ces copolymères biodégradables et potentiellement biocompatibles, leur synthèse est effectuée par la méthode du "grafting from" en trois étapes : silylation partielle des fonctions hydroxyle du dextrane ; polymérisation par ouverture de cycle du D,L-lactide à partir des fonctions alcool résiduelles situées sur le dextrane protégé, puis clivage des groupements silyléthers dans des conditions douces.

Des études détaillées de chaque étape ont permis d'assurer la stabilité de la chaîne de dextrane et le contrôle de l'architecture des copolymères (nombre et longueur des greffons). Les propriétés d'organisation de ces produits ont été évaluées à la fois par tensiométrie et spectroscopie de fluorescence. Ces propriétés nous ont permis d'envisager l'emploi de ces copolymères pour la préparation de nanosphères.

Mots-clés : *dextrane, polysaccharide, polylactide (PLA), amphiphile, copolymère en peigne, biocompatible, tensioactif, nanosphères.*

Abstract:

Synthesis of novel grafted amphiphilic copolymers polylactide-grafted dextran was achieved. Macromolecular control of such biodegradable and potentially biocompatible copolymers requires a three-step synthesis based on the "grafting from" concept : partial protection of the dextran hydroxyl groups by silylation ; followed by ring opening polymerization of D, L-lactide initiated from remaining hydroxyls of this partially silylated dextran backbone. The third step involves the silylethers deprotection under very mild conditions.

Throughout the synthesis, detailed studies of each step have led to stability of dextran backbone and control of copolymer architecture in terms of graft number and graft length. Tension and fluorescence experiments have given information about the organisation properties of these copolymers. The potential of such copolymers for formulation of nanospheres has been also studied.

Key words : *dextran, polysaccharide, polylactide (PLA), amphiphilic, graft copolymer, biocompatible, surfactant, nanospheres.*