



**HAL**  
open science

# De l'effet Ouzo à la chimioradiothérapie : formulation de nanocapsules hybrides nanoparticules/polymères pour l'encapsulation de principes actifs par déplacement de solvant

Déborah Iglicki

## ► To cite this version:

Déborah Iglicki. De l'effet Ouzo à la chimioradiothérapie : formulation de nanocapsules hybrides nanoparticules/polymères pour l'encapsulation de principes actifs par déplacement de solvant. Matériaux. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENS142 . tel-04703660

**HAL Id: tel-04703660**

**<https://theses.hal.science/tel-04703660v1>**

Submitted on 20 Sep 2024

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

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

# THÈSE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

École Doctorale n° 638  
*Science de la Matière, des Molécules et Matériaux*  
Spécialité : « Chimie - Science des Matériaux »

Par

**Déborah IGLICKI**

## **De l'effet Ouzo à la chimioradiothérapie : Formulation de nanocapsules hybrides nanoparticules/polymères pour l'encapsulation de principes actifs par déplacement de solvant**

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 10 mars 2023

Unité de recherche : UMR CNRS 6226 – Institut des Sciences Chimiques de Rennes – Equipe COInt

### **Rapportrices avant soutenance :**

Stéphanie BRIANÇON  
Fabienne TESTARD

Professeure des universités, LAGEPP, Université Claude Bernard Lyon 1  
Directrice de Recherches, LIONS, CEA

### **Composition du Jury :**

#### **Examinatrices/Examinateur :**

Paul RÉTIF  
Sophie TOMASI

Physicien médical, Hôpital de Mercy, CHR Metz-Thionville  
Professeure des Universités, ISCR, Université de Rennes 1

Stéphanie BRIANÇON  
Fabienne TESTARD

Professeure des Universités, LAGEPP, Université Claude Bernard Lyon 1  
Directrice de Recherches, LIONS, CEA

#### **Directrice de thèse :**

Fabienne GAUFFRE

Directrice de Recherches - CNRS, ISCR, Université de Rennes 1

#### **Co-encadrante de thèse :**

Soizic CHEVANCE

Maîtresse de Conférences, ISCR, Université de Rennes 1



## AVANT-PROPOS

---

Cette thèse porte globalement sur la compréhension de l'effet Ouzo, une méthode de nanopréciipitation par déplacement de solvant, et la formulation de nanocapsules hybrides nanoparticules inorganiques/polymère, nommées Hybridosomes®.

Dans un premier temps, la revue de littérature (chapitre 1) introduira le principe de la nanopréciipitation, en particulier par déplacement de solvant comprenant l'effet Ouzo, ainsi que les différents types de capsules colloïdales élaborées par déplacement de solvant. Une partie se concentrera sur l'encapsulation de principes actifs dans différents types de nanocapsules comparés. Enfin, une dernière partie sera consacrée à l'utilisation de nanoparticules radiosensibilisantes pour la radiothérapie, ainsi qu'à l'intérêt de la thérapie combinée (chimioradiothérapie).

Un constat clair peut être établi suite à la revue de littérature : le développement d'un modèle théorique du domaine Ouzo semble être un défi de taille puisque la nanopréciipitation dépend à la fois de la thermodynamique et de la cinétique. Dans de nombreux cas, la formation de nanoparticules par effet Ouzo est basée sur l'expérience empirique et l'observation visuelle de la turbidité. Dans la littérature, nous avons constaté que diverses techniques (DLS, SAXS, SANS, RMN, TEM, etc.) ont été utilisées pour étudier les structures formées dans les systèmes Ouzo et déterminer les frontières entre les différents domaines. Néanmoins, l'utilisation de ces différentes techniques d'analyse a conduit à une variabilité des critères pour déterminer les limites du domaine Ouzo. C'est pourquoi, dans le chapitre 2, nous nous sommes proposés de déterminer une méthodologie et des critères plus objectifs qui permettent d'avoir une connaissance plus précise des diagrammes de phase et de délimiter plus distinctement les domaines Ouzo et SFME.

Les travaux portant sur les Hybridosomes® ouvrent de nouvelles perspectives pour l'élaboration de nanocapsules de nanoparticules, en particulier contenant des médicaments pour des applications thérapeutiques. Ainsi, dans le chapitre 3, nous avons cherché à encapsuler différents principes actifs hydrophobes (solide ou liquide) dans les Hybridosomes®.

Outre une très grande stabilité, les nanoparticules dans la coque des H® peuvent apporter des propriétés spécifiques aux nanocapsules. Quand leur coque contient quelques nanoparticules d'or, ces H® deviennent d'efficaces radiosensibilisants, permettant de potentialiser des radiothérapies. Dans le chapitre 4, nous avons cherché à démontrer l'intérêt d'encapsuler des molécules chimiothérapeutiques dans les H® combiné aux effets radiosensibilisants des nanoparticules d'or dans la coque.



# SOMMAIRE GÉNÉRAL

---

<b>CHAPITRE 1 Introduction Bibliographique</b>	<b>1</b>
<b>I La nanoprécipitation</b>	<b>5</b>
<b>I.1 Le mécanisme de la nanoprécipitation :</b>	<b>5</b>
I.1.a Le processus classique : Théorie de LaMer	5
I.1.b Production de la sursaturation et de la nucléation	7
I.1.c Croissance par condensation et par coagulation/coalescence	9
I.1.d Différents mécanismes d'évolution du système	10
I.1.d.i Coalescence versus mûrissement d'Ostwald	10
I.1.d.ii Croissance versus coalescence	12
<b>I.2 Le déplacement de solvant comme technique de nanoprécipitation</b>	<b>13</b>
I.2.a Ajout d'un « non-solvant » : le principe	13
I.2.b Effet Ouzo : un cas particulier	14
I.2.b.i Qu'est-ce que l'effet Ouzo ?	14
I.2.b.ii Limite supérieure du domaine Ouzo	19
I.2.b.iii Un effet Ouzo inverse ?	19
I.2.b.iv La zone pré-Ouzo ou microémulsion sans tensioactif (SFME)	20
I.2.b.v Stabilisation colloïdale des nano-objets	25
I.2.c Co-Nanoprecipitation	27
I.2.c.i Nucléation hétérogène	28
I.2.c.ii La nanoprécipitation séquentielle	28
<b>I.3 Les paramètres influençant les nanostructures obtenues par l'effet Ouzo</b>	<b>30</b>
I.3.a Choix du solvant, du « non-solvant » et du soluté	31
I.3.a.i Le paramètre d'affinité entre le solvant et l'eau	31
I.3.a.ii Modulation de l'interdiffusion entre le solvant et le « non-solvant »	32
I.3.a.iii Le choix du soluté à nanoprécipiter	33
I.3.b Les méthodes d'ajout et de temps de mélange	34
I.3.c L'ajout d'un stabilisant	37
I.3.d Autres paramètres (température, force ionique)	39
<b>II La nanoprécipitation pour l'élaboration de nanocapsules à partir de l'effet Ouzo et/ou de la zone SFME</b>	<b>41</b>
II.1 Capsules de polymère à partir de polymères préformés	41
II.2 Capsules de nanoparticules inorganiques	47
II.3 Capsules hybrides : à partir de polymères et de nanoparticules inorganiques	49
II.3.a Les Hybridosomes®	49
II.3.b Les autres capsules hybrides	54
<b>III Encapsulation de principes actifs dans des nanocapsules</b>	<b>56</b>
III.1 Les différentes stratégies pour encapsuler les médicaments	56
III.2 Les Hybridosomes®	57
III.3 Les autres méthodes d'encapsulation de principe actif	62
III.3.a Les systèmes d'émulsion	62
III.3.a.i Les Micro- et Nano-émulsions	63
III.3.a.ii Les micelles de copolymères à bloc : l'auto-assemblage de polymères amphiphiles	63
III.3.a.iii Les émulsions Pickering	64

III.3.b	Les autres systèmes d'encapsulation	65
III.3.b.i	Les vésicules : liposomes, polymersomes et capsules LbL (Layer-by-Layer)	65
III.3.b.ii	Les cages moléculaires : dendrimères et cyclodextrines	67
<b>IV</b>	<b>La radiothérapie et la thérapie combinée</b>	<b>69</b>
<b>IV.1</b>	<b>La radiothérapie par photons</b>	<b>69</b>
<b>IV.2</b>	<b>Radiothérapie sensibilisée par des nanoparticules d'or (AuNP)</b>	<b>70</b>
IV.2.a	Rôle des AuNP en tant que radiosensibilisant	71
IV.2.b	Propriétés physico-chimiques des AuNP	75
IV.2.b.i	Taille des NP	75
IV.2.b.ii	La charge de surface	76
IV.2.c	La toxicité des AuNP (et des SPION)	76
<b>IV.3</b>	<b>La chimio-radiothérapie combinée</b>	<b>77</b>
IV.3.a	L'administration de médicaments multifonctionnels	77
IV.3.b	L'amélioration du ciblage ou de l'absorption tumorale par radiothérapie	78
IV.3.c	L'amélioration de l'effet des rayonnements ionisants	79
IV.3.d	La libération contrôlée en utilisant les rayonnements ionisants comme déclencheur	80
<b>V</b>	<b>Références bibliographiques</b>	<b>81</b>
<b>CHAPITRE 2 Formation et stabilité des mésostructures dans les systèmes ternaires « Ouzo »</b>		<b>99</b>
<b>I</b>	<b>Étude du système BHT/THF/H<sub>2</sub>O</b>	<b>105</b>
<b>I.1</b>	<b>Construction du diagramme de phase</b>	<b>105</b>
I.1.a	Par observation visuelle	105
I.1.b	Détermination de la binodale par COSMO-RS	105
I.1.c	Focalisation sur une zone d'intérêt du diagramme de phase	106
<b>I.2</b>	<b>Investigation de la ligne à <math>\Phi_{THF} = 0,2</math></b>	<b>107</b>
I.2.a	Analyse de la stabilité des échantillons par analyses NTA et DLS	108
I.2.b	Analyse de la stabilité des échantillons par SMLS (Static Multiple Light Scattering)	109
<b>I.3</b>	<b>Investigation de la ligne à <math>\Phi_{THF} = 0,1</math> et <math>\Phi_{THF} = 0,15</math></b>	<b>111</b>
I.3.a	Mise en évidence d'un domaine Ouzo limpide	112
I.3.b	Influence des conditions de mélange	113
<b>I.4</b>	<b>Etude de la stabilité des gouttelettes par la présence d'une charge à la surface</b>	<b>114</b>
<b>I.5</b>	<b>Évolution de la composition des gouttelettes du domaine monophasique au domaine métastable</b>	<b>115</b>
<b>I.6</b>	<b>Conclusion intermédiaire de la partie I</b>	<b>118</b>
<b>II</b>	<b>Étude des systèmes avec une huile comme soluté hydrophobe.</b>	<b>118</b>
<b>II.1</b>	<b>Construction des diagrammes de phase par observation visuelle</b>	<b>118</b>
<b>II.2</b>	<b>Détermination de la binodale par analyse SMLS (et NTA)</b>	<b>119</b>
II.2.a	Pour le système limonène/DMSO/H <sub>2</sub> O	119
II.2.b	Pour le système $\alpha$ -tocophérol/THF/H <sub>2</sub> O	122
<b>II.3</b>	<b>Comparaison globale des 2 systèmes étudiés avec le BHT/THF/H<sub>2</sub>O</b>	<b>123</b>
<b>III</b>	<b>Étude du système BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O : cas d'un soluté solide fluorescent</b>	<b>124</b>
<b>III.1</b>	<b>Construction d'un diagramme de phase selon la fluorescence du BODIPY</b>	<b>124</b>

III.2	Détermination de la composition de la goutte par fluorescence	127
III.3	Analyse DLS et Mesure de la mobilité électrophorétique	127
IV	<i>Conclusions et perspectives</i>	130
V	<i>Références Bibliographiques</i>	133
<b>CHAPITRE 3 Encapsulation de principes actifs par nanopréciipitation dans les H<sup>®</sup></b>		<b>135</b>
I	<i>Stratégie d'encapsulation dans les H<sup>®</sup></i>	141
II	<i>Étude du système Sorafénib/THF/H<sub>2</sub>O</i>	142
II.1	Étude du système à $\Phi_{\text{THF}} = 0,23$ (en l'absence de NP)	142
II.2	Étude des H <sup>®</sup> contenant du sorafénib nanoprécipité	144
II.3	Évaluation de l'encapsulation du sorafénib dans les H <sup>®</sup> et de sa libération (non contrôlée)	148
III	<i>Comparaison avec une forme ionique : le sorafénib tosylate</i>	149
III.1	Détermination de la limite de solubilité du système sorafénib tosylate/THF/H <sub>2</sub> O	149
III.2	Étude de la charge à la surface des gouttelettes	151
III.3	Étude des H <sup>®</sup> contenant du sorafénib tosylate nanoprécipité	151
IV	<i>Cas d'un soluté hydrophobe liquide : la vitamine E</i>	153
V	<i>Étude du système paclitaxel/THF/H<sub>2</sub>O.</i>	155
V.1	Détermination de la limite de solubilité du système paclitaxel/THF/H <sub>2</sub> O	155
V.2	Étude des H <sup>®</sup> contenant du paclitaxel	156
VI	<i>Conclusions et perspectives</i>	159
VII	<i>Références bibliographiques</i>	160
<b>CHAPITRE 4 Vers la thérapie combinée - chimioradiothérapie</b>		<b>163</b>
I	<i>Utilisation des Hybridosomes<sup>®</sup> pour la chimiothérapie</i>	168
I.1	Choix du sorafénib	168
I.2	Évaluation des effets chimiothérapeutiques	168
I.2.a	Lignée cellulaire HuH-7 et protocole de culture cellulaire	169
I.2.b	Test de viabilité en présence des différents contrôles : médicaments non-formulés en H <sup>®</sup>	170
I.2.c	Test de viabilité en présence d'H <sup>®</sup> avec ou sans Sorafénib encapsulé	171
II	<i>Utilisation des Hybridosomes<sup>®</sup> pour la thérapie combinée</i>	172
II.1	<b>Stratégie de potentialisation de la radiothérapie par l'utilisation de nanoparticules radiosensibilisantes</b>	<b>172</b>
II.1.a	Intérêt de l'utilisation des nanoparticules d'or (AuNP).	172
II.1.b	Elaboration des H <sup>®</sup> contenant seulement des AuNP	173
II.1.b.i	Synthèse des AuNP	173
II.1.b.ii	Choix du polymère et élaboration des H <sup>®</sup> BHT/AuNP@polymère	174
II.1.b.iii	Élaboration des H <sup>®</sup> sorafénib/AuNP@PVPA	175



<b>II.2</b>	<b>Évaluation des effets chimioradiothérapeutiques des H<sup>®</sup></b>	<b>180</b>
II.2.a	Évaluation de l'activité chimiothérapeutique des H <sup>®</sup> AuNP@PVPA avec/sans sorafénib.	180
II.2.b	Évaluation de l'activité chimioradiothérapeutique du sorafénib formulé en H <sup>®</sup>	181
II.2.b.i	Détermination de la dose d'irradiation adéquate	181
II.2.b.ii	Tests cellulaires de thérapie combinée	184
<b>III</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>187</b>
<b>IV</b>	<b>Références bibliographiques</b>	<b>189</b>
<b>CHAPITRE 5 Partie expérimentale</b>		<b>193</b>
<b>I</b>	<b>Produits utilisés</b>	<b>197</b>
I.1	Solvants organiques et aqueux	197
I.2	Solutés hydrophobes	197
<b>II</b>	<b>Méthodes de caractérisation des échantillons</b>	<b>197</b>
II.1	NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)	197
II.2	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	198
II.3	SMLS (Static Multiple Light Scattering)	199
II.4	MET (Transmission Electron Microscopy)	200
II.5	Mobilité électrophorétique	200
<b>III</b>	<b>Chapitre 2 – Mise en évidence de la formation et de la stabilité des mésostructures dans les mélanges ternaires Ouzo.</b>	<b>201</b>
III.1	Préparation des échantillons et élaboration d'un diagramme de phase	201
III.2	Détermination de la binodale	202
III.2.a	Par observation visuelle	202
III.2.b	Par COSMO-RS (COnductor-like Screening MOdel for Real Solvents)	202
III.3	Suivi cinétique de l'évolution de la taille des gouttelettes	203
III.3.a	Par NTA	203
III.3.b	Par DLS	203
III.4	Etude de la composition des gouttes	204
III.4.a	Par RMN <sup>1</sup> H, NOESY <sup>1</sup> H 2D et DOSY 2D	204
III.4.b	Par suivi de la fluorescence du BODIPY	204
<b>IV</b>	<b>Chapitre 3 – Encapsulation des principes actifs par nanopréciipitation dans les Hybridosomes<sup>®</sup></b>	<b>206</b>
IV.1	Les nanoparticules d'oxyde de Fer ou SPION	206
IV.2	Préparation et purification des H <sup>®</sup> - Procédé d'encapsulation des principes actifs	206
IV.3	Analyse de la taille des H <sup>®</sup> par NTA	207
IV.4	Détermination du taux d'encapsulation du sorafénib dans les H <sup>®</sup> SPION@PEG-PAA	207
IV.5	Etude du relargage du sorafénib hors des H <sup>®</sup> SPION@PEG-PAA au cours du temps	208
<b>V</b>	<b>Chapitre 4 – Vers la thérapie combinée – chimioradiothérapie</b>	<b>209</b>
V.1	Synthèse des nanoparticules d'or (AuNP)	209

<b>V.2</b>	<b>Préparation et purification des H<sup>®</sup></b>	<b>210</b>
V.2.a	H <sup>®</sup> SPION@PEG-PAA (encapsulant soit sorafénib soit BHT)	210
V.2.b	H <sup>®</sup> AuNP@PVPA (encapsulant soit sorafénib soit BHT)	210
<b>V.3</b>	<b>Tests cellulaires</b>	<b>210</b>
V.3.a	Préparation des échantillons H <sup>®</sup> dans le sérum	210
V.3.b	Protocole d'incubation dans les milieux cellulaires	211
V.3.b.i	Cultures cellulaires	211
V.3.b.ii	Essai de cytotoxicité à effet de dose (détermination de IC <sub>50</sub> )	211
<b>V.4</b>	<b>Procédé d'irradiation des échantillons et des milieux cellulaires</b>	<b>211</b>
<b>VI</b>	<b>Références bibliographiques</b>	<b>213</b>
<b>CHAPITRE 6</b>	<b>Conclusion générale</b>	<b>215</b>



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

<b>AuNP</b> : Nanoparticule(s) d'or	<b>LogP</b> : coefficient de partage octanol/eau
<b>BHT</b> : Hydroxytoluène butylé	<b>LSW</b> : Lifshitz-Slyozov-Wagner
<b>BS</b> : Rétrodiffusion (Back Scattering)	<b>MEB</b> : Microscopie Électronique à Balayage
<b>CD</b> : cyclodextrine	<b>MET</b> : Microscopie Électronique à Transmission
<b>COSMO-RS</b> : COnductor-like Screening MOdel for Real Solvents	<b>MeOH</b> : Méthanol
<b>DEX</b> : Dextran	<b>MOF</b> : Metal-Organic Framework
<b>D<sub>H</sub></b> : Diamètre hydrodynamique	<b>M<sub>w</sub></b> : masse moléculaire
<b>DLCA</b> : Diffusion limited cluster aggregation	<b>NOESY</b> : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<b>DLS</b> : Diffusion dynamique de la lumière	<b>NP</b> : Nanoparticule(s)
<b>DMF</b> : N,N-diméthylformamide	<b>NTA</b> : Nanoparticle Tracking Analysis
<b>DMSO</b> : Diméthylsulfoxyde	<b>OA</b> : Octylamine
<b>DOSY</b> : Diffusion Ordered Spectroscopy	<b>OIA</b> : Oléylamine
<b>DOX</b> : Doxorubicine	<b>OIAc</b> : Acide oléique
<b>DSC</b> : Calorimétrie différentielle à balayage	<b>PAA</b> : poly(acide acrylique)
<b>DVB</b> : Divinylbenzène	<b>PAAH</b> : poly(hydrochlorure d'allylamine)
<b>EDX</b> : Energy-dispersive X-ray spectroscopy	<b>PAMAM</b> : polyamidoamine
<b>ELS</b> : Électrophorèse laser Doppler	<b>PBS</b> : Phosphate buffered saline
<b>EPR</b> : Enhanced Permeability and Retention	<b>PCL</b> : polycaprolactone
<b>EtOH</b> : éthanol	<b>PEEGM</b> : poly(N-[2-( $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy)ethyl]) methacrylamide
<b>FBS</b> : sérum de veau foetal	<b>PEG</b> : poly(éthylène glycol)
<b>FDA</b> : Food and Drug Administration	<b>PEI</b> : poly(éthylèneimine)
<b>FNP</b> : Flash Nanoprecipitation	<b>PEMM</b> : Poly(N-[2-(2-ethoxy)ethyl( $\alpha$ -D-glucopyranoside)]) methacrylamide
<b>H<sup>®</sup></b> : Hybridosomes <sup>®</sup> (marque déposée)	<b>PLA</b> : poly-(D,L-lactide)
<b>HPLC</b> : High performance liquid chromatography	<b>PLGA</b> : Poly(lactic-co-glycolic acid)
<b>IC<sub>50</sub></b> : Concentration inhibitrice médiane	<b>PMMA</b> : poly(méthacrylate de méthyle)
<b>IRM</b> : Imagerie par résonance magnétique	<b>poly(PDL-co-DO)</b> : (poly( $\omega$ -pentadecalactone-co-p-dioxanone)
<b>LbL</b> : layer-by-layer	

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

**PTX** : Paclitaxel

**PUL** : Pullulan

**PVPA** : poly(acide vinylphosphonique)

**QD** : Quantum Dots

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**SBME** : Surfactant-Based MicroEmulsions

**SFME** : Surfactant Free MicroEmulsion

**SLN** : particule lipidique solide

**SLS** : Static Light Scattering

**SMILES** : Simplified Molecular Input Line  
Entry Specification

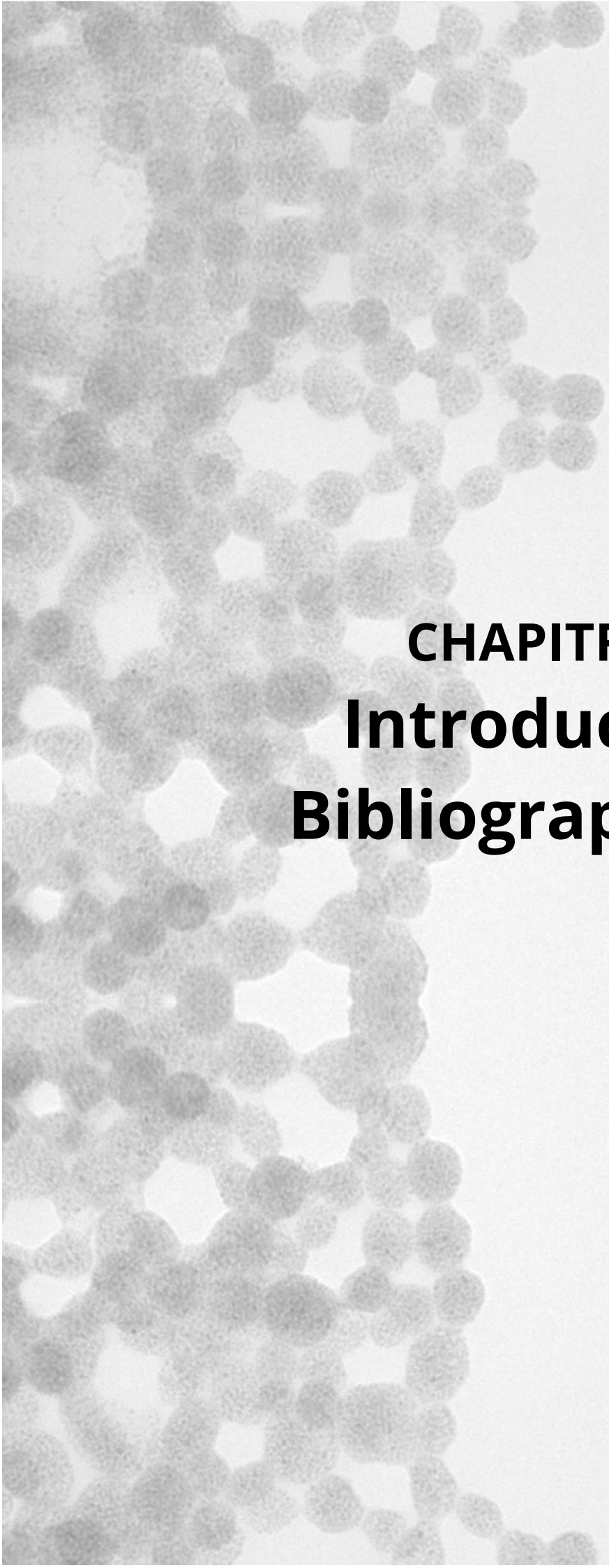
**SMLS** : Static Multiple Light Scattering

**SPION** : SuperParamagnetic Iron Oxide  
Nanoparticle

**THF** : Tétrahydrofurane

**UFME** : UltraFlexible MicroEmulsion

**VIT E** : Vitamine E



**CHAPITRE 1**  
**Introduction**  
**Bibliographique**



# SOMMAIRE

---

<b>CHAPITRE 1 Introduction Bibliographique</b>	<b>1</b>
<b>I La nanoprécipitation</b>	<b>5</b>
<b>I.1 Le mécanisme de la nanoprécipitation :</b>	<b>5</b>
I.1.a Le processus classique : Théorie de LaMer	5
I.1.b Production de la sursaturation et de la nucléation	7
I.1.c Croissance par condensation et par coagulation/coalescence	9
I.1.d Différents mécanismes d'évolution du système	10
I.1.d.i Coalescence versus mûrissement d'Ostwald	10
I.1.d.ii Croissance versus coalescence	12
<b>I.2 Le déplacement de solvant comme technique de nanoprécipitation</b>	<b>13</b>
I.2.a Ajout d'un « non-solvant » : le principe	13
I.2.b Effet Ouzo : un cas particulier	14
I.2.b.i Qu'est-ce que l'effet Ouzo ?	14
I.2.b.ii Limite supérieure du domaine Ouzo	19
I.2.b.iii Un effet Ouzo inverse ?	19
I.2.b.iv La zone pré-Ouzo ou microémulsion sans tensioactif (SFME)	20
I.2.b.v Stabilisation colloïdale des nano-objets	25
I.2.c Co-Nanoprecipitation	27
I.2.c.i Nucléation hétérogène	28
I.2.c.ii La nanoprécipitation séquentielle	28
<b>I.3 Les paramètres influençant les nanostructures obtenues par l'effet Ouzo</b>	<b>30</b>
I.3.a Choix du solvant, du « non-solvant » et du soluté	31
I.3.a.i Le paramètre d'affinité entre le solvant et l'eau	31
I.3.a.ii Modulation de l'interdiffusion entre le solvant et le « non-solvant »	32
I.3.a.iii Le choix du soluté à nanoprécipiter	33
I.3.b Les méthodes d'ajout et de temps de mélange	34
I.3.c L'ajout d'un stabilisant	37
I.3.d Autres paramètres (température, force ionique)	39
<b>II La nanoprécipitation pour l'élaboration de nanocapsules à partir de l'effet Ouzo et/ou de la zone SFME</b>	<b>41</b>
<b>II.1 Capsules de polymère à partir de polymères préformés</b>	<b>41</b>
<b>II.2 Capsules de nanoparticules inorganiques</b>	<b>47</b>
<b>II.3 Capsules hybrides : à partir de polymères et de nanoparticules inorganiques</b>	<b>49</b>
II.3.a Les Hybridosomes®	49
II.3.b Les autres capsules hybrides	54
<b>III Encapsulation de principes actifs dans des nanocapsules</b>	<b>56</b>
<b>III.1 Les différentes stratégies pour encapsuler les médicaments</b>	<b>56</b>
<b>III.2 Les Hybridosomes®</b>	<b>57</b>
<b>III.3 Les autres méthodes d'encapsulation de principe actif</b>	<b>62</b>
III.3.a Les systèmes d'émulsion	62
III.3.a.i Les Micro- et Nano-émulsions	63
III.3.a.ii Les micelles de copolymères à bloc : l'auto-assemblage de polymères amphiphiles	63
III.3.a.iii Les émulsions Pickering	64
III.3.b Les autres systèmes d'encapsulation	65



III.3.b.i	Les vésicules : liposomes, polymersomes et capsules LbL (Layer-by-Layer)	65
III.3.b.ii	Les cages moléculaires : dendrimères et cyclodextrines	67
<b>IV</b>	<b>La radiothérapie et la thérapie combinée</b>	<b>69</b>
<b>IV.1</b>	<b>La radiothérapie par photons</b>	<b>69</b>
<b>IV.2</b>	<b>Radiothérapie sensibilisée par des nanoparticules d'or (AuNP)</b>	<b>70</b>
IV.2.a	Rôle des AuNP en tant que radiosensibilisant	71
IV.2.b	Propriétés physico-chimiques des AuNP	75
IV.2.b.i	Taille des NP	75
IV.2.b.ii	La charge de surface	76
IV.2.c	La toxicité des AuNP (et des SPION)	76
<b>IV.3</b>	<b>La chimio-radiothérapie combinée</b>	<b>77</b>
IV.3.a	L'administration de médicaments multifonctionnels	77
IV.3.b	L'amélioration du ciblage ou de l'absorption tumorale par radiothérapie	78
IV.3.c	L'amélioration de l'effet des rayonnements ionisants	79
IV.3.d	La libération contrôlée en utilisant les rayonnements ionisants comme déclencheur	80
<b>V</b>	<b>Références bibliographiques</b>	<b>81</b>

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

---

Dans un premier temps, nous définirons la nanoprécipitation et en présenterons les principaux mécanismes. Nous exposerons les différents procédés de nanoprécipitation utilisés dans la littérature, dont l'effet Ouzo, ainsi que les paramètres influençant la structure finale des nano-objets obtenus. Nous présenterons aussi succinctement la co-nanoprécipitation.

Dans un second temps, nous aborderons plus précisément l'élaboration de nanocapsules polymères à partir de l'effet Ouzo et de la zone nommée Surfactant Free MicroEmulsion (SFME). Par ailleurs, il existe des capsules à partir de nanoparticules inorganiques, ainsi que des capsules dites hybrides qui sont conçues à partir de polymères organiques et de nanoparticules inorganiques. Nous détaillerons plus particulièrement les travaux antérieurs de mon équipe de recherche portant sur ces capsules hybrides organiques/inorganiques, nommées Hybridosomes® (thèses de Flavien Sciortino et de Clément Goubault).

Ensuite, nous nous focaliserons sur l'encapsulation de principes actifs. Nous appréhenderons le mécanisme d'encapsulation d'un composé hydrophobe dans les Hybridosomes® à partir de la nanoprécipitation (thèse de Clément Goubault). Puis, nous le comparerons à d'autres méthodes classiques d'encapsulation. De plus, nous discuterons brièvement de la co-encapsulation de principes actifs et de son intérêt dans certains cas.

En dernier point, nous traiterons de l'utilisation des nanoparticules inorganiques pour les applications biomédicales, et particulièrement en théranostique (contraction de « thérapie » et « diagnostic »). Nous évoquerons la biodistribution *in vitro* et *in vivo* des Hybridosomes® qui a été étudiée dans la thèse de Clément Goubault, ainsi que l'effet potentialisant des nanoparticules d'or en radiothérapie.

## I La nanoprécipitation

La nanoprécipitation est fondée sur le changement de qualité du solvant utilisé pour précipiter les composés hydrophobes : si la qualité du solvant est diminuée, alors sa capacité à solubiliser les molécules d'intérêt est amoindrie, entraînant la précipitation du composé. Il existe plusieurs paramètres qui permettent de modifier la qualité du solvant tels que l'ajout d'un « non-solvant », la variation de pH, de température et la concentration en sel.<sup>1,2</sup>

Aujourd'hui, la nanoprécipitation est une méthode bien connue pour diverses applications en pharmacologie, cosmétologie, agroalimentaire, etc.<sup>3</sup> L'engouement pour cette méthode vient du fait que c'est un procédé simple, instantané, spontané et reproductible pour élaborer efficacement des nanoparticules à partir de composés hydrophobes.

### I.1 Le mécanisme de la nanoprécipitation :

#### I.1.a Le processus classique : Théorie de LaMer

Pour la première fois, le mécanisme de la nanoprécipitation a été décrit par la théorie de LaMer en 1950 et 1952.<sup>4,5</sup> En étudiant la synthèse d'hydrosol de soufre par la décomposition du thiosulfate de sodium, LaMer a décrit 3 phases de nucléation et de croissance des nanoparticules :

① Une augmentation rapide de la concentration de monomères libres en solution, dépassant la limite de solubilité (ou concentration de saturation d'équilibre) du soluté  $C_{\infty}$  et atteignant la concentration critique de sursaturation du soluté  $C_{cr}$ .

② Le monomère subit une "nucléation en rafale" qui réduit considérablement la concentration de monomères libres en solution.

③ après la nucléation, la croissance se produit sous le contrôle de la diffusion des monomères dans la solution.

Ces trois étapes sont illustrées dans la Figure 1 ci-dessous où la concentration des monomères est représentée en fonction du temps.

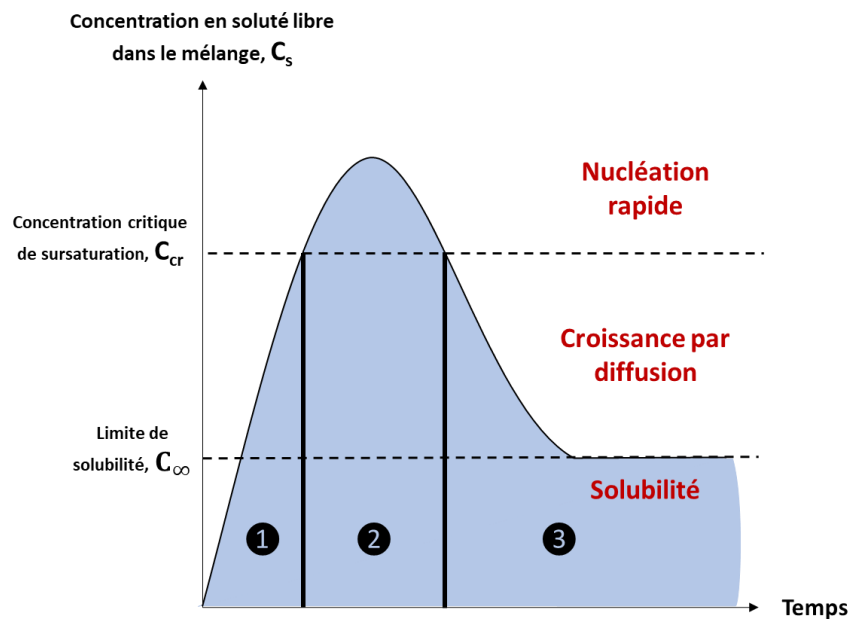


Figure 1 : Schéma du mécanisme de nanoprecipitation du soufre de LaMer. Courbe théorique représentant la concentration en soufre dissous dans le mélange en fonction du temps, avec les 3 étapes principales de nanoprecipitation : ① Sursaturation, ② Nucléation, et ③ Croissance par diffusion.<sup>4,6</sup>

Plus récemment, Joye et McClements<sup>7</sup> et Martinez Rivas *et al.*<sup>2</sup> ont utilisé le modèle de LaMer pour décrire plus finement la nanoprecipitation par changement de solvant. De plus, ils ont ajouté une quatrième étape qui est la croissance par coagulation/croissance. Ainsi, la Figure 2 se décompose en 4 étapes successives : ① la sursaturation, ② la nucléation, ③ la croissance par condensation et/ou par coagulation/coalescence, et enfin ④ la croissance par coagulation/coalescence.

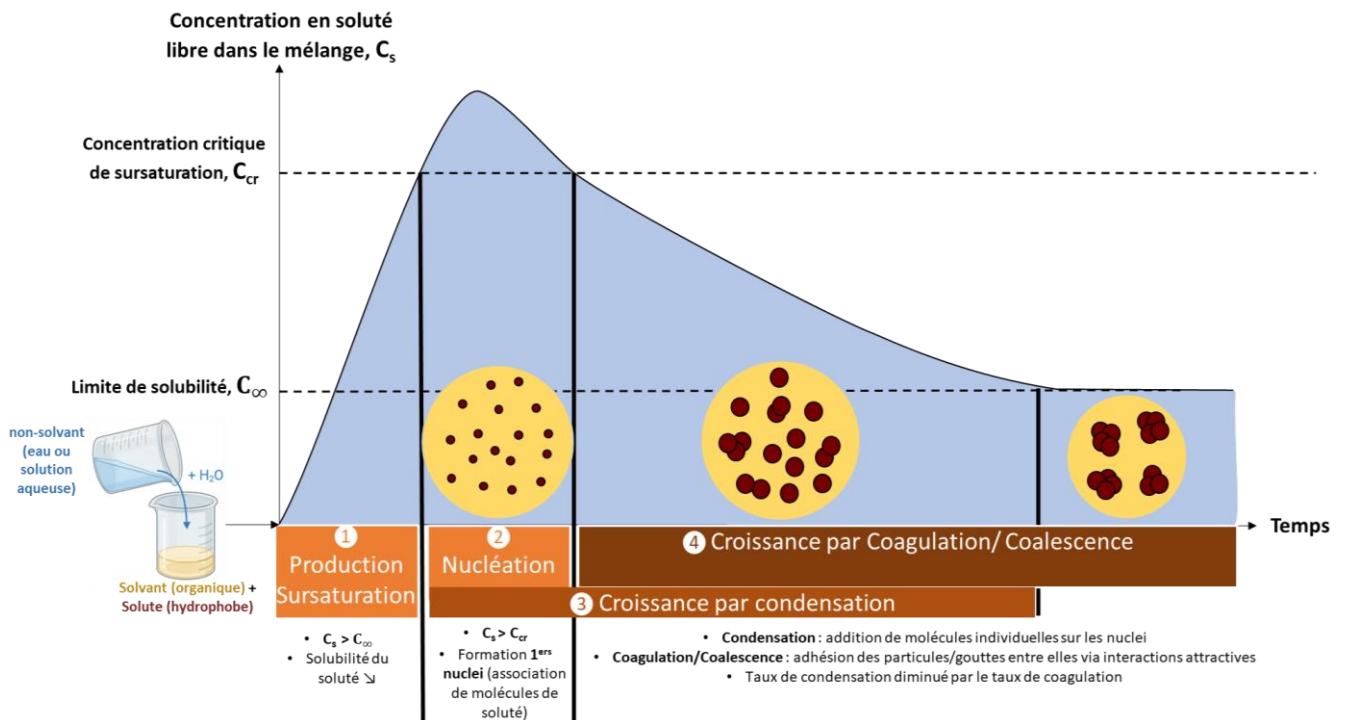


Figure 2 : Schéma des 4 étapes de la nanopréciipitation par ajout d'un "non-solvant".<sup>2,8</sup>

### I.1.b Production de la sursaturation et de la nucléation

L'ajout d'un grand volume de « non-solvant », généralement de l'eau, dans un solvant organique polaire et miscible au « non-solvant » et contenant le soluté hydrophobe, implique une diminution instantanée de sa solubilité. De ce fait, la concentration en soluté hydrophobe encore soluble dans le mélange est supérieure à sa limite de solubilité (ou la concentration de saturation d'équilibre) (cf. Figure 2). Ceci déclenche la première étape de la nanopréciipitation qui est la **sursaturation** du soluté. Prud'homme *et al.* définissent le taux de sursaturation  $S_r$  par le rapport suivant (équation (1)) :<sup>1,2,7</sup>

$$S_r = \frac{C_s}{C_\infty} \quad (1)$$

Avec  $C_s$  la concentration réelle du soluté dans le mélange et  $C_\infty$  la solubilité du soluté à l'équilibre dans le mélange. Ce taux de sursaturation est spécifique à un couple solvant / « non-solvant » donné et à chaque soluté hydrophobe dans le système ternaire. Il existe deux moyens de modifier le taux de sursaturation d'après cette équation :

- Plus la concentration en soluté est élevée, plus le taux de sursaturation est élevé et plus la nanopréciipitation est favorisée. Une augmentation de la taille des nanoparticules est alors observée dans ce cas de figure. En effet, le système ayant plus de matière, la probabilité que les nanoparticules formées se rencontrent est plus élevée et elles auront plus tendance à s'agglomérer entre elles.
- Dans un autre cas, on fait varier la solubilité à l'équilibre du soluté en modifiant le solvant et/ou le « non-solvant ». Alors, la taille des nanoparticules diminue lorsque  $S_r$  augmente, puisqu'il y a plus de noyaux formés lors de la nucléation. Si la concentration d'un soluté est relativement faible, la quantité de « non-solvant » insuffisante, ou

encore s'il est mal choisi pour diminuer la solubilité du soluté, alors il est possible de ne pas atteindre la sursaturation du composé hydrophobe.

Il est important de souligner que le taux de sursaturation affecte les propriétés finales des nanoparticules, comme la distribution de taille finale, la cristallinité des nanoparticules, ou encore leur morphologie.<sup>7</sup>

Lorsque la concentration de soluté libre est supérieure à la concentration critique de sursaturation, des fluctuations locales de concentration en soluté conduisent à la formation des premiers nuclei. C'est le début de la **nucléation** dite homogène.<sup>7,9</sup>

D'après la théorie classique de la nucléation, la variation de l'énergie libre de Gibbs  $\Delta G$  est le paramètre thermodynamique qui indique si la nucléation peut avoir lieu ou non.<sup>10</sup> Cette théorie postule que les noyaux formés ont une forme sphérique de rayon  $r$  et une tension superficielle  $\gamma$  constante et indépendante de leur taille.<sup>9</sup>  $\Delta G$  pour la nucléation d'une particule sphérique équivaut à la somme des contributions de l'énergie libre de Gibbs requise pour former une interface (surface),  $\Delta G_s$ , et la phase volumique (bulk),  $\Delta G_v$  (équation(2)) : <sup>1,9</sup>

$$\Delta G = \Delta G_s + \Delta G_v = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta g_v \quad (2)$$

$$\Delta g_v = \frac{-kT \ln(S_r)}{v} \quad (3)$$

Avec  $\Delta g_v$  la différence d'énergie libre par unité de volume entre les deux phases,  $\gamma$  la tension de surface à l'interface,  $r$  le rayon de la particule,  $T$  la température absolue,  $v$  le volume moléculaire,  $k$  la constante de Boltzmann et  $S_r$  le taux de sursaturation. La Figure 3 illustre la contribution des deux termes de l'énergie libre de Gibbs  $\Delta G$ , ainsi que leur somme en fonction du rayon des noyaux formés. La courbe passe par un maximum à un rayon critique  $r_c$ . Pour des valeurs de  $r < r_c$ , les noyaux ne sont pas stables et se redissolvent. Au-delà de  $r_c$ , les noyaux peuvent croître.

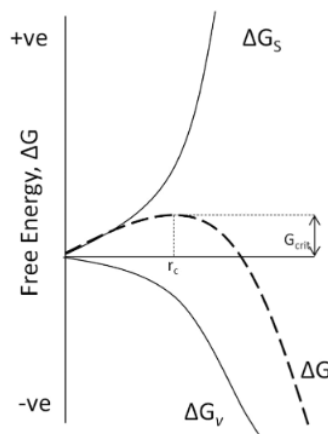


Figure 3 : Diagramme de l'énergie libre de Gibbs  $\Delta G$  en fonction du rayon des noyaux formés. Représentation de la contribution des termes de  $\Delta G$ , en surface  $\Delta G_s$  et en volume  $\Delta G_v$ , ainsi que leur somme : passage par un maximum  $\Delta G_{cr}$  à partir d'un rayon critique  $r_c$ .<sup>10</sup>

Le rayon critique dépend de la différence d'énergie libre par unité de volume entre les deux phases  $\Delta g_v$ , et donc de la sursaturation (équation (4)) :

$$r_c = \frac{-2\gamma}{\Delta g_v} \quad (4)$$

L'énergie libre critique  $\Delta G_{cr}$  correspondant au rayon critique est formulée selon l'équation (5) suivante :

$$\Delta G_{cr} = \frac{16\pi\gamma^3 v^3}{3k^2 T^2 (\ln S_r)^2} \quad (5)$$

Le taux de nucléation  $N_r$  suit la loi d'Arrhenius telle que :<sup>1</sup>

$$N_r = A \exp\left(-\frac{\Delta G_{cr}}{kT}\right) \quad (6)$$

avec A une constante.

Ainsi, le taux de nucléation est relié au taux de sursaturation et à la tension de surface par la combinaison des équations (4) et (6). Elles illustrent qu'une sursaturation élevée conduit à un fort taux de nucléation, impliquant une formation d'un plus grand nombre de noyaux de plus petite taille.<sup>7,8</sup>

Le rayon critique  $r_c$  est aussi relié au taux de sursaturation par recombinaison des équations (3) et (4) :<sup>10</sup>

$$\frac{kT(\ln S_r)}{v} = \frac{2\gamma}{r_c} \quad (7)$$

Si le taux de sursaturation est faible, alors le rayon critique est élevé induisant une plus faible production de noyaux stables pendant la phase de nucléation. Au contraire, un niveau élevé de sursaturation du soluté induit un taux de nucléation élevé et une croissance des noyaux avec une taille homogène.<sup>11</sup>

Cette étape de nucléation se poursuit jusqu'à épuisement de la sursaturation, après cela le nombre de nucléi n'évolue plus.<sup>12</sup>

### 1.1.c Croissance par condensation et par coagulation/coalescence

Dans la littérature, le terme « croissance » est souvent relié à la croissance par condensation, tandis que les croissances par coalescence/coagulation et par mûrissement d'Ostwald sont nommées telles quelles. Pour simplifier la suite de cette partie, nous utiliserons les dénominations : « croissance » pour la croissance par condensation, « coalescence » ou « agrégation » pour la croissance par agrégation/coalescence/coagulation et « mûrissement d'Ostwald » pour la croissance par ce phénomène.

Pendant l'étape de nucléation et jusqu'à ce que  $C_s$  redescende sous  $C_\infty$ , les nucléi croissent par condensation. En parallèle, les nanoparticules venant d'être formées par nucléation/condensation peuvent poursuivre leur croissance par coagulation et par coalescence (Figure 4). En effet, ces nanoparticules, ou gouttelettes, entrent en collision et s'agrègent entre elles par interactions attractives.<sup>1</sup> Cela réduit la surface de l'interface et donc l'énergie libre interfaciale totale. Ici, l'agrégation des particules est déterminée par le modèle cinétique de Smoluchowski.<sup>13</sup> Ce mode de croissance dépend :<sup>14</sup>

- du nombre de nanoparticules formées dans le milieu. Plus il y en a, plus leur probabilité de rencontre est élevée ;
- de leur taille. Plus elles sont grosses, plus elles ont de chance d'entrer en collision. Par ailleurs, en plus du mouvement Brownien, la gravité peut être une force motrice de la coalescence/coagulation pour les plus grosses particules ( $> \mu\text{m}$ ) ;
- de l'agitation.

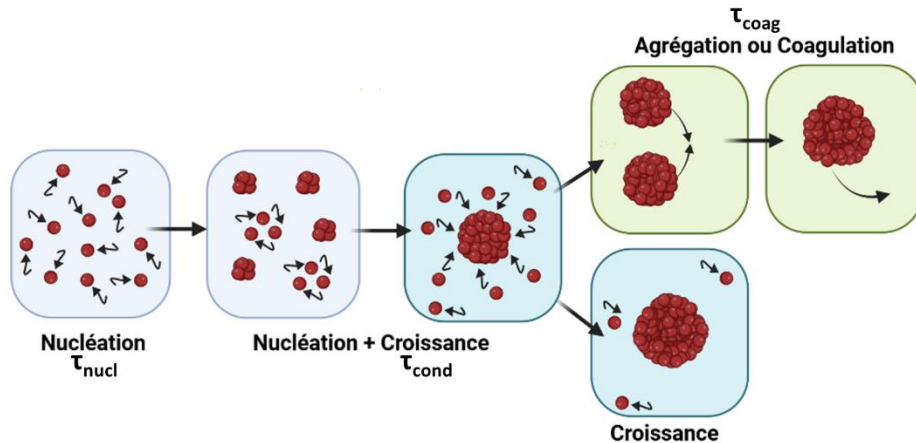


Figure 4: Schéma des mécanismes de nucléation et de croissance par condensation et/ou de croissance par coagulation.<sup>9,15</sup>

Finalement, les nanoparticules peuvent être stabilisées par différentes sources comme l'ajout de tensioactifs ou de polymères chargés (stabilisation électrostatique) ou non (stabilité stérique).

### 1.1.d Différents mécanismes d'évolution du système

#### 1.1.d.i Coalescence versus mûrissement d'Ostwald

Les processus de coalescence ou de mûrissement d'Ostwald peuvent être distingués en étudiant la taille des gouttelettes en fonction du temps :<sup>16,17</sup>

- La croissance par coalescence se produit par la fusion de deux ou plusieurs gouttelettes, et le volume de ces gouttelettes augmente de manière exponentielle dans le temps :  $R^3 = R_0^3 \exp(Kt)$ , avec  $R_0$  le rayon initial de la particule,  $R$  le rayon final,  $K$  une constante et  $t$  le temps.
- Le mûrissement d'Ostwald dépend de la diffusion des molécules de soluté dissoutes dans le milieu.<sup>10</sup> Ce phénomène est dirigé par la différence de pression de Laplace entre les gouttelettes de petites et grandes tailles. Ainsi, les plus petites disparaissent au profit des plus grosses. Dans ce cas la taille des gouttelettes croît de façon linéaire dans le temps d'après la théorie de Lifshitz-Slyozov-Wagner (LSW).

Sitnikova *et al.* ont mesuré l'évolution des tailles de gouttelettes d'émulsions trans-anéthole/éthanol/eau en fonction du temps. Pour différentes fractions d'alcool et d'eau et différentes concentrations en huile, ils obtiennent des courbes linéaires où le volume des gouttelettes ( $R^3$ ) est proportionnel au temps (Figure 5).<sup>17</sup> De ce fait, ils ont déduit que la

croissance des gouttelettes est bien gouvernée par le mûrissement d'Ostwald, et ce, sans coalescence. Par ailleurs, ils ont déterminé le taux de mûrissement d'Ostwald des émulsions à partir de l'évolution de la taille des gouttelettes en fonction du temps. Celui-ci augmente avec la quantité de soluté hydrophobe à faible taux d'alcool (Figure 5a), tandis qu'il diminue à des taux élevés d'éthanol (Figure 5b).<sup>16,17</sup> Par ailleurs, le taux de croissance diminue en augmentant la taille de la chaîne hydrocarbonée d'une molécule de soluté. Ensuite, à partir du taux du mûrissement d'Ostwald, ils ont pu estimer la tension interfaciale des gouttelettes et l'ont représentée en fonction de la concentration en huile à différents rapports éthanol/eau (Figure 6). Ils en ont conclu, d'une part, que la théorie LSW ne s'applique qu'aux émulsions très diluées avec une diffusion indépendante de l'environnement local. D'autre part, une plus grande quantité d'alcool réduit la tension interfaciale des gouttelettes de l'émulsion avec une adsorption plus thermodynamiquement favorable de molécules d'alcool à l'interface eau/huile, expliquant la diminution du taux du mûrissement d'Ostwald de la Figure 5b.

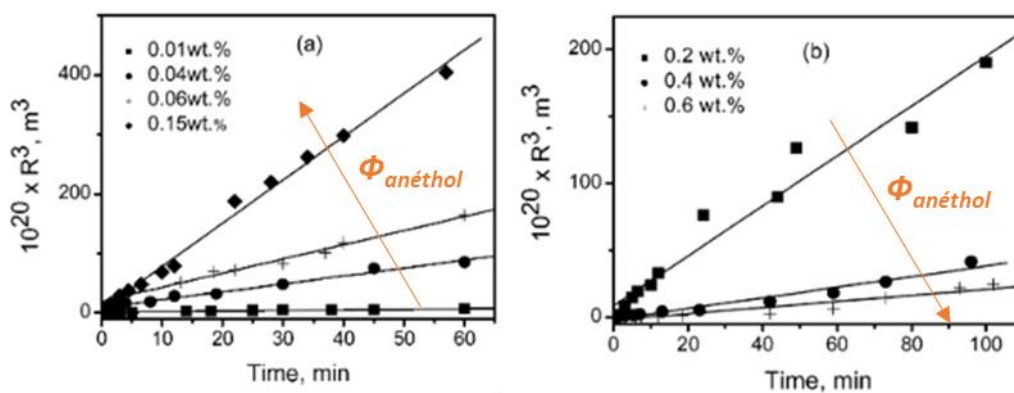


Figure 5 : Evolution du volume des gouttelettes de l'émulsion en fonction du temps à différentes concentrations de trans-anéthol dans des mélanges éthanol/eau de (a) 0,05/0,95(w/w) et (b) 0,3/0,70 (w/w). Les pentes de ces courbes représentent les taux de croissance qui permettent le calcul du taux de mûrissement.<sup>17</sup>

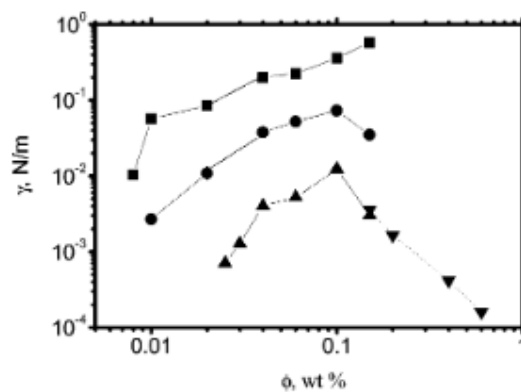


Figure 6 : Tension de surface estimée des gouttelettes de l'émulsion en fonction de la concentration massique de l'anéthol à différentes fractions d'éthanol/eau : ■ 0,05/0,95 ; ● 0,1/0,9 ; ▲ 0,2/0,8 ; et ▼ 0,3/0,7.<sup>17</sup>

Nazarzadeh *et al.* ont utilisé une approche plus spécifique au comportement des gouttes en absence ou en présence de tensioactifs afin de différencier la coalescence du mûrissement d'Ostwald.<sup>18</sup> En effet, le tracé de la courbe de l'évolution du volume ( $R^3$ ) en fonction du temps n'est pas un critère suffisant selon eux et expliquerait les divergences dans la littérature. Ils ont observé l'évolution temporelle de la distribution de la taille des gouttelettes en fonction de la quantité de tensioactifs dans le système. Ils ont constaté que la coalescence est majoritaire dans le cas de gouttes peu ou pas recouvertes de tensioactif car il n'y a pas assez



de répulsions entre elles. En revanche, dans le cas d'une concentration élevée en tensioactif, le système subit majoritairement le mûrissement d'Ostwald à plus long terme.<sup>18</sup> En effet, il existe beaucoup plus de répulsions entre les gouttes grâce aux tensioactifs à leur surface, diminuant leur probabilité de rencontre. Il reste donc la possibilité du mûrissement d'Ostwald. Il faut toutefois que les gouttes aient une certaine différence de taille pour que ça ait lieu de manière significative.

Le mûrissement d'Ostwald peut être limité en changeant alors la qualité ou la quantité de solvant par rapport au soluté et donc en réduisant sa solubilité dans le milieu.<sup>11,17,19</sup> Par exemple, la Figure 7 montre une diminution du taux de mûrissement d'Ostwald au cours du temps quand la quantité de solvant organique (Tétrahydrofurane, THF) diminue par rapport à l'eau.<sup>19</sup> On observe également une diminution de la taille des particules avec le taux de solvant organique. Ceci est dû à une sursaturation élevée. Par ailleurs, le mûrissement peut aussi être limité par une distribution de taille plus monodisperse des gouttes.

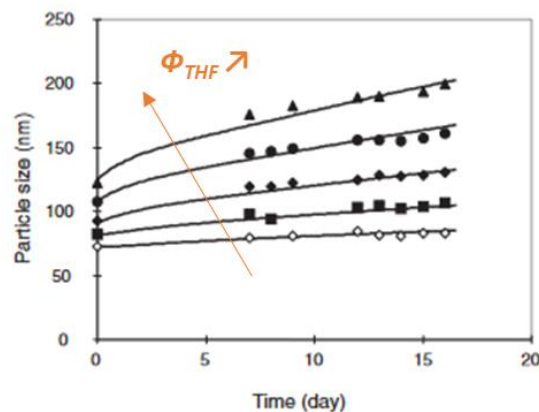


Figure 7 : Évolution de la taille des particules de  $\beta$ -carotène stabilisées par un copolymère à bloc en fonction du temps, à différents ratio volumique de solvant organique (THF) par rapport à l'eau avec  $\blacktriangle$  30:120,  $\bullet$  24:120,  $\blacklozenge$  18:120,  $\blacksquare$  12:120,  $\blacklozenge$  6:120. Les courbes noires représentent les simulations numériques obtenues par la théorie LSW qui décrit la croissance des particules par diffusion.<sup>19</sup>

#### 1.1.d.ii Croissance versus coalescence

Dans le cas d'Aubry et Ganachaud, il est question d'un mécanisme de « nucléation-agrégation » qui ne suit pas la théorie classique de croissance des particules.<sup>13</sup> Ici, la taille des nanoparticules croît avec la concentration en soluté PMMA (poly(méthacrylate de méthyle)) (Figure 8). En effet, la forte concentration de nucléi augmente leur probabilité de rencontre, puisque celle-ci est proportionnelle au carré du nombre de particules.<sup>13</sup> Ainsi, en suivant le modèle cinétique de Smoluchowski, la rencontre de ces particules provoque leur coalescence/agrégation, selon la température et la viscosité du milieu dispersif. En revanche, aux faibles ajouts d'eau accompagnés d'un mélange rapide, la sursaturation est faible et la barrière d'énergie  $\Delta G$  de nucléation est élevée. Cela implique la formation de nucléi moins nombreux qui grossissent par condensation selon le mécanisme de « nucléation-croissance ».<sup>13</sup>

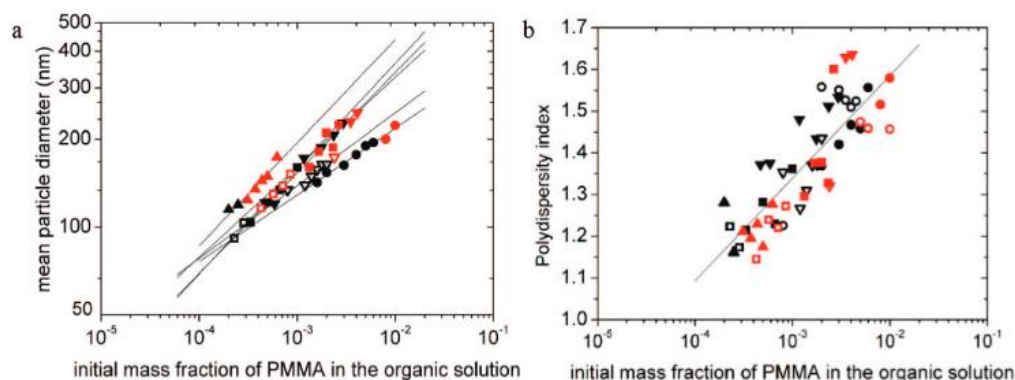


Figure 8 : Diamètre moyen des particules (a) et indice de polydispersité (b) en fonction de la fraction massique initiale de PMMA dans différentes fractions d'acétone (● 0,05 ; ▼ 0,17 ; ▽ 0,25 ; ■ 0,3 ; □ 0,35 ; ▲ 0,4). Les symboles noirs correspondent aux points se trouvant dans le domaine Ouzo (cas particulier de nanopréciipitation que nous verrons plus bas dans cette partie) et les points rouges aux points au-delà de ce domaine Ouzo.<sup>13</sup>

## 1.2 Le déplacement de solvant comme technique de nanopréciipitation

Dans la littérature, la nanopréciipitation peut être évoquée sous différentes dénominations selon la procédure employée pour développer des nanoparticules : précipitation par inversion de phase, déplacement/remplacement de solvant, ajout d'un « non-solvant », effet Ouzo, nanopréciipitation séquentielle, etc.<sup>20</sup>

Cette partie est centrée principalement sur la technique de déplacement de solvant qui fait l'objet de cette thèse. La méthode d'ajout d'un « non-solvant », la déposition interfaciale, le remplacement de solvant, la précipitation par inversion de phase, ou encore l'effet Ouzo désignent cette même technique.

### 1.2.a Ajout d'un « non-solvant » : le principe

Fessi *et al.* sont les premiers à avoir développé ce procédé et l'ont breveté en 1986.<sup>21</sup> Ils y présentent les différents paramètres et étapes rentrant en jeu pour nanopréciipiter le composé hydrophobe. Les deux points primordiaux qui en ressortent sont les suivants :

- L'utilisation d'un solvant aqueux (« non-solvant ») et d'un solvant organique (en général polaire) miscibles. Il est possible d'utiliser des mélanges de solvants et/ou de « non-solvants ». Généralement les solvants organiques utilisés sont l'acétone, l'éthanol, le tétrahydrofurane (THF), le N,N-diméthylformamide (DMF), et le diméthylsulfoxyde (DMSO ; pour les applications biologiques) ;<sup>3,9,22</sup>
- L'utilisation d'un composé miscible avec seulement l'une des deux phases pour engendrer sa nanopréciipitation. Par exemple, l'ajout d'une grande quantité d'eau dans un solvant organique contenant une molécule hydrophobe induit la précipitation de celle-ci puisqu'elle se retrouve en mauvais solvant.

Ainsi, l'ajout rapide du « non-solvant » au solvant contenant le soluté hydrophobe provoque la sursaturation du soluté. Une émulsification de la solution a alors lieu spontanément, entraînant la formation de nanoparticules (ou nano-gouttelettes).

Le processus est régi par l'effet Gibbs-Marangoni.<sup>23,24</sup> En fait, un liquide avec une tension superficielle élevée (la phase aqueuse) attire plus fortement le liquide environnant qu'un liquide à faible tension superficielle (le solvant organique). Cette différence de tension superficielle entre les deux liquides provoque une turbulence interfaciale.<sup>25,26</sup> Cela conduit à une interdiffusion des deux phases à l'interface et le soluté précipite progressivement, entraînant la formation des nanoparticules (Figure 9).<sup>9</sup>

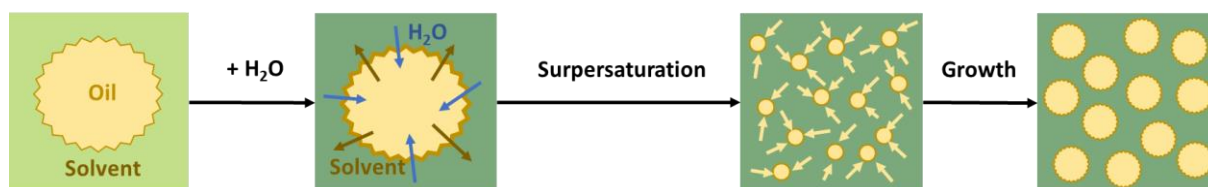


Figure 9 : Schéma général du procédé de nanopréciipitation.<sup>9</sup>

La déposition interfaciale est une méthode basée sur le déplacement de solvant.<sup>27</sup> Elle permet d'élaborer des nanocapsules en incorporant au système un petit volume d'huile soluble dans la phase organique. Le polymère nanopréciipite alors à la surface des gouttelettes d'huile formées après l'ajout du « non-solvant ». Par conséquent, des molécules hydrophobes peuvent être encapsulées à l'intérieur de ces capsules de polymères.

Le brevet de Fessi *et al.*, ainsi que les publications qui en découlent, ont démontré qu'un large panel de molécules hydrophobes peuvent être nanopréciipitées, telles que des polymères (synthétiques, semi-synthétiques ou encore d'origine naturelle), des acides gras ou des huiles (ex. miglyol), des pigments, ainsi que des principes actifs ou agents de contraste.<sup>21,28,29</sup> Par exemple, la méthode de nanopréciipitation par déposition interfaciale leur a permis d'élaborer des nanocapsules monodisperses ayant une coque de polymère biodégradable (poly-(D,L-lactide), PLA) et contenant un médicament, l'indométhacine.<sup>29</sup>

La nanopréciipitation par déplacement de solvant est finalement un processus peu coûteux en énergie. Elle peut se faire en une étape par ajout de la solution aqueuse à la solution organique, avec ou sans travail mécanique, et l'ajout de tensioactifs est optionnel puisque les nanoparticules obtenues sont plutôt stables dans le temps (métastabilité). Elle conduit généralement à la formation de nanoparticules/nanocapsules nanométriques (< 500 nm).<sup>30,31</sup> Cependant, ce procédé présente un inconvénient qui est la grande dilution des dispersions de soluté hydrophobe, puisqu'elle utilise une faible fraction massique de soluté (généralement <math>10^{-4}</math>).<sup>13</sup> Mais il est possible de concentrer par la suite pour augmenter le nombre de nanoparticules par volume.

## 1.2.b Effet Ouzo : un cas particulier

### 1.2.b.i Qu'est-ce que l'effet Ouzo ?

Beaucoup d'articles ont étudié la nanopréciipitation par déplacement de solvant dans des systèmes ternaires en utilisant un solvant organique miscible à l'eau, comme Ruschak et Miller avec le système toluène/éthanol/eau, où l'éthanol est le solvant organique miscible à l'eau (souvent appelé hydrotrope<sup>32</sup>) et contenant le soluté hydrophobe (toluène).<sup>33</sup> Ils ont constaté une émulsification spontanée relativement stable avec l'apparition d'un trouble,

sans mélange mécanique, sans ajout de tensioactif ni d'un dispersant.<sup>33,34</sup> Dans la littérature, ce phénomène est souvent appelé « auto-émulsification » (« self-emulsification »), « méthode de déplacement de solvant », « méthode à basse énergie », ou « émulsification spontanée ».<sup>20,25,31,35</sup> Cependant, la réciproque n'est pas forcément vraie, car certaines publications parlent d'émulsification spontanée pour des systèmes utilisant deux phases liquides non miscibles et qui ne présentent pas les mêmes phénomènes que l'effet Ouzo.<sup>31</sup>

En 2003, Vitale et Katz investiguent ce mécanisme de nanopréciipitation en profondeur et le nomment « effet Ouzo », encore connu ainsi aujourd'hui.<sup>34</sup> Ils tirent ce nom de la boisson alcoolisée anisée connue en Grèce, l'Ouzo, contenant de l'huile d'anis (trans-anéthol). Dans ce système ternaire simple, l'éthanol est l'alcool polaire miscible à l'eau et à l'huile d'anis, laquelle constitue le soluté hydrophobe. Après l'ajout d'une grande quantité d'eau dans la solution binaire éthanol/trans-anéthol, un trouble apparaît à cause de la présence de gouttelettes d'huile dans l'eau (Figure 10 ci-dessous). C'est l'effet Tyndall caractéristique des suspensions colloïdales. En fait, comme nous l'avons vu dans la partie I.2.a, l'ajout de l'eau diminue la solubilité de la substance aromatique hydrophobe. Une interdiffusion de l'eau et de l'alcool a lieu provoquant une sursaturation élevée de l'huile dans la phase continue.<sup>9,25,33</sup> Ceci déclenche une nucléation liquide-liquide homogène et rapide de l'huile, donnant lieu à la formation des nucléi qui finissent par croître en nano-gouttelettes.<sup>34</sup> La croissance des gouttelettes est souvent décrite, soit par coalescence, soit par mûrissement d'Ostwald.<sup>16,17,35,36</sup> À ce stade, la croissance des gouttelettes peut être très lente, et la stabilité colloïdale de l'échantillon peut atteindre plusieurs semaines. Elles sont alors considérées comme cinétiquement stables.<sup>34,35</sup> L'existence d'une charge à la surface des gouttelettes semble l'hypothèse la plus probable pour expliquer une telle stabilité, en plus de la faible taille et de la monodispersité des nanoparticules formées (limitation de la coalescence et du mûrissement d'Ostwald). Cependant, l'origine de cette charge fait encore l'objet de débats (voir plus en détail la partie I.2.b.v).<sup>37-39</sup> Néanmoins, des tensioactifs sont généralement ajoutés à la phase aqueuse avant l'émulsification dans la majorité des études sur l'effet Ouzo afin d'obtenir des émulsions stables pendant de très longues périodes (*i.e.* plusieurs mois).<sup>40</sup> Des distributions étroites et homogènes de taille des gouttelettes/particules peuvent être obtenues, comme dans tous processus d'agrégation qui suivent le mécanisme DLCA (Diffusion limited cluster aggregation).<sup>13</sup> La taille finale varie d'environ 100 nm à quelques microns, en fonction de la nature du soluté, de la composition (par exemple, le ratio soluté/solvant) et du mode de préparation (par exemple, mélange en une seule fois ou goutte à goutte).<sup>34,41-43</sup>



Figure 10 : Photographies à différents temps après l'ajout d'eau à de l'Ouzo. Observation de l'apparition du trouble suite à la nucléation des gouttelettes d'huile dans l'eau.<sup>44</sup>

Par ailleurs, nous retrouvons l'effet Ouzo dans d'autres boissons tels que le Raki (Turquie), Limoncello (Italie), ou encore le Pastis (France).<sup>43,45</sup> Outre le système

anéthol/éthanol/eau qui a été largement étudié<sup>16,17,45,46</sup>, l'émulsification spontanée par effet Ouzo a été reproduit dans différents systèmes ternaires : toluène/éthanol/eau, benzène/éthanol/eau, polyméthylméthacrylate (PMMA)/ THF/eau, hydroxytoluène butylé (BHT)/THF/eau, hexadécane/acétone/eau et bien d'autres encore.<sup>13,47-51</sup> L'ensemble de ces exemples démontre aisément les différentes possibilités d'application de l'effet Ouzo. Par ailleurs, ce phénomène demeure très utile lorsqu'on souhaite créer des gouttelettes de taille submicrométrique à longue durée de vie sans utiliser d'agitation mécanique ni de tensioactifs, comme dans les applications biologiques et pharmacologiques.

La Figure 11 illustre le procédé général d'émulsification spontanée par l'effet Ouzo, ainsi que la localisation limitée du domaine Ouzo dans un diagramme de phase du système ternaire soluté (ou huile)/solvant/non-solvant (ou eau). Au-dessus de la courbe binodale, à forte concentration de solvant, l'huile est complètement soluble dans le milieu continu. La courbe binodale (ou courbe de coexistence, en bleu dans la Figure 11) correspond à la limite de miscibilité (ou solubilité), c'est-à-dire à la séparation de phases thermodynamiquement stables.<sup>9,25,34</sup> La courbe spinodale (en pointillé rouge) définit la limite de stabilité locale. De ce fait, le système évolue par nucléation de particules/gouttelettes de soluté dans la région entre les deux courbes (les zones en jaune et vert dans le diagramme de phase de la Figure 11).<sup>9,34</sup> Les différentes compositions situées entre les deux courbes ne sont pas thermodynamiquement stables mais elles résistent aux petites fluctuations. C'est pourquoi cette zone est dite « métastable ».<sup>34</sup> La zone Ouzo (en jaune dans la Figure 11) se situe entre les courbes binodale et spinodale et comprenant la zone Ouzo dite « stable » et la zone Ouzo dite « instable » que nous abordons plus bas. Ainsi, nous verrons dans la partie I.3 que le domaine Ouzo dépend des conditions de préparation de l'échantillon. Par exemple, la limite déterminée par l'ajout progressif d'eau à la solution organique de soluté diffère souvent de celle obtenue par l'ajout d'eau en une seule fois.<sup>42</sup> Enfin, à l'intérieur de la courbe spinodale, l'échantillon subit une décomposition spinodale et finit par devenir biphasique à l'échelle macroscopique.

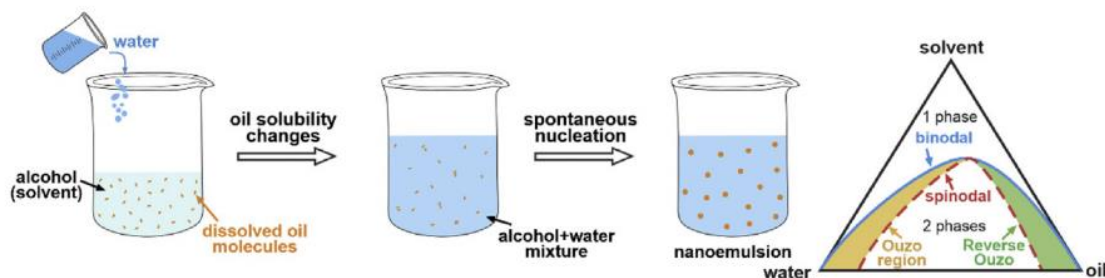


Figure 11 : Illustration de l'effet Ouzo. À gauche, le procédé d'émulsification spontanée, à droite le diagramme de phase ternaire.<sup>31</sup>

Vitale et Katz ont représenté le diagramme de phase ternaire sous forme de triangle droit pour simplifier l'observation de la zone Ouzo selon les différentes compositions (Figure 12.a).<sup>34</sup> La concentration du soluté est en abscisse et la concentration du solvant en ordonnée. La concentration du non-solvant (ou eau) est déduite par différence avec les deux autres composés. Dans la Figure 12.b, ils élaborent le diagramme de phase du système divinylbenzène (DVB)/éthanol (EtOH)/eau en utilisant la même méthode que la Figure 12.a.

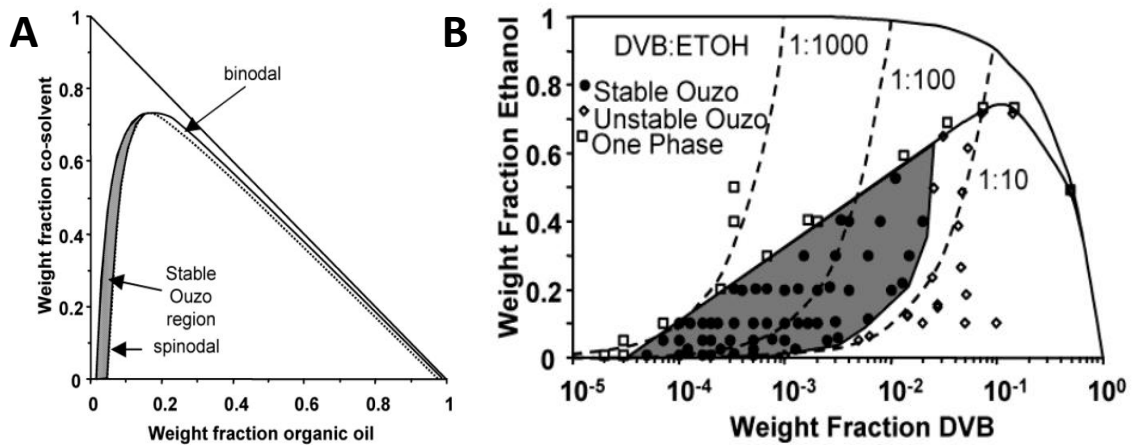


Figure 12 : Représentation d'un système ternaire sous forme de triangle droit pour simplifier le diagramme de phase en pseudo-binaire, et visualisation du domaine Ouzo (zone grise) comprise entre les courbes binodale et spinodale. a) schéma général pour un système huile/solvant/eau ; b) pour le système DVB/EtOH/eau à température ambiante avec l'axe des abscisses en échelle logarithmique pour les petites fractions en soluté. La zone métastable se trouve entre les deux droites.<sup>34</sup>

Aujourd'hui encore, la composition exacte des gouttelettes formées reste incertaine. Ganachaud *et al.*, et d'autres, pensent que les gouttes sont en réalité gonflées en solvant organique.<sup>13,47,52,53</sup> Pour le démontrer, ils utilisent une méthode de gonflement contrôlé des nanoparticules de PMMA par le solvant.<sup>13</sup> Ils nanoprécipitent d'abord le PMMA dans le mélange acétone/eau, puis ils évaporent le solvant. Ensuite, ils ajoutent différentes fractions d'acétone et suivent l'évolution de la taille. Ils constatent que les tailles des nanoparticules augmentent linéairement avec l'ajout d'acétone (Figure 13 ci-dessous). Il est important de noter que dans cet exemple, la nanoparticule est préalablement « figée » par la nanoprécipitation du polymère, puis gonflée par l'ajout d'un solvant organique. De ce fait, il paraît difficile de comprendre réellement la composition d'une goutte dans le domaine Ouzo à l'état « brut » mais cela semble quand même indiquer que les nanoparticules sont en partie gonflées par le solvant organique.

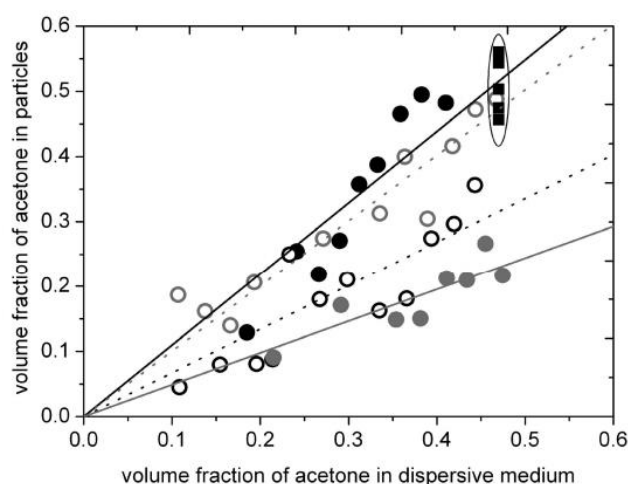


Figure 13 : Évolution de la taille des nanoparticules de PMMA dans l'Ouzo en fonction de l'ajout de solvant acétone. Fraction volumique en acétone dans les particules en fonction de la fraction volumique en acétone dans la phase aqueuse. Fraction initiale en polymère dans le système :  $1,1 \cdot 10^{-4}$  pour les cercles pleins noirs,  $3,1 \cdot 10^{-4}$  pour les cercles ouverts noirs,  $1,2 \cdot 10^{-3}$  pour les cercles pleins gris, et  $1,5 \cdot 10^{-3}$  pour les cercles ouverts gris.<sup>13</sup>

Trevisan *et al.* ont comparé la structure des nanoparticules de deux copolymères présentant des chaînes pendantes de longueurs différentes : poly(4-vinylphénol-alt-dodécylmaléimide) avec des chaînes pendantes de 12 carbones, AltC12 ; et poly(4-vinylphénol-alt-octadécylmaléimide) avec des chaînes pendantes de 18 carbones, AltC18.<sup>52</sup> Ils ont trouvé une différence de composition entre ces deux systèmes par différentes techniques d'analyse (SANS pour Small-Angle Neutron Scattering, DLS pour Dynamic Light Scattering, SLS pour Static Light Scattering, et Cryo-MET) : celui comprenant une chaîne plus courte (AltC12) présente une nanoparticule gonflée en solvant THF, l'autre avec la chaîne carbonée plus longue (AltC18) forme une structure cœur/coquille avec un cœur riche en solvant THF emprisonné dans une enveloppe de polymère (Figure 14 ci-dessous). Ils concluent qu'en jouant avec la lipophilie latérale (la chaîne à 12 ou 18 carbones), ils peuvent préparer deux types de structures submicroniques pouvant piéger plus (AltC18) ou moins (AltC12) de solvant.

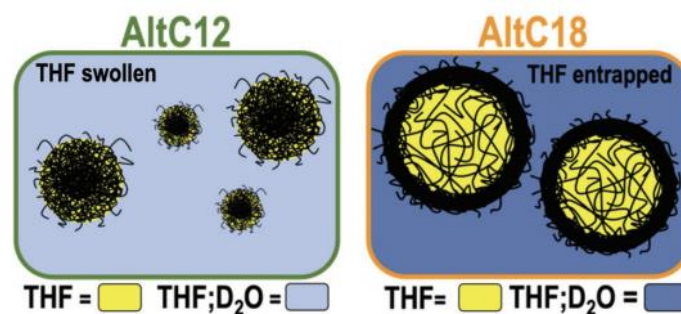


Figure 14 : Illustration des structures agrégées des nanoparticules formées à partir de l'effet Ouzo dans un système copolymère/THF/D<sub>2</sub>O. Les chaînes du copolymère AltC12 (12 carbones) se sont auto-assemblées en NP légèrement gonflées en THF ; les chaînes du copolymère AltC18 (18 carbones) forment une structure en cœur-coquille avec le cœur riche en un mélange de THF/copolymère et une enveloppe de copolymère. Le mélange THF/D<sub>2</sub>O est en bleu foncé dans la représentation schématique du AltC18 car il y a beaucoup moins de THF dans la phase continue (étant majoritairement dans les nanoparticules) contrairement au milieu du AltC12.<sup>52</sup>

Dans les travaux de Li *et al.*, une structure cœur/coquille avec un cœur riche en BHT et une enveloppe constituée d'un mélange THF-D<sub>2</sub>O riche en THF a été identifiée par la combinaison de la diffusion dynamique de la lumière laser (DLS) et de la diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) dans le système BHT/THF/D<sub>2</sub>O (Figure 15).<sup>49</sup> Cependant, notons que ces auteurs ne mentionnent pas l'« effet Ouzo ».

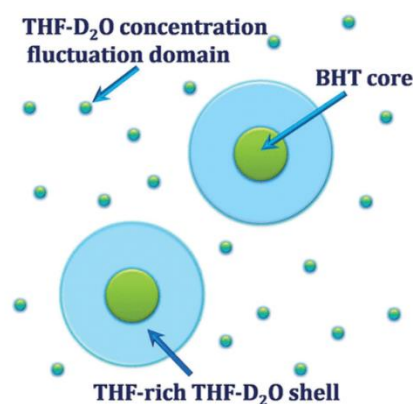


Figure 15 : Représentation de la composition des nano-gouttelettes obtenues par effet Ouzo du système BHT/THF/eau. Les gouttelettes présentent un cœur riche en soluté BHT et une enveloppe riche en solvant THF.<sup>49</sup>

### 1.2.b.ii Limite supérieure du domaine Ouzo

A partir de l'effet Ouzo, à des plus grandes concentrations de soluté, il est possible d'observer soit des nanoparticules polydisperses soit une séparation de phase. Vitale et Katz ont défini « Ouzo instable » comme un domaine où des gouttelettes macroscopiques et/ou une séparation de phase sont obtenues par décomposition spinodale (Figure 16A).<sup>33,34</sup> Cependant, de nombreux auteurs ont utilisé le terme d'« Ouzo instable » pour qualifier le domaine où ils obtiennent des nanoparticules polydisperses dans une région du métastable à proximité de la courbe spinodale (Figure 16B et C).<sup>13,52</sup> Aubry, Ganachaud *et al.* observent des microparticules dans leurs émulsions de PMMA à des fractions de polymère plus élevées que le domaine Ouzo (Figure 16C). Dans leur cas, la limite du domaine Ouzo correspondrait à la concentration en polymère au-delà de laquelle les particules deviennent susceptibles de coalescer.

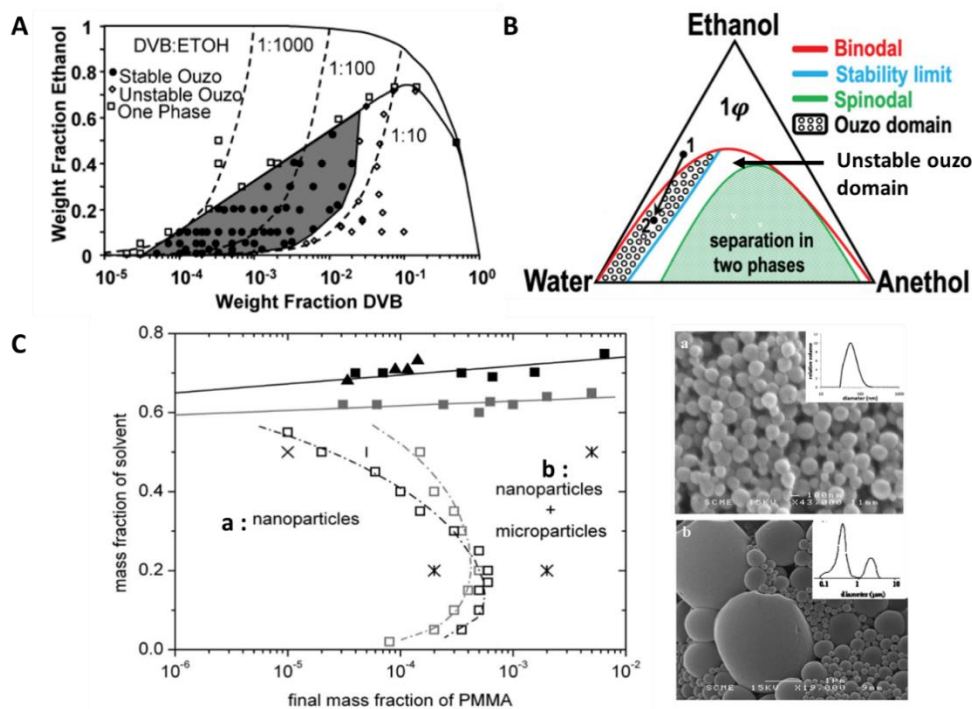


Figure 16 : (A) Système DVB/éthanol/eau d'après les travaux de Vitale et Katz représentant le domaine Ouzo dit stable, dans le domaine métastable, et l'Ouzo dit instable par décomposition spinodale.<sup>34</sup> (B) Système anéthol/éthanol/eau d'après les travaux de Trevisan *et al.* représentant le domaine Ouzo instable à proximité de la spinodale.<sup>52</sup> (C) Systèmes PMMA/acétone/eau (noir) et PMMA/THF/eau (gris) avec représentation de la limite (lignes pointillées) entre la zone Ouzo stable comprenant des nanoparticules (a) et la zone Ouzo instable possédant des nanoparticules et des microparticules (b) pour les deux systèmes. Les deux traits pleins dans la partie haute du diagramme de phase représentent les binodales des deux systèmes. A droite, les photos MEB des nanoparticules de PMMA synthétisées dans le domaine Ouzo stable en haut et dans l'Ouzo instable en bas, les inserts en haut à droite des photos représentent les distributions de taille des particules dans les deux régions, obtenues par méthode de diffusion de la lumière.<sup>13</sup>

### 1.2.b.iii Un effet Ouzo inverse ?

C'est dans le brevet de Fessi publié en 1986 que cet effet a été proposé pour la première fois.<sup>21,29</sup> Il consiste en une émulsion de gouttelettes d'eau dans une phase continue organique, d'où son nom « Ouzo inverse ».



Peu de publications travaillent sur l'Ouzo inverse. Néanmoins, Vitale et Katz ont pu observer ce phénomène dans leur système DVB/solvant/eau (gouttelettes riches en eau dans la phase continue organique contenant le DVB).<sup>34</sup> Filomena *et al.* ont étudié la séparation de phase du système toluène/acétonitrile/eau avec trois compositions différentes pour comparer les différents mécanismes de nanopréciipitation tels que l'effet Ouzo, l'effet Ouzo inverse et la décomposition spinodale.<sup>54</sup> Ils ont constaté que l'émulsion issue du domaine Ouzo inverse peut rester stable sur de relativement longues périodes (environ 20 min ici), contrairement à l'Ouzo instable qui démixe spontanément (à peine quelques secondes).

La nanopréciipitation, voire l'encapsulation, de composés hydrophiles peut être envisagée dans ce cas de figure, puisqu'ils se solubilisent aisément dans la phase aqueuse qui constituent les nano-gouttelettes de l'émulsion. Leur relargage se produirait alors en milieu aqueux comme dans les travaux de Puri *et al.*<sup>55</sup>

#### 1.2.b.iv La zone pré-Ouzo ou microémulsion sans tensioactif (SFME)

Des microémulsions thermodynamiquement stables peuvent également être observées dans le domaine monophasique, à la limite du domaine Ouzo (Figure 17).<sup>56,57</sup> Elles sont transparentes. Dans la littérature, il est possible de les trouver sous une multitude de dénominations telles que : « microémulsion sans tensioactif » (SFME, pour « Surfactant-Free MicroEmulsion »), « microémulsions ultra flexibles » (UFME, pour « UltraFlexible MicroEmulsion »), « fluctuation structurale de type micellaire », « micro-hétérogénéités nanoscopiques », « séparations de pseudo-phases », ou simplement la zone « pré-Ouzo ». <sup>58-63</sup> Leur taille peut varier de quelques nanomètres<sup>32,56,61,64,65</sup> à une centaine de nanomètres<sup>50,58,60</sup>, ce qui suggère qu'elles pourraient avoir une origine différente.

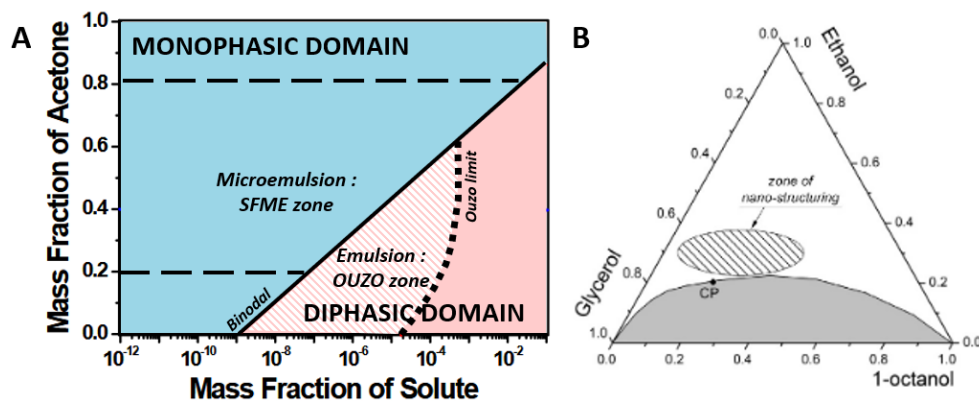


Figure 17 : Exemples de diagramme de phase mettant en évidence les domaines SFME (ou pré-Ouzo) à la limite de la binodale. A) pour le système miglyol/acétone/eau adapté des travaux de Yan, Ganachaud *et al.* (Zone rose : diphasique dont l'Ouzo hachurée sur le graphe, zone bleue : pseudo-monophasique dont la zone SFME comprise entre les droites en pointillées)<sup>58</sup>, B) pour le système 1-octanol/éthanol/glycérol des travaux de Fischer, Kunz *et al.* (Zone grise : deux phases dont l'Ouzo, zone hachurée : pré-Ouzo, zone blanche : monophasique).<sup>59</sup>

Ganachaud *et al.* ont étudié l'évolution de la taille et la stabilité des nanoparticules formées dans la zone SFME pour le système miglyol/acétone/eau se trouvant à des fractions très faibles et avant la binodale (Figure 18A).<sup>58</sup> D'après leurs mesures DLS, les nano-gouttelettes sont de plus petite taille que dans l'Ouzo, et elles sont riches en solvant et en huile. Ils ont observé que, pour un même taux de solvant, la taille des agrégats du SFME demeure constante quel que soit le taux en huile (Figure 18A et Figure 18C.1) et au cours du temps (Figure 18C.3), corroborant la stabilité thermodynamique du domaine. De plus, ils ont

montré que la taille augmente avec l'ajout croissant de solvant et pour un taux constant de soluté, pouvant aller de 20 nm à environ 150 nm (Figure 18C.1). En outre, la Figure 18C.2 illustre une évolution linéaire (en échelle semi-log), appuyant que la taille des gouttes évolue avec l'ajout de solvant, tandis que les nano-objets formés à partir de l'effet Ouzo voient leur taille croître avec l'ajout de soluté, quel que soit le taux de solvant (Figure 18A et B). Cette différence de comportement soutient que la composition de la goutte n'est pas la même dans les deux zones du diagramme de phase. C'est-à-dire que toute la quantité en soluté huileux ajouté se retrouve dans les gouttes, plus ou moins gonflées en solvant, dans le domaine Ouzo. Au contraire, dans la zone SFME, la taille constante des gouttes avec l'ajout d'huile, ainsi que la localisation de la zone avant la binodale suggèrent qu'une partie de l'huile existe dans la phase continue. Celle-ci présente encore une bonne solubilité dans le système ternaire car il y a toujours beaucoup de solvant par rapport à la quantité d'huile. L'autre partie se situe dans les gouttes gonflées en solvant de la phase dispersée. C'est l'ajout croissant de solvant qui augmente la taille de ces gouttes, étant de plus en plus gonflées pour un même taux de soluté.

Par conséquent, ils ont réussi à **contrôler la taille** des gouttelettes de microémulsion ainsi formées dans la zone SFME et à utiliser ce phénomène pour **générer des nano-capsules de polymère** contenant un médicament anticancéreux hydrophobe nanoprecipité, la camptothécine.

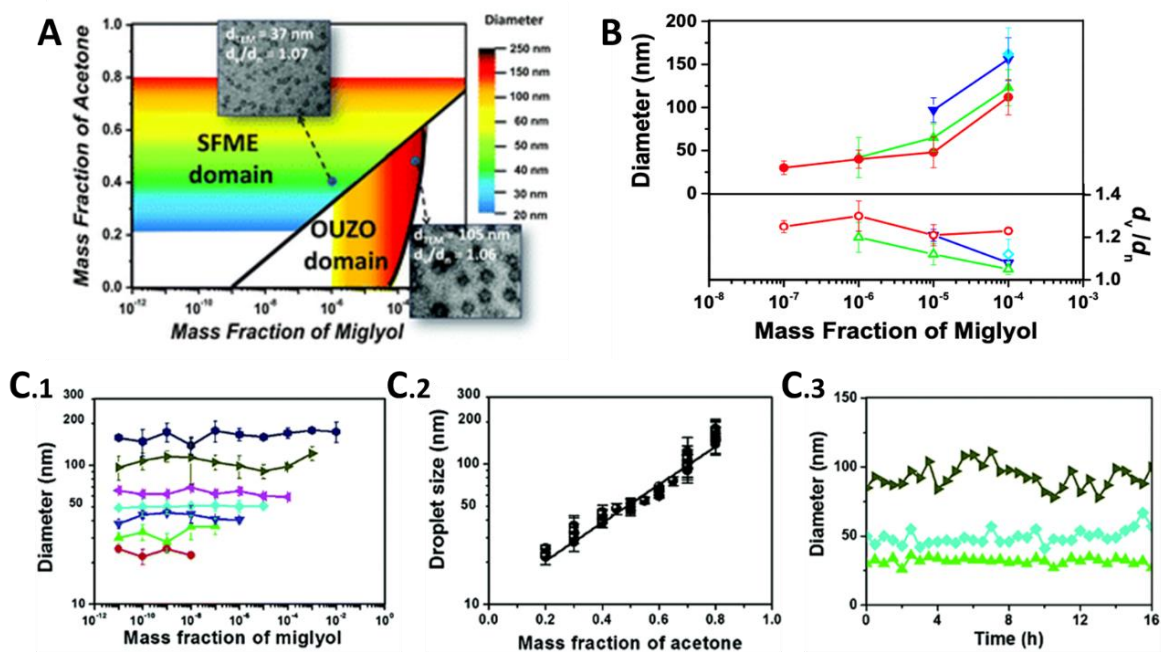


Figure 18 : Comparaison de l'évolution de la taille des nano-gouttelettes entre les domaines SFME et Ouzo du système miglyol/acétone/eau. A) Représentation schématisée de l'évolution de la taille des gouttes dans le diagramme de phase. B) Evolution du diamètre hydrodynamique des agrégats (haut) et la distribution de taille (bas) dans le domaine Ouzo en fonction de la teneur en miglyol et pour différents taux d'acétone (mesures DLS). C) Etude du domaine SFME : C.1) Evolution du diamètre hydrodynamique des gouttes en fonction du taux de miglyol et d'acétone (mesures DLS) ; C.2) Relation semi-logarithmique entre le diamètre hydrodynamique et la fraction massique d'acétone ; C.3) Evolution du diamètre hydrodynamique en fonction du temps. Pour l'ensemble des graphes, fraction massique d'acétone : 0,2 (●) ; 0,3 (▲) ; 0,4 (▼) ; 0,5 (◆) ; 0,6 (◆) ; 0,7 (▲) ; 0,8 (●).<sup>58</sup>

La formation de ces microémulsions thermodynamiquement stables et sans l'utilisation de tensioactifs est retrouvée dans plusieurs systèmes tels que : anisol/THF/eau, limonène/éthanol/eau, l'hexadécane/acétone/eau, 1-octanol/éthanol/eau, ou encore limonène/acétone/acétonitrile, et bien d'autres encore.<sup>58,60,63,66-68</sup>

L'équipe de Kunz et Zemb a largement approfondi l'étude de la stabilité des microémulsions formées à travers plusieurs publications.<sup>59,64,66-68</sup> Ils ont constaté que la formation de ces microstructures résulte d'une compétition entre la force d'hydratation (c'est-à-dire l'énergie de solvation des agrégats riches en soluté hydrophobe par un hydrotrope) et l'entropie de mélange.<sup>53,64,67</sup> Par ailleurs, la présence de liaisons hydrogènes renforcerait ces structures. Cependant, ils ajoutent que ce n'est pas une condition nécessaire pour l'apparition de SFME, pouvant être alors renommées « microémulsions sans liaison hydrogène » (HBFME, ou « Hydrogen-bonding-free microemulsions » en anglais).<sup>66</sup>

Comme pour l'effet Ouzo, il existe un domaine inverse au domaine pré-Ouzo à des teneurs faibles en eau et élevées en soluté hydrophobe (Figure 19), avec une plus haute viscosité de mélange.<sup>62,69,70</sup>

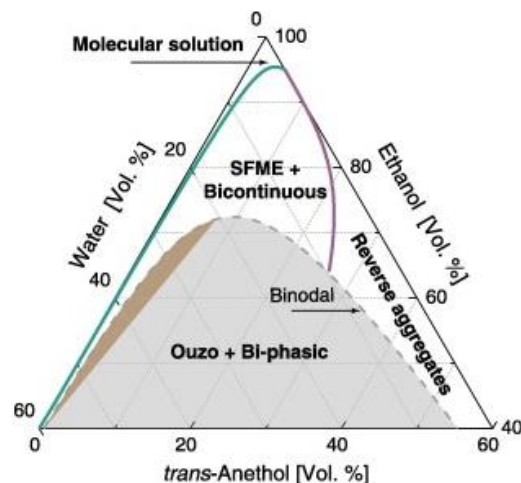


Figure 19 : Diagramme de phase du système trans-anéthol/éthanol/eau en fraction volumique à 25°C. La ligne pointillée représente la limite de solubilité entre les domaines pseudo-monophasique (blanc : SFME + phase bicontinue, SFME inverse, et solution moléculaire) et multi-phase (marron : zone Ouzo, gris : domaine diphasique).<sup>62</sup>

Ainsi, deux évolutions continues sur le diagramme de phase sont mises en évidence tels que représentées dans les Figure 20A et Figure 21A.<sup>62</sup> En augmentant la fraction volumique de trans-anéthol (Figure 20), les nanostructures du domaine SFME (quelques nanomètres à une centaine, Figure 20B et C) qui sont riches en trans-anéthol croissent et s'interconnectent de manière aléatoire pour former une phase continue. C'est le domaine bicontinu où les réseaux d'eau et de trans-anéthol formés sont interconnectés, donnant une morphologie de type éponge<sup>71</sup> et marquant la disparition des gouttelettes autour de 100 nm (Figure 20C). Puis cet état transitoire évolue vers l'état inverse du SFME formant de nombreux agrégats riches en phase aqueuse et gonflées en solvant (Figure 20A).

En augmentant la fraction volumique en eau (Figure 21), les petits agrégats de quelques nanomètres du domaine SFME se combinent pour évoluer vers des gouttelettes de taille plus grosse du SFME (centaine de nanomètre) (Figure 21B, C, D et E), et enfin devenir l'émulsion Ouzo pouvant atteindre des tailles de gouttes de quelques microns (Figure 21A).

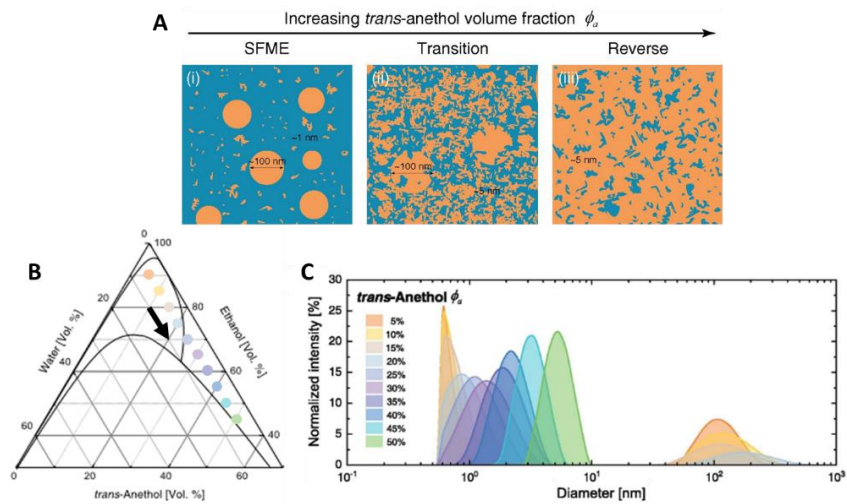


Figure 20 : Évolution des nanostructures du domaine SFME au SFME inverse. A) Représentation schématique de l'évolution des agrégats/nano-gouttelettes entre les 2 zones avec une transition bicontinue (bleu : riche en eau ; orange : riche en trans-anéthol). B) Diagramme de phase montrant les populations observées en DLS (C) avec  $\Phi_{trans-anéthol,vol} = 5$  à 50 % et à fraction d'eau constante (5%). C) Distribution de taille (diamètre hydrodynamique) des agrégats riches en huile (à faible teneur en trans-anéthol) ou riches en eau (à haute teneur en trans-anéthol) entre  $\sim 1$  et 10 nm, et des gouttelettes riches en huile et solvant à  $\sim 100$  nm à faible teneur en huile.<sup>62</sup>

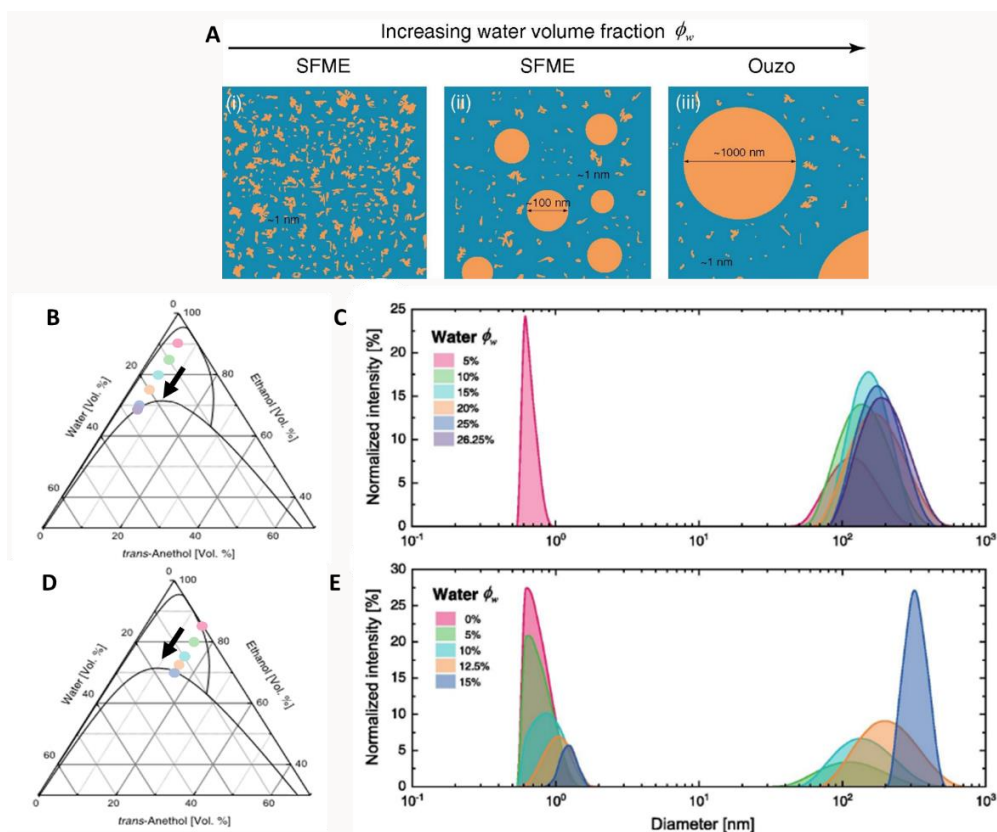


Figure 21 : Évolution des nanostructures du domaine SFME vers l'Ouzo. A) Représentation schématique de l'évolution des agrégats/nano-gouttelettes entre les deux zones, les domaines riches en eau et trans-anéthol sont marqués en bleu et orange respectivement. (B, D) Diagramme de phase montrant les populations observées en DLS (C, E) en augmentant la fraction volumique d'eau : (B) à fraction volumique de trans-anéthol constante à 5%, (C) une distribution de taille (diamètre hydrodynamique) des agrégats riches en huile vers  $\sim 1$  nm, et des gouttelettes riches en huile et solvant (SFME) à  $\sim 100$  nm, la taille des gouttes Ouzo n'est pas représentée ici ; (D) à fraction volumique de trans-anéthol constante à 15%, (E) une distribution de taille des agrégats riches en huile vers  $\sim 1$  nm, et des gouttelettes riches en huile et solvant (SFME) à  $\sim 100$  nm.<sup>62</sup>

Les petits agrégats riches en huile retrouvés dans le domaine SFME et à l'échelle moléculaire ( $\sim 1$  nm) sont souvent comparés au comportement des micelles (SBME : Surfactant-Based MicroEmulsions) mais n'en sont pas. En effet, d'après les travaux de Kunz et Zemb, ces agrégats présentent un cœur huileux et une « coque » de solvant organique.<sup>65</sup> De plus, ils sont plus polydisperses et plus petits que leurs homologues à base de tensioactif.<sup>56,70</sup> Aussi, leur cœur huileux est moins hydrophobe que dans le cas des microémulsions à base de tensioactifs car Kunz et Zemb ont constaté qu'ils devaient ajouter une plus grande quantité de matière organique pour dissoudre leurs colorants hydrophobes.<sup>68</sup> Ces agrégats fonctionnent comme des réservoirs huileux pour alimenter les nano-gouttelettes formées dans le domaine SFME (autour de  $\sim 100$  nm), ainsi que les gouttelettes des émulsions Ouzo si davantage d'eau est ajoutée au système.<sup>32</sup> Donc la quantité totale de soluté hydrophobe n'est pas incorporée dans les gouttelettes qui, elles, sont plus ou moins gonflées en solvant dans les domaines SFME et Ouzo. Une partie du soluté demeure aussi à l'état moléculaire dans la phase continue en plus des agrégats et des nano-gouttelettes.

Dans les travaux de Li *et al.*, l'étude de la stabilité de différents systèmes présentant ces nanostructures a été élaborée sur 9 jours (Figure 22a) :<sup>62</sup>

- Figure 22b : système avec des gouttelettes ( $\sim 100$ - $300$  nm) du domaine SFME. Il est possible qu'il y ait les agrégats (quelques nm) mais en trop faible quantité. L'intensité de la lumière diffusée par ces petits agrégats est alors masquée par celle des plus gros.
- Figure 22c : système avec agrégats riches en eau ( $\sim 5$  nm) du domaine SFME inverse.
- Figure 22d et e : systèmes avec agrégats riches en trans-anéthol et des gouttelettes du domaine SFME.

Dans l'ensemble, les résultats montrent un échange dynamique entre les agrégats et les gouttelettes. Le système b voit ses gouttelettes évoluer vers des tailles plus grandes avec le temps, leur concentration augmenter et leur distribution de taille devenir plus étroite (Figure 22b), tandis que les agrégats riches en eau du système c restent stables dans le temps (Figure 22c). Les systèmes d et e mettent en évidence la diffusion moléculaire du trans-anéthol vers les nano-gouttes du SFME. Et cela se réalise :

- soit au profit des gouttelettes déjà présentes qui deviennent alors plus grosses et tendent vers un affinement de la distribution de taille (Figure 22e),
- soit aux nouvelles gouttelettes nucléées, ce qui ne modifie pas la distribution de taille au cours du temps (Figure 22d).

Et les petits agrégats finissent par tous disparaître au dernier jour de suivi par un mûrissement d'Ostwald très lent (avec un taux estimé 5 ordres de grandeur plus petit que celui de l'Ouzo).<sup>17,62</sup> Ainsi, Li *et al.* pensent que les agrégats formés sont dans un état d'équilibre thermodynamique, alors que les gouttelettes SFME sont en réalité des structures cinétiquement piégées, avec une cinétique très lente (plus lente que l'Ouzo), dû à la barrière énergétique élevée.<sup>62</sup> En outre, l'accumulation de charges négatives à la surface des gouttelettes, qui se manifeste par un potentiel Zêta élevé en valeur absolue, pourrait stabiliser les gouttelettes du système.<sup>62,72</sup> En revanche, Prévost *et al.* appuient que ces systèmes « agrégats-gouttelettes » du SFME sont résistants au mécanisme de mûrissement d'Ostwald.<sup>32</sup> Ils expliquent cela par la faible tension interfaciale entre les fluides ternaires coexistant, au-delà d'une concentration minimale d'hydrotrope, et donnant lieu à une pression de Laplace inférieure à 100 Pa. De ce fait, la raison de leur stabilité n'est pas encore entièrement élucidée.

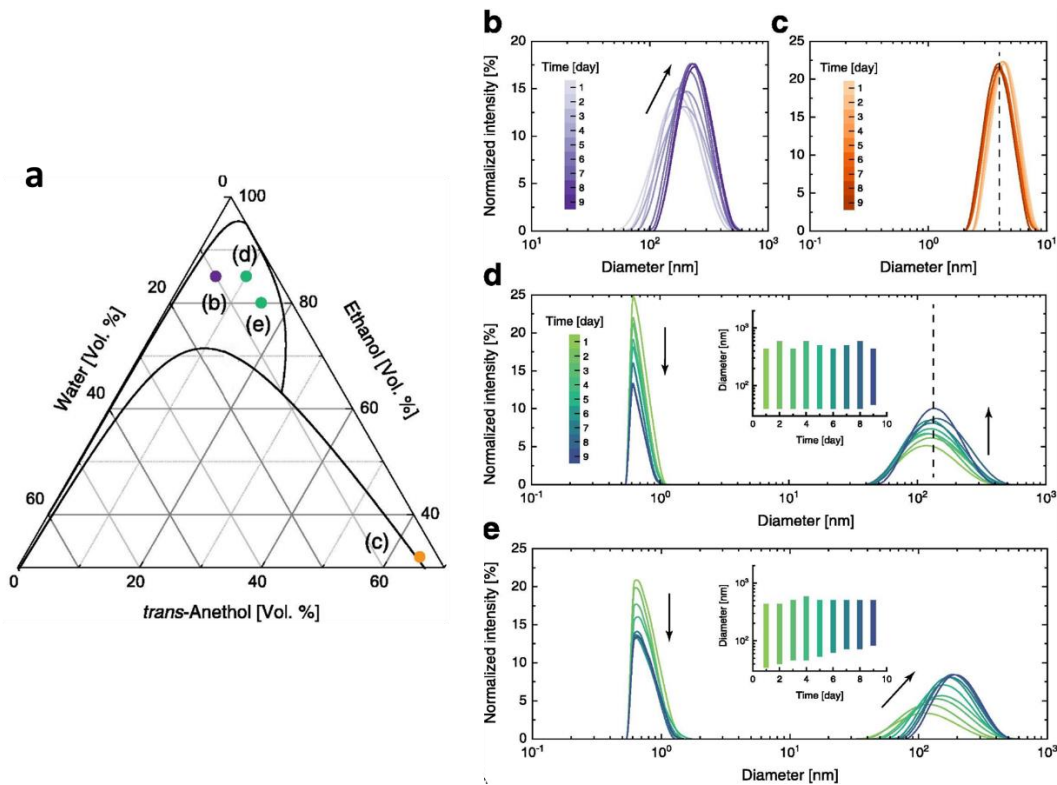


Figure 22 : Stabilité des différentes nanostructures du SFME et du SFME inverse. (a) Diagramme de phase ternaire avec les symboles indiquant les différentes compositions étudiées. (b-e) Suivi à long terme des mesures DLS de solutions ternaires avec (b) seulement des gouttelettes SFME présentes, (c) seulement des agrégats inversés présents, et (d-e) des agrégats et des gouttelettes coexistant.<sup>62</sup>

L'existence de cette zone étendue SFME pourrait intéresser un grand nombre de domaines d'application tel que la pharmaceutique, l'agriculture (par exemple les produits phytosanitaires), la cosmétique/parfumerie ou encore l'agroalimentaire.<sup>60,61,73-76</sup> En effet, ces microémulsions sont souvent qualifiées comme « vertes » due à l'absence de tensioactif qui est souvent un critère recherché dans ces domaines afin d'éviter leur toxicité.<sup>59</sup> Kunz *et al.* ont même remplacé l'eau des systèmes ternaires par du glycérol ou par des solvants eutectiques profonds (DES), ou remplacé les solvants organiques par d'autres peu toxiques d'origine naturelle pour des applications plus écologiques.<sup>56,59,64</sup> De plus, cette zone est bien plus étendue que celle de l'Ouzo, permettant de travailler dans une plus large gamme de concentration de soluté pour l'élaboration de capsules à partir de la co-nanoprécipitation avec des polymères.<sup>58</sup> Néanmoins, la concentration en soluté encapsulée dans ces capsules polymériques est amoindrie par rapport aux capsules du domaine Ouzo.

Pour conclure, une évolution continue et dynamique du domaine SFME vers le domaine Ouzo existe. Les émulsions spontanées Ouzo semblent être en équilibre dynamique avec le pré-Ouzo, comme pour les nanoémulsions cinétiquement stabilisées par la coexistence d'une microémulsion.<sup>53</sup>

#### 1.2.b.v Stabilisation colloïdale des nano-objets

La croissance des gouttelettes peut être très lente et la stabilité colloïdale peut atteindre plusieurs semaines. Cette stabilité colloïdale s'expliquerait par l'existence d'une charge à la surface des gouttelettes. Et ceci serait peut-être dû à l'adsorption d'espèces, par exemple des ions ou des polymères ionisables.<sup>36-39,62,72,77,78</sup> Cependant, l'origine de cette charge fait encore

l'objet de débats. Il est aussi possible d'apporter une stabilité colloïdale *via* l'utilisation de tensioactifs qui diminuent la tension interfaciale des nanoparticules.<sup>2,13,21,79</sup> L'utilisation de tensioactif ou de polymère permet de stabiliser par répulsion électrostatique s'ils sont chargés, ou par répulsion stérique en ajoutant des polymères (copolymères à blocs amphiphiles ou polymères non ioniques).<sup>19,37</sup>

Quelques travaux ont tenté d'étudier l'origine de cette stabilité des suspensions colloïdales en absence de tensioactif :

- Il est connu que les gouttes d'huile portent une charge négative à l'interface dont la densité de charge augmente rapidement avec le pH et donc avec la concentration en ions hydroxydes  $\text{OH}^-$ .<sup>80-82</sup> Ceux-ci s'adsorbent à la surface expliquant une valeur de potentiel zêta négative, et donc une bonne stabilité. La croissance des gouttelettes s'arrête quand la densité de charge négative est suffisante en surface.
- Roger et Cabane ont attribué l'existence de cette stabilité aux traces d'acides gras ionisés par les ions hydroxydes.<sup>77</sup> En effet, ces ions s'adsorbent sur les acides gras (acides faibles) présents à l'état de traces dans l'hexadécane non purifié. Puis ce sont ces acides gras ionisés qui s'adsorbent à leur tour à la surface des gouttes d'huile. Ils ont constaté que l'hexadécane purifié ne présente pas autant de charge en surface et la distribution de taille des gouttes était plus grande. Ainsi, ils en ont conclu que ce ne sont pas les ions hydroxydes qui viennent directement s'adsorber à la surface des gouttes mais les traces d'acide gras anioniques.
- Ganachaud *et al.* ont constaté qu'à pH 6 – 9, ce sont les ions bicarbonates (formés *via* la carbonatation de l'eau par absorption du  $\text{CO}_2$  déjà présent dans la solution ou dans l'atmosphère) qui sont présents en majorité et qui s'adsorbent à la surface avec d'autres ions (hydroxydes) minoritaires, expliquant la charge négative à la surface et donc la stabilité colloïdale de leurs gouttelettes.<sup>38</sup>

Roger *et al.* ont étudié le phénomène de coalescence de gouttelettes/particules colloïdales qui ont des charges répulsives à leur surface (polymère PMMA ionique avec une charge sur les groupes terminaux) ou aucune charge.<sup>36</sup> Les populations de nanoparticules PMMA dispersées dans un mélange acétone/eau présentent une distribution de taille étroite, comme dans tous les processus d'agrégation/coalescence qui suivent le mécanisme DLCA. Le rayon moyen  $\langle R \rangle$  augmente logarithmiquement avec le temps écoulé tandis que la largeur relative  $\sigma_R/\langle R \rangle$  de la distribution diminue comme la racine carrée inverse de  $\langle R \rangle$ . Roger *et al.* ont interprété cette évolution comme résultant d'événements de coalescence qui sont entravés par les répulsions ioniques entre les gouttelettes. Grâce à l'équation cinétique de Smoluchowski, ils ont généralisé cette évolution par une simulation prenant en compte les interactions entre les gouttelettes. Ils ont constaté que toutes les rencontres entre gouttelettes mènent à la coalescence, que les interactions soient nulles ou attractives, avec la largeur de la distribution  $\sigma_R/\langle R \rangle$  qui augmente jusqu'à une valeur plateau.<sup>17,36</sup> De plus, pour les gouttelettes qui interagissent par des répulsions ioniques à longue portée, les rencontres entre les grandes gouttelettes et les plus petites ont plus de chance de coalescer que deux grandes (Figure 23A). En effet les répulsions électrostatiques entre deux grandes gouttelettes

sont plus importantes (car elles ont plus de charges à leur surface), qu'entre une petite et une grande. En résumé, le cas de coalescence sans répulsion (donc sans charge à la surface des gouttes) mène à une polydispersité élevée, tandis que la coalescence avec répulsion conduit à une faible polydispersité (où  $\sigma_R/\langle R \rangle$  diminue comme  $1/\sqrt{\langle R \rangle}$  dans la Figure 23B à droite) observée dans le domaine métastable (Figure 23B). Alors que l'ajout de tensioactifs donnent le résultat inverse. D'après la Figure 23B, plus les gouttelettes portent de charge à leur surface, moins la variation du rayon moyen est importante au cours du temps (à gauche de la figure) et moins la largeur de la distribution de taille est importante (à droite de la figure).

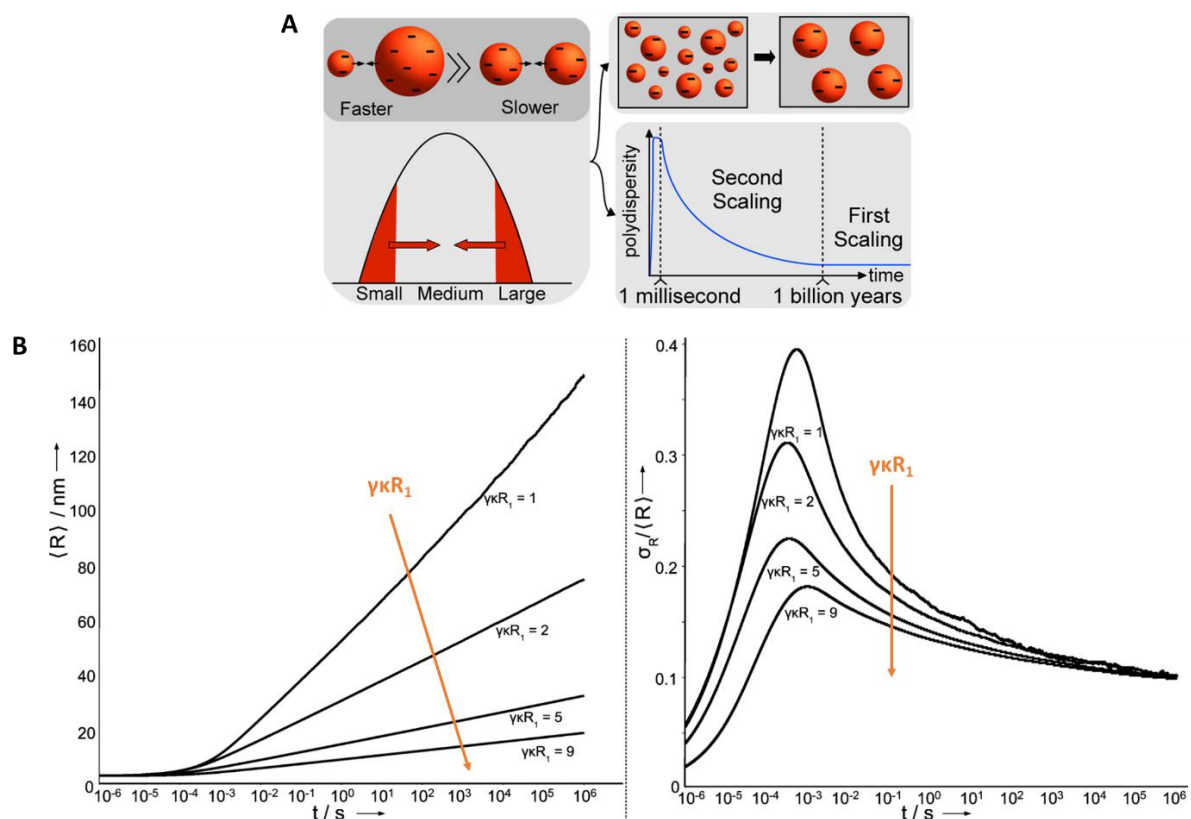


Figure 23 : (A) Illustration schématique des phénomènes de coalescence entre une grande gouttelette et une petite en fonction de leur densité de charge à leur surface, amenant à une faible polydispersité au cours du temps dans le domaine métastable. (B) (gauche) Évolution calculée du rayon moyen  $\langle R \rangle$  pour plusieurs valeurs du paramètre  $\gamma k R_1$ , qui correspond à l'amplitude des répulsions ioniques. Une évolution logarithmique est toujours observée et la pente de la variation diminue avec l'augmentation de la charge de surface. (Droite) Évolution calculée de la polydispersité  $\sigma_R/\langle R \rangle$  pour plusieurs valeurs du paramètre  $\gamma k R_1$ . La polydispersité ne dépend que faiblement de ce paramètre pour les temps supérieurs à quelques secondes et en est presque indépendante pour les temps supérieurs à quelques heures.<sup>36</sup>

### 1.2.c Co-Nanoprecipitation

La co-nanoprécipitation consiste à nanoprécipiter plusieurs composés simultanément ou séquentiellement. Dès 1986, Fessi *et al.* ont cherché à élaborer des capsules de polymère contenant une molécule huileuse active, en coprécipitant un polymère et une huile.<sup>28</sup> Finalement, beaucoup de travaux aujourd'hui usent de la méthode de co-nanoprécipitation en tentant de fabriquer des capsules ou des sphères de polymères contenant des principes actifs pour améliorer leur biodistribution, biodisponibilité et leur solubilité dans les milieux



aqueux. Plusieurs techniques ont été développées pour rendre leur élaboration efficace, facile et contrôlable.

#### 1.2.c.i Nucléation hétérogène

Dans la nucléation dite hétérogène, l'ajout de substrats étrangers réduit l'énergie libre critique de nucléation  $\Delta G_{cr}$ .<sup>1</sup> De ce fait, la nucléation se produit à une sursaturation plus faible et les molécules libres de soluté s'adsorbent à la surface du substrat étranger. Ces « germes » ajoutés dans le milieu contrôlent le nombre et la taille des nanoparticules. Par exemple, une macromolécule hydrophobe, comme le polycaprolactone (PCL), se solubilise dans un solvant miscible à l'eau, le tétrahydrofurane avec une molécule hydrophobe d'intérêt, le paclitaxel.<sup>1</sup> Dès l'ajout de l'eau au mélange organique, la nucléation hétérogène se produit et le paclitaxel s'accumule sur les nanoparticules de polymères, s'étant d'abord formées après l'ajout de l'eau. Ainsi, une co-nanoprécipitation du PCL et du médicament Paclitaxel se produit. Dans cette étude, ils ont montré que l'utilisation de différents poids moléculaires de polymère à masse constante peut induire différentes tailles de nanoparticules. En effet, en travaillant à masse constante, le polymère avec un poids moléculaire élevé est moins concentré dans le milieu que ceux de faible poids moléculaire. Ceci implique la formation d'une plus faible quantité de noyaux et présentant une plus grande taille après accumulation du médicament à leur surface.

#### 1.2.c.ii La nanoprécipitation séquentielle

Souvent dans la littérature, nous retrouvons la méthode de nanoprécipitation séquentielle pour conanoprécipiter deux composés hydrophobes en deux étapes : la nanoprécipitation du soluté hydrophobe suivie de la nanoprécipitation du polymère pour encapsuler la nanoparticule de soluté.<sup>20,83</sup> Cette méthode est utilisée pour différentes raisons telles que *i*) l'élaboration de capsules polymères,<sup>83</sup> *ii*) la stabilisation de nanoparticules inorganiques par stabilité stérique,<sup>84</sup> *iii*) la favorisation de la nanoprécipitation d'un soluté hydrophobe dans le milieu,<sup>11</sup> ou encore *iv*) apporter des propriétés provenant des deux composés utilisés selon les applications visées.

Il est possible de réaliser la co-nanoprécipitation séquentielle soit en bulk soit en microfluidique. Pour la méthode en bulk, il suffit d'ajuster leur solubilité en sélectionnant différents systèmes de solvants (utilisation de co-solvants) de sorte que le soluté puisse précipiter en premier pour former le cœur de la nanoparticule, suivi par la nanoprécipitation immédiate du polymère pour obtenir une enveloppe polymère, dans un même réacteur. Liu *et al.* ont comparé cette méthode avec la nanoprécipitation traditionnelle, c'est-à-dire le mélange du polymère et du principe actif (la curcumine dans leur cas) en une seule fois dans du solvant organique DMF qui est ensuite ajoutée à une grande quantité d'eau (Figure 24a).<sup>83</sup> Dans le cas de nanoprécipitation traditionnelle, ils ont observé que la solution devient instantanément trouble, puis après quelques minutes de gros cristaux de curcumine apparaissent dans la solution. Finalement, cela s'explique par une différence de solubilité intrinsèque de la curcumine et du polymère dans le DMF. Ils ne présentent pas la même vitesse de nanoprécipitation dans ce solvant : le polymère nanoprécipite plus vite pour former des nanoparticules de polymère pouvant contenir une infime quantité de curcumine, suivi de la cristallisation de la curcumine en quantité majoritaire dans le milieu (étant

thermodynamiquement plus favorable sous la forme cristalline). Dans le cas de la nanoprécipitation séquentielle en bulk, l'utilisation de co-solvants adéquats (DMF/DMSO/EtOH) et l'ajout d'eau en 2 étapes donne lieu à la nanoprécipitation par étape de chaque composé hydrophobe pour former des nanoparticules cœur/coquille hautement riches en charge médicamenteuse, sans l'apparition d'agrégats dans la suspension (Figure 24b).

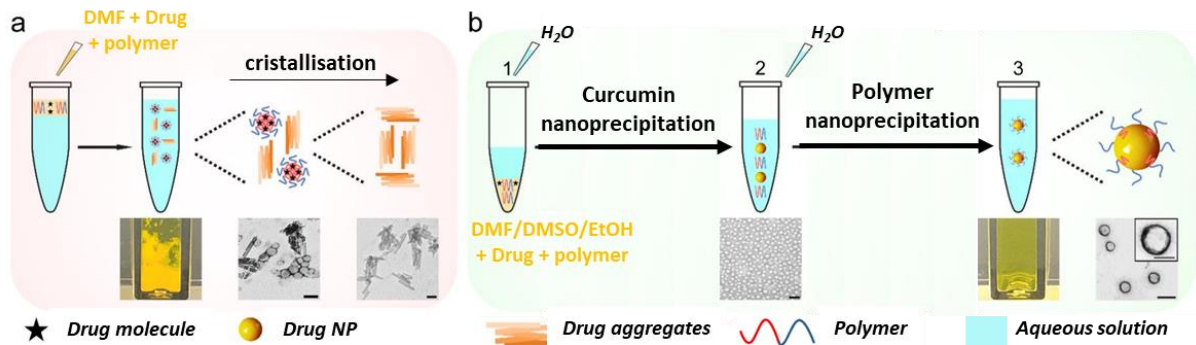


Figure 24 : Illustration schématique accompagnée des observations visuelles et en TEM de la méthode traditionnelle de nanoprécipitation en une seule étape (a) et de la méthode de co-nanoprécipitation séquentielle en bulk en deux étapes (b). La méthode (a) présente des agrégats de polymères et de curcumine, observable visuellement par l'apparition d'un gros précipité dans la solution et en TEM avec les cristaux de curcumine et les agrégats de polymères. La méthode (b) a permis la formation des nanoparticules de polymère avec un cœur riche en curcumine et la solution semble homogène.<sup>83</sup>

Un autre exemple est présenté dans la Figure 25.<sup>20</sup> L'ajout d'un solvant organique miscible à l'eau dans une solution contenant une substance active soluble dans la phase aqueuse provoque sa nanoprécipitation (étape 1 : obtention de nanoparticules de soluté hydrophile dans ce cas). Dans un second temps, cette solution est ajoutée à une solution de polymères suspendus dans un solvant organique, pour finalement former des nanoparticules avec un cœur enrichi en substance active recouvert d'une enveloppe de polymère.

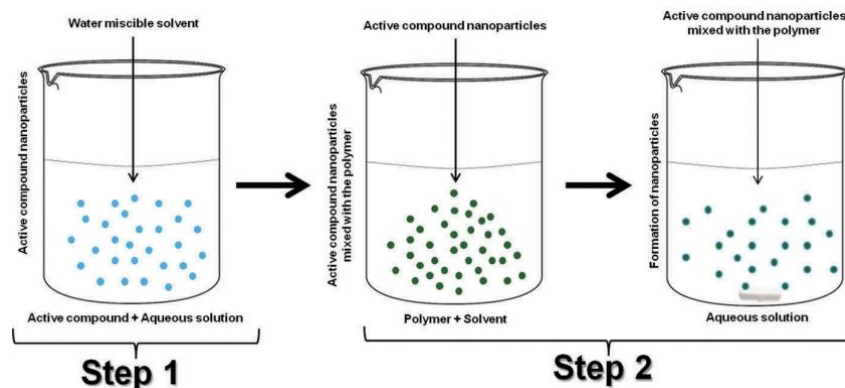


Figure 25 : Représentation schématique de la méthode de co-nanoprécipitation séquentielle en bulk dans le cas d'une substance active soluble dans la phase aqueuse et d'un polymère soluble dans la phase organique pour former des nanoparticules de polymère chargées en substance active.<sup>20</sup>

Néanmoins, la microfluidique est souvent la méthode de prédilection pour contrôler la séquence d'introduction du soluté et du polymère et pour contrôler la taille et la morphologie des nanoparticules formées.<sup>85-87</sup> Comme pour la méthode en bulk, il convient d'utiliser des solvants adéquats pour chaque composé à nanoprécipiter, puis de les mélanger soit ensemble

(utilisation de co-solvants appropriés)<sup>88</sup> soit séparément (en deux étapes)<sup>85</sup>. Puis la phase organique et la phase aqueuse sont ajoutées en même temps dans une chambre de mélange. Une diffusion instantanée du solvant dans la phase « non-solvant » a lieu impliquant la précipitation du polymère et la formation des nanoparticules comme pour la méthode traditionnelle de précipitation, mais en un temps très court (quelques millisecondes ou secondes). C'est la « Flash Nanoprecipitation » (FNP).<sup>11,20,89</sup> Elle produit de petites nanoparticules (entre 50 et 150 nm) de manière reproductible, avec une meilleure distribution de taille et avec une charge plus élevée en composés hydrophobes.<sup>86</sup>

Liu *et al.* ont élaboré un dispositif microfluidique pour réaliser une précipitation séquentielle des médicaments et des polymères.<sup>85</sup> Ils ont utilisé une phase organique contenant un médicament hydrophobe (paclitaxel, sorafénib) et un polymère sensible au pH. Cette phase organique est pompée simultanément avec une phase aqueuse dans le dispositif microfluidique pour obtenir les nanoparticules de médicament dans un premier temps. Ensuite, ils ont ajouté dans le dispositif un troisième flux extérieur contenant une solution acide pour induire la précipitation du polymère à la surface des nanoparticules de médicament préformées. Le résultat obtenu est une nanoparticule cœur/coquille avec une charge élevée en médicament dans le cœur de la capsule polymérique. En outre, l'intervalle de temps extrêmement court entre les processus de précipitation du médicament et du polymère a permis d'obtenir des nanoparticules stables en l'absence de tout stabilisant. Ce dispositif microfluidique est résumé dans la Figure 26.

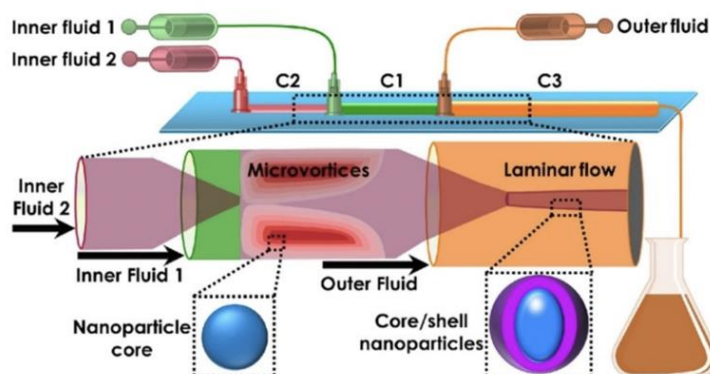


Figure 26 : Illustration schématique de la plateforme de nanoprecipitation séquentielle par méthode microfluidique super-rapide. Fluide interne 1 : précurseurs de médicaments et de polymères dissous dans le solvant ; Fluide interne 2 : solution aqueuse comme « non-solvant » pour le médicament ; Fluide externe : solution acide comme « non-solvant » pour les polymères.<sup>85</sup>

Il faut avoir en tête qu'il est aussi possible d'obtenir un co-chargement de deux molécules en une seule étape, sans passer par la nanoprecipitation séquentielle. Une liaison forte peut exister entre les deux molécules à nanoprecipiter.<sup>90</sup> Différents systèmes peuvent être utilisés pour l'auto-assemblage comme un polymère hydrophile combiné à un médicament hydrophobe, ou la combinaison de deux médicaments hydrophobes, etc.

### 1.3 Les paramètres influençant les nanostructures obtenues par l'effet Ouzo

La méthode de préparation est une étape clé pouvant influencer la taille, le nombre, la distribution ou la structure globale des particules précipitées selon les applications souhaitées

(Figure 27). Cette partie vise à mieux cerner les conditions qui favorisent et optimisent la nanoprécipitation du soluté hydrophobe par l'effet Ouzo, telles que l'abaissement de la qualité du solvant, la rapidité du mélange, la solubilité du soluté dans le mélange, l'effet de la température, ou encore l'ajout d'agents stabilisants pour limiter les phénomènes d'agrégation.

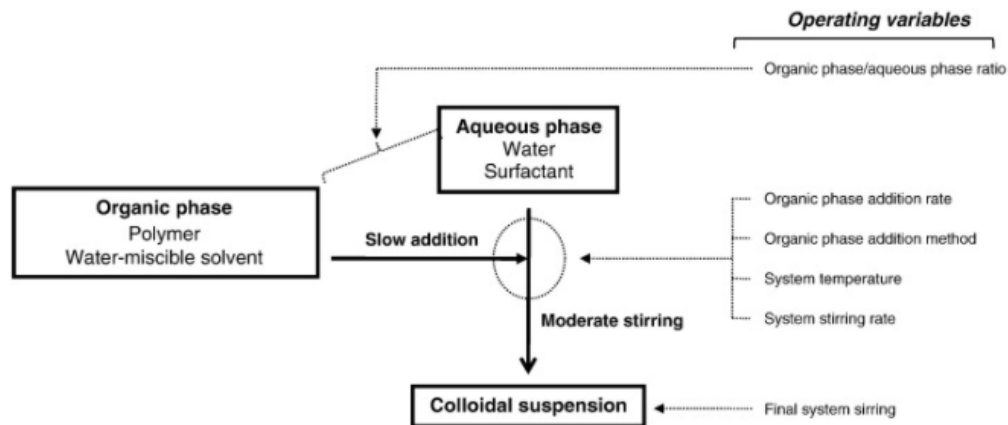


Figure 27 : Représentation schématique des paramètres pouvant influencer l'élaboration des particules submicroniques par méthode de déplacement de solvant.<sup>91</sup>

### 1.3.a Choix du solvant, du « non-solvant » et du soluté

Le facteur clé de la nanoprécipitation est le choix des composants :

- le soluté (hydrophobe) miscible au solvant organique ;
- le solvant organique miscible au non-solvant et au soluté à nanoprécipiter, souvent appelé hydrotrope.<sup>67</sup> Il est possible aussi d'utiliser un mélange de solvants ;
- le « non-solvant », souvent une phase aqueuse, qui est un mauvais solvant pour le soluté hydrophobe à nanoprécipiter.

#### 1.3.a.i Le paramètre d'affinité entre le solvant et l'eau

Le contrôle des affinités entre ces composants semble être crucial.<sup>22,92,93</sup> Une faible affinité entre le soluté et le « non-solvant » et une forte affinité entre le solvant et le « non-solvant » favorisent la sursaturation (et la nucléation) du soluté. Cela conduit à de petites nanoparticules homogènes dans les conditions Ouzo (faible fraction massique de soluté et de solvant par rapport au « non-solvant »). Par ailleurs, il est possible d'obtenir des gouttelettes plus petites avec des solvants plus hydrophiles (donc des meilleurs hydrotropes).<sup>34</sup> De Oliveira *et al.*<sup>92</sup> ont étudié le paramètre d'affinité entre le solvant et l'eau ( $\chi_{\text{solvant-eau}}$ ) pour faire le meilleur choix de solvant dans leur système polymère PLGA/solvant/eau :

$$\chi_{\text{solvant-eau}} = \frac{V_{\text{eau}}}{RT} (\delta_{\text{solvant}} - \delta_{\text{eau}})^2$$

Ce paramètre d'affinité décrit l'interaction entre les molécules d'eau et les molécules du solvant organique.  $V_{\text{eau}}$  représente le volume molaire de l'eau (calculé à partir de sa masse

molaire et de sa densité),  $R$  est la constante des gaz parfaits,  $T$  la température absolue,  $\delta_{\text{eau}}$  et  $\delta_{\text{solvant}}$  sont les paramètres totaux de solubilité de l'eau et du solvant organique, caractérisant les interactions qu'une molécule peut avoir avec son environnement. Ce paramètre de solubilité, aussi appelé paramètre de solubilité de Hansen, permet d'évaluer la solubilité entre les deux espèces.<sup>94</sup> Il est le résultat de la contribution de 3 types d'interaction que sont les forces de dispersion ( $\delta_d$ ), les interactions polaires ( $\delta_p$ ) et les liaisons hydrogènes ( $\delta_h$ ). Plus les  $\delta$  des deux composés sont proches, plus ils sont solubles l'un avec l'autre.

En traçant la taille moyenne des nanoparticules en fonction de ce paramètre (Figure 28), ils ont constaté que plus l'affinité entre le solvant et l'eau est grande (c'est-à-dire, plus la valeur de  $\chi$  est petite), plus la taille des nanoparticules est petite. Ainsi, ils ont suggéré qu'une grande affinité permettrait un taux de mélange eau-solvant élevé menant alors à la formation de plus petites nanoparticules. Par ailleurs, certains travaux ont mis en évidence que le choix du solvant pouvait décaler la binodale.<sup>13,22,95</sup> Par exemple, une forte affinité décale la binodale vers des plus grandes concentrations en soluté. Quant à Ganachaud et Katz, ils ont ajouté que les solvants qui ont une très bonne affinité avec l'eau (plus qu'avec l'huile) ne font pas gonfler les gouttelettes de l'émulsion.<sup>40</sup> Alors que les solvants qui se répartissent plus uniformément gonflent les gouttelettes donnant de grosses gouttes polydisperses.

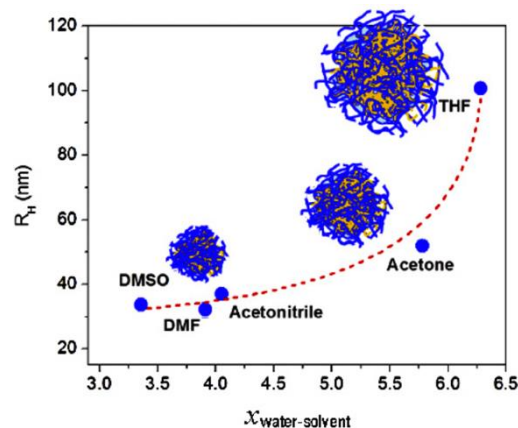


Figure 28 : Influence du paramètre d'interaction eau-solvant sur la taille moyenne des nanoparticules avec leurs illustrations schématiques en fonction du solvant utilisé.<sup>92</sup>

### 1.3.a.ii Modulation de l'interdiffusion entre le solvant et le « non-solvant »

La diffusion du solvant à travers le « non-solvant » est aussi une étape clé de l'effet Ouzo, pouvant subir l'influence de divers paramètres comme :

- **le poids moléculaire du soluté et la viscosité du mélange.**<sup>7,96,97</sup> Par exemple, la taille des nanoparticules peut augmenter avec le poids moléculaire du polymère hydrophobe, puisque cela augmente la viscosité du mélange et donc limite la diffusion solvant/« non-solvant ». Cependant, Seremeta *et al.* ont démontré que l'augmentation du poids moléculaire du polymère PCL impliquait une diminution de la taille des nanoparticules.<sup>98</sup> Ils ont expliqué ce phénomène par une diminution de la solubilité du polymère dans le milieu acétone/eau et donc une sursaturation plus rapide formant des plus petits noyaux plus nombreux.
- **la concentration en soluté** (pour un polymère, Figure 29A, et pour une huile, Figure 29C).<sup>22,92,97,99,100</sup> En effet, plus la concentration en soluté est élevée, plus le taux de sursaturation est élevé et plus la nanopréciipitation est favorisée. Ceci

entraîne une augmentation de la taille des nanoparticules puisqu'un plus grand nombre de molécules de polymère par unité de volume de solvant participe à la nucléation-croissance.<sup>96,101</sup> D'après Aubry *et al.*, la taille des nanoparticules de polymère est proportionnelle à la concentration en polymère à la puissance 1/3, comme prédit par le modèle cinétique de Smoluchowski et par le mécanisme d'agrégation de cluster limitée par la diffusion (DLCA).<sup>13,102</sup> Mais, plus la concentration en soluté est élevée, plus la viscosité augmente aussi, et donc cela rend difficile l'interdiffusion des deux phases.

- **les proportions en solvant et « non-solvant » utilisées à une température donnée.**<sup>92,100</sup> Plusieurs études ont démontré que la taille des particules augmente avec l'augmentation de la fraction en solvant organique dans le milieu. En effet, ceci induit une diminution de la sursaturation et donc de la nucléation, favorisant la croissance des nanoparticules.

En outre, Vitale et Katz ont démontré que le paramètre qui augmente la taille des gouttes est plutôt le rapport de la concentration de soluté en excès (sursaturation) par rapport à la concentration en solvant (Figure 29C).<sup>34</sup> L'augmentation de ce rapport conduit à une augmentation de la taille des nanoparticules.

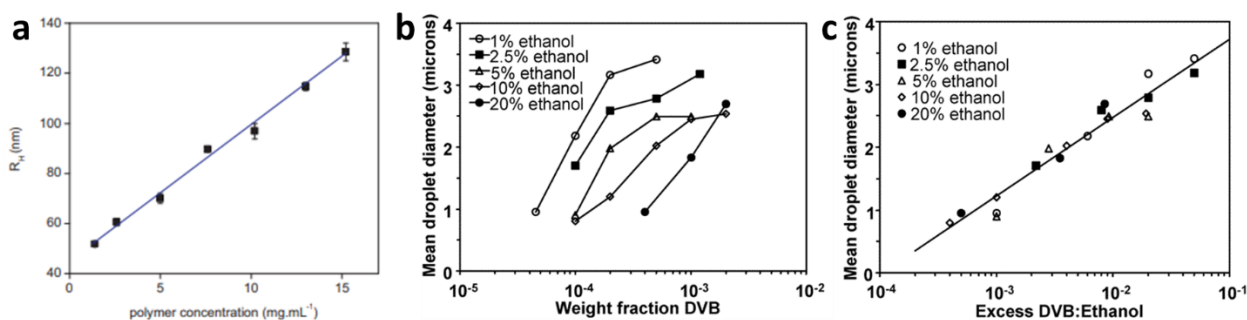


Figure 29 : (a) Augmentation linéaire de la taille (rayon hydrodynamique) des gouttelettes en fonction de l'ajout croissant en polymère dans la solution initiale, pour un système polymère/acétone/eau.<sup>92</sup> (b) Évolution de la taille des gouttelettes Ouzo obtenues dans le système DVB/éthanol/eau en fonction de la fraction volumique de DVB pour différente fraction de solvant.<sup>34</sup> (c) Évolution de la taille des gouttelettes Ouzo obtenues dans le système DVB (huile)/éthanol/eau en fonction du rapport entre l'excès de DVB et l'éthanol.<sup>34</sup>

### 1.3.a.iii Le choix du soluté à nanoprecipiter

En plus du choix du solvant qui peut décaler les limites du domaine Ouzo, le **choix du soluté** peut aussi jouer dessus. Trevisan *et al.* ont justement démontré ce point en utilisant des copolymères alternés portant de longs groupes alkyl-pendants : l'un AltC12 pour 12 carbones, l'autre AltC18 pour 18 carbones (Figure 30).<sup>52</sup> La limite du domaine Ouzo est décalée, vers un taux en solvant plus bas, pour AltC18. Ils ont suggéré que cela pouvait s'expliquer par la partition du copolymère dans le mélange solvant/eau après sursaturation. Etant donné que le copolymère AltC18 est plus lipophile que l'AltC12, le THF est un meilleur solvant pour AltC18. Ainsi, à des taux plus élevés de THF pour un mélange THF/eau, AltC18 aura plus tendance à se solubiliser (domaine monophasique à partir de 40 % THF) que l'AltC12 (à partir de 50 % de THF).

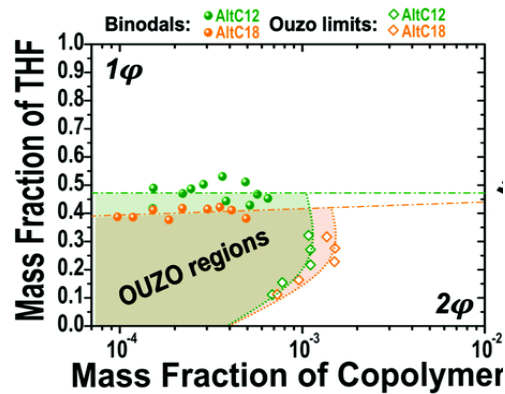


Figure 30 : Diagramme de phase bidimensionnel représentant les fractions massiques de THF en fonction des fractions massiques des copolymères (AltC12 et AltC18).<sup>52</sup>

Jusqu'à présent, la plupart des études sur l'effet Ouzo ont porté sur des huiles ou des polymères, ce qui laisse peu de doute sur l'état physique de la phase dispersée, c'est-à-dire liquide pour les huiles et solide (amorphe) pour les polymères. Concernant les composés organiques, comme un médicament, ils peuvent précipiter sous forme amorphe ou recristalliser, selon leurs caractéristiques physico-chimiques propres.<sup>89</sup> Pucci *et al.* ont constaté que les propriétés cristallines de leurs particules de poly(caprolactone) n'étaient pas affectées par le processus du mélange.<sup>42</sup> Dans ce cas, l'état physique des particules dépend uniquement de leur composition et la cristallisation se produit après la formation des particules. Par ailleurs, ils ont constaté que les propriétés semi-cristallines de leur polymère PCL étaient restaurées après élimination par dialyse des molécules de THF se trouvant encore dans les nanoparticules. D'autres travaux ont tenté de préserver la forme amorphe des médicaments nanoprecipités dans les capsules en utilisant des co-solvants. Cette méthode permet d'éviter la cristallisation trop rapide des composés d'intérêt à l'extérieur des capsules.<sup>83</sup>

### 1.3.b Les méthodes d'ajout et de temps de mélange

Aujourd'hui, un grand nombre de travaux ont prouvé la dépendance (cinétique) des propriétés des particules obtenues avec les conditions de préparation comme la méthode et le temps de mélange.

L'évolution du système dépend de la compétition entre le temps de mélange et le temps de séparation de phase.<sup>37</sup> Ainsi, une sursaturation élevée, rapide et homogène exige que le mélange des deux phases et la diffusion moléculaire soit extrêmement plus rapide que la vitesse de séparation de phase (Figure 31a).<sup>9,37</sup> Alors, seules les interactions entre les nanoparticules en formation déterminent les distributions de taille finales. Si cette condition est remplie, les nuclei produits simultanément peuvent croître en même temps de façon homogène et sont dispersés aléatoirement dans le mélange. Dans le cas contraire, si le mélange se produit simultanément à la séparation de phase (Figure 31b), voire un mélange plutôt lent par rapport au temps de nucléation et de croissance, alors les conditions de nucléation et de croissance sont hétérogènes et conduisent à des dispersions moins uniformes.

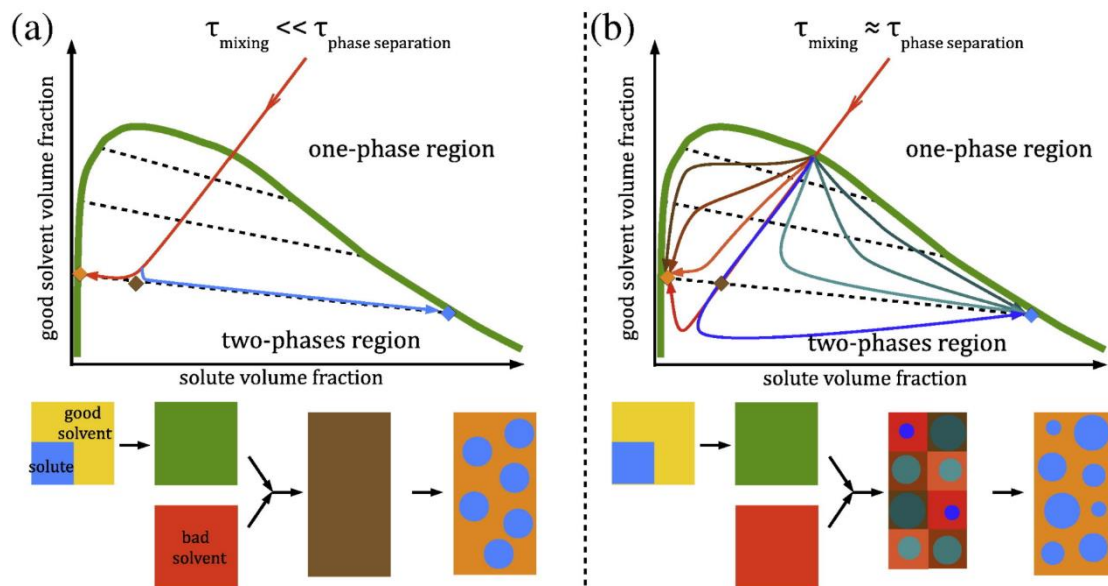


Figure 31 : Diagramme de phase d'un système **soluté/bon solvant/mauvais solvant**. L'addition du mauvais solvant conduit à une séparation de phases en traversant la frontière de solubilisation (ligne verte). Les compositions de chaque phase sont données par les lignes de liaison en pointillé. (a) Un mélange plus rapide que la séparation de phase, amenant à une solution homogène sursaturée puis se séparant en 2 phases. (b) Un mélange et une séparation de phases simultanés. La séparation de phases se produit à des compositions différentes et variables.<sup>37</sup>

Pour illustrer ce propos, Pucci, *et al.* ont montré que la méthode d'ajout, et donc indirectement le temps de mélange, est une condition importante en étudiant la nanopréciipitation du poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) par l'ajout rapide (FA pour « fast addition ») de l'eau dans la phase organique (PCL/THF) ou l'ajout goutte à goutte (DD pour « drop-by-drop »).<sup>42</sup> Quelle que soit la fraction de THF, ils ont observé que la méthode d'ajout rapide présente un domaine Ouzo plus large (●, Figure 32a, gauche) avec des particules plus petites (Figure 32b à gauche et c) et plus stables dans le temps que celles obtenues par l'ajout goutte à goutte de l'eau (Figure 32a, b à droite et c). Ainsi, l'ajout rapide d'eau mène à des conditions de sursaturation élevées, rapides et homogènes, abaissant rapidement la solubilité du soluté hydrophobe et favorisant un haut taux de nucléation. Ici le temps de mélange est plus court que le mécanisme de nucléation-croissance/agrégation. Alors que l'ajout goutte à goutte d'eau à la phase organique mène à un temps de mélange proche, voire plus long que le temps de séparation de phase des particules, et donc à un faible taux de sursaturation. Ainsi, la solution subit une décomposition spinodale avant d'atteindre la concentration finale dans le domaine Ouzo. Comme vu dans la partie I.2.b.ii, cela conduit à une nucléation de taille hétérogène favorisant la formation de particules plus grandes et plus polydisperses (Figure 32a, ▲, b et c, à droite).



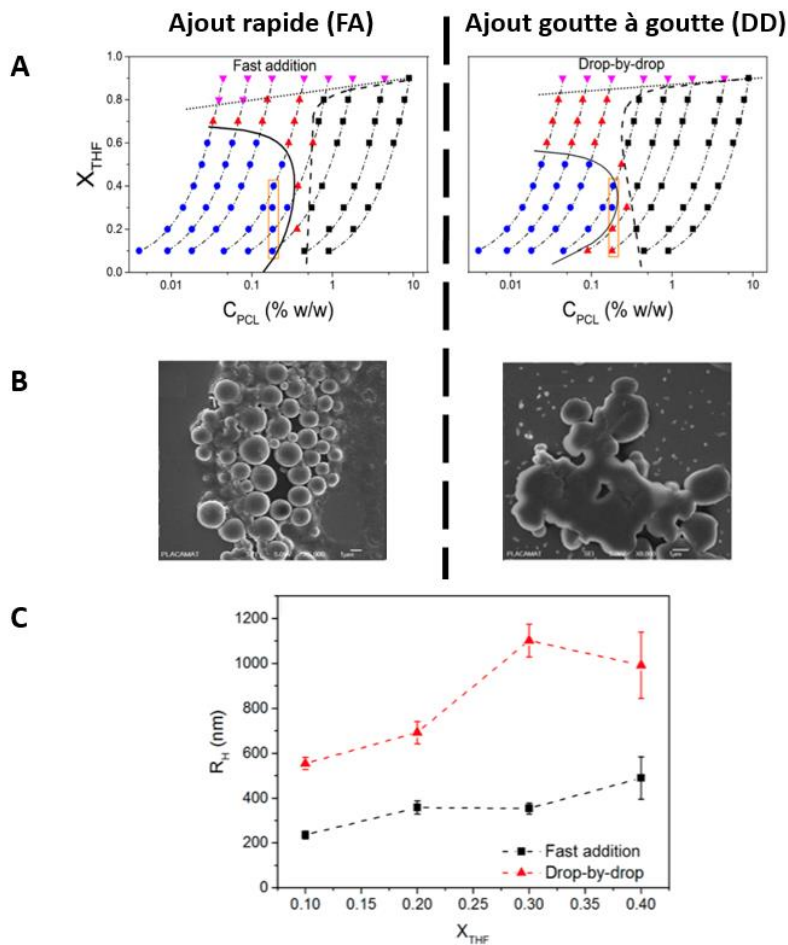


Figure 32 : A) Diagrammes de phase du système PCL/THF/eau obtenus par, ajout rapide (FA, gauche) ou goutte à goutte (DD, droite) de l'eau : Solutions transparentes (▼, polymère soluble) ; troubles dans le domaine Ouzo (●, nanoparticules) ; troubles dans le domaine Ouzo instable (▲, micro- et nanoparticules) ; et séparation macroscopique (■, sédiments). La fraction volumique du THF ( $X_{THF}$ ) est rapportée en fonction de la concentration finale en PCL. La limite de miscibilité ou binodale (.....), la limite de l'Ouzo (—) et la limite de stabilité ou spinodale (- - -). Les lignes en pointillés (- - - - -) représentent les trajectoires de composition, allant d'une teneur élevée en THF à une teneur plus faible avec l'ajout d'eau. B) Photographies MEB des particules de PCL préparées à  $X_{THF} = 0,20$  et  $C_{PCL} = 0,20$  %w, pour FA (à gauche) et DD (à droite). (C) Le rayon hydrodynamique moyen des particules de PCL est indiqué en fonction de  $X_{THF}$  (courbe noire pour FA et courbe rouge pour DD). La concentration finale en PCL est de 0,18 %w. Les analyses DLS ont été effectuées juste après la préparation, ces échantillons sont ceux entourés d'un rectangle orange dans les diagrammes de phase en (A).<sup>42</sup>

Sitnikova *et al.* ont constaté aussi que l'ordre d'ajout avait son importance.<sup>17</sup> En effet, l'ajout de l'huile directement dans le mélange eau/éthanol ou de l'alcool dans la solution huile/eau n'aboutit pas à une émulsification spontanée. Elle ne se produit qu'à condition d'ajouter rapidement la grande quantité d'eau au système huile/solvant. Autrement, il est possible d'injecter rapidement la phase organique contenant le soluté hydrophobe dans le mélange aqueux, comme Schubert *et al.* l'ont fait avec une aiguille d'injection pour former des nanoparticules de lipides.<sup>103</sup>

Il est important de mentionner l'effet du taux d'agitation puisque la méthode souvent employée pour mélanger les différentes phases est l'agitation mécanique dans une cuve. Une augmentation de la vitesse d'agitation entraîne généralement une diminution de la taille des particules.<sup>24</sup> En effet, le mélange se fait plus efficacement et induit une interdiffusion plus rapide entre les phases aqueuse et organique.

La « flash nanopréciipitation » est une méthode de prédilection qui a été développée pour améliorer les conditions de mélange d'une émulsion Ouzo. Sa dénomination est due à la formation rapide et instantanée des nanoparticules grâce à un micromélangeur en flux, faisant alors appel à la microfluidique comme expliqué précédemment.<sup>104</sup> Grâce à cette technique, l'ajout des composants et le mélange se font dans des temps extrêmement courts (de l'ordre de quelques millisecondes) et de façon plus homogène par rapport au procédé habituel avec une agitation mécanique.<sup>105,106</sup> Dans ce cas de figure, le taux de mélange est bien plus important que celui de séparation de phase, permettant le contrôle du taux de nucléation et l'obtention reproductible de nanoparticules monodisperses et petites.

### 1.3.c L'ajout d'un stabilisant

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'ajout de polymères à la surface des nanoparticules peut apporter une stabilité stérique et/ou électrostatique s'ils sont chargés. Les stabilisants ayant un effet électrosterique favorise la production de particules plus petites.<sup>24</sup> En revanche, si une trop grande concentration est utilisée alors la viscosité du non-solvant augmente, ce qui défavorise l'interdiffusion entre le solvant et le non-solvant. En effet, la diffusion est ralentie et les nanoparticules voient leur taille augmenter. L'utilisation d'une concentration plus élevée de tensioactif favorise son adsorption à la surface des nanoparticules et leurs tailles diminuent. De ce fait, une plus faible concentration en polymère est souhaitable contrairement aux tensioactifs pour obtenir une stabilisation interfaciale améliorée provoquant une diminution de la taille des nanoparticules.

Par ailleurs, selon la nature du stabilisant et le type d'émulsion (SFME ou Ouzo), il est possible d'obtenir différentes tailles. C'est donc un paramètre important à prendre en compte en fonction du système étudié. Par exemple, Yan, Ganachaud *et al.* ont constaté une différence d'évolution de taille après l'ajout d'un tensioactif non ionique soit dans une émulsion SFME soit dans une émulsion Ouzo (miglyol/acétone/eau pour élaborer les capsules polymères PEMM).<sup>58</sup> L'ajout du tensioactif sur les capsules de polymère diminue légèrement leur taille dans le domaine de l'Ouzo et augmente leur stabilité colloïdale, tandis qu'il conduit à une augmentation de la taille des capsules et à un élargissement des distributions dans le domaine SFME (Figure 33).

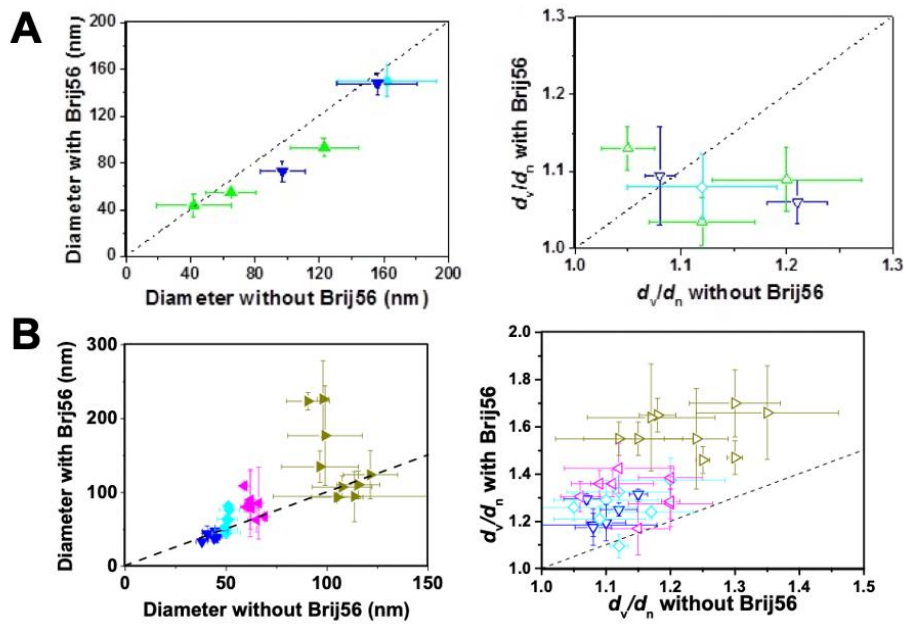


Figure 33 : Comparaison des diamètres (gauche) et des polydispersités (droite) obtenues avec/sans tensioactif non ionique Brij56. (A) Dans le domaine Ouzo, les gouttelettes sont stabilisées par le tensioactif. Fraction massique en acétone : 0,3, 0,4, 0,5. (B) Dans le domaine SFME, les gouttelettes sont déstabilisées par le tensioactif. Fraction massique en acétone : 0,4, 0,5, 0,6, 0,7.<sup>58</sup>

Jusqu'à présent, nous avons discuté de l'effet de l'ajout de stabilisant type tensioactif ou polymère dans les émulsions. Dans notre équipe, l'étude de la stabilité des gouttelettes a aussi été investiguée en ajoutant des nanoparticules inorganiques hydrophobes (< 10 nm) à leur surface.<sup>50</sup> Grâce aux analyses NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), il a été constaté que l'adsorption de nanoparticules inorganiques à la surface des gouttes Ouzo diminue leur taille et donne une distribution de taille plus étroite (Figure 34b) qu'en absence de nanoparticules (Figure 34a). De plus, la taille diminue (et leur nombre augmente) d'autant plus que la quantité de nanoparticules ajoutée augmente. Par ailleurs, l'ajout des nanoparticules ne modifie pas la transition SFME – Ouzo (augmentation de taille et diminution du nombre Figure 34c et d) dans le diagramme de phase du système étudié, mais il permet d'étendre le domaine Ouzo vers des concentrations plus élevées en soluté. Enfin, Goubault *et al.* ont démontré que les émulsions pouvaient subir une coalescence limitée comme les émulsions Pickering (huile/eau) en traçant l'inverse de la taille des gouttelettes qui croît linéairement en fonction de la concentration de nanoparticules.<sup>50,107</sup> Cette étude nous permet alors de comprendre le phénomène qui gouverne l'évolution de la taille des gouttes du métastable lorsque des nanoparticules sont adsorbées à l'interface, à savoir la coalescence limitée.

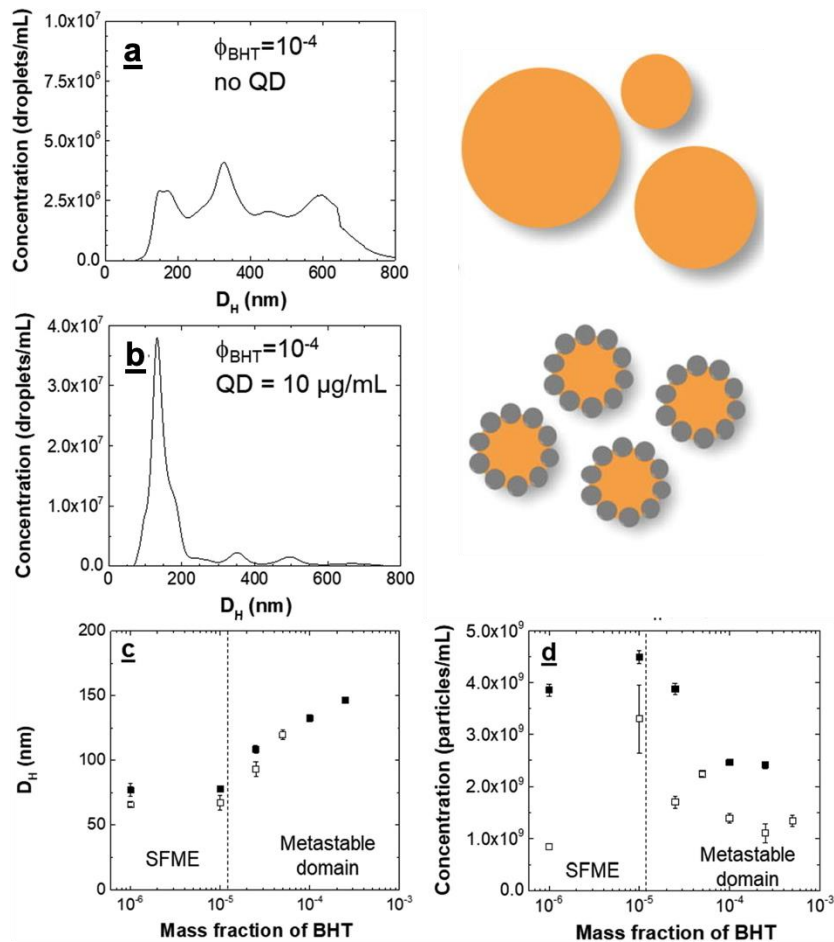


Figure 34 : Comparaison de la distribution de taille (diamètre hydrodynamique  $D_H$ ) mesurée par NTA et de l'illustration schématique des gouttes en l'absence (a) et en présence (b) de nanoparticules de QD pour un échantillon se trouvant dans la zone métastable du système BHT/THF/eau ( $\Phi_{THF} = 0.2$  ;  $\Phi_{BHT} = 10^{-4}$ ). (c) Taille (mode principal de la distribution) et (d) concentration des gouttelettes, en l'absence ( $\square$ ) et en présence ( $\blacksquare$ ) du QD ( $10 \mu\text{g/mL}$ ). L'histogramme de taille du (a) ne montre aucun mode principal, et n'est pas représenté sur la figure (c). Toutes les compositions se tiennent le long de la ligne  $\Phi_{THF} = 0,2$ .<sup>50</sup>

### I.3.d Autres paramètres (température, force ionique)

De Oliveira *et al.* ont élaboré des particules de polymères et ont balayé une plage de températures allant de 5 à 55°C.<sup>92</sup> Ils ont observé une diminution de taille de 58,6 nm à 42,3 nm. Ainsi, une meilleure affinité acétone-eau a induit une interdiffusion eau-solvant plus rapide, un taux de nucléation plus élevé conduisant à la formation de nanoparticules plus petites à des températures plus élevées.

Vitale et Katz ont montré que la largeur de la distribution de taille des gouttelettes dépendait de la température.<sup>34</sup> Ils ont étudié le système DVB/éthanol/eau mélangé soit à 25°C, soit à 50°C puis refroidis dans un bain-marie jusqu'à température ambiante. Ils ont obtenu une distribution étroite en chauffant puis en refroidissant leur système. Comme la solubilité de l'huile dans le mélange (particulièrement dans la phase aqueuse) augmente avec la température, il y a moins d'huile en excès disponible pour former des gouttelettes. Ainsi, les gouttelettes formées après ajout de l'eau présentent une taille plus petite qu'à

température ambiante. Le refroidissement, étant un processus lent par rapport au mélange et à la diffusion, ne permet pas de provoquer la nucléation de nouvelles gouttelettes. En fait, l'huile a suffisamment de temps pour diffuser vers les gouttelettes déjà existantes, menant vers une distribution de taille plus étroite. Il faut tout de même contrôler la température une fois l'émulsion faite, car une température élevée la déstabilise favorisant la coalescence (agitation thermique) et le mûrissement d'Ostwald.<sup>45</sup> D'autres travaux ont montré que le domaine SFME est aussi sensible aux changements de température, lesquels pouvant modifier la taille des gouttes et leur structure.<sup>108</sup>

De Oliveira *et al.* ont aussi étudié l'effet de l'ajout de sel dans le système PLGA/solvant/eau. La force ionique a été contrôlée en variant la concentration en NaCl et ils ont observé une nette influence sur la taille moyenne des particules. La taille des nanoparticules a augmenté avec la force ionique jusqu'à même flocculer. L'augmentation de la concentration en NaCl réduit le potentiel zêta négatif car les ions Na<sup>+</sup> écrantent les charges négatives entre les chaînes de polymères PLGA. Ceci expliquerait la déstabilisation des particules et leur agrégation par forces attractives de van der Waals.

Finalement, de nombreux paramètres contrôlent la taille des particules. Ils sont résumés dans le tableau ci-dessous de la Figure 35 adapté d'Elaissari et de Budhian.

	Parameters
Decrease particle size	Increase stirring rate Increase volume of aqueous phase Decrease polymer concentration in organic phase Increase surfactant concentration in aqueous phase Decrease polymer molecular weight
Increase particle size	Decrease stirring rate Decrease volume of aqueous phase Increase polymer concentration in organic phase Decrease surfactant concentration in aqueous phase Increase polymer molecular weight

Figure 35 : Tableau résumant les paramètres régissant la taille des NP obtenues par déplacement de solvant.<sup>24</sup>

## II La nanoprécipitation pour l'élaboration de nanocapsules à partir de l'effet Ouzo et/ou de la zone SFME

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons plus particulièrement aux nanocapsules (structure cœur/coquille), puisque ces réservoirs disposent d'un plus haut rendement d'encapsulation de composés hydrophobes par rapport aux nanosphères.<sup>109</sup>

### II.1 Capsules de polymère à partir de polymères préformés

Comme nous l'avons vu dans la partie I de ce chapitre, Fessi *et al.* sont parmi les premiers à avoir élaboré des nanocapsules à base de polymère par dépôt interfacial à partir de la méthode de déplacement de solvant.<sup>28,29</sup> Cette technique consiste en l'émulsification spontanée d'une huile hydrophobe par ajout d'un « non-solvant » dans une phase organique, suivie du dépôt du polymère à la surface des gouttes formées.

L'équipe de Ganachaud a aussi développé des nanocapsules de polymères à partir de l'effet Ouzo, ainsi que de la zone SFME.<sup>51</sup> Leur technique d'approche pour les fabriquer consiste à faire nanoprécipiter simultanément le polymère et le soluté hydrophobe dans une même gamme de concentration solvant/ « non-solvant ». Puis le polymère déposé à la surface des gouttes est réticulé pour renforcer la coque de la capsule. Pour cela, ils ont superposé le diagramme de phase de l'huile et celui du polymère pour trouver une zone exploitable. Par exemple, la Figure 36 illustre la superposition du diagramme de phase de l'héxadécane et du glycopolymère PHMM, tous deux dans THF/H<sub>2</sub>O. Du fait de cette méthode, il est possible d'anticiper les morphologies des nano-objets pouvant être obtenues dans les différentes zones du diagramme de phase. La zone verte « f » sur le diagramme de phase correspond à la zone exploitable où co-nanoprécipitent le glycopolymère et l'huile, permettant d'élaborer les nanocapsules polymères avec une distribution de taille monodisperse d'environ 100 nm. Le polymère est soluble dans les zones a, b, et c, tandis que l'huile est dissoute dans les zones c et d. Le polymère nanoprécipite dans les zones d, e et f, et l'huile forme des gouttelettes métastables dans les zones Ouzo b et f. Dans les zones a et e, la taille des gouttelettes d'huile est polydisperse (« Ouzo instable », partie I.2.b.ii), expliquant l'obtention de capsules de taille hétérogène dans la zone e. Par ailleurs, ils ont réussi à encapsuler un fluorophore, le pyrène, dans le cœur de leurs capsules en le solubilisant au préalable dans le solvant organique. Ils ont aussi décoré l'enveloppe avec des composés d'intérêt dont des nanoparticules inorganiques pour des applications biologiques, mais nous abordons ce sujet dans la partie II.2 de ce chapitre.

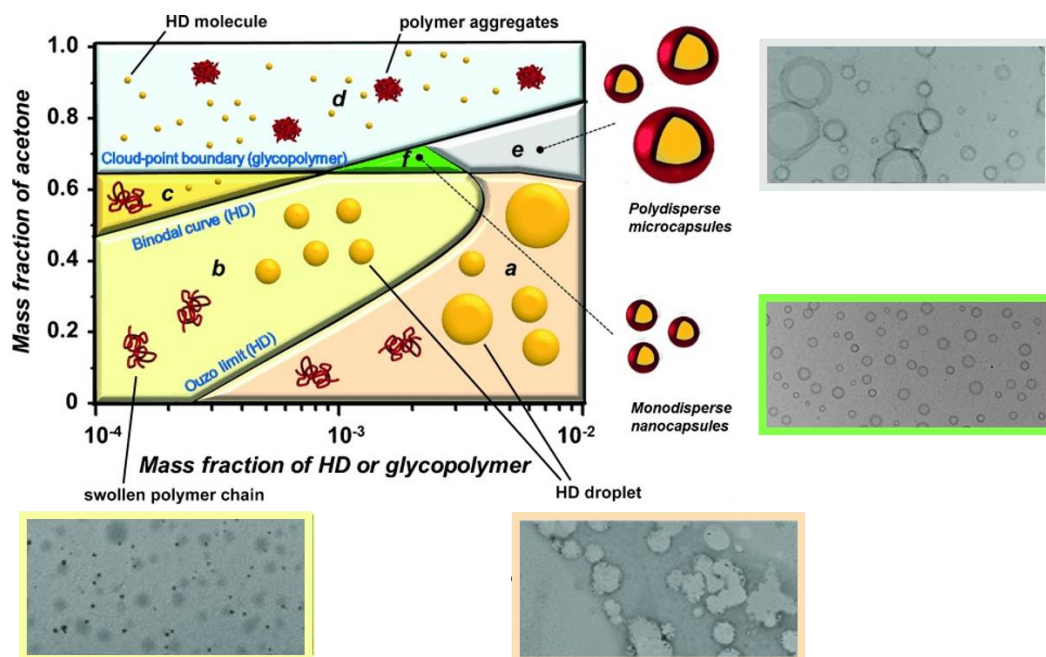


Figure 36 : Diagrammes de phase superposés du glycopolymère PHMM et de l'huile hexadécane dans le système THF/H<sub>2</sub>O, présentant les schémas des différentes structures obtenues dans chaque zone et les images MET correspondantes.<sup>51</sup>

À partir de cette méthode de superposition de diagrammes de phase soluté-polymère s'en est suivi de nombreuses élaborations de nanocapsules à partir de différents systèmes dans les travaux de Yan *et al.* Par exemple, ils ont aussi utilisé le système ternaire miglyol/acétone/eau pour former l'émulsion Ouzo et du glycopolymère PEEGM réticulé pour former la nanocapsule de polymère (Figure 37).<sup>58</sup>

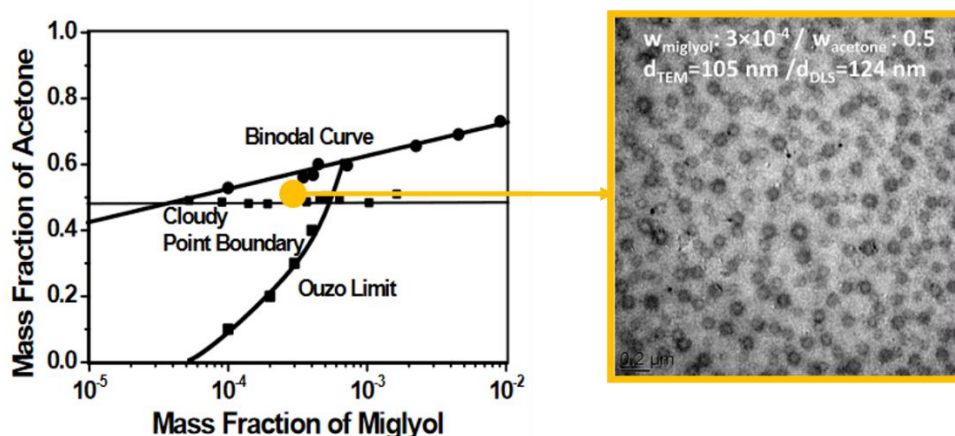


Figure 37 : Diagramme de phase du système ternaire miglyol/acétone/eau et du glycopolymère PEEGM/acétone/eau, accompagné de l'image MET correspondant au point du diagramme dans le domaine Ouzo où le miglyol et le PEEGM co-nanoprécipite pour élaborer les nanocapsules à base polymère réticulé.<sup>58</sup>

L'élaboration de capsules polymères à partir du domaine Ouzo permet de fabriquer des capsules de taille contrôlée, monodisperses et encapsulant efficacement des composés d'intérêt selon l'application visée. De plus, il est possible d'encapsuler directement une huile d'intérêt médicamenteux comme le cas de la vitamine E dans une capsule de PCL.<sup>110</sup> Il est important d'avoir en tête que souvent ces capsules polymères sont réticulées, et donc figées. C'est pour cette raison que la taille des capsules n'évolue pas malgré la métastabilité de l'émulsion Ouzo. De ce fait, il paraît important de contrôler la durée séparant le mélange et

l'immobilisation du système. Par ailleurs, Yan *et al.* ont exploré la zone SFME pour tenter d'élaborer des nanocapsules.<sup>58</sup> Cela peut se révéler utile afin d'utiliser d'autres gammes de concentration du soluté hydrophobe à encapsuler. En effet, comme nous le montre la zone f de la Figure 36, l'aire exploitable où les nanocapsules monodisperses se forment est extrêmement étroite. Il est même possible que la co-nanoprécipitation du polymère et du soluté ne puisse pas se réaliser si la zone Ouzo du soluté et le domaine de précipitation du polymère ne coïncident pas sur le diagramme de phase.<sup>111</sup> Ils ont utilisé les mêmes systèmes que précédemment (hexadécane/acétone/eau et miglyol/acétone/eau) pour comparer les capsules obtenues par SFME et par effet Ouzo, en utilisant un autre glycopolymère PEMM.<sup>58</sup> Cette étude dans la région SFME a démontré la formation de capsules comparables à celles obtenues par effet Ouzo et de taille contrôlée, entre 25 et 180 nm dans le cas du miglyol (Figure 38) et entre 75 et 140 nm pour l'hexadécane (Figure 39). Ils ont constaté les mêmes résultats en remplaçant PEMM par PEEGM. Aussi, comme vu dans la partie I de ce chapitre, les capsules obtenues dans la zone SFME voient leur taille augmenter avec le taux de solvant et rester constante quelle que soit la quantité de soluté (Figure 38). À l'opposé, la taille des capsules à partir des émulsions Ouzo augmente avec la quantité de soluté ajouté (Figure 36).

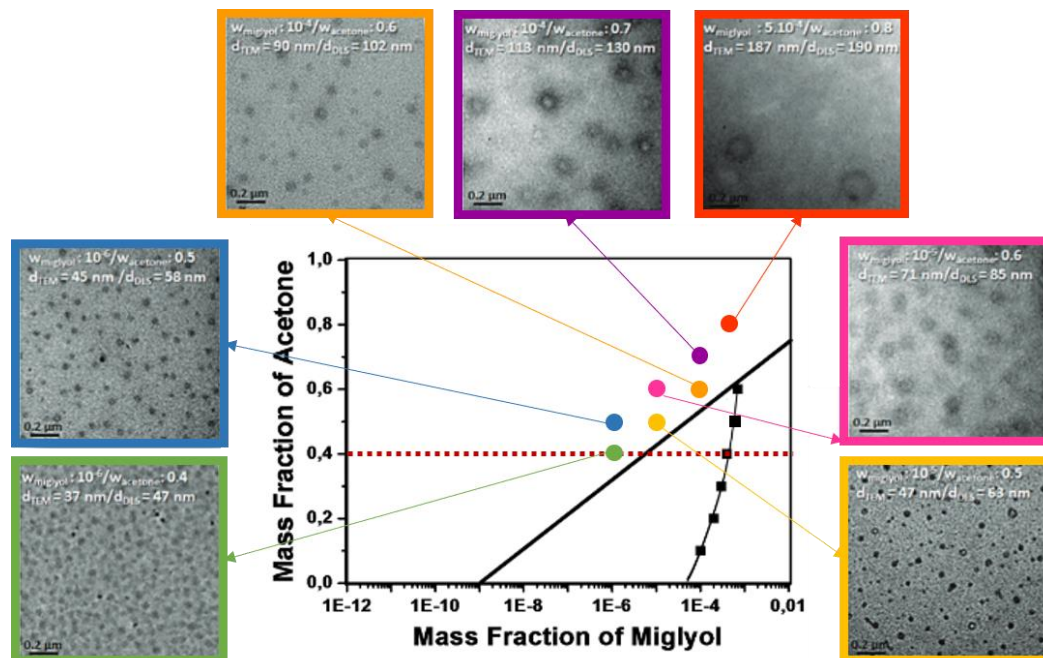


Figure 38 : MET de nanocapsules préparées dans le domaine SFME en co-nanoprécipitant le miglyol et le glycopolymère PEMM. Ligne pointillée rouge : limite du point de trouble du PEMM.<sup>58</sup>



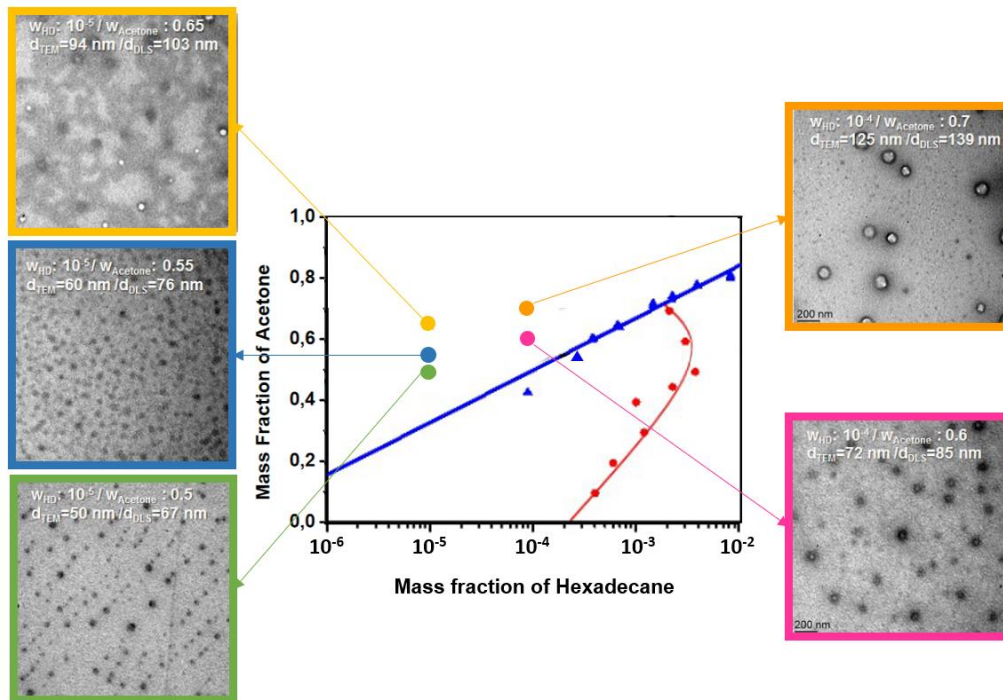


Figure 39 : MET de nanocapsules préparées dans le domaine SFME en co-nanoprécipitant l'hexadécane et le glycopolymère PEMM.<sup>58</sup>

Dans ce système glycopolymère/miglyol/acétone/eau et en utilisant la zone SFME, ils ont encapsulé cette fois un principe actif hydrophobe, la camptothécine, aussi solubilisé au préalable dans le solvant organique.<sup>58</sup>

Comme nous l'avons vu précédemment, le domaine SFME produit des nanogouttelettes thermodynamiquement stables n'évoluant pas au cours du temps, à la différence de celles obtenues par effet Ouzo qui sont métastables. Par conséquent, la taille des capsules après réticulation du polymère correspond à celles des gouttes du SFME, comme le démontre la Figure 40.

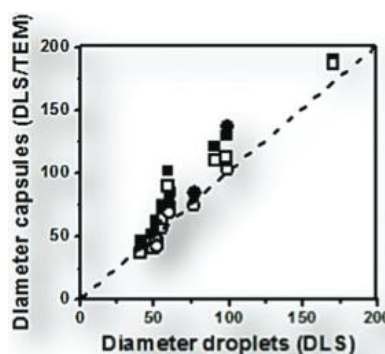


Figure 40 : Diamètres obtenus par MET (symboles vides) et par DLS (symboles pleins) des capsules élaborées avec le PEMM (■) ou le PEEGM (●) en fonction du diamètre initial des gouttes obtenues dans le SFME, pour le système Miglyol/acétone/eau. La ligne en pointillé représente la corrélation entre ces deux tailles (capsules et gouttes).<sup>58</sup>

Il est alors possible de contrôler les tailles finales des capsules en se positionnant dans le domaine SFME du diagramme de phase. Cependant, pour une fraction de solvant donnée, les capsules élaborées à partir du SFME contiennent moins de soluté hydrophobe dans le cœur, en comparaison à celles du domaine Ouzo.

Jusqu'à maintenant, nous avons discuté des capsules hydrophiles se composant d'un seul type de polymère. Pour aller plus loin, ces capsules polymères peuvent aussi se composer de plusieurs polymères en une ou plusieurs couches. Par exemple, des capsules composées de différentes couches de polymère peuvent être obtenues en co-nanoprécipitant différents polymères par nanoprécipitation séquentielle (vue dans la partie I de ce chapitre).<sup>112,113</sup> Pour la nanoprécipitation simultanée, les polymères sont mélangés en même temps pour faire co-précipiter en une seule étape, permettant d'obtenir une couche mixte de polymères. La Figure 41 résume ces deux mécanismes.

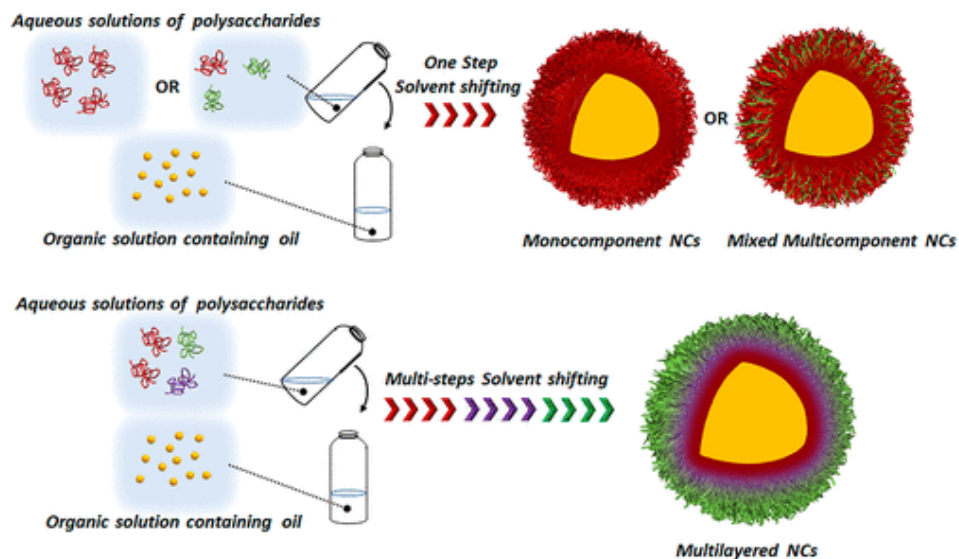


Figure 41 : Illustration schématique de nanocapsules monocouches avec une ou 2 sortes de polymères par nanoprécipitation simultanée (en haut) et de nanocapsules multicouches par nanoprécipitation séquentielle (en bas).<sup>112</sup>

Par exemple, Yan *et al.* ont réussi à élaborer des capsules mixtes et des multicouches (bicouches et tricouches) par nanoprécipitation séquentielle en ajoutant successivement le solvant organique (acétone ici) pour faire précipiter à différentes étapes chaque polymère (Figure 42A, B et C).<sup>112,113</sup> En effet, ces différents polymères ne précipitent pas aux mêmes fractions d'acétone. Dans la Figure 42A, ils prouvent la déposition de la seconde couche en ajoutant de l'avidine qui a une grande affinité pour la biotine (biomarqueur) contenue dans la première couche de la capsule. Quand l'avidine est ajoutée en présence seulement de cette première couche, les nanocapsules s'agrègent entre elles. Alors qu'aucune agrégation n'est observée après la seconde nanoprécipitation du pullulan (PUL1) qui ne présente aucune affinité pour l'avidine. Dans la Figure 42B, ils observent les images MET des nanocapsules après l'ajout des différentes couches et constatent que l'épaisseur de la coque augmente après chaque étape de nanoprécipitation en ajoutant successivement l'acétone. Par ailleurs, en fabriquant ces nanocapsules avec plusieurs couches de polymère, ils démontrent un contrôle du relargage d'un principe actif encapsulé (Figure 42D). Plus il y a de couches successives, moins le principe actif est relargué en dehors des capsules dans le temps. Ceci évite alors le relargage prématuré et en grande quantité du médicament.

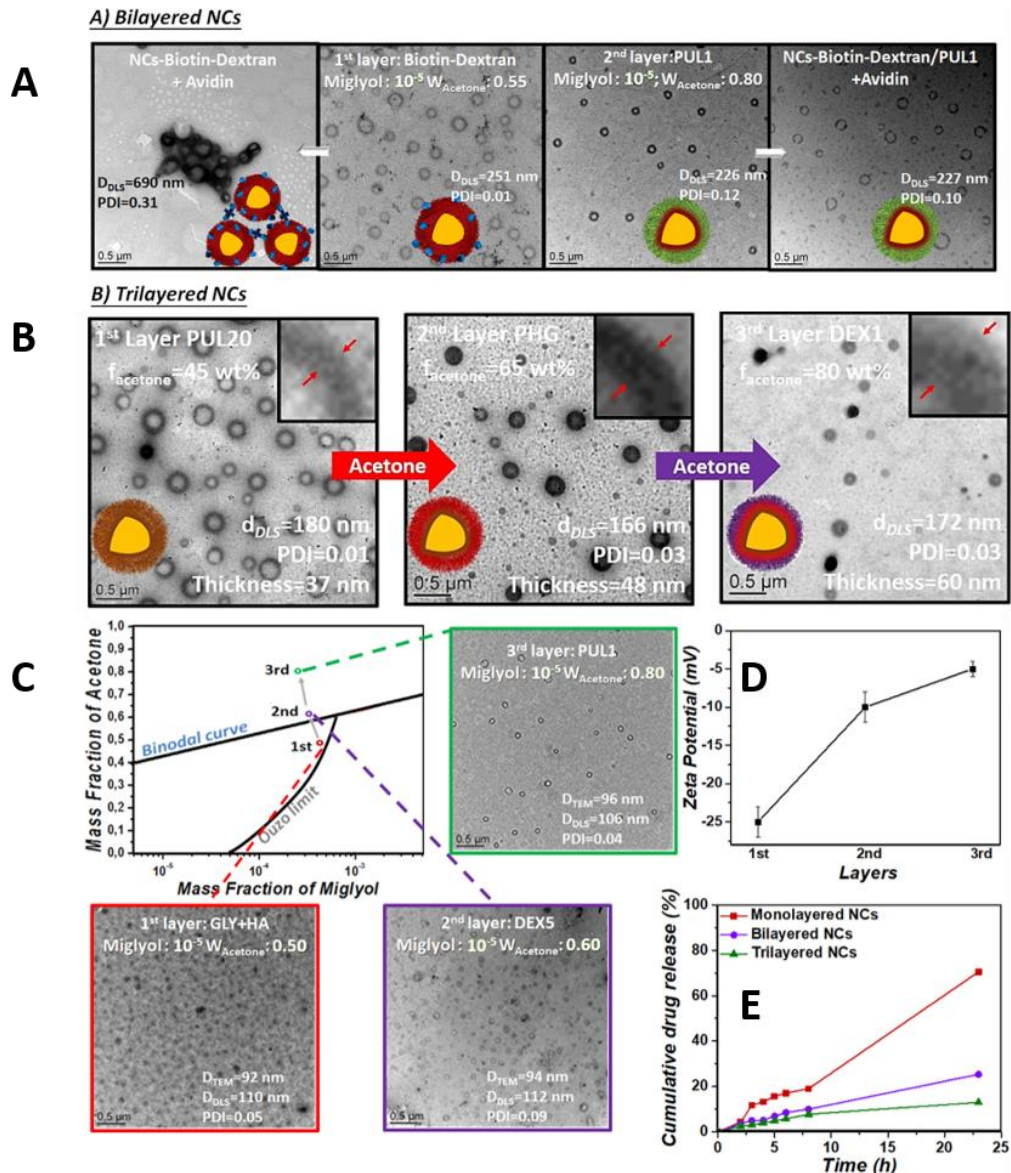


Figure 42 : Nanocapsules multicouches par nanopréciipitation séquentielle. (A) Images MET de nanocapsules à base de dextran fonctionnalisées à la biotine (centre gauche), et des nanocapsules avec une bicouche à base de dextran/PUL2 fonctionnalisées à la biotine (centre droit), et mélanges avidine/nanocapsules (images latérales). L'ajout d'avidine qui a une haute affinité pour la biotine entraîne la formation d'agrégats des nanocapsules. (B) Images MET de nanocapsules tricouches ; l'enveloppe polymère de la couche intérieure à la couche extérieure est composée de pullulan, de PHG (glycopolymères à base de PHMM) et de dextran ; insert en haut à droite : images zoomées (10x) de l'enveloppe polymère. (C) Chemin de nanopréciipitation vers des nanocapsules multicouches (en haut à gauche), images MET de nanocapsules mixtes glycogène-HA, en bicouche à base de glycogène-HA/DEX2, et en tricouche à base de glycogène-HA/dextran(5K)/pullulan(1K). (D) Potentiel zêta et (E) cinétique de libération du médicament (camphothécine) en fonction du nombre de couches de polysaccharides.<sup>112,113</sup>

Souvent, une nanocapsule est définie comme présentant une structure cœur/coquille avec un cœur huileux, et une multitude de systèmes a déjà été répertoriée dans la littérature.<sup>40,114</sup> Cependant, il existe aussi des structures cœur/coquille avec un cœur solide.<sup>115</sup> Par exemple, Chambon *et al.* ont élaboré des nanoparticules cœur/coquille à base de polymères semi-conducteurs tels que le poly(3-hexylthiophène) (P3HT) et le [6,6]-phényl-C<sub>61</sub>-butanoate de méthyle (PCBM), présentant une taille comprise entre 77 et 85 nm.<sup>116</sup> En premier lieu, les deux polymères sont solubilisés dans le THF, puis l'ajout de DMSO fait

nanoprécipiter le cœur de P3HT en premier. Enfin l'ajout d'eau fait nanoprécipiter la coquille de PCBM (Figure 43).

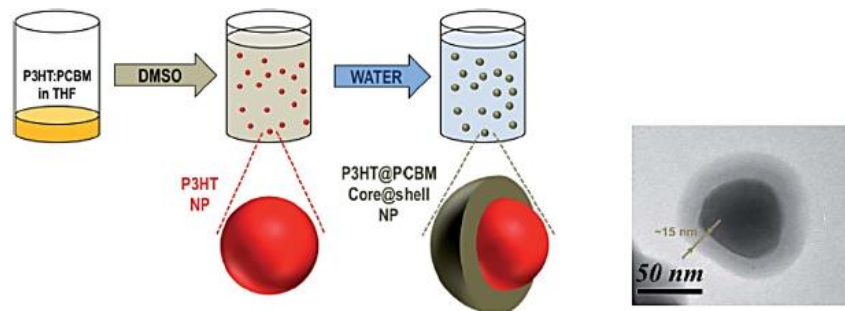


Figure 43 : Illustration schématique de la préparation des nanoparticules semiconductrices de structure cœur/coquille par nanoprécipitation séquentielle (à gauche) et l'image MET de la capsule obtenue (à droite).<sup>116</sup>

Liu, Zhao *et al.* ont quant à eux cherché à faire nanoprécipiter un cœur de médicament entouré d'une coquille de polymère en utilisant la méthode de la nanoprécipitation séquentielle que nous avons abordé dans la partie I de ce chapitre.<sup>83</sup> Pour ce faire, ils ont utilisé un mélange de trois solvants (DMSO, DMF et éthanol) pour solubiliser puis nanoprécipiter des médicaments hydrophobes (curcumine, paclitaxel, ibuprofène, docétaxel, et amphotéricine B) ainsi que des polymères biocompatibles (PLGA, PLGA-b-PEG, etc.). Ils ont constaté que les nanoparticules cœur/coquille ainsi formées sont stables, avec un diamètre autour de 50 nm avec une capacité de charge pouvant aller jusqu'à environ 50 % (fraction massique). En outre, la microfluidique est une méthode souvent utilisée pour fabriquer des structures cœur/coquille par nanoprécipitation séquentielle ultrarapide. Ainsi, il a été possible d'élaborer un cœur médicamenteux (des anticancéreux tels que le paclitaxel et le sorafénib, ou encore la curcumine) entouré d'une enveloppe polymère grâce au dispositif microfluidique.<sup>85,117</sup>

## II.2 Capsules de nanoparticules inorganiques

D'autres types de capsules contenant des nanoparticules inorganiques dans leur paroi peuvent être fabriqués à partir de l'effet Ouzo. Cependant, il en existe moins dans la littérature que les capsules à base de polymère. Les nanoparticules inorganiques trouvent leur intérêt dans les nanocapsules du fait de leurs nombreuses propriétés. Elles sont utiles dans diverses applications, notamment l'imagerie ou encore la radiothérapie dans le domaine biomédical par exemple. Ces propriétés seront plus discutées dans la partie III de ce chapitre.

Shen *et al.* ont élaboré une nanocapsule avec un noyau à base d'un médicament anticancéreux, le paclitaxel (PTX), et d'une coque du complexe acide tannique (TA) - Fe (III).<sup>118</sup> Comme le montre la Figure 44a, ils ont d'abord nanoprécipité le paclitaxel par l'ajout de l'eau à la solution organique (éthanol). Ensuite la solution aqueuse contenant le TA et le Fe (III) a été ajoutée pour former ces nanoparticules cœur/coquille. Les ions TA et le Fe (III) se complexent fortement et s'assemblent à l'interface pour former un réseau sur la nanoparticule de paclitaxel, se traduisant par l'apparition immédiate d'une solution bleue après le mélange. Les nanoparticules de complexe PTX@TA-Fe(III) présentent une distribution de taille étroite autour de 100 nm comme le montre la mesure DLS et les images MET (Figure 44b à d). Cette enveloppe inhibe le mûrissement d'Ostwald des nanoparticules et ralentit,

voire stoppe, leur croissance. De plus, ils obtiennent une forte charge médicamenteuse dans leurs capsules inorganiques. Ils ont démontré que leurs objets s'accumulent plus facilement dans les tumeurs, ce qui augmente l'activité antitumorale par rapport à la formulation commerciale (Taxol®).

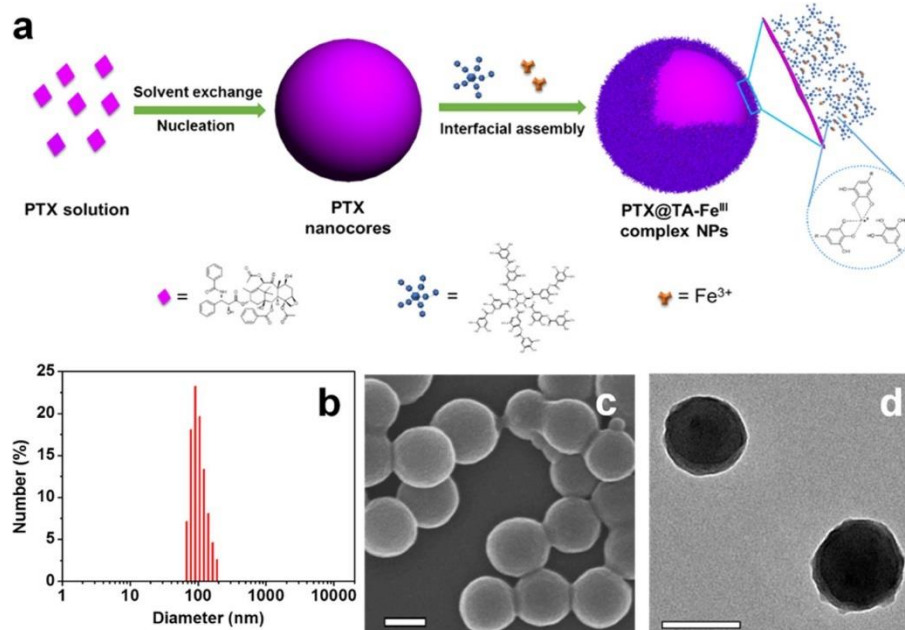


Figure 44 : Illustration schématique et morphologie des NP complexes. (a) Procédure générale pour la fabrication de nanoparticules complexes de PTX@TA-Fe(III). (b) Distribution de taille des nanoparticules de complexe PTX@TA-Fe(III) mesurée par DLS. La morphologie des nanoparticules du complexe PTX@TA-Fe(III) a été caractérisée par MEB (c) et MET (d). Les barres d'échelle sont de 100 nm.<sup>118</sup>

Les nanocapsules de Silice mésoporeuse (MSN) présentent des propriétés intéressantes parmi lesquelles une grande surface spécifique, une porosité uniforme et élevée dont le diamètre des pores peut être contrôlé, ainsi qu'une biocompatibilité pour les applications biomédicales et la délivrance de médicaments.<sup>119</sup> Vu *et al.* ont élaboré des nanocapsules de silice en nanoprécipitant un cœur de polystyrène (PS), lui-même entouré du tensioactif Bromure de cétrimonium (CTAB), servant de « template » pour la capsule de silice (Figure 45).<sup>120</sup> Ensuite, le cœur de polystyrène est extrait du composite PS@SiO<sub>2</sub> avec le solvant THF pour le PS et l'éthanol pour le CTAB. Ils obtiennent alors des capsules de silice creuses.

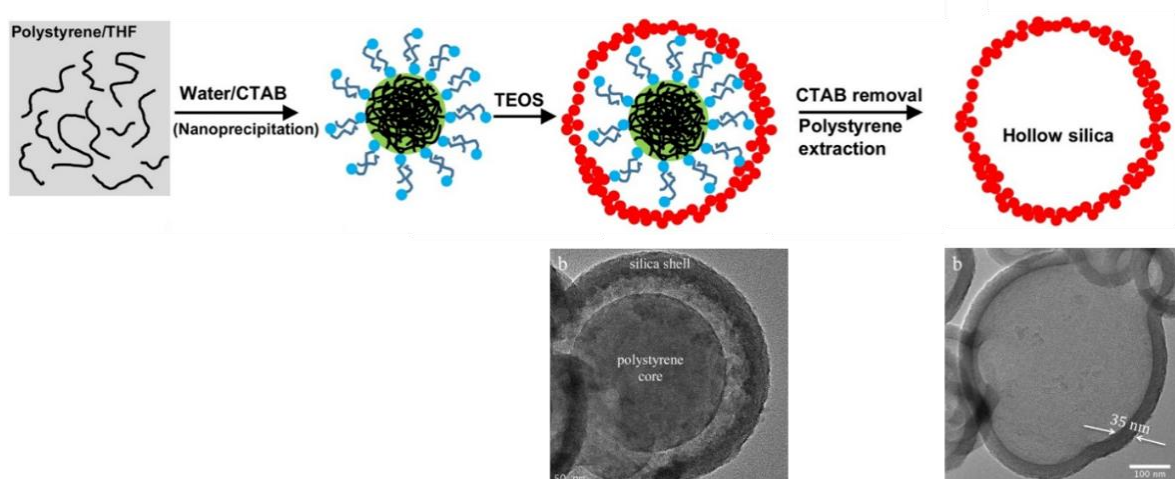


Figure 45 : Illustration schématique de la fabrication de nanocapsules de silice creuses par nanopréciipitation du polystyrène-CTAB. Les images Met correspondant aux structures schématisées sont ajoutées en bas de la figure.<sup>120</sup>

## II.3 Capsules hybrides : à partir de polymères et de nanoparticules inorganiques

### II.3.a Les Hybridosomes®

Dans notre équipe à l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes (ISCR), nous formons des nanocapsules appelées Hybridosomes® (H®) associant nanoparticules inorganiques et polymère organique dans la coque. Ce projet a débuté par la synthèse des nanoparticules à travers la thèse de Gérald Casterou (2012-2015), par l'assemblage de celles-ci en Hybridosomes® durant la thèse de Flavien Sciortino (2014-2017), puis celle de Clément Goubault (2017-2020).

Le procédé de fabrication (breveté en 2015) est résumé dans la Figure 46.<sup>121</sup> Celui-ci consiste à préparer dans un seul réacteur un mélange HydroxyToluène Butylé (BHT)/eau/THF/nanoparticule (NP). Le BHT est un anti-radicalaire contenu initialement dans la solution commerciale de tétrahydrofurane. Ainsi, grâce à l'effet Ouzo, une suspension de nano-gouttelettes riches en BHT, ayant le rôle de soluté hydrophobe, se forme spontanément dans la phase continue. Les nanoparticules hydrophobes, initialement solubilisées dans le THF, s'adsorbent à la surface des nano-gouttelettes pour les stabiliser. Puis l'ajout de polymère hydrophile (poly(acide acrylique), PAA, ou copolymère à bloc poly(éthylène glycol)-*b*-poly(acide acrylique), PEG-PAA) vient renforcer la coquille de nanoparticules, par échange entre les ligands des NPs et les polymères. Enfin, le THF encore présent dans les gouttes et la phase continue est évaporé lentement, permettant d'obtenir une capsule contenant le BHT nanopréciipité. Il est aussi possible de retirer le solvant organique de la suspension par dialyse.

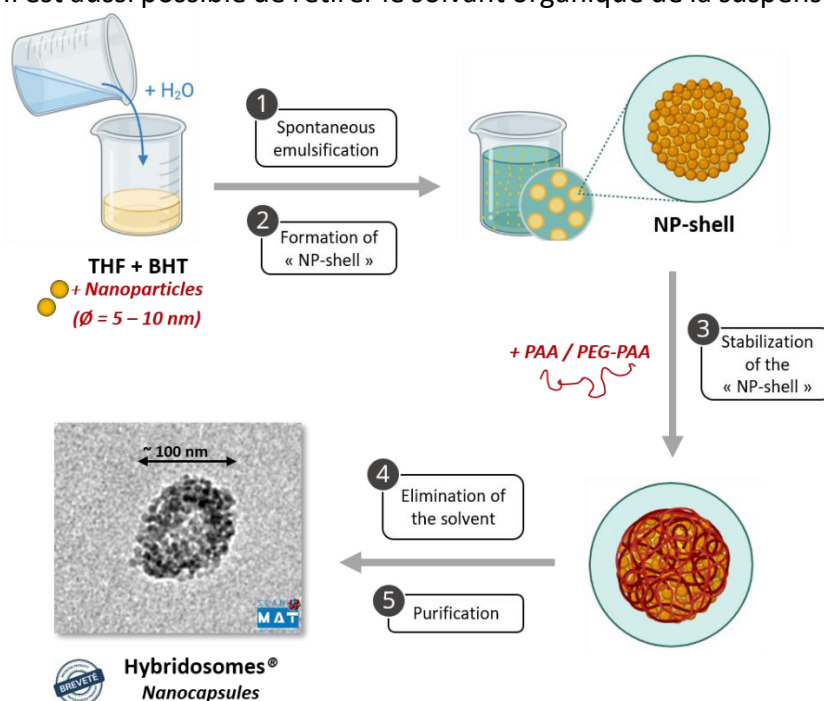


Figure 46 : Illustration schématique du procédé de fabrication des H® et observations MET d'un H® entouré de nanoparticules d'oxyde de fer (SPION, diamètre =  $5,5 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ ,  $[\text{Fe}] = 12,5 \mu\text{g/mL}$ ) réticulées avec du PAA.<sup>122</sup>

Les H<sup>®</sup> possèdent ainsi une paroi composée de NP hydrophobes d'environ 5-10 nm de diamètre (nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques : SPION ; nanoparticules d'or : Au ; Quantum dots : QD ; etc.) et de polymère (PAA, PEG-PAA, etc.). Leur distribution de taille est étroite et la taille moyenne est typiquement de 100 nm de diamètre. L'épaisseur de la coque équivaut au diamètre des nanoparticules adsorbées à la surface de la goutte, ce qui correspond à une seule couche de nanoparticules inorganiques (Figure 47a). La Figure 47b permet de mettre en évidence le dépôt de la couche de nanoparticules à la surface des gouttes comme un « template ». <sup>121</sup> Par ailleurs, leur taille peut être modulée entre 80 et 100 nm en ajustant la quantité de nanoparticules. <sup>123</sup> De plus, ces objets ont une très bonne stabilité dans l'eau (pH neutre) pouvant aller jusqu'à plusieurs mois. En effet, la présence des fonctions carboxyliques chargées négativement (carboxylates) de l'acide acrylique constituant les polymères PAA et PEG-PAA permettent de stabiliser les H<sup>®</sup> par répulsions électrostatiques. Ce procédé présente beaucoup d'avantages comme la reproductibilité, la simplicité et la rapidité.

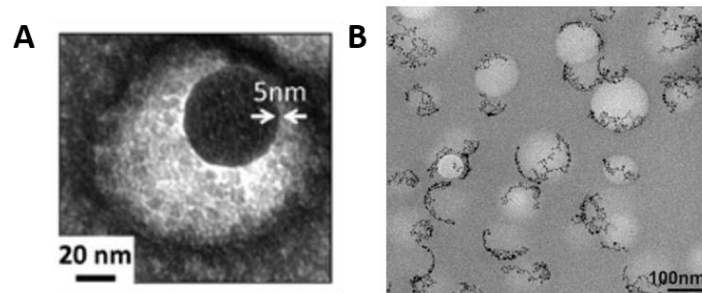


Figure 47 : (A) Observation MET avec coloration négative d'un Hybridosome<sup>®</sup> dont la coque est rompue ([PAA] = 450 000 g.mol<sup>-1</sup>, [AA] = 2,25 mM; [Fe] = 12,5 µg/mL). <sup>123</sup> (B) Image MET d'assemblages de SPION à faible concentration de nanoparticules et entourés de polymère pour mettre en évidence l'effet template des gouttelettes liquides. [Fe]=5 µg/mL ; polymère : PAA<sub>450k</sub>. Barre d'échelle : 100 nm. <sup>121</sup>

Des expériences de compression osmotique ont permis de montrer que la coque des H<sup>®</sup> présente une certaine porosité permettant un échange entre la phase continue et le cœur des nanocapsules. <sup>123</sup> Pour ce faire, la distribution de taille des H<sup>®</sup> a été étudiée en présence de poly(éthylèneglycol) (PEG) de différents poids moléculaires par NTA. Dans la Figure 48, les PEG plus petits que 4k diffusent à travers la coquille, équilibrant les pressions osmotiques internes et externes, contrairement aux PEG 10k et 20k. Par conséquent, la taille des pores est estimée à environ 2 nm (rayon hydrodynamique, ou 4kDa de PEG).

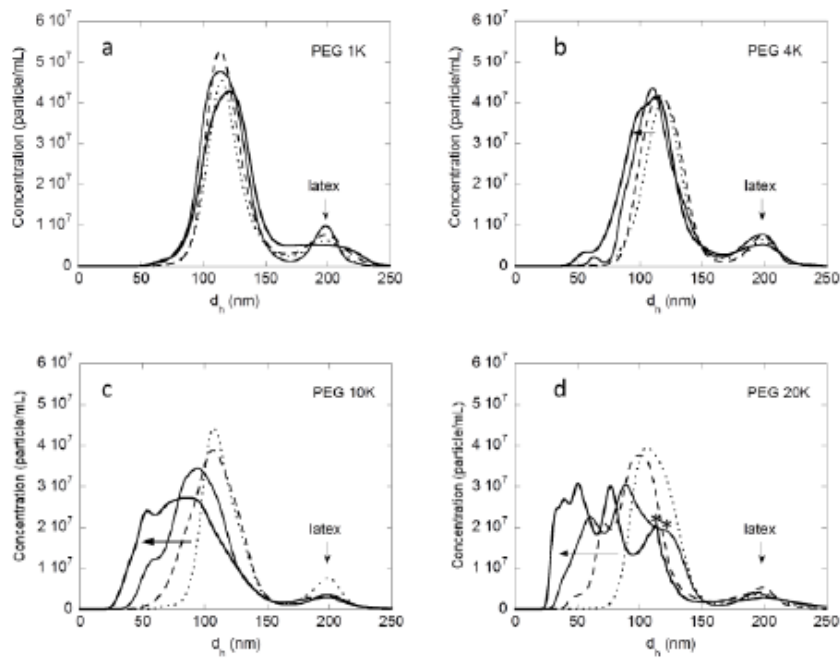


Figure 48 : Mesures de distribution de taille des H<sup>®</sup> dispersés dans des solutions de PEG 1k (a), 4k (b), 10k (c), 20k (d) par NTA pour de la compression osmotique. Un latex de 200 nm a été ajouté à la dispersion pour renormaliser la viscosité. Les symboles (\*) indiquent des H<sup>®</sup> brisés. Les concentrations de PEG sont (· · ·) 15 g.L<sup>-1</sup> ; (- - -) 45 g.L<sup>-1</sup> ; (—) 75 g.L<sup>-1</sup> ; (—) 100 g.L<sup>-1</sup>. H<sup>®</sup> : [Fe]= 25 µg.mL<sup>-1</sup> ; [AA] = 2,25 mM.<sup>123</sup>

En outre, il a été démontré que les H<sup>®</sup> présentent une certaine élasticité (module d'Young de l'ordre du MPa) en mesurant la taille des H<sup>®</sup> sous pression osmotique (par NTA).<sup>123</sup> Dans la Figure 49, les mesures de distribution de taille des H<sup>®</sup> par NTA sous compression osmotique en utilisant du PEG 10k montrent que les H<sup>®</sup> peuvent se comprimer (courbe bleue, se traduisant par une polydispersité) et ensuite revenir à leur taille initiale en éliminant la pression osmotique.

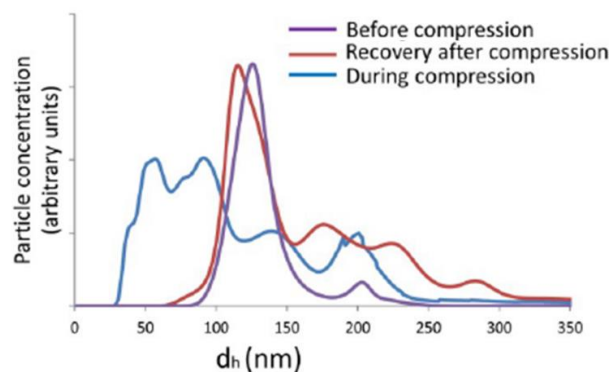


Figure 49 : Distribution de tailles d'H<sup>®</sup> SPION@PAA avant, pendant et après compression osmotique en utilisant un PEG10k (150 g.L<sup>-1</sup>). Pour la récupération après compression, les H<sup>®</sup> ont subi une séparation magnétique et purification/lavage.<sup>123</sup>

Lors de la précédente thèse, les travaux de Clément Goubault ont mis en évidence l'importance des ligands hydrophobes pour élaborer les H<sup>®</sup> par effet Ouzo. Les diagrammes de phase de différents ligands entourant plusieurs types de NP (SPION, QD ou AuNP) ont été établis (Figure 50). Dans cette figure, des domaines Ouzo sont démontrés et localisés pour les divers ligands dans le système THF/eau. L'ensemble des ligands étudiés, sauf l'octylamine (OA), peuvent former des gouttelettes dans les mêmes conditions d'élaboration des H<sup>®</sup>



puisque la zone métastable du BHT dans THF/eau se superpose avec celles des ligands. La présence de ces ligands peut alors favoriser la formation des gouttelettes par effet Ouzo.

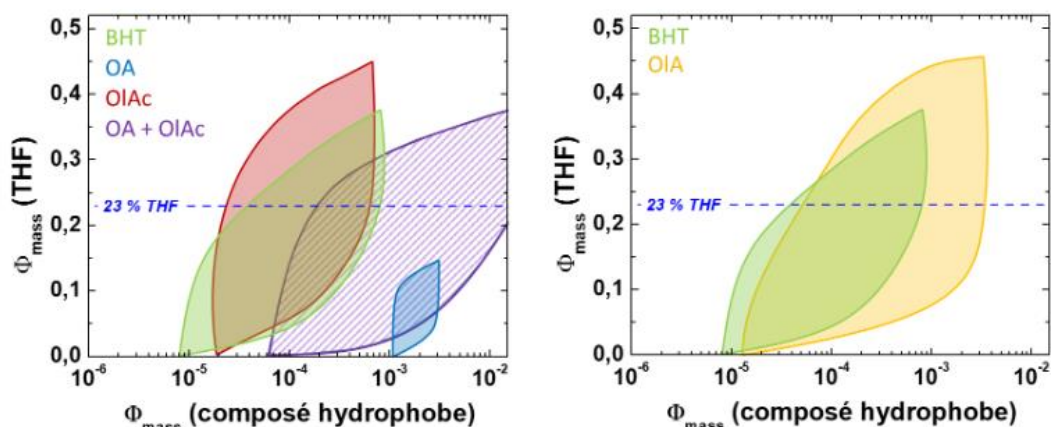


Figure 50 : Localisation du domaine Ouzo des systèmes ligand/THF/eau, avec comme ligands : OA pour octylamine (bleu), OIAc pour acide oléique (rouge), OIA pour l'oléylamine (jaune) et OA+OIAc pour le mélange oléylamine et acide oléique (violet). Gauche : ligands des SPION et QD CdSe/ZnS ; Droite : ligand des AuNP et QD InP/ZnS. Le diagramme de référence du BHT est reporté en vert sur les deux graphes. La ligne pointillée bleue représente les conditions classiques d'élaboration des H<sup>®</sup> en termes de concentration d'eau et de THF pour l'effet Ouzo. (Figure reprise de la thèse de Clément Goubault).

Par ailleurs, selon les nanoparticules utilisées pour fabriquer la coque des H<sup>®</sup> (Figure 51), il est possible de moduler les propriétés et donc les applications visées.

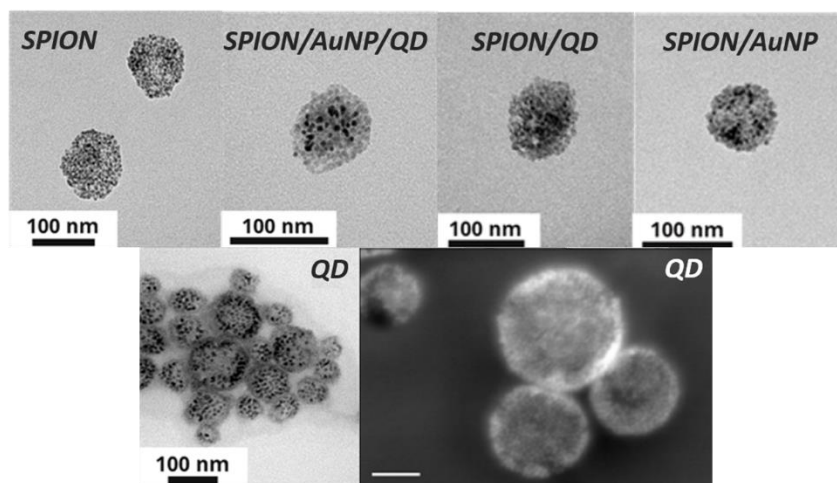


Figure 51 : Images MET ou MEB (pour le QD au centre en bas) d'Hybridosomes<sup>®</sup> à partir de diverses nanoparticules (SPION ; QD pour Quantum dots) et de différentes associations (SPION/AuNP/QD ; SPION/QD ; SPION/AuNP) au niveau de la coque.<sup>121</sup>

Les H<sup>®</sup> peuvent être utilisés en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) si nous utilisons des oxydes de fer (SPION) comme nanoparticules.<sup>121</sup> Les relaxivités transversales  $r_2$  des H<sup>®</sup> magnétiques ont été mesurées *in vitro* en solution dans le PBS (Phosphate buffered saline), allant  $274 \pm 35 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $285 \pm 37 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $257 \pm 15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour les hybrides SPION stabilisés par PAA, SPION stabilisés par PEG-PAA, et SPION/AuNP stabilisés par PAA, respectivement. Elles sont comparables à celles de l'agent de contraste commercial pour l'imagerie préclinique Feraspin<sup>™</sup> dans les mêmes conditions en *in vitro* ( $r_2 = 307 \pm 80 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Le choix du polymère n'a pas d'effet significatif sur le résultat et les H<sup>®</sup> AuNP/SPION présentent un couplage magnétique moins important que dans le cas de l'utilisation des SPION seules. La capacité

d'imagerie par résonance magnétique a aussi été évaluée *in vivo* sur un modèle murin (Figure 52). Les images par résonance magnétique montrent une extinction significative du signal hépatique après injection intraveineuse rétro-orbitaire des H<sup>®</sup> SPION@PAA (Figure 52A encadré rouge haut), SPION@PEG-PAA (Figure 52A encadré rouge bas) ou SPION/AuNP@PAA (Figure 52B encadrés rouge & vert en haut à droite). Ceci prouve aussi la prise en charge des H<sup>®</sup> par les macrophages après injection et leur transfert vers le foie. Dans la Figure 52B, le contraste négatif en IRM procure une meilleure détection des tumeurs non vascularisées. Par ailleurs, les H<sup>®</sup> (avec SPION ou SPION/AuNP et stabilisés par PAA ou PEG-PAA) ne montrent aucune (SPION), ou une très légère (SPION/AuNP) cytotoxicité sur les cellules HEK après 48 h d'exposition à une concentration élevée en métaux (Figure 53).

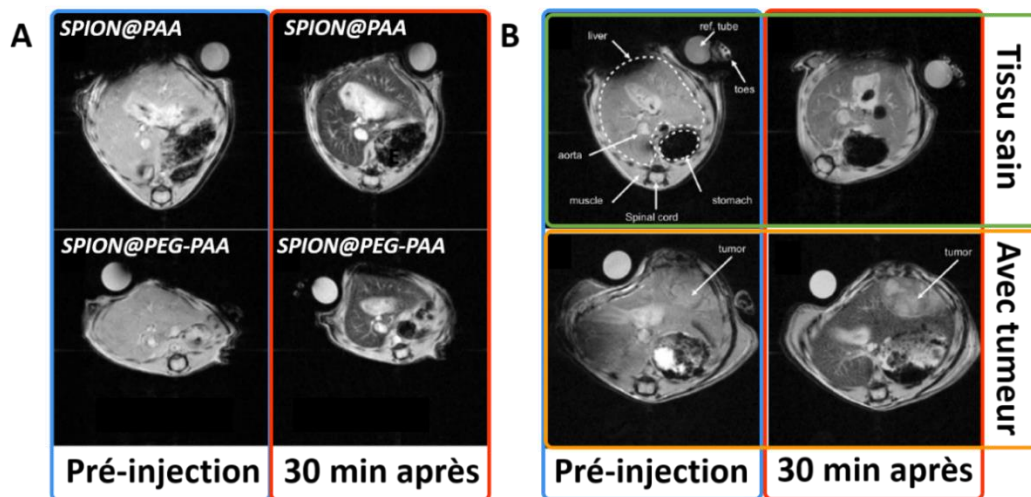


Figure 52 : Images par résonance magnétique pondérée en T2\* dans le modèle murin. (A) Images de souris saines auxquelles des H<sup>®</sup> SPION@PAA (deux images du haut) ou SPION@PEG-PAA (deux images du bas) ont été injectés dans la veine rétro-orbitaire et acquises avant injection (images entourées en bleu) et à 30 min après l'injection (images entourées en rouge), montrant une nette extinction du foie. (B) Images d'une souris saine (entourées en vert) et portant une tumeur du foie (entourée en orange), acquises avant (entourées en bleu) et à 30 min (entourées en rouge) après l'injection des H<sup>®</sup> SPION/AuNP (0,5 à 0,9 mg.kg<sup>-1</sup>) dans la veine rétro-orbitaire, mettant en évidence la tumeur par différence de contraste.<sup>121</sup>

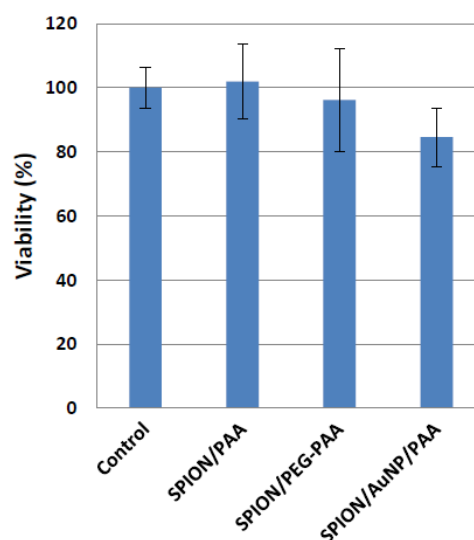


Figure 53 : Viabilité des cellules HEK après incubation 48h avec les H<sup>®</sup> SPION ([Fe] = 100 µg / 10<sup>6</sup> cellules) ou les H<sup>®</sup> SPION/AuNP ([Fe] = [Au] = 100 µg / 10<sup>6</sup> cellules) utilisés comme agents de contraste pour l'IRM.<sup>121</sup>

L'enveloppe souple et déformable des H<sup>®</sup> explique leurs propriétés mécaniques exceptionnelles, telles que la stabilité à long terme, la facilité de déformation et la récupération de la forme. Cela pourrait permettre de résister à la pression osmotique élevée régnant dans les vaisseaux sanguins et de se faufiler dans les petits capillaires. Par ailleurs, les H<sup>®</sup> possèdent un cœur pouvant internaliser des molécules hydrophobes d'intérêt. La taille des Hybridosomes<sup>®</sup> et les propriétés de leur enveloppe peuvent être ajustées en faisant varier leur composition. De plus, l'évaporation du solvant dans ce processus est un plus pour les applications biologiques qui cherchent à s'en affranchir à cause de leur toxicité. La Figure 54 résume les propriétés de ces nanocapsules hybrides et polyvalentes. D'autres applications ont été explorées pour les H<sup>®</sup> comme la catalyse en utilisant des clusters de molybdène<sup>124</sup>, ou encore la délivrance stimulée de contenu actif grâce à la conception par chimie électro-click de films d'H<sup>®</sup> qui sont sensibles au pH ou à un stimulus électrochimique.<sup>122</sup>

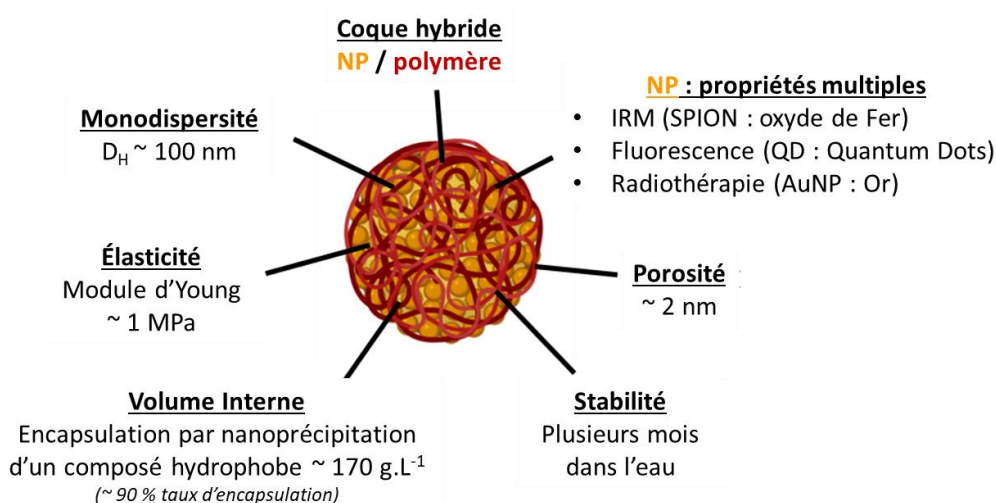


Figure 54 : Présentation des différentes propriétés physico-chimiques des Hybridosomes<sup>®</sup>.

Pour conclure, ces diverses caractéristiques peuvent nous permettre d'envisager une multitude d'applications dont une qui nous paraît évidente et qui est abordée au cours de cette thèse : l'encapsulation de médicaments pour la chimiothérapie et l'utilisation de nanoparticules radiosensibilisantes pour la radiothérapie.

### II.3.b Les autres capsules hybrides

Dans la littérature, d'autres capsules hybrides ont été élaborées comme dans les travaux de Yan, Ganachaud *et al.* Ils ont modifié la surface de capsules de polymère en greffant des nanoparticules inorganiques possédant des propriétés recherchées selon l'application qu'ils visaient (Figure 55).<sup>51</sup> Dans le système hexadécane/acétone/eau, ils ont démontré que l'incorporation initiale de nanoparticules d'or (AuNP) fonctionnalisées par du dodécane-thiol ou d'oxyde de fer (SPION) dans la phase organique conduit à la préparation de nanocapsules glycopolymères avec quelques NP greffées à la surface (Figure 56). Dans leur système miglyol/acétone/eau, ils ont aussi réussi à greffer des nanoparticules de cobalt (CoNP, fonctions amines) par réaction d'ouverture de cycle époxyde-amine à la surface de la capsule d'un type ou plus (Figure 57A) de glycopolymère (cycle époxyde) pour des applications antibactériennes par exemple.<sup>113</sup> Les bactéries *E. coli* agglutinées sur les capsules peuvent être

extraites efficacement de la solution par séparation magnétique grâce aux propriétés magnétiques des CoNP (Figure 57B).<sup>125</sup>

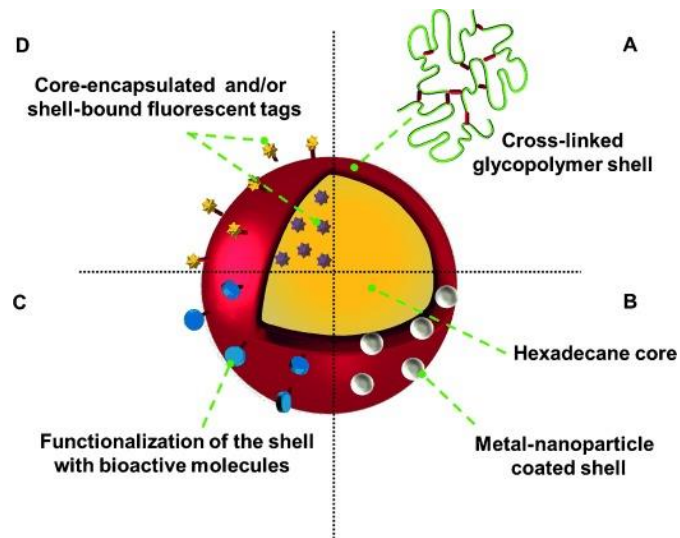


Figure 55 : Illustration schématique de la capsule de glycopolymère possédant des modifications à la surface pour apporter de nouvelles propriétés, dont la zone B possède des nanoparticules inorganiques dans la coque.<sup>51</sup>

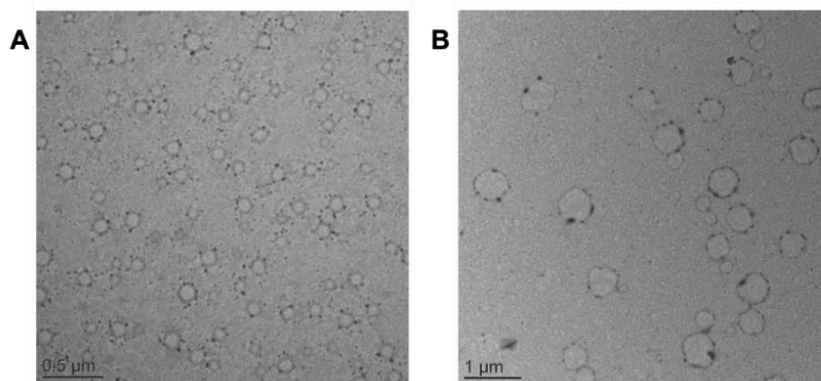


Figure 56 : Nanocapsules hybrides à partir d'une coque de glycopolymère et de l'incorporation de nanoparticules (A) d'AuNP et (B) de SPION.<sup>51</sup>

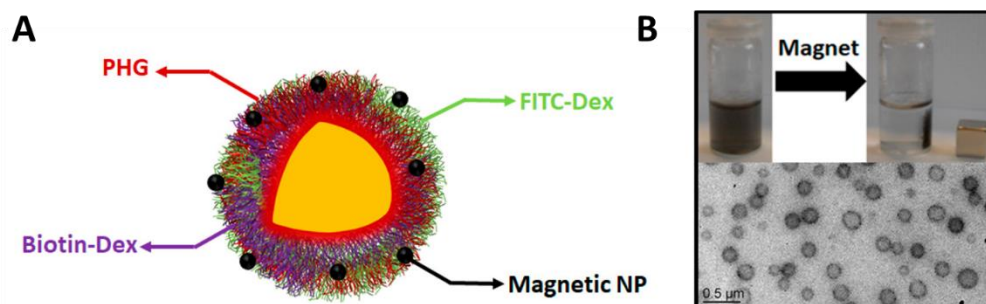


Figure 57 : (A) Illustration schématique des nanocapsules hybrides comprenant des polymères mixtes FITC-DEX/biotine-Dex/PHG et des nanoparticules magnétiques CoNP. (B) image MET des nanocapsules sensibles au magnétisme (bas) et une photo de leur séparation de la phase aqueuse sous l'effet du magnétisme (haut).<sup>113</sup>

### III Encapsulation de principes actifs dans des nanocapsules

Les médicaments (particulièrement anticancéreux) sont souvent peu solubles dans l'eau. C'est pourquoi une grande diversité de vecteurs d'administration a été développée pour améliorer leur biodisponibilité.<sup>118</sup> L'émergence des nanocapsules connaît un franc succès car elles possèdent une grande charge médicamenteuse.

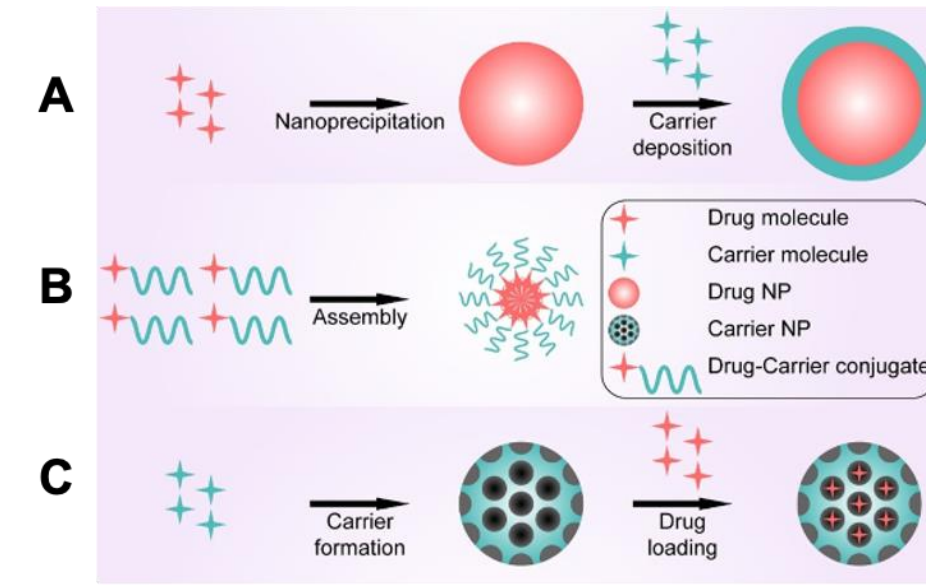
Dans la littérature, les capsules de polymères sont souvent utilisées pour l'encapsulation de principes actifs, et ceci pour de nombreuses raisons : propriétés de libération contrôlée et prolongée, biocompatibilité avec les cellules et les tissus, et biodégradabilité.<sup>126</sup> Dans cette partie, nous discuterons de la méthode d'encapsulation de molécules hydrophobes dans les H<sup>®</sup>, puisque l'encapsulation de principes actifs fait l'objet de cette thèse et sera démontrée dans le chapitre 3. Par ailleurs, notre méthode d'encapsulation sera comparée à d'autres processus plus communs dans la littérature, et ne faisant pas appel à l'effet Ouzo tels que les liposomes ou les coques de silice par exemple.

#### III.1 Les différentes stratégies pour encapsuler les médicaments

Il existe de nombreuses revues qui décrivent les différentes stratégies pour encapsuler les médicaments. Liu *et al.* ont classé les différents vecteurs selon le mode de chargement du principe actif (Figure 58).<sup>90</sup> Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons les vecteurs qui encapsulent les principes actifs par famille, et non par stratégie d'encapsulation afin de simplifier la lecture. Cependant, il est important de garder à l'esprit qu'il existe les trois stratégies suivantes :<sup>90</sup>

- Pré-formation de la nanoparticule de médicament avant élaboration de l'enveloppe, privilégiant des structures cœur/coquille avec une charge médicamenteuse élevée selon l'épaisseur de la coque (Figure 58A). Souvent, les polymères constituent l'enveloppe en raison de leur biocompatibilité, biodégradabilité et de la possibilité de les fonctionnaliser (libération contrôlée, ciblage thérapeutique, suivi de la biodistribution, etc.), mais nous avons vu dans la partie précédente qu'il était aussi possible de trouver des capsules hybrides dont nos matériaux Hybridosomes<sup>®</sup>.
- Formation du vecteur en même temps que l'encapsulation du médicament (Figure 58B). On trouve des systèmes conjugués entre un polymère et un médicament, ou encore des nanoparticules amphiphiles en conjuguant un médicament hydrophile et un autre hydrophobe (co-chargement de médicaments). Dans ce dernier cas, le taux de chargement peut donc atteindre 100%.
- Post-encapsulation du médicament dans le vecteur (Figure 58C). Dans ce cas, le support est d'abord fabriqué, puis le médicament est encapsulé avec une forte charge médicamenteuse. Pour cette stratégie, il paraît évident que les vecteurs doivent avoir une structure poreuse pour que le principe actif y pénètre. C'est le cas des nanoparticules de silice connue pour leur structure mésoporeuse, des nanoparticules de carbones, ou encore d'autres nanoparticules inorganiques (SPION, MOF pour « metal-organic framework », etc.). Ces matériaux offrent une grande surface exploitable, une porosité contrôlable (taille et volume), et peuvent être fonctionnalisés à leur surface. Il existe aussi des supports non poreux entrant dans cette catégorie de post-chargement en usant d'interactions hydrophobes non covalentes, d'attractions

électrostatiques, de liaisons hydrogènes et d'empilement  $\pi$ - $\pi$ . C'est le cas de nanoparticules de protéines ou de polypeptides.



### III.2 Les Hybridosomes®

Dans cette partie, nous discutons du procédé d'encapsulation dans les H® comme preuve de concept.

Au début de l'étude de conception des H®, notre équipe n'avait pas idée que l'effet Ouzo était le phénomène qui régissait la formation de ces capsules sphériques enrobées de nanoparticules. Il se trouve qu'initialement, le procédé mentionnait le mélange THF/eau. Par la suite, l'équipe a compris que l'antioxydant BHT présent en infime quantité (1,28 mM dans le THF) jouait un rôle crucial dans l'existence de ces structures, en se basant sur les travaux de Sedlák *et al.* qui avaient déjà étudié de telles structures dans une large gamme de solutés et de solvant.<sup>127-129</sup> Ainsi, l'encapsulation de BHT a déjà été réalisée dans les premiers travaux sur les H® (thèses de Flavien Sciortino et Clément Goubault). Un premier article a démontré et quantifié l'encapsulation de BODIPY, un fluorophore (Figure 59), dans des H® de SPION.<sup>121</sup> Le BODIPY hydrophobe a d'abord été solubilisé dans le THF dans la première étape du processus d'élaboration. Après séparation magnétique, les H® se trouvaient dans le culot (comme nous l'avons déjà vu dans la partie précédente de ce chapitre) tandis que le surnageant ne contenait que la solution aqueuse. Grâce à la spectroscopie UV et de fluorescence, ils ont constaté que le fluorophore était bien à l'intérieur des nanocapsules hybrides monodisperses (Figure 59E) puisque le spectre du culot montrait bien la signature du BODIPY, qui fluoresce différemment à l'état dissous et à l'état agrégé (Figure 59D).

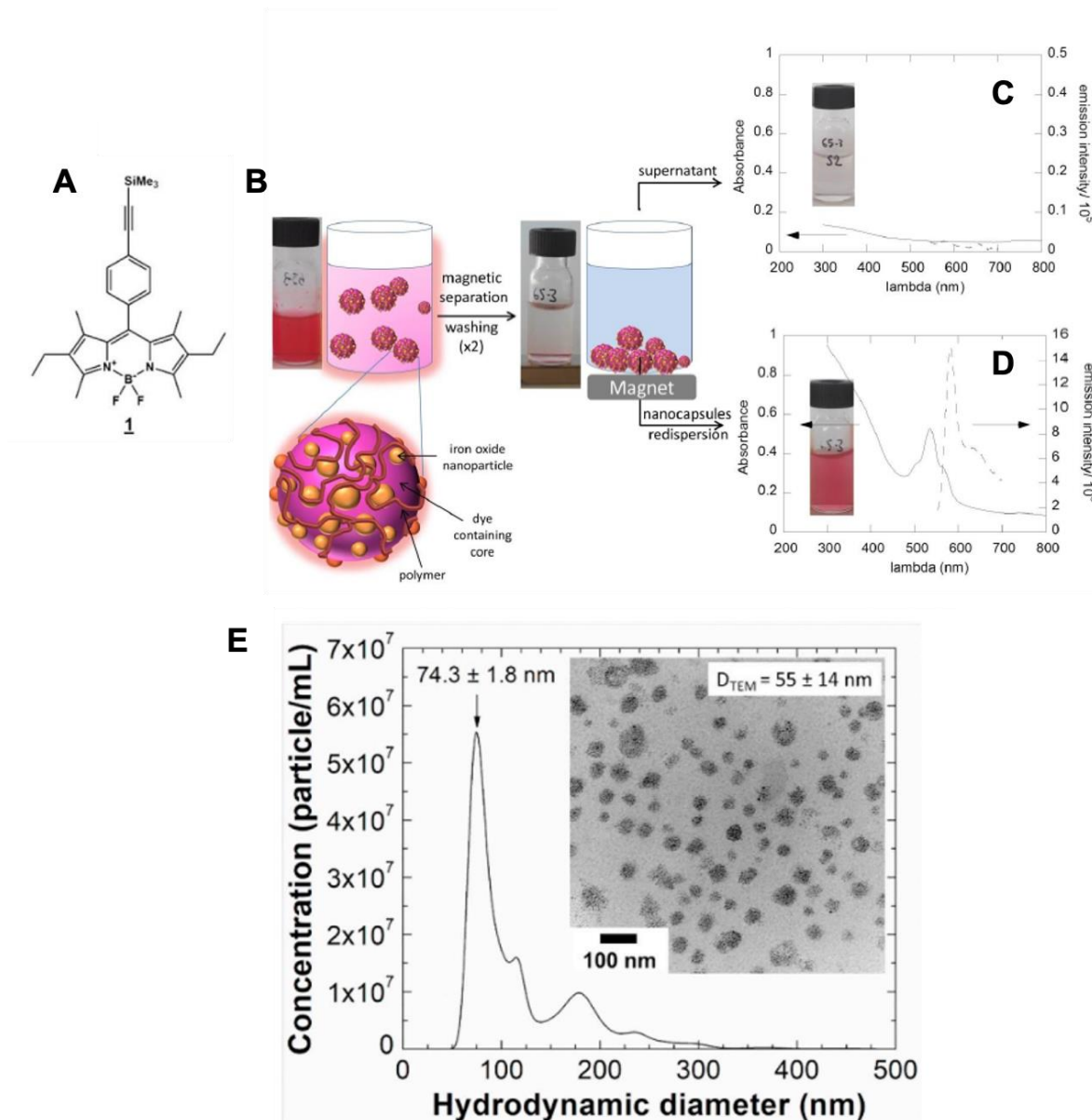


Figure 59 : (A) Structure chimique du BODIPY. (B) Elaboration d' $H^{\circ}$  aux propriétés magnétiques et fluorescentes. (C) Spectres d'absorption et d'émission du surnageant après élimination des  $H^{\circ}$  fluo-magnétiques par séparation magnétique. (D) Spectres d'absorbance UV-vis et d'émission de fluorescence de la suspension après dispersion des  $H^{\circ}$  dans l'eau. (E) Distribution de taille d' $H^{\circ}$  SPION-PEG-PAA contenant du BODIPY ( $[BODIPY] = 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).<sup>121,130</sup>

Une étude plus approfondie de l'encapsulation de ce fluorophore a été réalisée au cours de la thèse précédente (Clément Goubault), les résultats qui en ont découlé sont les suivants :<sup>130</sup>

- 1) le BODIPY est concentré dans les gouttelettes pendant l'étape d'émulsification, simultanément à la formation de la capsule. Puis, il précipite à l'intérieur des  $H^{\circ}$  au cours de l'évaporation du solvant, d'après Figure 60.

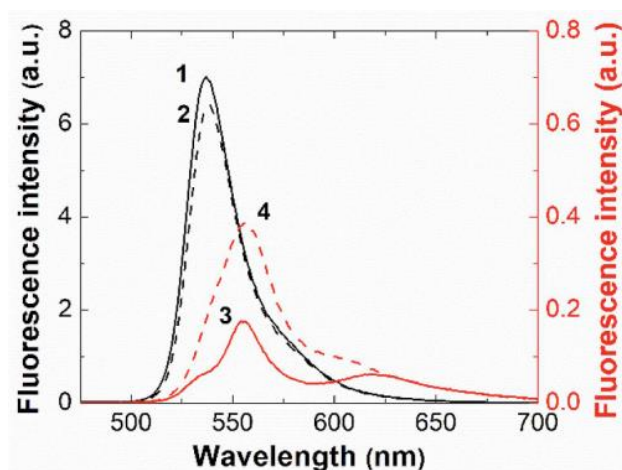


Figure 60 : Spectres d'émission de fluorescence du BODIPY 1 à différentes étapes du processus ( $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ ). 1) BODIPY dissous dans THF (ligne noire unie) ; 2) BODIPY dans un mélange THF/eau (25/75) (ligne noire pointillée) ; 3) BODIPY nanoprecipité (ligne rouge unie) ; 4) BODIPY encapsulé dans des H<sup>®</sup> d'oxyde de fer stabilisés par PEG-PAA (ligne rouge pointillée).<sup>130</sup>

- 2) Les H<sup>®</sup> peuvent contenir jusqu'à  $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$  (équivalent à  $170 \text{ g.L}^{-1}$  ou 450 000 molécules/capsule) de BODIPY nanoprecipité (Figure 61B), une capacité de chargement exceptionnelle spécifique à la nanoprecipitation par effet Ouzo.<sup>130</sup> Et le taux d'encapsulation est de minimum 80% (Figure 61A).

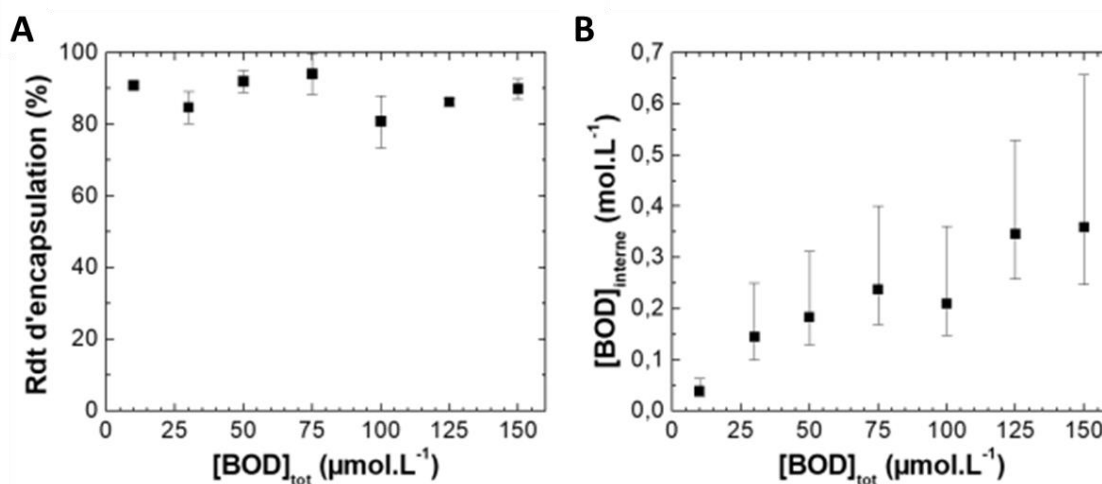


Figure 61 : (A) Taux d'encapsulation et (B) concentration de BODIPY nanoprecipité dans les H<sup>®</sup> comme une fonction de la concentration totale du BODIPY.<sup>130</sup>

- 3) D'après les mesures de fluorescence *in vitro*, le BODIPY peut être transféré du cœur des H<sup>®</sup> (encapsulé sous forme nanoprecipitée) à la membrane de liposomes.<sup>130</sup> En effet, comme nous l'avons déjà expliqué dans la partie II de ce chapitre portant sur les H<sup>®</sup>, ces nanocapsules présentent une structure poreuse (pores d'environ 4 nm) permettant au soluté hydrophobe de sortir de celles-ci par simple diffusion si un environnement plus favorable lui est présenté. La Figure 62A montre une augmentation élevée de la fluorescence due au transfert du BODIPY vers la membrane des liposomes. Et la Figure 62B montre la cinétique du transfert du BODIPY nanoprecipité dans les H<sup>®</sup> vers la membrane des liposomes, (courbes bleues) pour trois concentrations de liposomes ( $2, 5 \text{ et } 8 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Cette cinétique n'est que légèrement différente de celle du BODIPY nanoprecipité hors H<sup>®</sup>, confirmant le caractère poreux



des objets. Enfin, d'après la courbe noire de la Figure 62B (ajustement par l'équation de Korsmeier-Peppas, équation  $f = k.t^n$  avec  $n$  proche de 0,5), l'étape limitante est un processus diffusif.

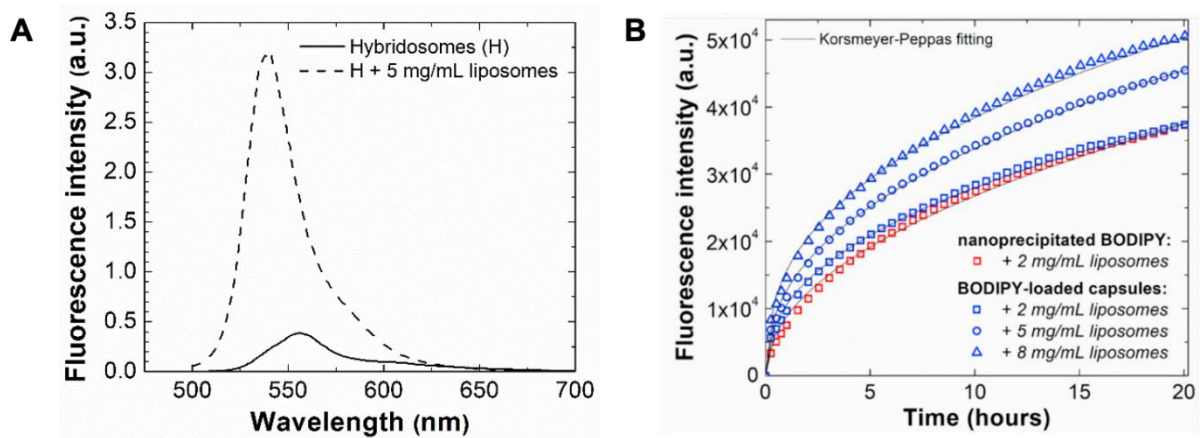


Figure 62 : (A) Fluorescence du BODIPY encapsulé dans les H<sup>®</sup> en solution aqueuse, en absence (ligne pleine) et en présence (ligne pointillée) de liposomes (5 mg.mL<sup>-1</sup>). (B) Diffusion du BODIPY encapsulé dans les H<sup>®</sup> vers les liposomes en fonction du temps. Rouge (□) pour BODIPY nanoprecipité hors H<sup>®</sup> en présence de 2 mg.mL<sup>-1</sup> de liposomes ; pour BODIPY nanoprecipité dans les H<sup>®</sup>, noir (□) pour 2, (○) pour 5, et (△) pour 8 mg.mL<sup>-1</sup> de liposomes ; lignes noires : ajustement par l'équation empirique :  $f = k.t^n$ .<sup>130</sup>

- 4) L'incubation *in vitro* des H<sup>®</sup> chargés en BODIPY avec des cellules pendant 2 h montre que le contenu des capsules finit par être internalisé dans le cytosol (points verts ou oranges de la Figure 63B, dû à la double émission caractéristique du BODIPY), probablement dans des lysosomes (aucune trace du BODIPY fluorescent dans les noyaux).<sup>130</sup>

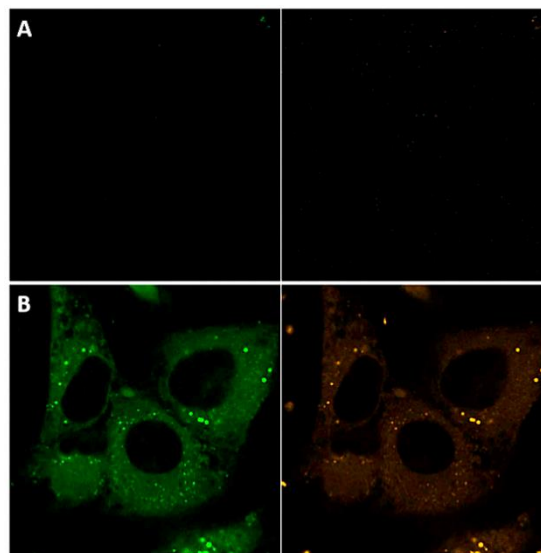


Figure 63 : Imagerie de fluorescence confocale de cellules malignes GL261 (A) avant et (B) après 2 h d'incubation avec des H<sup>®</sup> SPION/PEG-PAA chargés de BODIPY. De gauche à droite, canal de fluorescence vert ( $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 517-544 \text{ nm}$ ) et canal de fluorescence orange ( $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 579-624 \text{ nm}$ ).<sup>130</sup>

- 5) D'après les études *in vivo*, le BODIPY encapsulé diffuse dans l'organisme pendant plusieurs jours et finit par s'accumuler dans les graisses corporelles (Figure 64), tandis que les nanoparticules inorganiques restent piégées dans le foie et les macrophages de la rate (Figure 65).<sup>130</sup> Cette accumulation dans les graisses confirme le résultat du

point 3 : le soluté hydrophobe peut être transféré dans un autre compartiment lipophile.

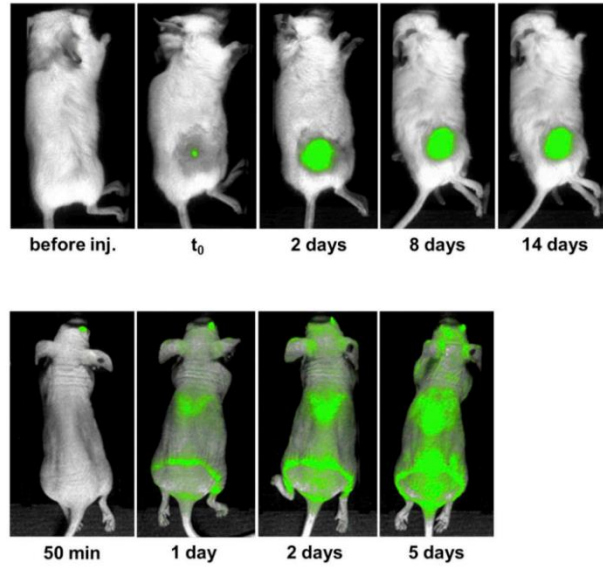


Figure 64 : En haut : Bioimagerie de fluorescence *in vivo* après injection d'H<sup>®</sup> chargés de BODIPY dans des cellules Nalm6 contenant du matrigel<sup>®</sup> ; En bas : Bioimagerie par émission de fluorescence *in vivo* après injection du fluorophore en intraveineuse (veine rétro-orbitaire). ( $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 547 \text{ nm}$ ).<sup>130</sup>

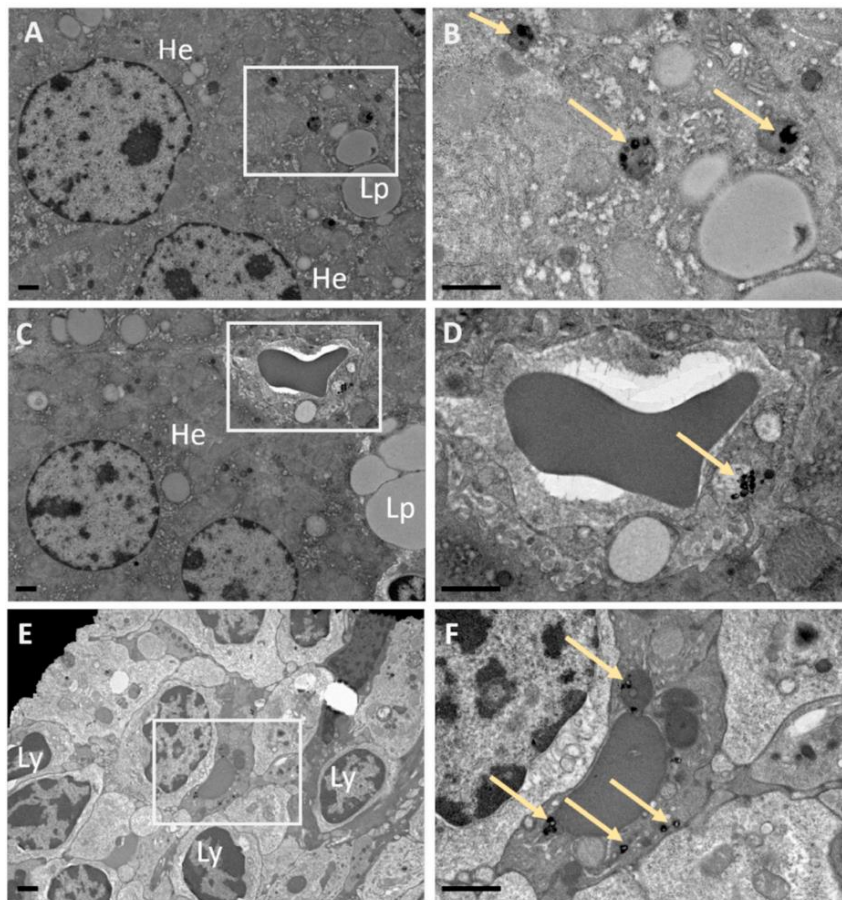


Figure 65 : Images de microscopie électronique à transmission (MET) du foie (A, B, C et D) et de la rate (E et F) de souris, 24 heures après l'injection intraveineuse d'H<sup>®</sup>. A, C et E représentent l'architecture cellulaire à faible grossissement. Les détails ultra-structuraux à l'intérieur des rectangles blancs en A, C et E sont imagés en B, D et F, respectivement. Les flèches jaunes indiquent les H<sup>®</sup> à l'intérieur des cellules. Abréviations : Hépatocyte (He), Globule lipidique (Lp), Lymphocyte (Ly). Barre d'échelle :  $1 \mu\text{m}$ .<sup>130</sup>

### III.3 Les autres méthodes d'encapsulation de principe actif

D'autres vecteurs de transport du médicament existent dans la littérature, la Figure 66 en illustre quelques exemples. Le choix de la méthode appropriée dépend des propriétés physico-chimiques du médicament à encapsuler (comme sa solubilité), du matériau encapsulant le médicament ainsi que des caractéristiques visées pour façonner la structure comme la distribution de taille de l'objet final, la nature de la charge de surface (pour une sensibilité au pH ou pour une stabilité colloïdale par exemple), la porosité de surface (taille des pores et leur densité), etc. Nous discuterons ici des principaux véhicules d'administration.

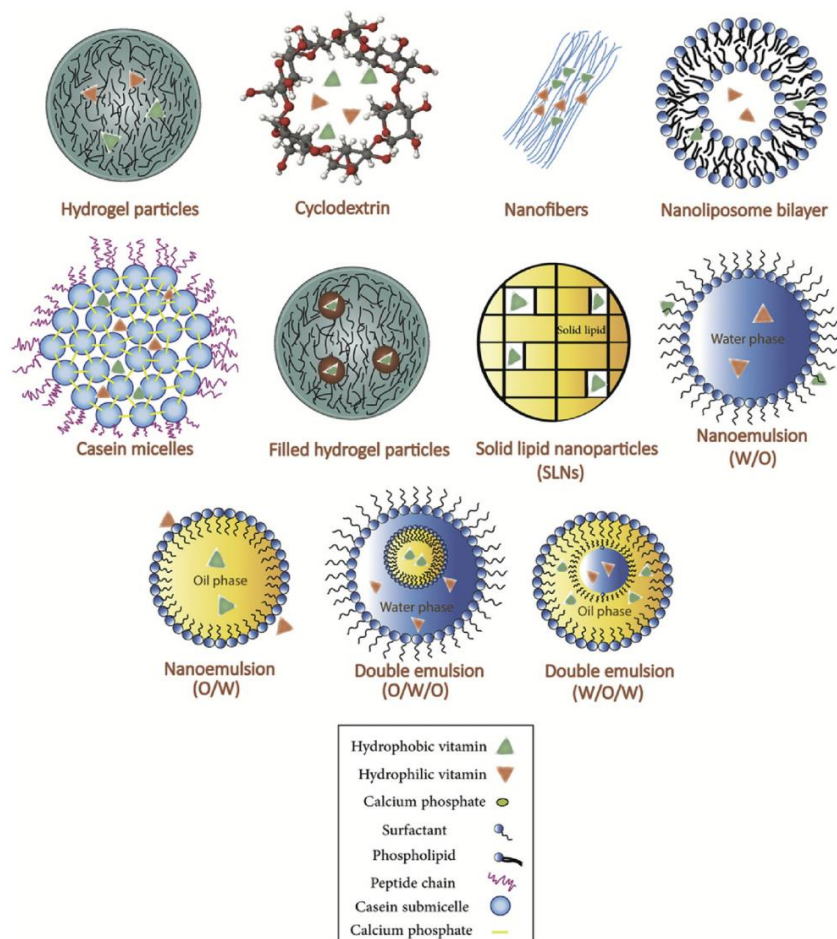


Figure 66 : Illustration schématique des différents types de systèmes d'administration nanostructurés (ici application à l'encapsulation de vitamines par exemple).<sup>131</sup>

#### III.3.a Les systèmes d'émulsion

La Figure 67 ci-dessous représente les différents systèmes d'émulsion pouvant encapsuler une molécule active.

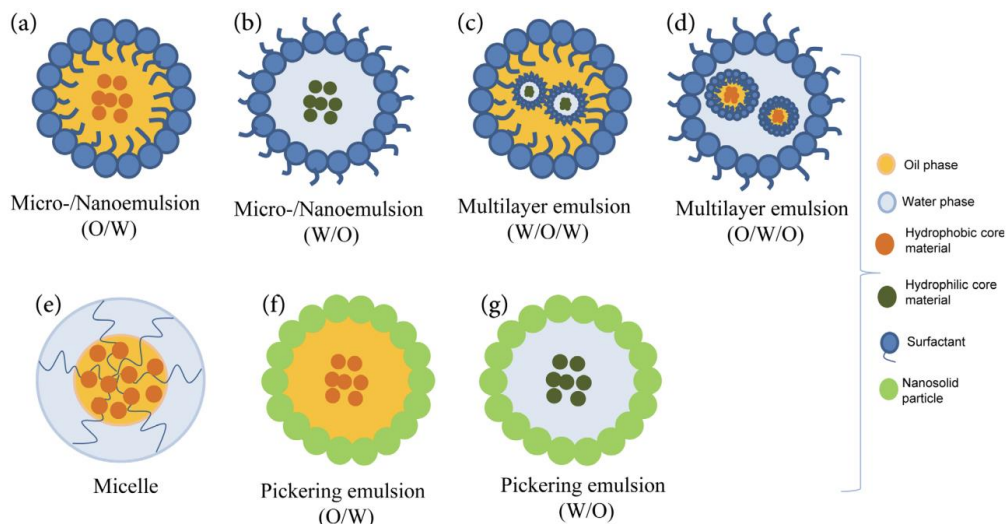


Figure 67 : Représentation schématique des différents systèmes d'émulsion : (a-b) micro-/nanoémulsion (huile/eau ou eau/huile) ; (c-d) émulsion à multicompartiments (huile/eau/huile ou eau/huile/eau) ; (e) micelle ; (f-g) émulsion Pickering (huile/eau ou eau/huile).<sup>132</sup>

### III.3.a.i Les Micro- et Nano-émulsions

La microémulsion est un système d'apparence transparente, thermodynamiquement stable et constitué de deux liquides non miscibles (Figure 67a et b). En présence de tensioactifs (tête hydrophile et queue hydrophobe), il peut y avoir formation spontanée de gouttelettes stables submicroniques pouvant aller jusqu'à 150 nm.<sup>132</sup> Ce type d'émulsification n'a pas besoin d'un grand apport d'énergie externe, alors que la nanoémulsion nécessite soit un apport d'énergie élevé comme une homogénéisation à haute pression ou par ultrasons, soit un apport plus faible en manipulant la température de transition de phase ou l'émulsification spontanée. La taille des gouttes dans le cas des nanoémulsions peut atteindre jusqu'à 250 nm et le système n'est pas à l'équilibre thermodynamique.<sup>132</sup>

Il existe aussi des émulsions à multicompartiments, aussi appelées émulsions multiples, puisqu'elles possèdent des phases multiples dans leur structure (Figure 67c et d). Dans ce cas, il faut procéder à une émulsification de la première émulsion élaborée. Les émulsions multiples sont généralement considérées comme plus stables que les émulsions conventionnelles car elles permettent de mieux protéger les substances actives de la dégradation par l'environnement et d'obtenir une libération prolongée des principes actifs.<sup>132</sup>

### III.3.a.ii Les micelles de copolymères à bloc : l'auto-assemblage de polymères amphiphiles

Les micelles de copolymères à bloc se forment spontanément en système colloïdal en réunissant les queues hydrophobes au cœur de la micelle et les têtes hydrophiles des polymères amphiphiles au niveau de l'enveloppe (Figure 67 e et Figure 68). Toutefois, il faut garder à l'esprit que la formation des micelles dépend de la morphologie des polymères utilisés (« packing parameter »).<sup>133</sup>

Les micelles de copolymères permettent de solubiliser dans leur cœur hydrophobe les substances peu solubles dans l'eau, comme la curcumine dans les travaux de Gong *et al.*<sup>134</sup> Les médicaments peuvent être incorporés dans le noyau par des interactions chimiques, physiques ou électrostatiques.<sup>135</sup> Il faut moduler cette interaction entre le polymère et le

médicament pour éviter le relargage précoce de celui-ci ou le non-relargage. La taille de l'enveloppe et donc son encombrement stérique peut jouer un rôle sur le temps de circulation sanguine, celui-ci pouvant être plus long si l'encombrement est élevé.

Les copolymères à bloc présentent aussi une autre caractéristique attractive pour la délivrance de médicaments. Leurs groupes terminaux peuvent être fonctionnalisés par des groupes sensibles au pH pour libérer des médicaments en fonction du pH de l'environnement, par exemple la libération de doxorubicine d'une micelle composée de complexes polyioniques pouvant se dégrader à un pH autour de 5.<sup>135-137</sup> Le médicament serait alors aisément libéré dans une tumeur au pH plutôt acide (~ pH 6,7) que celui des tissus normaux (~ pH 7,2).

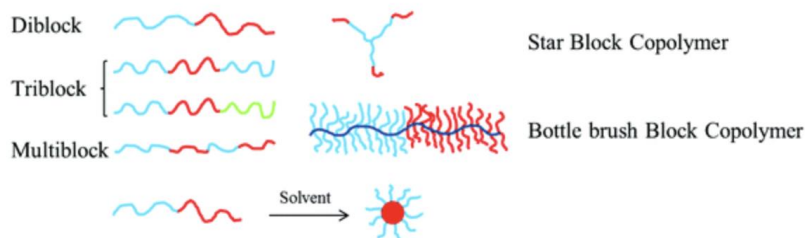


Figure 68 : les différents types de copolymères à bloc et leur assemblage.<sup>135</sup>

### III.3.a.iii Les émulsions Pickering

Les émulsions dites Pickering sont aussi des émulsions, mais les gouttelettes sont stabilisées à l'interface par des particules colloïdales au lieu de tensioactifs (Figure 67f et g, Figure 69).<sup>138</sup> Ces structures sont très stables et les particules colloïdales à leur surface permettent de réduire la coalescence. Dans les travaux de Liu *et al.*, des émulsions Pickering sensibles au pH ont été développées, pouvant alors libérer une substance active.<sup>139</sup> Un autre exemple avec la libération de l'ibuprofène encapsulé dans une émulsion stabilisée par de l'hydroxyde de magnésium a été développé.<sup>140</sup> L'hydroxyde de magnésium, hydrosoluble à pH acide, est solubilisé dans l'estomac (pH 1,2), libérant l'ibuprofène. Jia *et al.* ont quant eux utilisé des nanogels sensibles au pH pouvant devenir hydrophiles à pH neutre et hydrophobes à pH acide.<sup>141</sup> Les principes actifs encapsulés sont alors libérés de manière ciblée au niveau de la tumeur. Celui-ci ayant un micro-environnement plutôt acide, il déstabilise les nanocapsules Pickering, entraînant une séparation de phase. Un autre stimulus a été étudié pour libérer les substances actives de ces émulsions, il s'agit de la température. Par exemple, Dieng *et al.* ont utilisé des particules lipidiques solides (SLN) pour stabiliser l'émulsion Pickering. Ces SLN présentent un état vitreux à une température inférieure à 30°C.<sup>142</sup> De ce fait, les capsules peuvent libérer les principes actifs dans l'organisme à 37°C.

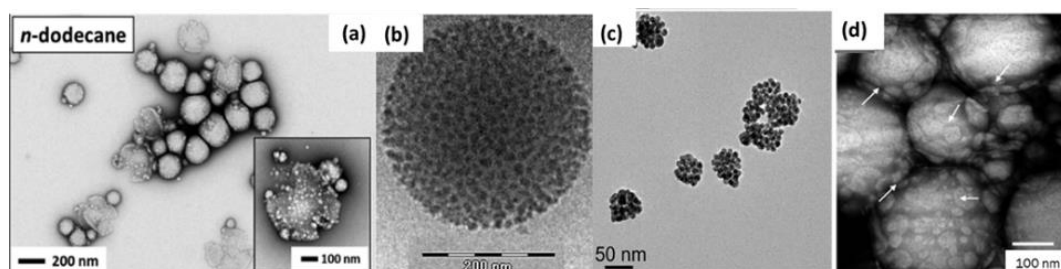


Figure 69 : Images (cryo)-MET d'émulsions Pickering stabilisées par diverses particules. (a) émulsion de *n*-alcane stabilisée par des nanoparticules de copolymère ; (b) émulsion de squalène stabilisée par des nanoparticules de silice ; (c) émulsion de perfluorooctane stabilisée par des nanoparticules d'or amphiphiles ; (d) émulsion d'huile de colza stabilisée par des nanoparticules lipidiques solides.<sup>138</sup>

Finalement, dans la littérature, les émulsions Pickering sont souvent utilisées comme gabarit liquide pour élaborer des capsules à multicompartiments. Par exemple, Fang *et al.* ont utilisé la méthode d'émulsions multiples (W/O/W) pour fabriquer des capsules à plusieurs compartiments à base de polymère et de nanoparticules inorganiques (SPION), avec un médicament dans le cœur de la capsule.<sup>143</sup> Dans les travaux de Hitchcock *et al.*<sup>144</sup>, ainsi que ceux de Sun *et al.*<sup>145</sup>, les émulsions Pickering ont servi à fabriquer des capsules d'or sensibles aux ultrasons pour une libération contrôlée du médicament. Ce type de capsules permet de combiner aussi les différentes propriétés des composés utilisés.

### III.3.b Les autres systèmes d'encapsulation

#### III.3.b.i Les vésicules : liposomes, polymersomes et capsules LbL (Layer-by-Layer)

Décrits pour la première fois en 1964 par Bangham *et al.*, les liposomes se composent de lipides amphiphiles qui s'assemblent spontanément pour former une couche, voire plusieurs, dans le milieu aqueux (Figure 70).<sup>135,146-148</sup> Les lipides utilisés peuvent être naturels ou synthétiques (phospholipides, etc.). Ils accordent une bonne fluidité et une bonne biodégradabilité aux liposomes. Par ailleurs, il est possible de déposer des matériaux polymères à leur surface pour améliorer leur stabilité, du chitosan par exemple.<sup>149</sup> Ces structures sphériques demeurent quand même stables sans cette couche polymérique et ont des tailles variant de 25 à 5000 nm.<sup>132</sup>

Les liposomes présentent l'avantage de pouvoir encapsuler des substances hydrophiles au cœur de la vésicule (Figure 70a), hydrophobes à l'intérieur de la membrane (Figure 70b), et des substances ayant un logP (coefficient de partage octanol/eau) intermédiaire (Figure 70d en rouge). De plus, les liposomes à plusieurs couches permettent d'obtenir une libération plus prolongée des principes actifs par rapport aux liposomes mono-lamellaires.<sup>149</sup> Toutes ces caractéristiques font des liposomes des candidats idéaux pour la délivrance de médicament. Dans le cas de l'encapsulation de médicament entouré de phospholipides, la substance active est piégée dans la tête polaire des phospholipides constituant le liposome, présentant alors le nom de phytosome (Figure 70c).<sup>132</sup> Il est aussi possible de retrouver des nanoparticules inorganiques dans les membranes des liposomes.<sup>150</sup>

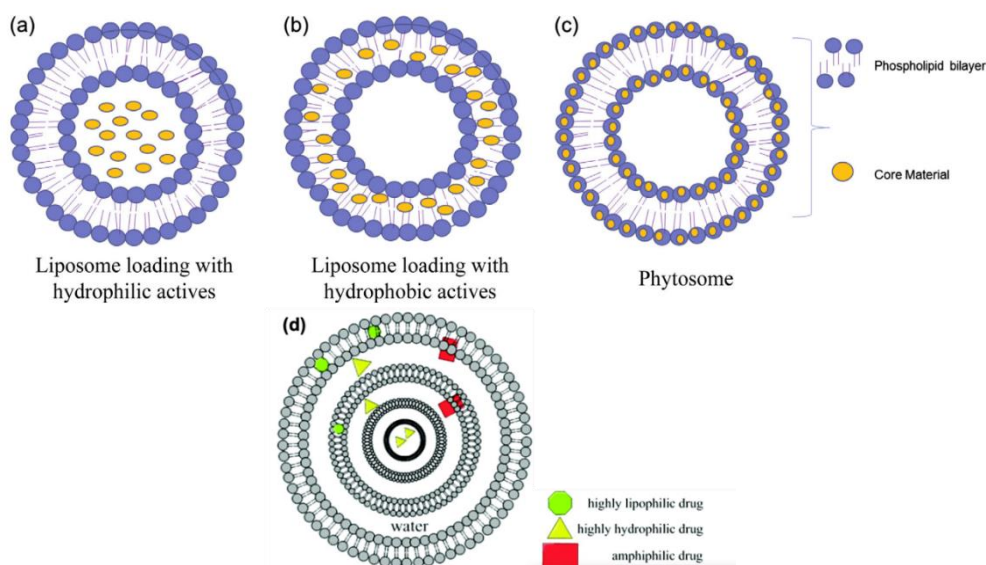


Figure 70 : Représentation schématique de (a) liposome monocouche, (b) liposome bicouche, (c) phytosome, et (d) liposome multicouche.<sup>132,135</sup>

Dans le cas des liposomes, l'administration de médicaments est assez simple puisqu'il suffit que la membrane du liposome fusionne avec celle de la cellule ou que le liposome subisse une endocytose pour que le médicament soit internalisé dans la cellule.<sup>135</sup> D'autres propriétés des liposomes peuvent être modulées par différents paramètres afin d'augmenter leur efficacité et leur stabilité : une charge de surface, leur hydrophobie, leur taille, le nombre de couches, etc.<sup>135</sup> Par ailleurs, pour contrôler le relargage de médicament, Turk *et al.* ont élaboré des liposomes sensibles au pH. Ces liposomes sont entièrement internalisés dans la cellule et libèrent la charge médicamenteuse par changement de pH dans le milieu environnant.<sup>151</sup> Une autre méthode consiste à modifier les liposomes avec des ligands appropriés pour une délivrance ciblée, comme le greffage d'anticorps à la surface pour donner des immunoliposomes.<sup>152,153</sup>

Des nanoliposomes existent aussi, et leur nom provient de leur taille plus petite que celle des liposomes classiques.<sup>154</sup> Les nanoliposomes et les liposomes présentent des propriétés chimiques et physiques similaires. Néanmoins, les nanoliposomes possèdent un rapport surface/volume plus important, une meilleure biodisponibilité et solubilité, ainsi qu'un ciblage affiné.<sup>155</sup>

Discher *et al.* ont élaboré une nouvelle classe de vésicules en s'inspirant des liposomes : les polymersomes.<sup>156,157</sup> Ils sont fabriqués à partir de copolymères diblocs amphiphiles dont les blocs hydrophobes s'assemblent entre eux et peuvent être obtenus par nanoprecipitation.<sup>9,158</sup> Par ailleurs, ils peuvent être co-chargés en molécules actives hydrophobes (préalablement solubilisés dans la phase organique) dans la membrane et hydrophiles (préalablement solubilisés dans la phase aqueuse) dans le cœur aqueux de la vésicule (Figure 71).<sup>159</sup> Les polymersomes présentent une plus grande stabilité que les liposomes et une faible perméabilité de leur enveloppe selon l'épaisseur de la membrane qui peut être variée en fonction de la longueur des blocs hydrophiles/hydrophobes.<sup>160,161</sup> Ces vésicules doivent être biocompatibles et biodégradables pour rivaliser avec les liposomes et des recherches récentes ont étudié la conception de vésicules intelligentes, ciblantes et sensibles aux stimuli.<sup>160,161</sup> Des polymersomes chargés de paclitaxel, un anti-cancéreux hydrophobe, dans la bicouche hydrophobe ont révélé que l'efficacité de chargement du médicament est jusqu'à 10 fois supérieure à celle des liposomes.<sup>159</sup> Ceci est attribué à la membrane plus épaisse dans les polymersomes par rapport aux liposomes. Concernant la doxorubicine, un anti-cancéreux hydrophile chargé à l'intérieur des vésicules, l'efficacité est comparable entre les polymersomes et liposomes.

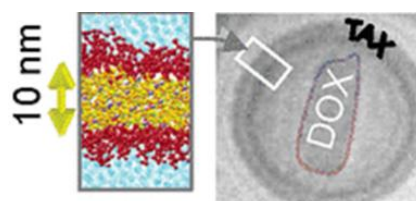


Figure 71 : Illustration schématique de la co-encapsulation dans le polymersome (copolymère PEG-PAA). À droite, une image cryo-MET du polymersome.<sup>159</sup>

Allen *et al.* ont utilisé la méthode de « flash nanoprecipitation » pour élaborer des polymersomes peu polydisperses à partir de copolymères séquencés poly(éthylène glycol)-*b*-poly(sulfure de propylène).<sup>158</sup> Ils ont constaté une relation entre la fraction massique de PEG et la morphologie des polymersomes obtenus, ayant alors un impact sur l'efficacité d'encapsulation du médicament. Ils ont démontré l'efficacité de leurs capsules en encapsulant un immunosuppresseur (rapamycine) et un colorant fluorescent pour relayer les cellules immunitaires ciblées à l'immunomodulation des lymphocytes T, dans le but d'une livraison contrôlée et de stratégies thérapeutiques.

Les capsules dites LbL (Layer-by-Layer) sont des capsules de polyelectrolytes auto-assemblés séquentiellement. Les polyelectrolytes s'assemblent par charge opposée autour d'une sphère elle-même chargée qui agit comme un template (Figure 72).<sup>162</sup> Ce template solide est souvent une nanoparticule de silice ou de polymère et est ensuite dissoute pour obtenir la capsule LbL.<sup>163</sup> Il est aussi possible que ce « template » solide soit directement une nanoparticule de médicament préalablement formée pour ensuite y déposer les couches de polyelectrolytes.<sup>164</sup> Pendant l'enrobage LbL, divers éléments tels que des NP métalliques, magnétiques ou fluorescentes, peuvent être incorporés dans les multicouches pour ajouter des fonctionnalités aux capsules (Figure 72).<sup>165–167</sup> Ces capsules LbL peuvent être élaborées de façon qu'elles soient sensibles à différents stimuli (physiologique, pH, UV, ultrasons, etc.) pour la libération contrôlée de médicaments.<sup>162,168</sup>

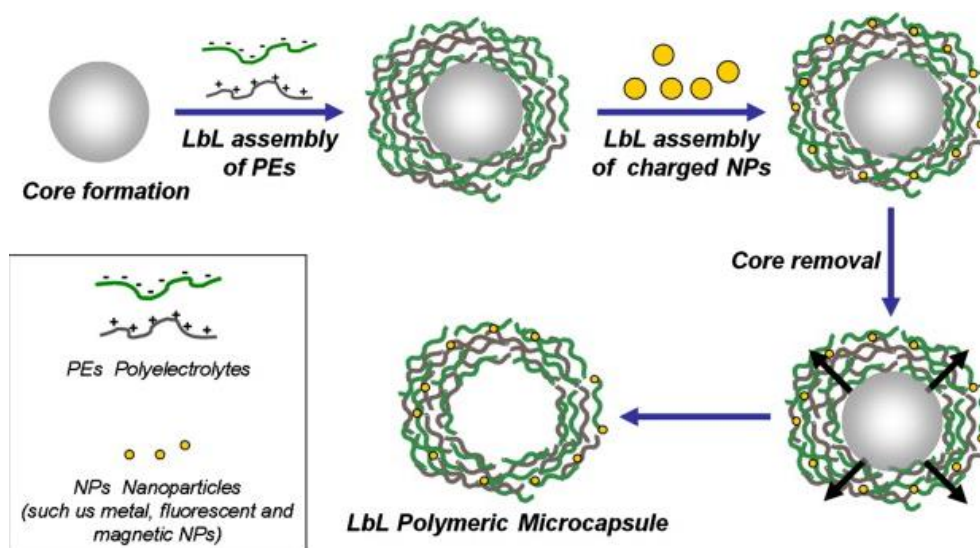


Figure 72 : Représentation schématique de l'assemblage LbL des capsules multicouches de polyelectrolyte. Les capsules sont produites par adsorption LbL de polyelectrolytes de charge opposée (vert et gris) sur des sphères chargées sphériques, suivie de sa dissolution pour obtenir la capsule creuse.<sup>162</sup>

Des capsules de silice poreuses, fonctionnalisées et biocompatibles peuvent aussi exister pour la délivrance de médicament.<sup>119</sup> Ce type de capsules présente l'avantage d'avoir une grande surface, une grande cavité interne creuse ainsi qu'une porosité uniforme et élevée. L'ajustement de la taille de leurs pores ou leur sensibilité à un stimulus (pH, UV, température, etc.) permettent de contrôler la libération du médicament.<sup>169,170</sup>

### III.3.b.ii Les cages moléculaires : dendrimères et cyclodextrines



Les dendrimères sont des microstructures complexes (2-10 nm en taille) possédant des bras de polymères ramifiés (dendrons) à partir d'un noyau central initiateur (Figure 73).<sup>135</sup> Cette classe de polymères présente un plus grand degré de symétrie et une ramification très élevée comparée aux autres types de polymères. Par ailleurs, cette morphologie leur procure une grande densité de groupes terminaux réactifs. La synthèse des dendrimères se fait à partir du noyau central vers l'extérieur avec une croissance exponentielle, ou par couplage de dendrons préalablement synthétisés sur le noyau central.<sup>135</sup> Le dendron couramment utilisé pour générer des dendrimères est la polyamidoamine (PAMAM).<sup>135</sup> Par cette ramification symétrique et contrôlée, leur monodispersité est élevée par rapport aux polymères classiques gouvernés par une croissance statistique et polydisperse.

En fonction du nombre de générations synthétisées (Figure 73), leur forme peut passer de disques bidimensionnels petits et souples (jusqu'à la génération 4) à des nanoparticules sphériques tridimensionnelles (génération 5 et plus).<sup>135</sup> Dans ce dernier cas de figure, la charge médicamenteuse est beaucoup plus élevée. Par ailleurs, la modification des groupes terminaux des branches peut rendre les dendrimères hydrophiles avec un noyau hydrophobe, ou inversement. Et cette modification de groupes terminaux peut aussi rendre accessible la thérapie ciblée en y greffant des molécules sensibles aux récepteurs cibles. Par exemple, Teow *et al.* ont élaboré des dendrimères PAMAM de troisième génération modifiés en surface avec des chaînes lauriques et conjugués au paclitaxel.<sup>171</sup> Leur but était d'améliorer la perméabilité des barrières cellulaires au paclitaxel et de surmonter les barrières cellulaires. Les tests cellulaires ont montré une meilleure absorption du paclitaxel que le médicament libre.

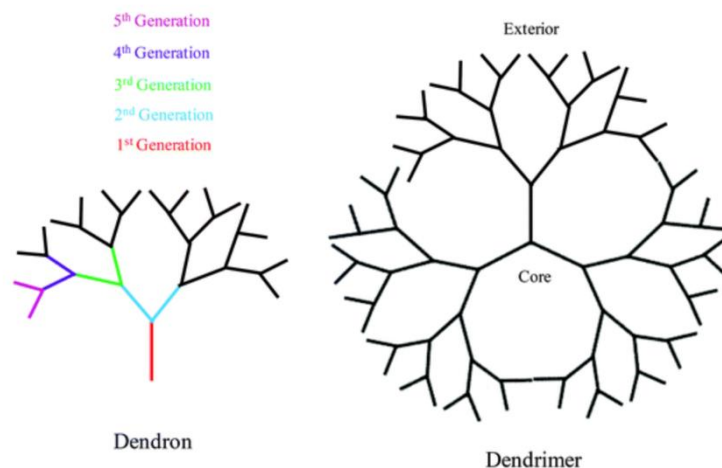


Figure 73 : Illustration schématique d'une branche de dendrimère et d'un dendrimère.<sup>135</sup>

Des médicaments et des vitamines liposolubles peuvent aussi être encapsulés dans des cyclodextrines (CD), des molécules dites « cages ». <sup>172</sup> Elles sont une classe d'oligomères cycliques de glucopyranose qui forment une cavité lipophile. Les cyclodextrines ont la capacité d'incorporer sélectivement des composés dont la taille et la polarité sont compatibles avec celles de leur cavité. Les polymères réticulés à base de CD sont souvent appelés « nano-éponges de cyclodextrine » (CDNS).<sup>173</sup> Ces types de CD peuvent présenter une grande biodisponibilité, une bonne solubilisation et stabilité des molécules hydrophobes active dans leur cavité, ainsi qu'une meilleure efficacité et une diminution des effets secondaires indésirables.

## IV La radiothérapie et la thérapie combinée

Actuellement, les principales approches thérapeutiques utilisées pour traiter le cancer sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, administrées séparément ou en diverses combinaisons.<sup>174,175</sup> Plus spécifiquement, la radiothérapie consiste à déposer de l'énergie dans le tissu tumoral. Cependant, une partie de cette énergie déposée peut avoir des effets néfastes sur les tissus sains environnants. Les nanoparticules inorganiques composées d'atomes de numéro atomique  $Z$  élevé sont des outils incontournables pour jouer le rôle de sensibilisateur. En effet, elles ont prouvé leur efficacité pour augmenter localement l'effet des rayonnements appliqués à la zone tumorale tout en réduisant les effets délétères sur les tissus sains à proximité. Parmi ces atomes riches en électrons, l'or est particulièrement bien indiqué. Les nanoparticules d'or présentent en effet une multitude d'avantages : i) biocompatibilité, ii) synthèses bien établies, iii) accès à différentes tailles, et iv) surface fonctionnalisable par des molécules d'intérêt.<sup>174,176,177</sup> Le but de cette thèse étant l'application des  $H^{\oplus}$  à la thérapie combinée chimio-radiothérapie, nous introduirons le principe et le mécanisme de la radiothérapie par rayons X et l'utilisation de nanoparticules d'or pour l'optimiser. De plus, nous discuterons de l'intérêt de la thérapie combinée pour le traitement de cancer.

### IV.1 La radiothérapie par photons

De façon générale, la radiothérapie est un procédé simple à mettre en place. Après l'irradiation, une série d'événements se produisent (Figure 74) et peuvent se découper en trois stades (Physique, Chimique et Biologique) :<sup>174,178</sup>

- **Le premier stade (Physique)** : les photons (rayons X ou gamma de haute énergie) interagissent avec la matière (atomes du milieu biologique irradié) et déposent de l'énergie. Les rayonnements ionisants peuvent endommager directement la cellule, notamment par fragmentation ionisante de l'ADN (cassure simple ou double brin).
- **Le second stade (Chimique)** : c'est la génération d'espèces secondaires (électrons aqueux, photoélectrons et électrons Auger) par ionisation des composants intracellulaires et/ou des molécules d'eau (radiolyse de l'eau). Ces espèces secondaires libérées provoquent la formation d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS = OH, NO $\cdot$ , H $\cdot$  et H $_2$ O $_2$ ) qui peuvent endommager davantage la cellule (ADN, mitochondries, membrane, protéines).<sup>174,179-181</sup> De même, les électrons secondaires peuvent provoquer des ruptures de brins d'ADN (fixation dissociative des électrons) et amplifier la production de radicaux en interagissant avec le milieu aqueux.<sup>182</sup> Tous ces dommages dus aux espèces secondaires sont appelés dommages indirects.
- **Le dernier stade (Biologique)** : ce sont les conséquences de l'exposition au rayonnement sur les cellules. Si elles sont exposées à une dose de rayonnement suffisamment élevée, avec un débit de dose et un fractionnement de la dose appropriés, alors la cellule meurt (apoptose) ou bien peut essayer de se réparer.

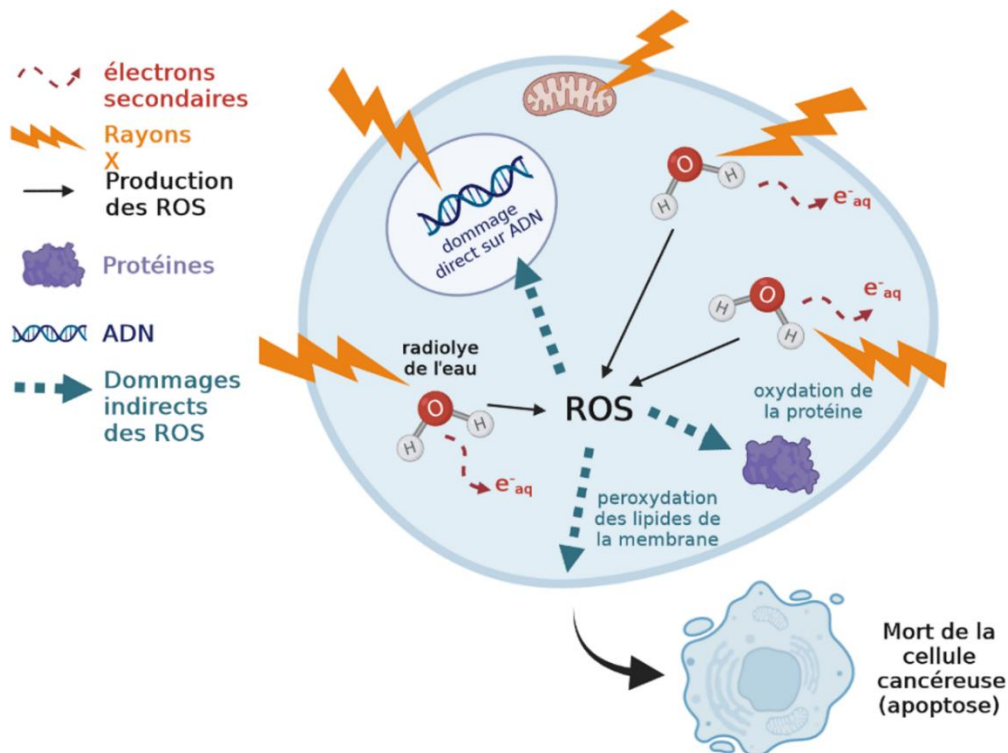


Figure 74 : La radiothérapie et les ROS favorisent les effets antitumoraux. L'irradiation par radiothérapie provoque la mort cellulaire par des dommages directs sur l'ADN et des effets indirects des ROS.<sup>174,183</sup>

En radiothérapie du cancer, les énergies des rayons X s'élèvent généralement entre 80 keV et 25 MeV, et principalement entre 8 et 18 MeV pour les accélérateurs linéaires modernes à haute énergie qui sont utilisés pour produire et former le faisceau de rayonnement.<sup>174</sup>

Le rayonnement sur des cellules saines demeure quand même problématique dans l'efficacité de la radiothérapie. En effet, celui-ci peut provoquer des dommages sur les cellules saines qui peuvent alors devenir à leur tour des cellules tumorales (par mutation de l'ADN) ou mourir.<sup>174,184</sup> C'est pourquoi, la quantité de rayonnement sur le patient est souvent limitée. De plus, un autre inconvénient de cette méthode par photons est que les tissus cancéreux peuvent développer une résistance aux rayonnements ou se régénérer si l'irradiation n'est pas réalisée sur l'ensemble de la zone cancéreuse.<sup>174,184</sup>

## IV.2 Radiothérapie sensibilisée par des nanoparticules d'or (AuNP)

Les principales voies permettant d'augmenter l'indice thérapeutique qui correspond au rapport entre l'efficacité du traitement et les effets secondaires ont été établies :<sup>174</sup>

- Eviter la résistance aux rayonnements dans le tissu tumoral,
- Augmenter la radiorésistance dans le tissu sain,
- Augmenter la radiosensibilisation dans le tissu tumoral,
- Déposer une dose plus localisée dans le tissu tumoral.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes penchés sur les deux dernières voies en utilisant des nanoparticules d'or connues pour optimiser la radiosensibilisation et un arrangement des nanoparticules en H<sup>®</sup> pour obtenir une dose plus élevée et plus localisée.<sup>174,178,185-188</sup>

## IV.2.a Rôle des AuNP en tant que radiosensibilisant

L'effet photoélectrique (ou diffusion/effet Compton) désigne l'éjection des électrons dans le milieu après absorption de la lumière par la matière.<sup>183</sup> C'est-à-dire qu'un photon incident du rayonnement entre en collision avec un électron libre faiblement lié d'un atome. Alors, l'électron est éjecté de l'atome, qui est donc ionisé, tandis qu'un photon est diffusé. De ce fait, la probabilité que la matière interagisse avec le rayonnement dépend du nombre Z (numéro atomique) de l'atome qui interagit.<sup>183</sup> Or, les compositions chimiques des tissus tumoraux et des tissus sains sont très proches, provoquant l'endommagement sans distinction de ces deux types de tissus. Toutefois, les éléments à Z élevé possèdent par définition une forte densité électronique autour de l'atome central. S'ils subissent une ionisation par des rayonnements photoniques, ils peuvent alors engendrer une forte ionisation autour d'eux et augmenter la production des espèces réactives (ROS et électrons secondaires libres), ainsi que l'amplification des dommages sur l'ADN (Figure 75).<sup>183</sup> Par ailleurs, comme la masse tumorale augmente rapidement (angiogenèse), elle génère une grande densité de vaisseaux avec de grands pores (pouvant atteindre ~ 2 microns) pour répondre aux besoins nutritifs des cellules cancéreuses.<sup>189</sup> Grâce à l'effet de perméabilité et de rétention améliorées (EPR), l'absorption intracellulaire de nanoparticules métalliques à haut Z et relativement grandes entraîne leur extravasation par fuite vasculaire dans ces vaisseaux tumoraux.<sup>190</sup> Elles finissent par s'accumuler dans les tissus tumoraux puisqu'ils n'ont pas de système lymphatique fonctionnel permettant la clairance (capacité d'un tissu ou organe à éliminer une substance) des nanoparticules (c'est un ciblage passif). Cette accumulation préférentielle des nanoparticules à Z élevé dans le tissu tumoral permet la distinction entre le tissu tumoral et le tissu sain et conduit à un dépôt de dose beaucoup plus localisé.<sup>183</sup> C'est pour cette raison que les nanoparticules d'or (Z = 79) sont fortement utilisées dans la radiothérapie, apportant une efficacité accrue en localisant la dose déposée sans augmenter la dose de rayonnements X, voire même en la diminuant (Figure 76).<sup>191-193</sup> Par ailleurs, les AuNP produisent des espèces réactives (ROS et électrons secondaires) sous le faisceau ionisant en interagissant avec les molécules d'eau dans le milieu ou en libérant des électrons directement sous irradiation.<sup>185,191,194</sup>

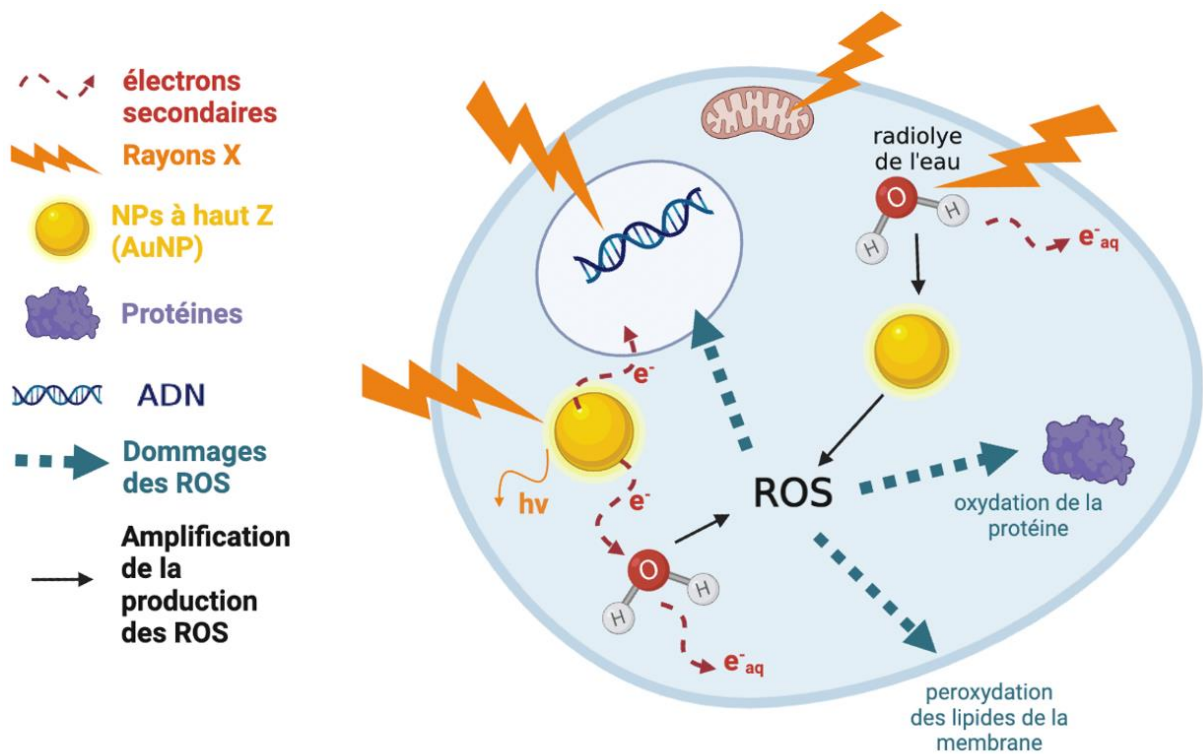


Figure 75 : Illustration schématique de l'effet potentielisateur de la radiothérapie par des nanoparticules métalliques à haut Z (AuNP). Le faisceau incident de photons X induit des excitations/ionisations des composants intracellulaires, provoquant des effets directs (dommages à l'ADN, radiolyse de l'eau entraînant la production de ROS). Les ROS altèrent à leur tour les macromolécules cellulaires en induisant une oxydation des protéines, une peroxydation des lipides membranaires et des dommages indirects à l'ADN.<sup>183</sup>

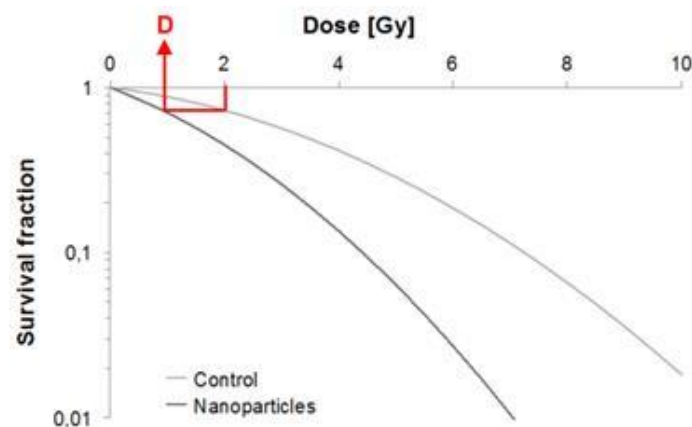


Figure 76 : Courbe de survie (test in vitro) en fonction de la dose de rayonnement déposée sur un milieu biologique avec ou sans nanoparticules.<sup>191</sup>

Hainfeld *et al.* ont publié une étude dans laquelle ils ont utilisé des AuNP de 1,9 nm et les ont administrées par voie intraveineuse à des souris atteintes de tumeurs sous-cutanées.<sup>192</sup> Ensuite, ils ont comparé l'effet des AuNP seules, des AuNP combinées à l'irradiation (26 Gy provenant d'une source de 250 kV<sub>p</sub>), de l'irradiation seule et d'aucun traitement (ni injection de nanoparticules ni irradiation). La combinaison de l'AuNP et de l'irradiation a entraîné une inhibition significative de la croissance de la tumeur (Figure 77), avec une survie de 86 % des souris jusqu'à un an, contre 20 % pour l'irradiation seule.

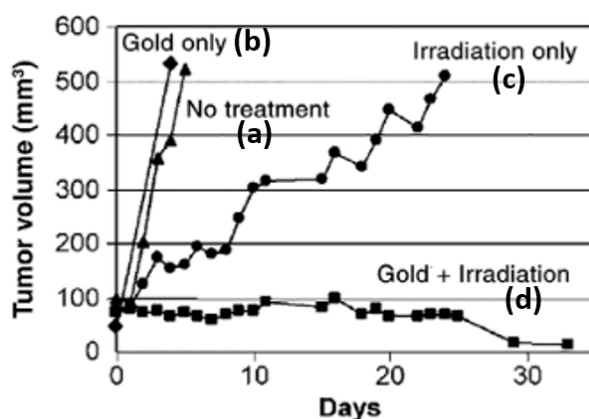


Figure 77 : Volume tumoral moyen après : (a) aucun traitement (triangles, n = 12) ; (b) AuNP seul (losanges, n = 4) ; (c) irradiation seule (30 Gy, 250 kVp, cercles, n = 11) ; (d) injection intraveineuse d'or (1,35 g Au/kg) suivie d'une irradiation (carrés, n = 10).<sup>192</sup>

Notre équipe a réalisé récemment une étude portant sur l'effet radiosensibilisant des Hybridsomes<sup>®</sup>.<sup>195</sup> Plus concrètement, des H<sup>®</sup> (diamètre 94 ± 13 nm) ont été élaborés avec une coque constituée majoritairement de nanoparticules d'oxyde de fer (SPION, diamètre de 5 nm) et de 10% en masse de nanoparticules d'or (AuNP, diamètre de 10 nm) (Figure 78). Un modèle murin porteur de tumeurs cérébrales (type Glioblastome, cellules implantées GL261-Luc+) a subi une injection intratumorale des H<sup>®</sup> avant traitement par irradiation et leur survie a été suivie pendant 80 jours (Figure 79).

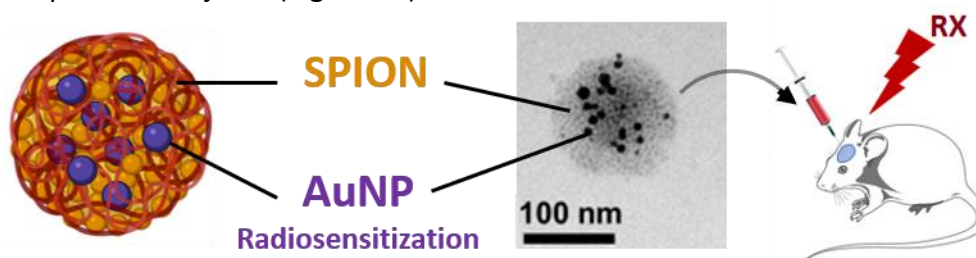


Figure 78 : Illustration schématique d'un H<sup>®</sup> comportant des SPION et AuNP dans sa coque (ratio massique Fe/Au : 10/1), accompagnée d'une image MET et d'une illustration du procédé de traitement de la tumeur sur modèle murin (radiothérapie par rayons X et injection intra-tumorale d'une solution contenant les H<sup>®</sup> pour le traitement du glioblastome).<sup>195</sup>

L'effet potentialisant des AuNP a pu être mis en évidence par cette étude :<sup>195</sup>

- Le groupe de souris ayant reçu des H<sup>®</sup> dont la coque est constituée seulement de SPION, irradiés ou non (courbes bleues), ne présentent aucune différence avec le groupe contrôle (sans traitement, courbe noire pointillée). L'oxyde de fer ne semble alors pas avoir d'effet bénéfique pour la radiothérapie.
- En revanche, un réel effet des nanoparticules d'or irradiées est observé (courbe rouge pleine), et ce malgré leur faible quantité. La médiane de survie de ce groupe a augmenté de près de 20% par rapport à la radiothérapie seule (courbe noire pleine) et de 33% par rapport au groupe contrôle n'ayant eu aucun traitement (courbe noire pointillée).

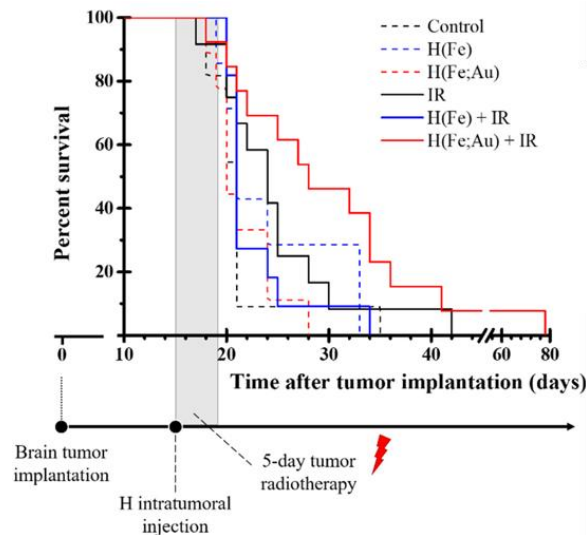


Figure 79 : Courbes de Kaplan-Meier de la survie des souris atteintes de gliomes GL261 après traitement par radiothérapie et/ou H<sup>®</sup>. L'injection intratumorale de H(Fe) (bleu), H(Fe;Au) (rouge) ou aucune (noir) a été réalisée deux semaines après l'implantation des cellules GL261-Luc+, et l'irradiation (IR) a commencé immédiatement avec 2 Gy par jour pendant 5 jours (lignes pleines : irradié ; lignes pointillées : non irradié).<sup>195</sup>

Par ailleurs, une des souris traitées par radiothérapie en présence d'H<sup>®</sup> contenant des AuNP a survécu 78 jours (Figure 79). Un suivi de la croissance tumorale de cette souris durant cette période a été réalisé en utilisant l'IRM et la bioluminescence. À travers ce suivi, une diminution de l'activité tumorale après le traitement a été constatée, puisqu'une diminution de la bioluminescence de la tumeur est observée à partir du 25<sup>ème</sup> jour (Figure 80A et C).<sup>195</sup> Dans la Figure 80B, grâce à l'agent de contraste (SPION dans la coque des H<sup>®</sup>), il est possible d'observer l'évolution de la tumeur en IRM qui confirme les résultats de bioluminescence. Qui plus est, la présence des H<sup>®</sup> à proximité de la tumeur cérébrale a pu être confirmée plus de 5 jours après l'injection intra-tumorale, ce qui correspond à la durée de la radiothérapie du protocole Stupp (détection à J+78).<sup>195</sup>

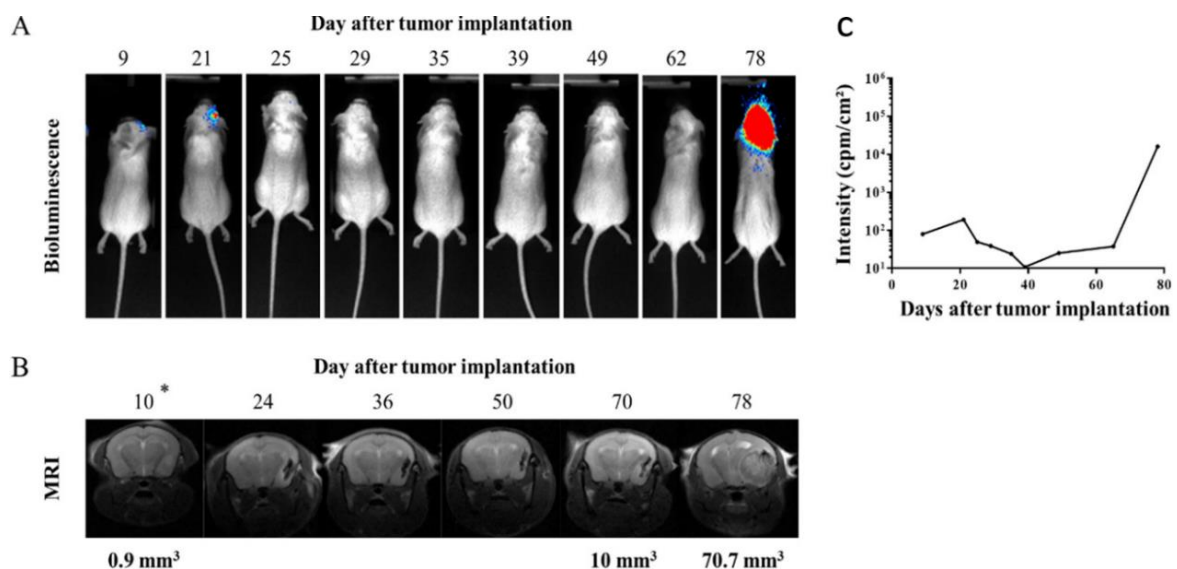


Figure 80 : Au 14<sup>ème</sup> jour après l'implantation cérébrale des cellules GL261-Luc+, la souris a subi une injection intra-tumorale de H<sup>®</sup>(Fe;Au) et a été traitée par irradiation pendant une semaine. (A) Signal de bioluminescence de la tumeur GL261-Luc+. (B) IRM du cerveau. Le jour 10 est avant l'injection des H<sup>®</sup> ; toutes les autres images sont après l'injection des H<sup>®</sup>. Grâce aux propriétés magnétiques des SPION, il est possible de mieux observer par IRM la localisation des H<sup>®</sup>, tout en suivant la croissance de la tumeur. (C) Le suivi de l'intensité du signal de bioluminescence de la tumeur en fonction des jours après implantation de la tumeur.<sup>195</sup>

Il faut garder à l'esprit qu'il est aussi possible d'utiliser d'autres nanoparticules inorganiques pour potentialiser la radiothérapie, par exemple l'argent, le platine, l'hafnium, le fer, le bismuth, le tungstène, le zinc et des éléments de terres rares comme le gadolinium et le cérium.<sup>196</sup>

## IV.2.b Propriétés physico-chimiques des AuNP

L'interaction avec les rayonnements et la réponse biologique des cellules peuvent être influencées par la forme, la taille, la charge et le revêtement à la surface des AuNP.<sup>191,197</sup>

### IV.2.b.i Taille des NP

Comme vu dans la partie précédente, la biodistribution des nanoparticules et la voie d'élimination de l'organisme (clairance) dépendent fortement de leur taille. L'effet EPR indique que les nanoparticules peuvent s'accumuler dans les tissus tumoraux, ce qui est une bonne chose pour le traitement. Cependant, il convient d'éviter leur accumulation dans des tissus sains comme le cœur et le foie, ce qui pourrait entraîner des effets secondaires à long terme. Il faut donc les éliminer. Pour ce faire, la clairance rénale est la voie principale pour éliminer les corps étrangers mais elle dépend fortement de la taille des NP.<sup>174,198,199</sup> Si leur diamètre hydrodynamique est supérieur à 10 nm, alors elles seront capturées par des macrophages pour finir dans le foie.<sup>174,199,200</sup> S'il est inférieur à 6 nm, alors ils emprunteront la voie de la clairance rénale indépendamment de leur charge.<sup>174,201,202</sup> En revanche, pour les tailles comprises entre 6 et 10 nm, leur élimination par clairance rénale dépendra de la charge à leur surface (les NP chargées positivement éliminées plus rapidement que les chargées négativement).<sup>174</sup>

En outre, comme évoqué précédemment, l'effet EPR dépend de la taille des nanoparticules. Pour rappel, il permet l'accumulation passive dans les tissus tumoraux des nanoparticules assez grosses (jusqu'à 100 nm, taille idéale pour la thérapie).<sup>178,199</sup> En effet, les parois des vaisseaux sont plus perméables avec des tailles de pores plus élevées que les vaisseaux sanguins sains dus à une plus grande distance entre les cellules endothéliales.

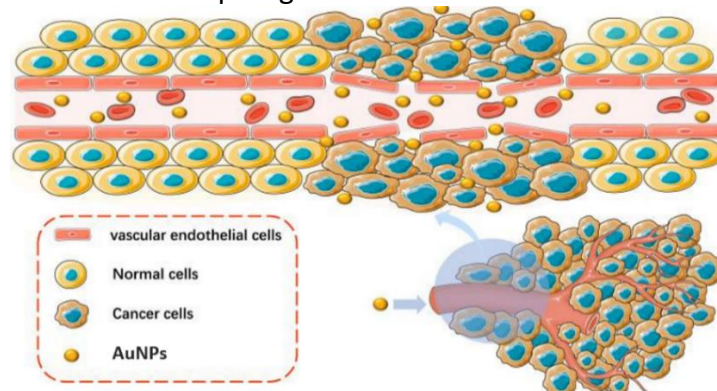


Figure 81 : Ciblage passif pour les AuNP par effet EPR. Les larges fenestrations de l'endothélium vasculaire tumoral (taille des pores élevées), sa haute perméabilité et son drainage lymphatique déficient, permettent l'accumulation ou le ciblage passif des AuNP dans les tissus tumoraux.<sup>178</sup>

La taille des nanoparticules a aussi une influence sur l'incidence du rayonnement. Plus les AuNP sont grandes, plus les électrons secondaires formés dans les nanoparticules ont une probabilité plus élevée de dissiper leur énergie à l'intérieur de la nanoparticule avant



d'atteindre la surface et donc plus la dose déposée dans le milieu est réduite.<sup>203</sup> Par exemple, dans les travaux de modélisation de Lin *et al.*, il a été constaté une meilleure destruction des cellules par les AuNP de 2 nm que par celles de 50 nm.<sup>203</sup> Par ailleurs, il existe de nombreuses études portant sur les simulations (Monte Carlo) pour établir la structure et la taille les plus adaptées pour optimiser l'effet sensibilisant des nanoparticules en radiothérapie.<sup>191,193,203–210</sup> En effet, la forme des nanoparticules d'or est connue pour affecter leur capacité de radiosensibilisation.<sup>203,211</sup> Par exemple, certaines études ont observé que les nanoparticules sphériques sont plus facilement internalisées par les cellules que les particules en forme de bâtonnet de taille similaire.<sup>212,213</sup> La raison pourrait être une meilleure absorption des particules sphériques due à leur courbure qui facilite leur interaction avec les membranes cellulaires.<sup>178</sup> Mais il existe aussi des travaux comme ceux de Zhang *et al.* qui prouvent à l'inverse que les nanoparticules d'or en forme de bâtonnets sont plus efficaces pour cibler l'angiogenèse tumorale que les nanoparticules sphériques.<sup>214</sup> Dans leur cas, ils ont conclu que cette forme en bâtonnet permettrait aux nanoparticules d'or d'échapper plus efficacement aux macrophages, leur permettant une circulation sanguine plus longue.<sup>215</sup>

#### IV.2.b.ii La charge de surface

La charge à la surface des nanoparticules est un facteur clé qui doit être contrôlé pour influencer la biodistribution et leur élimination comme nous l'avons évoqué plus haut dans cette partie. En effet, les nanoparticules chargées positivement présentent l'avantage d'être mieux absorbées par les cellules par interaction avec la membrane lipidique chargée négativement.<sup>174</sup>

De plus, les particules chargées positivement ont plus de chance d'adsorber les protéines sériques chargées négativement (opsonines) à leur surface. Ces protéines reconnaissent les corps étrangers dans la circulation sanguine pour ensuite les éliminer plus rapidement par rapport aux particules négatives ou neutres (opsonisation).<sup>216</sup> Mais leur élimination trop rapide peut aussi être un problème pour la radiothérapie, puisqu'elles doivent quand même être efficaces quelques jours. Pour éviter cela, il est possible de fixer à la surface des NP un revêtement de PEG et les nano-objets deviennent « furtifs ». <sup>174,199,200,217</sup> Ceci implique alors une augmentation du temps de circulation sanguine des NP, pouvant engendrer une absorption passive plus importante en raison de l'effet EPR.

#### IV.2.c La toxicité des AuNP (et des SPION)

De façon générale, les nanoparticules d'or sont peu toxiques, mêmes présentées comme biocompatibles dans la littérature.<sup>174</sup> Toutefois, il existe quelques exceptions qui peuvent dépendre :

- De la taille : une toxicité minime pour les nanoparticules de moins de 5 nm et de plus de 50 nm, mais sévère pour les tailles intermédiaires.<sup>218–220</sup> Mais cela reste une question complexe qui n'est pas entièrement résolue. Haume *et al.* ont dressé un tableau récapitulant les études cytotoxiques réalisées avec différentes tailles de nanoparticules d'or.<sup>174</sup>
- Du ligand de surface de la nanoparticule : les ligands cationiques (amines) sont toxiques, contrairement aux anioniques (acides carboxyliques).<sup>219,221</sup>

Dans la cadre de cette thèse, des H<sup>®</sup> constitués de SPION dans la coque sont aussi élaborés. Il apparaît donc utile de rédiger un paragraphe sur leur toxicité pour la bonne compréhension des résultats (chapitre 4). Dans la littérature, il est souvent mentionné que les SPION sont biocompatibles et non toxiques.<sup>222</sup> Cependant, cela peut aussi dépendre de leur taille et de leur revêtement : les SPION de très petite taille sont toxiques à haute dose et celles recouvertes de polyéthylèneimine (PEI) sont toxiques contrairement au cas du PEG.<sup>223–225</sup>

### IV.3 La chimio-radiothérapie combinée

La combinaison de la radiothérapie et de la chimiothérapie est une idée qui date du siècle dernier.<sup>226–229</sup> Ces deux thérapies peuvent se potentialiser mutuellement. Il est nécessaire de connaître et comprendre les effets des médicaments pour parfaitement les combiner avec les effets de la radiothérapie et savoir quand les administrer par rapport aux séances d'irradiation. De plus, la conception des capsules peut jouer un rôle essentiel pour obtenir le meilleur traitement. Le concept de thérapie combinée peut se baser sur quatre stratégies différentes selon le choix des constituants et leur mode d'action.<sup>211</sup>

#### IV.3.a L'administration de médicaments multifonctionnels

Certains médicaments présentent des fonctionnalités qui apportent des effets supplémentaires à la chimiothérapie comme augmenter la radiosensibilisation, inhiber la réparation/synthèse ou induire des mutations de l'ADN des cellules malades, comme la doxorubicine DOX et le cisplatine (agents anti-cancéreux), pour conduire à la mort cellulaire.<sup>211,230,231</sup> Par ailleurs, le cisplatine a un autre mécanisme d'action présenté dans les travaux de Lu : il permet le transfert d'électrons générés par le rayonnement ionisant et provenant de la radiolyse de l'eau, entraînant une cytotoxicité plus élevée.<sup>232</sup>

L'encapsulation simple de médicaments chimiothérapeutiques hydrophobes comme le paclitaxel (PTX, un inhibiteur de la croissance des microtubules qui sont les piliers du cytosquelette de la cellule et sont nécessaires pour la croissance cellulaire) dans des micelles de polymères entraîne une suppression de la croissance tumorale bien meilleure que l'utilisation du médicament pur, lorsqu'il est associé à des radiations.<sup>233</sup>

Un autre exemple d'encapsulation est l'élaboration de capsules PEO-PCL chargées en un inhibiteur de la réparation de l'ADN (comme l'olaparib). Lorsqu'ils sont irradiés, ils agissent comme un radiosensibilisant, en stoppant la capacité des cellules à réparer les cassures de l'ADN.<sup>234</sup> En encapsulant ce radiosensibilisant, une bien meilleure réduction des tumeurs est obtenue par rapport à son administration sous sa forme native, car étant hydrophobes seules de faibles quantités atteignent la tumeur. Un autre type de capsules polymériques (poly( $\omega$ -pentadecalactone-co-p-dioxanone), ou poly(PDL-co-DO)), a permis la libération du médicament inhibiteur sur une période prolongée puisque la radiothérapie est normalement administrée sur plusieurs jours.<sup>235</sup> Ces capsules étaient suffisamment petites pour traverser le parenchyme cérébral. De plus, elles présentaient deux phases de libération dont une initiale rapide suivie d'une phase plus lente durant plus de 28 jours.

La co-encapsulation de médicaments avec un effet synergique est un aspect qui a été envisagé par Au *et al.*<sup>236</sup> Ils ont cherché à co-encapsuler deux inhibiteurs de l'ADN dont la wortmannine qui est un radiosensibilisant pouvant bloquer la réparation de l'ADN et le

docétaxel qui est un médicament anticancéreux et radiosensibilisant (arrêt de la croissance des cellules après irradiation) dans des nanocapsules de copolymères à blocs.<sup>211,236</sup> Leur but n'était pas de réaliser un co-traitement, mais de libérer la wortmannine plus rapidement pour agir en pré-traitement pour améliorer l'efficacité des radiations et des effets chimiothérapeutiques. Dans les tests *in vivo*, ils ont constaté que ces nanocapsules associées aux radiations ont permis un meilleur contrôle de la croissance tumorale avec une quasi complète rémission des souris présentant un cancer de la prostate.

L'irradiation associée à un médicament encapsulé endommagerait moins les tissus sains que l'utilisation des irradiations seules, puisque les médicaments qui améliorent les effets radiosensibilisants sont délivrés principalement dans les tumeurs.<sup>211,237,238</sup>

#### IV.3.b L'amélioration du ciblage ou de l'absorption tumorale par radiothérapie

Dans certains travaux, on observe que les rayonnements peuvent améliorer l'absorption des vecteurs médicamenteux ce qui influence l'efficacité du traitement.<sup>211</sup> Par exemple, Stapleton *et al.* ont expliqué leurs résultats par l'amélioration de la vascularisation de la tumeur après irradiation, impliquant une meilleure absorption des vecteurs.<sup>239</sup>

D'autres études ont utilisé le ciblage passif pour mettre en évidence ce type de stratégie. Par exemple, Yi *et al.* ont démontré l'effet des rayons X sur l'absorption de différents types de vecteurs dans les cellules (Figure 82), ainsi que leur efflux.<sup>240</sup> Ils ont observé que l'absorption des vecteurs était nettement améliorée après irradiation et qu'ils subissaient moins le rejet des cellules à l'extérieur après traitement. Ils ont étudié les mécanismes à l'origine de ces observations et en ont conclu que cela provenait d'une augmentation de l'expression d'une protéine (Caveolin-1), un médiateur de l'endocytose, impliquant une meilleure absorption des vecteurs. Par ailleurs, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré de meilleurs résultats thérapeutiques pour les traitements combinés (radiothérapie et chimiothérapie), par rapport au médicament libre, aux rayons X sans vecteurs, ainsi qu'aux vecteurs sans irradiation et sans médicament encapsulé.<sup>240</sup>

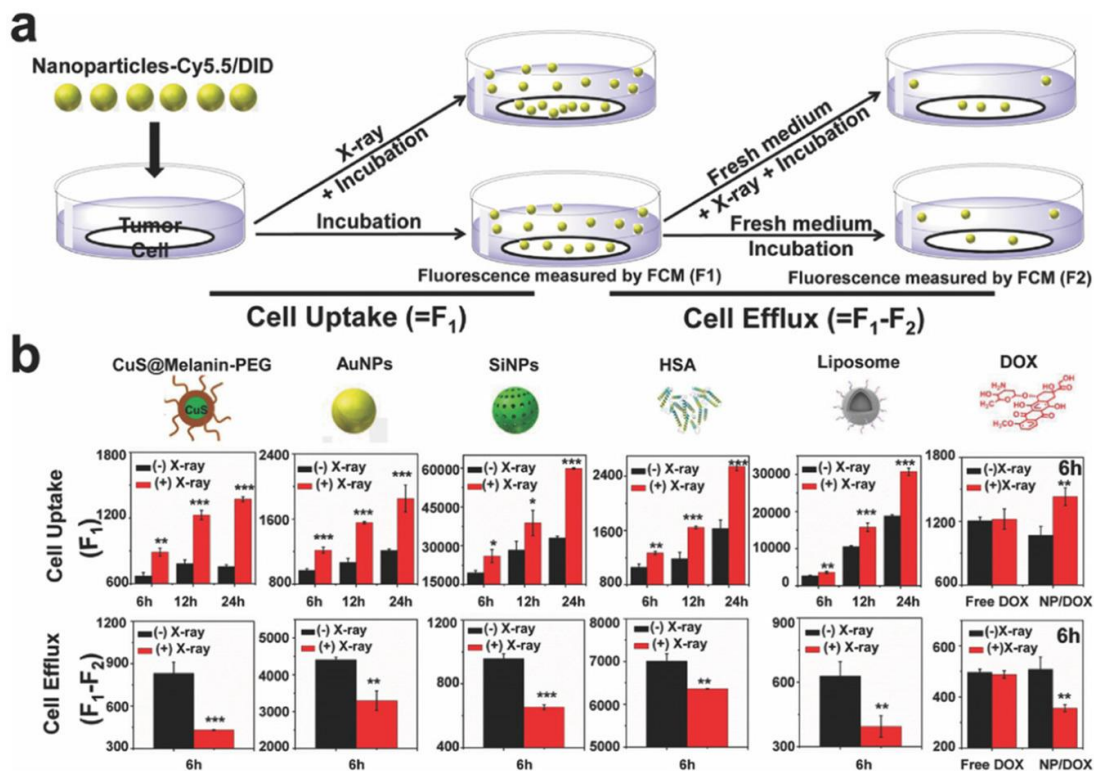


Figure 82 : a) Représentation schématique des expériences d'absorption cellulaire. Les cellules sont exposées à des rayonnements, puis leur absorption ou leur efflux de particules est mesuré. b) L'absorption et l'efflux de différents vecteurs (ou DOX libre) sont comparés pour des cellules exposées à des rayonnements ou non (+ ou - X-ray).<sup>240</sup>

Par ailleurs, il est important de souligner que la taille des capsules peut avoir des conséquences en termes de toxicité et d'efficacité d'absorption comme nous l'avons évoqué dans cette partie. En effet, Caster *et al.* ont étudié l'efficacité thérapeutique et la toxicité de leurs capsules de copolymères à bloc (mPEG-PLGA) contenant de la wortmannine.<sup>241</sup> Ils ont constaté que leurs capsules de taille moyenne de 100 nm présentaient une bonne absorption tumorale et une meilleure inhibition de la croissance tumorale que les capsules de 50 et 150 nm. Les plus petites capsules ont montré une absorption tumorale plus homogène. Néanmoins, elles présentaient un effet plus toxique sur les tissus sains puisqu'elles diffusaient plus facilement dans leurs vaisseaux sanguins plus perméables sous irradiation.<sup>211,242</sup>

#### IV.3.c L'amélioration de l'effet des rayonnements ionisants

Comme nous l'avons évoqué précédemment dans cette partie, les nanoparticules à Z élevé agissent comme des radiosensibilisants en augmentant le dépôt de la dose de rayonnement. Et l'un des matériaux les plus étudiés est l'or.

Le glioblastome est un cancer cérébral connu pour sa résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie et pour son risque élevé de réapparition, limitant l'espérance de vie des patients.<sup>211</sup> Setua *et al.* ont constaté cette résistance aux radiations, malgré l'utilisation de l'or comme radiosensibilisant.<sup>243</sup> Pour remédier à ce problème, ils ont conjugué du cisplatine à leurs vecteurs d'or. D'après les résultats *in vitro*, ils ont réussi à contourner la résistance à la chimiothérapie ou à la radiothérapie du glioblastome et ont amélioré la destruction cellulaire en combinant les effets du cisplatine et de l'or. Aussi, Fathy *et al.* ont observé que les

nanoparticules d'or coiffées de chitosan et encapsulant la doxorubicine étaient très efficaces pour tuer les cellules, même avec une faible dose de radiation (0,5 Gy).<sup>244</sup>

Par ailleurs, Li *et al.* ont formulé des nanogels thermosensibles contenant des vecteurs d'or avec de la doxorubicine.<sup>245</sup> Cette formulation en gel a permis de délivrer simultanément le médicament et les nanoparticules d'or dans les cellules tumorales, tout en les retenant plus efficacement au niveau de la tumeur, par rapport à la formulation en solution.

#### IV.3.d La libération contrôlée en utilisant les rayonnements ionisants comme déclencheur

Aujourd'hui, l'un des défis dans la chimiothérapie est la libération contrôlée uniquement au niveau de la tumeur pour préserver les tissus sains, et donc diminuer les effets secondaires. Cette libération peut être obtenue en utilisant les rayonnements ionisants comme déclencheur.<sup>211</sup> Par exemple, les études de Tanabe *et al.* ont développé des promédicaments antitumoraux pouvant s'activer sous rayons X, et donc devenir cytotoxique.<sup>246–248</sup> Cependant, la radiolyse du promédicament nécessite actuellement une dose de radiation trop élevée pour être appliquée aux cellules.

D'autres utilisent des NP à Z élevé pour interagir avec les rayonnements, entraînant la production indirecte de ROS qui peuvent détruire les liaisons chimiques.<sup>211</sup> Deng *et al.* ont élaboré des liposomes contenant des AuNP (taille ~ 3 à 5 nm) et un photosensibilisateur (verteporfin, VP).<sup>249</sup> Sous irradiation par rayons X, les AuNP ont généré des ROS qui ont alors oxydé la membrane lipidique des liposomes, conduisant à la libération du médicament. Ils ont aussi encapsulé la DOX pour vérifier la libération du médicament sous irradiation *in vivo*. Une régression significative des tumeurs par rapport aux témoins a été constatée.

## V Références bibliographiques

- (1) D’Addio, S. M.; Prud’homme, R. K. Controlling Drug Nanoparticle Formation by Rapid Precipitation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (6), 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.04.005>.
- (2) Martínez Rivas, C. J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q. A.; Galindo Rodríguez, S. A.; Román, R. Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation Process: From Encapsulation to Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532* (1), 66–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>.
- (3) Minost, A.; Delaveau, J.; Bolzinger, M.-A.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoparticles via Nanoprecipitation Process. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2012**, *6* (3), 250–258. <https://doi.org/10.2174/187221112802652615>.
- (4) LaMer, V. K.; Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72* (11), 4847–4854. <https://doi.org/10.1021/ja01167a001>.
- (5) LaMer, V. K. . Nucleation in Phase Transitions. **1952**, *44* (6).
- (6) Finney, E. E.; Finke, R. G. Nanocluster Nucleation and Growth Kinetic and Mechanistic Studies: A Review Emphasizing Transition-Metal Nanoclusters. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *317* (2), 351–374. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.05.092>.
- (7) Joye, I. J.; McClements, D. J. Production of Nanoparticles by Anti-Solvent Precipitation for Use in Food Systems. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *34* (2), 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.002>.
- (8) Kakran, M.; Sahoo, N. G.; Tan, I.-L.; Li, L. Preparation of Nanoparticles of Poorly Water-Soluble Antioxidant Curcumin by Antisolvent Precipitation Methods. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14* (3), 757. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0757-0>.
- (9) Lepeltier, E.; Bourgaux, C.; Couvreur, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo Effect”: Application to Drug Delivery Devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *71*, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.009>.
- (10) Thanh, N. T. K.; Maclean, N.; Mahiddine, S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (15), 7610–7630. <https://doi.org/10.1021/cr400544s>.
- (11) Saad, W. S.; Prud’homme, R. K. Principles of Nanoparticle Formation by Flash Nanoprecipitation. *Nano Today* **2016**, *11* (2), 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.04.006>.
- (12) Sugimoto, T. Formation of Monodispersed Nano- and Micro-Particles Controlled in Size, Shape, and Internal Structure. *Chem. Eng. Technol.* **2003**, *26* (3), 313–321. <https://doi.org/10.1002/ceat.200390048>.
- (13) Aubry, J.; Ganachaud, F.; Cohen Addad, J.-P.; Cabane, B. Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting:1. Boundaries. *Langmuir* **2009**, *25* (4), 1970–1979. <https://doi.org/10.1021/la803000e>.
- (14) Lachin, K.; Le Sauze, N.; Di Miceli Raimondi, N.; Aubin, J.; Cabassud, M.; Gourdon, C. Estimation of Characteristic Coagulation Time Based on Brownian Coagulation Theory and Stability Ratio Modeling Using Electrokinetic Measurements. *Chem. Eng. J.* **2019**, *369*, 818–827. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.130>.
- (15) Matteucci, M. E.; Hotze, M. A.; Johnston, K. P.; Williams, R. O. Drug Nanoparticles by Antisolvent Precipitation: Mixing Energy versus Surfactant Stabilization. *Langmuir* **2006**, *22* (21), 8951–8959. <https://doi.org/10.1021/la061122t>.

- (16) Scholten, E.; van der Linden, E.; This, H. The Life of an Anise-Flavored Alcoholic Beverage: Does Its Stability Cloud or Confirm Theory? *Langmuir* **2008**, *24* (5), 1701–1706. <https://doi.org/10.1021/la702186g>.
- (17) Sitnikova, N. L.; Sprik, R.; Wegdam, G.; Eiser, E. Spontaneously Formed *Trans* - Anethol/Water/Alcohol Emulsions: Mechanism of Formation and Stability. *Langmuir* **2005**, *21* (16), 7083–7089. <https://doi.org/10.1021/la046816l>.
- (18) Nazarzadeh, E.; Anthonypillai, T.; Sajjadi, S. On the Growth Mechanisms of Nanoemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *397*, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.12.018>.
- (19) Liu, Y.; Kathan, K.; Saad, W.; Prud'homme, R. K. Ostwald Ripening of  $\beta$  -Carotene Nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98* (3), 036102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.036102>.
- (20) Barreras-Urbina, C. G.; Ramírez-Wong, B.; López-Ahumada, G. A.; Burruel-Ibarra, S. E.; Martínez-Cruz, O.; Tapia-Hernández, J. A.; Rodríguez Félix, F. Nano- and Micro-Particles by Nanoprecipitation: Possible Application in the Food and Agricultural Industries. *Int. J. Food Prop.* **2016**, *19* (9), 1912–1923. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1089279>.
- (21) Fessi, H. C.; Devissaguet, J.-P.; Puisieux, F.; Thies, C. Process for the Preparation of Dispersible Colloidal Systems of a Substance in the Form of Nanoparticles. 5 118 528.
- (22) Beck-Broichsitter, M.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Solvent Selection Causes Remarkable Shifts of the “Ouzo Region” for Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation. *Nanoscale* **2015**, *7* (20), 9215–9221. <https://doi.org/10.1039/C5NR01695A>.
- (23) Iván Martínez-Muñoz, O.; Elizabeth Mora-Huertas, C. Nanoprecipitation Technology to Prepare Carrier Systems of Interest in Pharmaceutics: An Overview of Patenting. *Int. J. Pharm.* **2022**, *614*, 121440. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121440>.
- (24) Miladi, K.; Sfar, S.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. In *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*; Vauthier, C., Ponchel, G., Eds.; Springer International Publishing: Cham, **2016**; pp 17–53. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41421-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41421-8_2).
- (25) Solans, C.; Morales, D.; Homs, M. Spontaneous Emulsification. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2016**, *22*, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.03.002>.
- (26) Galindo-Rodriguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharm. Res.* **2004**, *21* (8), 1428–1439. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036917.75634.be>.
- (27) Pinto Reis, C.; Neufeld, R. J.; Ribeiro, A. J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2006**, *2* (1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>.
- (28) Al Khouri Fallouh, N.; Roblot-Treupel, L.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. Development of a New Process for the Manufacture of Polyisobutylcyanoacrylate Nanocapsules. *Int. J. Pharm.* **1986**, *28* (2–3), 125–132. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(86\)90236-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(86)90236-X).
- (29) Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. Ph.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55* (1), R1–R4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0).
- (30) Iván Martínez-Muñoz, O.; Fernando Ospina-Giraldo, L.; Elizabeth Mora-Huertas, C. Nanoprecipitation: Applications for Entrapping Active Molecules of Interest in Pharmaceutics. In *Nano- and Microencapsulation - Techniques and Applications* **2021**, N., Ed.; IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93338>.
- (31) Cholakova, D.; Vinarov, Z.; Tcholakova, S.; Denkov, N. D. Self-Emulsification in Chemical and Pharmaceutical Technologies. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2022**, *59*, 101576. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2022.101576>.

- (32) Prévost, S.; Krickl, S.; Marčelja, S.; Kunz, W.; Zemb, T.; Grillo, I. Spontaneous Ouzo Emulsions Coexist with Pre-Ouzo Ultraflexible Microemulsions. *Langmuir* **2021**, *37* (13), 3817–3827. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02935>.
- (33) Ruschak, K. J.; Miller, C. A. Spontaneous Emulsification in Ternary Systems with Mass Transfer. *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **1972**, *11* (4), 534–540. <https://doi.org/10.1021/i160044a017>.
- (34) Vitale, S. A.; Katz, J. L. Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid–Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect.” *Langmuir* **2003**, *19* (10), 4105–4110. <https://doi.org/10.1021/la026842o>.
- (35) Anton, N.; Vandamme, T. F. Nano-Emulsions and Micro-Emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (5), 978–985. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>.
- (36) Roger, K.; Botet, R.; Cabane, B. Coalescence of Repelling Colloidal Droplets: A Route to Monodisperse Populations. *Langmuir* **2013**, *29* (19), 5689–5700. <https://doi.org/10.1021/la400498j>.
- (37) Botet, R.; Roger, K. How Do Interactions Control Droplet Size during Nanoprecipitation? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2016**, *22*, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.03.003>.
- (38) Yan, X.; Delgado, M.; Aubry, J.; Gribelin, O.; Stocco, A.; Boisson-Da Cruz, F.; Bernard, J.; Ganachaud, F. Central Role of Bicarbonate Anions in Charging Water/Hydrophobic Interfaces. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (1), 96–103. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.7b02993>.
- (39) Roger, K.; Eissa, M.; Elaissari, A.; Cabane, B. Surface Charge of Polymer Particles in Water: The Role of Ionic End-Groups. *Langmuir* **2013**, *29* (36), 11244–11250. <https://doi.org/10.1021/la4019053>.
- (40) Ganachaud, F.; Katz, J. L. Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices. *ChemPhysChem* **2005**, *6* (2), 209–216. <https://doi.org/10.1002/cphc.200400527>.
- (41) Yu, W.; do Egito, E. S. T.; Barratt, G.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. A Novel Approach to the Preparation of Injectable Emulsions by a Spontaneous Emulsification Process. *Int. J. Pharm.* **1993**, *89* (2), 139–146. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90115-V](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90115-V).
- (42) Pucci, C.; Cousin, F.; Dole, F.; Chapel, J.-P.; Schatz, C. Impact of the Formulation Pathway on the Colloidal State and Crystallinity of Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Particles Prepared by Solvent Displacement. *Langmuir* **2018**, *34* (7), 2531–2542. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04198>.
- (43) Chiappisi, L.; Grillo, I. Looking into Limoncello: The Structure of the Italian Liquor Revealed by Small-Angle Neutron Scattering. *ACS Omega* **2018**, *3* (11), 15407–15415. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01858>.
- (44) Lohse, D.; Zhang, X. Surface Nanobubbles and Nanodroplets. *Rev. Mod. Phys.* **2015**, *87* (3), 981–1035. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.87.981>.
- (45) Grillo, I. Small-Angle Neutron Scattering Study of a World-Wide Known Emulsion: Le Pastic. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *225* (1–3), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00331-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00331-5).
- (46) Carteau, D.; Bassani, D.; Pianet, I. The “Ouzo Effect”: Following the Spontaneous Emulsification of Trans-Anethole in Water by NMR. *Comptes Rendus Chim.* **2008**, *11* (4–5), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2007.11.003>.
- (47) Tehrani-Bagha, A. R.; Viladot, A.; Holmberg, K.; Nordstierna, L. An Ouzo Emulsion of Toluene in Water Characterized by NMR Diffusometry and Static Multiple Light Scattering. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, *494*, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.01.008>.
- (48) Bozeya, A.; Al-Bawab, A.; Friberg, S. E.; Miller, C. A. Spontaneous Emulsification and Phase Equilibria in the System Water, Ethanol, and Benzene. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2013**, *34* (10), 1429–1436. <https://doi.org/10.1080/01932691.2012.743363>.



- (49) Li, Z.; Cheng, H.; Li, J.; Hao, J.; Zhang, L.; Hammouda, B.; Han, C. C. Large-Scale Structures in Tetrahydrofuran–Water Mixture with a Trace Amount of Antioxidant Butylhydroxytoluene (BHT). *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (24), 7887–7895. <https://doi.org/10.1021/jp203777g>.
- (50) Goubault, C.; Igllicki, D.; Swain, R. A.; McVey, B. F. P.; Lefevre, B.; Rault, L.; Nayral, C.; Delpech, F.; Kahn, M. L.; Chevance, S.; Gauffre, F. Effect of Nanoparticles on Spontaneous Ouzo Emulsification. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *603*, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.06.104>.
- (51) Yan, X.; Delgado, M.; Fu, A.; Alcouffe, P.; Gouin, S. G.; Fleury, E.; Katz, J. L.; Ganachaud, F.; Bernard, J. Simple but Precise Engineering of Functional Nanocapsules through Nanoprecipitation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (27), 6910–6913. <https://doi.org/10.1002/anie.201402825>.
- (52) Trevisan, H.; Nishimori, K.; Aime, S.; Guigner, J.-M.; Ouchi, M.; Tournilhac, F. Ouzo Phase Occurrence with Alternating Lipo/Hydrophilic Copolymers in Water. *Soft Matter* **2021**, *17* (31), 7384–7395. <https://doi.org/10.1039/D1SM00575H>.
- (53) Schöttl, S.; Lopian, T.; Prévost, S.; Touraud, D.; Grillo, I.; Diat, O.; Zemb, T.; Horinek, D. Combined Molecular Dynamics (MD) and Small Angle Scattering (SAS) Analysis of Organization on a Nanometer-Scale in Ternary Solvent Solutions Containing a Hydrotrope. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *540*, 623–633. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.01.037>.
- (54) Califano, F.; Mauri, R. Retardation of the Phase Segregation of Liquid Mixtures with a Critical Point of Miscibility. *AIChE J.* **2018**, *64* (11), 4047–4052. <https://doi.org/10.1002/aic.16213>.
- (55) Puri, S.; Kallinteri, P.; Higgins, S.; Hutcheon, G. A.; Garnett, M. C. Drug Incorporation and Release of Water Soluble Drugs from Novel Functionalised Poly(Glycerol Adipate) Nanoparticles. *J. Controlled Release* **2008**, *125* (1), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.009>.
- (56) Klossek, M. L.; Touraud, D.; Kunz, W. Eco-Solvents – Cluster-Formation, Surfactantless Microemulsions and Facilitated Hydrotropy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (26), 10971. <https://doi.org/10.1039/c3cp50636c>.
- (57) Smith, G. D.; Donelan, C. E.; Barden, R. E. Oil-Continuous Microemulsions Composed of Hexane, Water, and 2-Propanol. *J. Colloid Interface Sci.* **1977**, *60* (3), 488–496. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(77\)90313-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(77)90313-7).
- (58) Yan, X.; Alcouffe, P.; Sudre, G.; David, L.; Bernard, J.; Ganachaud, F. Modular Construction of Single-Component Polymer Nanocapsules through a One-Step Surfactant-Free Microemulsion Templated Synthesis. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (8), 1401–1404. <https://doi.org/10.1039/C6CC09701D>.
- (59) Fischer, V.; Marcus, J.; Touraud, D.; Diat, O.; Kunz, W. Toward Surfactant-Free and Water-Free Microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *453*, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.069>.
- (60) Hou, W.; Xu, J. Surfactant-Free Microemulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2016**, *25*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.06.013>.
- (61) Lucia, A.; Argudo, P. G.; Guzmán, E.; Rubio, R. G.; Ortega, F. Formation of Surfactant Free Microemulsions in the Ternary System Water/Eugenol/Ethanol. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *521*, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.04.062>.
- (62) Li, M.; Yi, L.; Sun, C. Spontaneously Formed Multiscale Nano-Domains in Monophasic Region of Ternary Solution. *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *628*, 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.07.152>.
- (63) Blahnik, J.; Müller, E.; Braun, L.; Denk, P.; Kunz, W. Nanoscopic Microheterogeneities or Pseudo-Phase Separations in Non-Conventional Liquids. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2022**, *57*, 101535. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101535>.
- (64) Zemb, T. N.; Klossek, M.; Lopian, T.; Marcus, J.; Schöttl, S.; Horinek, D.; Prévost, S. F.; Touraud, D.; Diat, O.; Marčelja, S.; Kunz, W. How to Explain Microemulsions Formed by Solvent Mixtures

- without Conventional Surfactants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113* (16), 4260–4265. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515708113>.
- (65) Diat, O.; Klossek, M. L.; Touraud, D.; Deme, B.; Grillo, I.; Kunz, W.; Zemb, T. Octanol-Rich and Water-Rich Domains in Dynamic Equilibrium in the Pre-Ouzo Region of Ternary Systems Containing a Hydrotrope. *J. Appl. Crystallogr.* **2013**, *46* (6), 1665–1669. <https://doi.org/10.1107/S002188981302606X>.
- (66) Hahn, M.; Krickl, S.; Buchecker, T.; Jošt, G.; Touraud, D.; Bauduin, P.; Pfitzner, A.; Klamt, A.; Kunz, W. *Ab Initio* Prediction of Structuring/Mesoscale Inhomogeneities in Surfactant-Free Microemulsions and Hydrogen-Bonding-Free Microemulsions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21* (15), 8054–8066. <https://doi.org/10.1039/C8CP07544A>.
- (67) Buchecker, T.; Krickl, S.; Winkler, R.; Grillo, I.; Bauduin, P.; Touraud, D.; Pfitzner, A.; Kunz, W. The Impact of the Structuring of Hydrotropes in Water on the Mesoscale Solubilisation of a Third Hydrophobic Component. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (3), 1806–1816. <https://doi.org/10.1039/C6CP06696H>.
- (68) Klossek, M. L.; Touraud, D.; Zemb, T.; Kunz, W. Structure and Solubility in Surfactant-Free Microemulsions. *ChemPhysChem* **2012**, *13* (18), 4116–4119. <https://doi.org/10.1002/cphc.201200667>.
- (69) Liu, Y.; Xu, J.; Deng, H.; Song, J.; Hou, W. A Surfactant-Free Microemulsion Composed of Isopentyl Acetate, *n*-Propanol, and Water. *RSC Adv.* **2018**, *8* (3), 1371–1377. <https://doi.org/10.1039/C7RA12594A>.
- (70) Prevost, S.; Lopian, T.; Pleines, M.; Diat, O.; Zemb, T. Small-Angle Scattering and Morphologies of Ultra-Flexible Microemulsions. *J. Appl. Crystallogr.* **2016**, *49* (6), 2063–2072. <https://doi.org/10.1107/S1600576716016150>.
- (71) Lopian, T.; Schöttl, S.; Prévost, S.; Pellet-Rostaing, S.; Horinek, D.; Kunz, W.; Zemb, T. Morphologies Observed in Ultraflexible Microemulsions with and without the Presence of a Strong Acid. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2* (7), 467–475. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.6b00116>.
- (72) Marinova, K. G.; Alargova, R. G.; Denkov, N. D.; Velev, O. D.; Petsev, D. N.; Ivanov, I. B.; Borwankar, R. P. Charging of Oil–Water Interfaces Due to Spontaneous Adsorption of Hydroxyl Ions. *Langmuir* **1996**, *12* (8), 2045–2051. <https://doi.org/10.1021/la950928i>.
- (73) Marcus, J.; Müller, M.; Nistler, J.; Touraud, D.; Kunz, W. Nano-Droplet Formation in Water/Ethanol or Isopropanol/Mosquito Repellent Formulations. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *458*, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.11.030>.
- (74) Marcus, J.; Klossek, M. L.; Touraud, D.; Kunz, W. Nano-Droplet Formation in Fragrance Tinctures: Nano-Droplet Formation in Fragrance Tinctures. *Flavour Fragr. J.* **2013**, *28* (5), 294–299. <https://doi.org/10.1002/ffj.3172>.
- (75) Tchakalova, V.; Zemb, Th.; Benczedi, D. Evaporation Triggered Self-Assembly in Aqueous Fragrance–Ethanol Mixtures and Its Impact on Fragrance Performance. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *460*, 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.01.011>.
- (76) Huber, V.; Muller, L.; Degot, P.; Touraud, D.; Kunz, W. NADES-Based Surfactant-Free Microemulsions for Solubilization and Extraction of Curcumin from Curcuma Longa. *Food Chem.* **2021**, *355*, 129624. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129624>.
- (77) Roger, K.; Cabane, B. Why Are Hydrophobic/Water Interfaces Negatively Charged? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (23), 5625–5628. <https://doi.org/10.1002/anie.201108228>.
- (78) Roger, K.; Cabane, B. Uncontaminated Hydrophobic/Water Interfaces Are Uncharged: A Reply. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (52), 12943–12945. <https://doi.org/10.1002/anie.201207114>.
- (79) Taarji, N.; Bouhoute, M.; Kobayashi, I.; Tominaga, K.; Isoda, H.; Nakajima, M. Preparation and Characterization of Concentrated  $\gamma$ -Oryzanol Nanodispersions by Solvent Displacement Method: Effect of Processing Conditions on Nanoparticles Formation. *Food Hydrocoll.* **2022**, *123*, 107161. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107161>.

- (80) Wu, Y.; Li, Q.; Deng, F.; Liang, X.; Liu, H. Solvent Effect on  $\zeta$  Potential at an Aqueous/Oil Interface in Surfactant-Free Emulsion. *Langmuir* **2014**, *30* (8), 1926–1931. <https://doi.org/10.1021/la403900e>.
- (81) Ma, A.; Xu, J.; Xu, H. Impact of Spontaneously Adsorbed Hydroxide Ions on Emulsification via Solvent Shifting. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (40), 23175–23180. <https://doi.org/10.1021/jp5076109>.
- (82) Poli, E.; Jong, K. H.; Hassanali, A. Charge Transfer as a Ubiquitous Mechanism in Determining the Negative Charge at Hydrophobic Interfaces. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 901. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14659-5>.
- (83) Liu, Y.; Yang, G.; Baby, T.; Tengjisi; Chen, D.; Weitz, D. A.; Zhao, C. Stable Polymer Nanoparticles with Exceptionally High Drug Loading by Sequential Nanoprecipitation. *Angew. Chem.* **2020**, *132* (12), 4750–4758. <https://doi.org/10.1002/ange.201913539>.
- (84) Abushrida, A.; Elhuni, I.; Taresco, V.; Marciani, L.; Stolnik, S.; Garnett, M. C. A Simple and Efficient Method for Polymer Coating of Iron Oxide Nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *55*, 101460. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101460>.
- (85) Liu, D.; Zhang, H.; Cito, S.; Fan, J.; Mäkilä, E.; Salonen, J.; Hirvonen, J.; Sikanen, T. M.; Weitz, D. A.; Santos, H. A. Core/Shell Nanocomposites Produced by Superfast Sequential Microfluidic Nanoprecipitation. *Nano Lett.* **2017**, *17* (2), 606–614. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b03251>.
- (86) Pustulka, K. M.; Wohl, A. R.; Lee, H. S.; Michel, A. R.; Han, J.; Hoyer, T. R.; McCormick, A. V.; Panyam, J.; Macosko, C. W. Flash Nanoprecipitation: Particle Structure and Stability. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (11), 4367–4377. <https://doi.org/10.1021/mp400337f>.
- (87) Ding, S.; Anton, N.; Vandamme, T. F.; Serra, C. A. Microfluidic Nanoprecipitation Systems for Preparing Pure Drug or Polymeric Drug Loaded Nanoparticles: An Overview. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13* (10), 1447–1460. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1193151>.
- (88) Bramosanti, M.; Chronopoulou, L.; Grillo, F.; Valletta, A.; Palocci, C. Microfluidic-Assisted Nanoprecipitation of Antiviral-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *532*, 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.062>.
- (89) Tao, J.; Chow, S. F.; Zheng, Y. Application of Flash Nanoprecipitation to Fabricate Poorly Water-Soluble Drug Nanoparticles. *Acta Pharm. Sin. B* **2019**, *9* (1), 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.11.001>.
- (90) Liu, Y.; Yang, G.; Jin, S.; Xu, L.; Zhao, C. Development of High-Drug-Loading Nanoparticles. *ChemPlusChem* **2020**, *85* (9), 2143–2157. <https://doi.org/10.1002/cplu.202000496>.
- (91) Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Influence of Process and Formulation Parameters on the Formation of Submicron Particles by Solvent Displacement and Emulsification–Diffusion Methods. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *163* (2), 90–122. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.02.005>.
- (92) de Oliveira, A. M.; Jäger, E.; Jäger, A.; Stepánek, P.; Giacomelli, F. C. Physicochemical Aspects behind the Size of Biodegradable Polymeric Nanoparticles: A Step Forward. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *436*, 1092–1102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.08.056>.
- (93) Manisekaran, A.; Grysan, P.; Duez, B.; Schmidt, D. F.; Lenoble, D.; Thomann, J.-S. Solvents Drive Self-Assembly Mechanisms and Inherent Properties of Kraft Lignin Nanoparticles (<50 Nm). *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *626*, 178–192. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.06.089>.
- (94) Lara, J.; Zimmermann, F.; Drolet, D.; Hansen, C. M.; Chollot, A.; Monta, N. The Use of the Hansen Solubility Parameters in the Selection of Protective Polymeric Materials Resistant to Chemicals. *Int. J. Curr. Res.* **2017**, *9* (3), 47860–47867.
- (95) Beck-Broichsitter, M. Stability-Limit “Ouzo Region” Boundaries for Poly(Lactide- Co -Glycolide) Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511* (1), 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.010>.

- (96) Miladi, K.; Sfar, S.; Fessi, H.; Elaissari, A. Encapsulation of Alendronate Sodium by Nanoprecipitation and Double Emulsion: From Preparation to in Vitro Studies. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *72*, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.079>.
- (97) Legrand, P.; Lesieur, S.; Bochot, A.; Gref, R.; Raatjes, W.; Barratt, G.; Vauthier, C. Influence of Polymer Behaviour in Organic Solution on the Production of Polylactide Nanoparticles by Nanoprecipitation. *Int. J. Pharm.* **2007**, *344* (1–2), 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.054>.
- (98) Seremeta, K. P.; Chiappetta, D. A.; Sosnik, A. Poly( $\epsilon$ -Caprolactone), Eudragit® RS 100 and Poly( $\epsilon$ -Caprolactone)/Eudragit® RS 100 Blend Submicron Particles for the Sustained Release of the Antiretroviral Efavirenz. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *102*, 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.038>.
- (99) Beck-Broichsitter, M.; Rytting, E.; Lehardt, T.; Wang, X.; Kissel, T. Preparation of Nanoparticles by Solvent Displacement for Drug Delivery: A Shift in the “Ouzo Region” upon Drug Loading. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41* (2), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.06.007>.
- (100) Cheng, J.; Teply, B.; Sherifi, I.; Sung, J.; Luther, G.; Gu, F.; Levynissenbaum, E.; Radovicmoreno, A.; Langer, R.; Farokhzad, O. Formulation of Functionalized PLGA–PEG Nanoparticles for in Vivo Targeted Drug Delivery. *Biomaterials* **2007**, *28* (5), 869–876. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.047>.
- (101) Lince, F.; Marchisio, D. L.; Barresi, A. A. Strategies to Control the Particle Size Distribution of Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Nanoparticles for Pharmaceutical Applications. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *322* (2), 505–515. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.03.033>.
- (102) Aschenbrenner, E.; Bley, K.; Koynov, K.; Makowski, M.; Kappl, M.; Landfester, K.; Weiss, C. K. Using the Polymeric Ouzo Effect for the Preparation of Polysaccharide-Based Nanoparticles. *Langmuir* **2013**, *29* (28), 8845–8855. <https://doi.org/10.1021/la4017867>.
- (103) Schubert, M. Solvent Injection as a New Approach for Manufacturing Lipid Nanoparticles – Evaluation of the Method and Process Parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, *55* (1), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00130-3).
- (104) Göttert, S.; Salomatov, I.; Eder, S.; Seyfang, B. C.; Sotelo, D. C.; Osma, J. F.; Weiss, C. K. Continuous Nanoprecipitation of Polycaprolactone in Additively Manufactured Micromixers. *Polymers* **2022**, *14* (8), 1509. <https://doi.org/10.3390/polym14081509>.
- (105) D’Addio, S. M.; Prud’homme, R. K. Controlling Drug Nanoparticle Formation by Rapid Precipitation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (6), 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.04.005>.
- (106) Johnson, B. K.; Prud’homme, R. K. Mechanism for Rapid Self-Assembly of Block Copolymer Nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91* (11), 118302. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.91.118302>.
- (107) Arditty, S.; Whitby, C. P.; Binks, B. P.; Schmitt, V.; Leal-Calderon, F. Some General Features of Limited Coalescence in Solid-Stabilized Emulsions. *Eur. Phys. J. E* **2003**, *11* (3), 273–281. <https://doi.org/10.1140/epje/i2003-10018-6>.
- (108) Zhang, Y.; Chen, X.; Liu, X. Temperature-Induced Reversible-Phase Transition in a Surfactant-Free Microemulsion. *Langmuir* **2019**, *35* (44), 14358–14363. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02842>.
- (109) Vauthier, C.; Bouchemal, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (5), 1025–1058. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>.
- (110) Khayata, N.; Abdelwahed, W.; Chehna, M. F.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation of Vitamin E Loaded Nanocapsules by the Nanoprecipitation Method: From Laboratory Scale to Large Scale Using a Membrane Contactor. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423* (2), 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.016>.

- (111) Yan, X.; Ramos, R.; Hoibian, E.; Soulage, C.; Alcouffe, P.; Ganachaud, F.; Bernard, J. Nanoprecipitation of PHPMA (Co)Polymers into Nanocapsules Displaying Tunable Compositions, Dimensions, and Surface Properties. *ACS Macro Lett.* **2017**, *6* (4), 447–451. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.7b00094>.
- (112) Yan, X.; Ramos, R. A. N. S.; Alcouffe, P.; Munoz, L. E.; Bilyy, R. O.; Ganachaud, F.; Bernard, J. Programmable Hierarchical Construction of Mixed/Multilayered Polysaccharide Nanocapsules through Simultaneous/Sequential Nanoprecipitation Steps. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (10), 3915–3923. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00990>.
- (113) Yan, X.; Alcouffe, P.; Bernard, J.; Ganachaud, F. Functional Hybrid Glyconanocapsules by a One-Pot Nanoprecipitation Process. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (11), 4591–4598. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00697>.
- (114) Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *385* (1–2), 113–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>.
- (115) Yan, X.; Bernard, J.; Ganachaud, F. Nanoprecipitation as a Simple and Straightforward Process to Create Complex Polymeric Colloidal Morphologies. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2021**, *294*, 102474. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102474>.
- (116) Chambon, S.; Schatz, C.; Sébire, V.; Pavageau, B.; Wantz, G.; Hirsch, L. Organic Semiconductor Core–Shell Nanoparticles Designed through Successive Solvent Displacements. *Mater Horiz* **2014**, *1* (4), 431–438. <https://doi.org/10.1039/C4MH00021H>.
- (117) Baby, T.; Liu, Y.; Yang, G.; Chen, D.; Zhao, C.-X. Microfluidic Synthesis of Curcumin Loaded Polymer Nanoparticles with Tunable Drug Loading and PH-Triggered Release. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *594*, 474–484. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.03.035>.
- (118) Shen, G.; Xing, R.; Zhang, N.; Chen, C.; Ma, G.; Yan, X. Interfacial Cohesion and Assembly of Bioadhesive Molecules for Design of Long-Term Stable Hydrophobic Nanodrugs toward Effective Anticancer Therapy. *ACS Nano* **2016**, *10* (6), 5720–5729. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07276>.
- (119) Mahdavi, Z.; Rezvani, H.; Keshavarz Moraveji, M. Core–Shell Nanoparticles Used in Drug Delivery-Microfluidics: A Review. *RSC Adv.* **2020**, *10* (31), 18280–18295. <https://doi.org/10.1039/D0RA01032D>.
- (120) Vu, K. B.; Phung, T. K.; Tran, T. T. T.; Mugemana, C.; Giang, H. N.; Nhi, T. L. P. Polystyrene Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation: A Recyclable Template for Fabricating Hollow Silica. *J. Ind. Eng. Chem.* **2021**, *97*, 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.02.010>.
- (121) Sciortino, F.; Casterou, G.; Eliat, P.-A.; Troadec, M.-B.; Gaillard, C.; Chevance, S.; Kahn, M. L.; Gauffre, F. Simple Engineering of Polymer-Nanoparticle Hybrid Nanocapsules. *ChemNanoMat* **2016**, *2* (8), 796–799. <https://doi.org/10.1002/cnma.201600155>.
- (122) Sciortino, F.; Rydzek, G.; Grasset, F.; Kahn, M. L.; Hill, J. P.; Chevance, S.; Gauffre, F.; Ariga, K. Electro-Click Construction of Hybrid Nanocapsule Films with Triggered Delivery Properties. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (4), 2761–2770. <https://doi.org/10.1039/C7CP07506E>.
- (123) Sciortino, F.; Thivolle, M.; Kahn, M. L.; Gaillard, C.; Chevance, S.; Gauffre, F. Structure and Elasticity of Composite Nanoparticle/Polymer Nanoshells (Hybridosomes®). *Soft Matter* **2017**, *13* (24), 4393–4400. <https://doi.org/10.1039/C7SM00705A>.
- (124) Sciortino, F.; Cuny, J.; Grasset, F.; Lagrost, C.; Lemoine, P.; Moréac, A.; Molard, Y.; Takei, T.; Cordier, S.; Chevance, S.; Gauffre, F. The Ouzo Effect to Selectively Assemble Molybdenum Clusters into Nanomarbles or Nanocapsules with Increased HER Activity. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (95), 13387–13390. <https://doi.org/10.1039/C8CC07402J>.
- (125) Yan, X.; Sivignon, A.; Alcouffe, P.; Burdin, B.; Favre-Bonté, S.; Bilyy, R.; Barnich, N.; Fleury, E.; Ganachaud, F.; Bernard, J. Brilliant Glyconanocapsules for Trapping of Bacteria. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (67), 13193–13196. <https://doi.org/10.1039/C5CC04653J>.

- (126) Anton, N.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P. Design and Production of Nanoparticles Formulated from Nano-Emulsion Templates—A Review. *J. Controlled Release* **2008**, *128* (3), 185–199. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>.
- (127) Sedláč, M. Large-Scale Supramolecular Structure in Solutions of Low Molar Mass Compounds and Mixtures of Liquids: I. Light Scattering Characterization. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (9), 4329–4338. <https://doi.org/10.1021/jp0569335>.
- (128) Sedláč, M. Large-Scale Supramolecular Structure in Solutions of Low Molar Mass Compounds and Mixtures of Liquids: II. Kinetics of the Formation and Long-Time Stability. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (9), 4339–4345. <https://doi.org/10.1021/jp056934x>.
- (129) Sedláč, M. Large-Scale Supramolecular Structure in Solutions of Low Molar Mass Compounds and Mixtures of Liquids. III. Correlation with Molecular Properties and Interactions. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (28), 13976–13984. <https://doi.org/10.1021/jp061919t>.
- (130) Goubault, C.; Sciortino, F.; Mongin, O.; Jarry, U.; Bostoën, M.; Jakobczyk, H.; Burel, A.; Dutertre, S.; Troadec, M.-B.; Kahn, M. L.; Chevance, S.; Gauffre, F. The Ouzo Effect: A Tool to Elaborate High-Payload Nanocapsules. *J. Controlled Release* **2020**, *324*, 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.023>.
- (131) Katouzian, I.; Jafari, S. M. Nano-Encapsulation as a Promising Approach for Targeted Delivery and Controlled Release of Vitamins. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 34–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.002>.
- (132) Yang, S.; Liu, L.; Han, J.; Tang, Y. Encapsulating Plant Ingredients for Dermocosmetic Application: An Updated Review of Delivery Systems and Characterization Techniques. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2020**, *42* (1), 16–28. <https://doi.org/10.1111/ics.12592>.
- (133) Stuart, M. C. A.; Boekema, E. J. Two Distinct Mechanisms of Vesicle-to-Micelle and Micelle-to-Vesicle Transition Are Mediated by the Packing Parameter of Phospholipid–Detergent Systems. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2007**, *1768* (11), 2681–2689. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.024>.
- (134) Gong, C.; Wu, Q.; Wang, Y.; Zhang, D.; Luo, F.; Zhao, X.; Wei, Y.; Qian, Z. A Biodegradable Hydrogel System Containing Curcumin Encapsulated in Micelles for Cutaneous Wound Healing. *Biomaterials* **2013**, *34* (27), 6377–6387. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.005>.
- (135) Wais, U.; Jackson, A. W.; He, T.; Zhang, H. Nanoformulation and Encapsulation Approaches for Poorly Water-Soluble Drug Nanoparticles. *Nanoscale* **2016**, *8* (4), 1746–1769. <https://doi.org/10.1039/C5NR07161E>.
- (136) Bae, Y.; Fukushima, S.; Harada, A.; Kataoka, K. Design of Environment-Sensitive Supramolecular Assemblies for Intracellular Drug Delivery: Polymeric Micelles That Are Responsive to Intracellular PH Change. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (38), 4640–4643. <https://doi.org/10.1002/anie.200250653>.
- (137) Bae, Y.; Nishiyama, N.; Fukushima, S.; Koyama, H.; Yasuhiro, M.; Kataoka, K. Preparation and Biological Characterization of Polymeric Micelle Drug Carriers with Intracellular PH-Triggered Drug Release Property: Tumor Permeability, Controlled Subcellular Drug Distribution, and Enhanced in Vivo Antitumor Efficacy. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16* (1), 122–130. <https://doi.org/10.1021/bc0498166>.
- (138) Gauthier, G.; Capron, I. Pickering Nanoemulsions: An Overview of Manufacturing Processes, Formulations, and Applications. *JCIS Open* **2021**, *4*, 100036. <https://doi.org/10.1016/j.jciso.2021.100036>.
- (139) Liu, K.; Jiang, J.; Cui, Z.; Binks, B. P. PH-Responsive Pickering Emulsions Stabilized by Silica Nanoparticles in Combination with a Conventional Zwitterionic Surfactant. *Langmuir* **2017**, *33* (9), 2296–2305. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04459>.

- (140) Sy, P. M.; Anton, N.; Idoux-Gillet, Y.; Dieng, S. M.; Messaddeq, N.; Ennahar, S.; Diarra, M.; Vandamme, T. F. Pickering Nano-Emulsion as a Nanocarrier for PH-Triggered Drug Release. *Int. J. Pharm.* **2018**, *549* (1–2), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.066>.
- (141) Jia, L.; Pang, M.; Fan, M.; Tan, X.; Wang, Y.; Huang, M.; Liu, Y.; Wang, Q.; Zhu, Y.; Yang, X. A PH-Responsive Pickering Nanoemulsion for Specified Spatial Delivery of Immune Checkpoint Inhibitor and Chemotherapy Agent to Tumors. *Theranostics* **2020**, *10* (22), 9956–9969. <https://doi.org/10.7150/thno.46089>.
- (142) Dieng, S. M.; Anton, N.; Bouriat, P.; Thioune, O.; Sy, P. M.; Massaddeq, N.; Enharrar, S.; Diarra, M.; Vandamme, T. Pickering Nano-Emulsions Stabilized by Solid Lipid Nanoparticles as a Temperature Sensitive Drug Delivery System. *Soft Matter* **2019**, *15* (40), 8164–8174. <https://doi.org/10.1039/C9SM01283D>.
- (143) Fang, K.; Song, L.; Gu, Z.; Yang, F.; Zhang, Y.; Gu, N. Magnetic Field Activated Drug Release System Based on Magnetic PLGA Microspheres for Chemo-Thermal Therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *136*, 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.10.014>.
- (144) Hitchcock, J.; White, A. L.; Hondow, N.; Hughes, T. A.; Dupont, H.; Biggs, S.; Cayre, O. J. Metal-Shell Nanocapsules for the Delivery of Cancer Drugs. *J. Colloid Interface Sci.* **2020**, *567*, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.12.018>.
- (145) Sun, Q.; Du, Y.; Hall, E. A. H.; Luo, D.; Sukhorukov, G. B.; Routh, A. F. A Fabrication Method of Gold Coated Colloidosomes and Their Application as Targeted Drug Carriers. *Soft Matter* **2018**, *14* (14), 2594–2603. <https://doi.org/10.1039/C7SM02485A>.
- (146) Bangham, A. D.; Horne, R. W. Action of Saponin on Biological Cell Membranes. *Nature* **1962**, *196* (4858), 952–953. <https://doi.org/10.1038/196952a0>.
- (147) Horne, R. W.; Bangham, A. D.; Whittaker, V. P. Negatively Stained Lipoprotein Membranes. *Nature* **1963**, *200* (4913), 1340–1340. <https://doi.org/10.1038/2001340a0>.
- (148) Bangham, A. D.; Horne, R. W. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8* (5), 660–IN10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7).
- (149) Jeon, S.; Yoo, C. Y.; Park, S. N. Improved Stability and Skin Permeability of Sodium Hyaluronate-Chitosan Multilayered Liposomes by Layer-by-Layer Electrostatic Deposition for Quercetin Delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *129*, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.018>.
- (150) Bollhorst, T.; Rezwan, K.; Maas, M. Colloidal Capsules: Nano- and Microcapsules with Colloidal Particle Shells. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (8), 2091–2126. <https://doi.org/10.1039/C6CS00632A>.
- (151) Turk, M. J.; Reddy, J. A.; Chmielewski, J. A.; Low, P. S. Characterization of a Novel PH-Sensitive Peptide That Enhances Drug Release from Folate-Targeted Liposomes at Endosomal PHs. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2002**, *1559* (1), 56–68. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00441-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00441-2).
- (152) Park, J. W.; Kirpotin, D. B.; Hong, K.; Shalaby, R.; Shao, Y.; Nielsen, U. B.; Marks, J. D.; Papahadjopoulos, D.; Benz, C. C. Tumor Targeting Using Anti-Her2 Immunoliposomes. *J. Controlled Release* **2001**, *74* (1–3), 95–113. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00315-7](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00315-7).
- (153) Lukyanov, A. N.; Elbayoumi, T. A.; Chakilam, A. R.; Torchilin, V. P. Tumor-Targeted Liposomes: Doxorubicin-Loaded Long-Circulating Liposomes Modified with Anti-Cancer Antibody. *J. Controlled Release* **2004**, *100* (1), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.007>.
- (154) Aman Mohamadi, M.; Farshi, P.; Ahmadi, P.; Ahmadi, A.; Yousefi, M.; Ghorbani, M.; Hosseini, S. M. Encapsulation of Vitamins Using Nanoliposome: Recent Advances and Perspectives. *Adv. Pharm. Bull.* **2021**, *1*. <https://doi.org/10.34172/apb.2023.005>.
- (155) Sun, Y.; Chi, J.; Ye, X.; Wang, S.; Liang, J.; Yue, P.; Xiao, H.; Gao, X. Nanoliposomes as Delivery System for Anthocyanins: Physicochemical Characterization, Cellular Uptake, and Antioxidant Properties. *LWT* **2021**, *139*, 110554. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110554>.

- (156) Discher, B. M.; Won, Y.-Y.; Ege, D. S.; Lee, J. C.-M.; Bates, F. S.; Discher, D. E.; Hammer, D. A. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. *Science* **1999**, *284* (5417), 1143–1146. <https://doi.org/10.1126/science.284.5417.1143>.
- (157) Discher, D. E.; Eisenberg, A. Polymer Vesicles. *Science* **2002**, *297* (5583), 967–973. <https://doi.org/10.1126/science.1074972>.
- (158) Allen, S.; Osorio, O.; Liu, Y.-G.; Scott, E. Facile Assembly and Loading of Theranostic Polymersomes via Multi-Impingement Flash Nanoprecipitation. *J. Controlled Release* **2017**, *262*, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.026>.
- (159) Ahmed, F.; Pakunlu, R. I.; Srinivas, G.; Brannan, A.; Bates, F.; Klein, M. L.; Minko, T.; Discher, D. E. Shrinkage of a Rapidly Growing Tumor by Drug-Loaded Polymersomes: PH-Triggered Release through Copolymer Degradation. *Mol. Pharm.* **2006**, *3* (3), 340–350. <https://doi.org/10.1021/mp050103u>.
- (160) Rideau, E.; Dimova, R.; Schwille, P.; Wurm, F. R.; Landfester, K. Liposomes and Polymersomes: A Comparative Review towards Cell Mimicking. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (23), 8572–8610. <https://doi.org/10.1039/C8CS00162F>.
- (161) Anajafi, T.; Mallik, S. Polymersome-Based Drug-Delivery Strategies for Cancer Therapeutics. *Ther. Deliv.* **2015**, *6* (4), 521–534. <https://doi.org/10.4155/tde.14.125>.
- (162) del Mercato, L. L.; Ferraro, M. M.; Baldassarre, F.; Mancarella, S.; Greco, V.; Rinaldi, R.; Leporatti, S. Biological Applications of LbL Multilayer Capsules: From Drug Delivery to Sensing. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *207*, 139–154. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.02.014>.
- (163) Du, P.; Zeng, J.; Mu, B.; Liu, P. Biocompatible Magnetic and Molecular Dual-Targeting Polyelectrolyte Hybrid Hollow Microspheres for Controlled Drug Release. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (5), 1705–1715. <https://doi.org/10.1021/mp300534a>.
- (164) Polomska, A.; Leroux, J.-C.; Brambilla, D. Layer-by-Layer Coating of Solid Drug Cores: A Versatile Method to Improve Stability, Control Release and Tune Surface Properties. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17* (1), 1600228. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600228>.
- (165) Ai, H. Layer-by-Layer Capsules for Magnetic Resonance Imaging and Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (9), 772–788. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.013>.
- (166) Kurapati, R.; Raichur, A. M. Near-Infrared Light-Responsive Graphene Oxide Composite Multilayer Capsules: A Novel Route for Remote Controlled Drug Delivery. *Chem Commun* **2013**, *49* (7), 734–736. <https://doi.org/10.1039/C2CC38417E>.
- (167) Kurapati, R.; Raichur, A. M. Graphene Oxide Based Multilayer Capsules with Unique Permeability Properties: Facile Encapsulation of Multiple Drugs. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (48), 6013. <https://doi.org/10.1039/c2cc32248j>.
- (168) Katagiri, K.; Koumoto, K.; Iseya, S.; Sakai, M.; Matsuda, A.; Caruso, F. Tunable UV-Responsive Organic–Inorganic Hybrid Capsules. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (2), 195–197. <https://doi.org/10.1021/cm802873f>.
- (169) Ji, Q.; Guo, C.; Yu, X.; Ochs, C. J.; Hill, J. P.; Caruso, F.; Nakazawa, H.; Ariga, K. Flake-Shell Capsules: Adjustable Inorganic Structures. *Small* **2012**, *8* (15), 2345–2349. <https://doi.org/10.1002/sml.201200317>.
- (170) Deng, Z.; Zhen, Z.; Hu, X.; Wu, S.; Xu, Z.; Chu, P. K. Hollow Chitosan–Silica Nanospheres as PH-Sensitive Targeted Delivery Carriers in Breast Cancer Therapy. *Biomaterials* **2011**, *32* (21), 4976–4986. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.050>.
- (171) Teow, H. M.; Zhou, Z.; Najlah, M.; Yusof, S. R.; Abbott, N. J.; D’Emanuele, A. Delivery of Paclitaxel across Cellular Barriers Using a Dendrimer-Based Nanocarrier. *Int. J. Pharm.* **2013**, *441* (1–2), 701–711. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.024>.
- (172) Ziegler, E. W.; Brown, A. B.; Nesnas, N.; Chouinard, C. D.; Mehta, A. K.; Palmer, A. G. B-Cyclodextrin Encapsulation of Synthetic AHLs: Drug Delivery Implications and Quorum-



- Quenching Exploits. *ChemBioChem* **2021**, 22 (7), 1292–1301. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000773>.
- (173) Tannous, M.; Caldera, F.; Hoti, G.; Dianzani, U.; Cavalli, R.; Trotta, F. Drug-Encapsulated Cyclodextrin Nanosponges. In *Supramolecules in Drug Discovery and Drug Delivery*; Mavromoustakos, T., Tzakos, A. G., Durdagi, S., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, **2021**; Vol. 2207, pp 247–283. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0920-0\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0920-0_19).
- (174) Haume, K.; Rosa, S.; Grellet, S.; Śmiałek, M. A.; Butterworth, K. T.; Solov'yov, A. V.; Prise, K. M.; Golding, J.; Mason, N. J. Gold Nanoparticles for Cancer Radiotherapy: A Review. *Cancer Nanotechnol.* **2016**, 7 (1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12645-016-0021-x>.
- (175) Sánchez-Santos, M. E. Therapeutic Applications of Ionizing Radiations. In *Radiation Damage in Biomolecular Systems*; García Gómez-Tejedor, G., Fuss, M. C., Eds.; Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering; Springer Netherlands: Dordrecht, **2012**; pp 397–409. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2564-5\\_24](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2564-5_24).
- (176) Balfourier, A.; Luciani, N.; Wang, G.; Lelong, G.; Ersen, O.; Khelifa, A.; Alloyeau, D.; Gazeau, F.; Carn, F. Unexpected Intracellular Biodegradation and Recrystallization of Gold Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, 117 (1), 103–113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911734116>.
- (177) Amina, S. J.; Guo, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, Volume 15, 9823–9857. <https://doi.org/10.2147/IJN.S279094>.
- (178) Chen, Y.; Yang, J.; Fu, S.; Wu, J. Gold Nanoparticles as Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, Volume 15, 9407–9430. <https://doi.org/10.2147/IJN.S272902>.
- (179) Emfietzoglou, D.; Cucinotta, F. A.; Nikjoo, H. A Complete Dielectric Response Model for Liquid Water: A Solution of the Bethe Ridge Problem. *Radiat. Res.* **2005**, 164 (2), 202–211. <https://doi.org/10.1667/RR3399>.
- (180) Kobayashi, K.; Usami, N.; Porcel, E.; Lacombe, S.; Le Sech, C. Enhancement of Radiation Effect by Heavy Elements. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2010**, 704 (1–3), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.01.002>.
- (181) Pan, Y.; Leifert, A.; Ruau, D.; Neuss, S.; Bornemann, J.; Schmid, G.; Brandau, W.; Simon, U.; Jahnke-Dechent, W. Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 Nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Small* **2009**, 5 (18), 2067–2076. <https://doi.org/10.1002/sml.200900466>.
- (182) Pan, X.; Cloutier, P.; Hunting, D.; Sanche, L. Dissociative Electron Attachment to DNA. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90 (20), 208102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.90.208102>.
- (183) Pinel, S.; Thomas, N.; Boura, C.; Barberi-Heyob, M. Approaches to Physical Stimulation of Metallic Nanoparticles for Glioblastoma Treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, 138, 344–357. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.013>.
- (184) Hainfeld, J. F.; Dilmanian, F. A.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M. Radiotherapy Enhancement with Gold Nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, 60 (8), 977–985. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.8.0005>.
- (185) Her, S.; Jaffray, D. A.; Allen, C. Gold Nanoparticles for Applications in Cancer Radiotherapy: Mechanisms and Recent Advancements. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, 109, 84–101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.012>.
- (186) Kempson, I. Mechanisms of Nanoparticle Radiosensitization. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* **2021**, 13 (1). <https://doi.org/10.1002/wnan.1656>.
- (187) Pallares, R. M.; Abergel, R. J. Nanoparticles for Targeted Cancer Radiotherapy. *Nano Res.* **2020**, 13 (11), 2887–2897. <https://doi.org/10.1007/s12274-020-2957-8>.
- (188) Boateng, F.; Ngwa, W. Delivery of Nanoparticle-Based Radiosensitizers for Radiotherapy Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 21 (1), 273. <https://doi.org/10.3390/ijms21010273>.

- (189) Hashizume, H.; Baluk, P.; Morikawa, S.; McLean, J. W.; Thurston, G.; Roberge, S.; Jain, R. K.; McDonald, D. M. Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156* (4), 1363–1380. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65006-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65006-7).
- (190) Golombek, S. K.; May, J.-N.; Theek, B.; Appold, L.; Drude, N.; Kiessling, F.; Lammers, T. Tumor Targeting via EPR: Strategies to Enhance Patient Responses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *130*, 17–38. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007>.
- (191) Retif, P.; Pinel, S.; Toussaint, M.; Frochot, C.; Chouikrat, R.; Bastogne, T.; Barberi-Heyob, M. Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: The Key Parameters. *Theranostics* **2015**, *5* (9), 1030–1044. <https://doi.org/10.7150/thno.11642>.
- (192) Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M. The Use of Gold Nanoparticles to Enhance Radiotherapy in Mice. *Phys. Med. Biol.* **2004**, *49* (18), N309–N315. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/18/N03>.
- (193) Zhang, S. X.; Gao, J.; Buchholz, T. A.; Wang, Z.; Salehpour, M. R.; Drezek, R. A.; Yu, T.-K. Quantifying Tumor-Selective Radiation Dose Enhancements Using Gold Nanoparticles: A Monte Carlo Simulation Study. *Biomed. Microdevices* **2009**, *11* (4), 925–933. <https://doi.org/10.1007/s10544-009-9309-5>.
- (194) Abdul Rashid, R.; Zainal Abidin, S.; Khairil Anuar, M. A.; Tominaga, T.; Akasaka, H.; Sasaki, R.; Kie, K.; Abdul Razak, K.; Pham, Binh. T. T.; Hawkett, B. S.; Carmichael, M.-A.; Geso, M.; Rahman, W. N. Radiosensitization Effects and ROS Generation by High Z Metallic Nanoparticles on Human Colon Carcinoma Cell (HCT116) Irradiated under 150 MeV Proton Beam. *OpenNano* **2019**, *4*, 100027. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2018.100027>.
- (195) Goubault, C.; Jarry, U.; Bostoën, M.; Éliat, P.-A.; Kahn, M. L.; Pedoux, R.; Guillaudeux, T.; Gauffre, F.; Chevance, S. Radiosensitizing Fe-Au Nanocapsules (Hybridosomes®) Increase Survival of GL261 Brain Tumor-Bearing Mice Treated by Radiotherapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2022**, *40*, 102499. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102499>.
- (196) Liu, Y.; Zhang, P.; Li, F.; Jin, X.; Li, J.; Chen, W.; Li, Q. Metal-Based *NanoEnhancers* for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells. *Theranostics* **2018**, *8* (7), 1824–1849. <https://doi.org/10.7150/thno.22172>.
- (197) Butterworth, K. T.; McMahan, S. J.; Currell, F. J.; Prise, K. M. Physical Basis and Biological Mechanisms of Gold Nanoparticle Radiosensitization. *Nanoscale* **2012**, *4* (16), 4830. <https://doi.org/10.1039/c2nr31227a>.
- (198) Alric, C.; Miladi, I.; Kryza, D.; Taleb, J.; Lux, F.; Bazzi, R.; Billotey, C.; Janier, M.; Perriat, P.; Roux, S.; Tillement, O. The Biodistribution of Gold Nanoparticles Designed for Renal Clearance. *Nanoscale* **2013**, *5* (13), 5930. <https://doi.org/10.1039/c3nr00012e>.
- (199) Barreto, J. A.; O'Malley, W.; Kubeil, M.; Graham, B.; Stephan, H.; Spiccia, L. Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (12), H18–H40. <https://doi.org/10.1002/adma.201100140>.
- (200) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5* (4), 505–515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>.
- (201) Choi, H. S.; Liu, W.; Liu, F.; Nasr, K.; Misra, P.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. Design Considerations for Tumour-Targeted Nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5* (1), 42–47. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.314>.
- (202) Soo Choi, H.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Itty Ipe, B.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. Renal Clearance of Quantum Dots. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (10), 1165–1170. <https://doi.org/10.1038/nbt1340>.
- (203) Lin, Y.; McMahan, S. J.; Paganetti, H.; Schuemann, J. Biological Modeling of Gold Nanoparticle Enhanced Radiotherapy for Proton Therapy. *Phys. Med. Biol.* **2015**, *60* (10), 4149–4168. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/60/10/4149>.

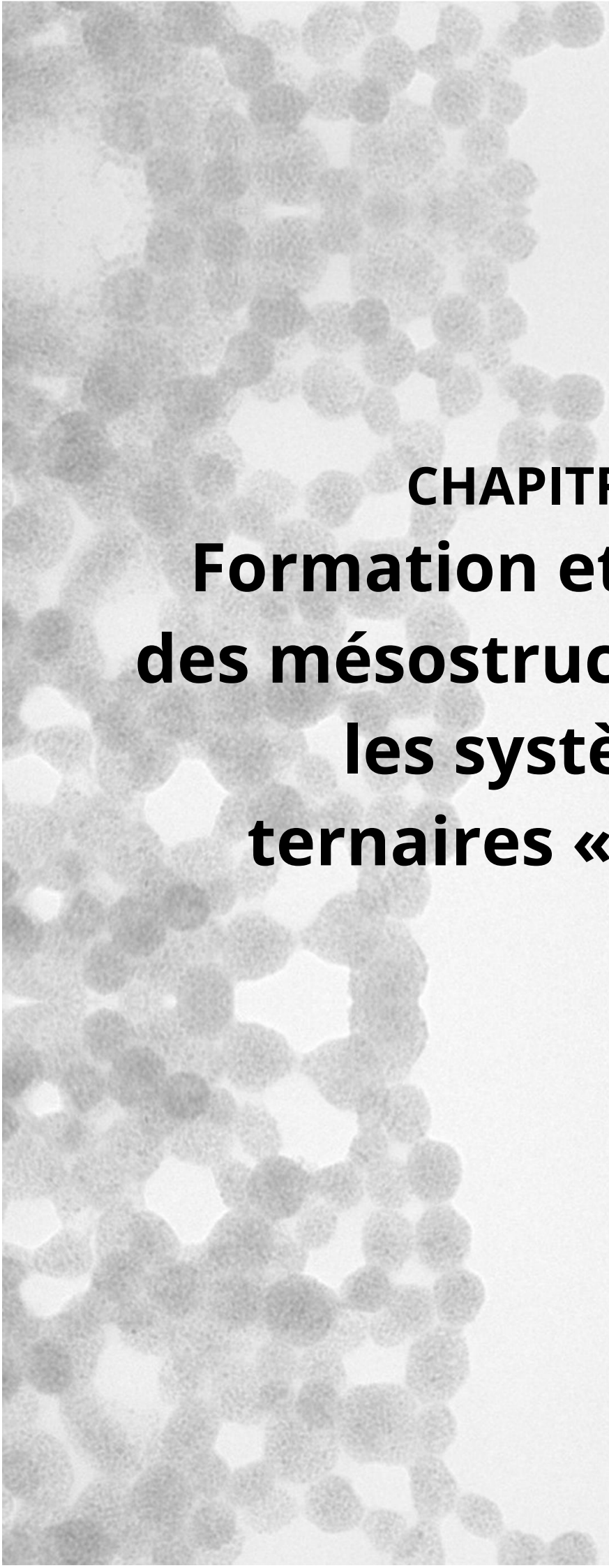
- (204) Leung, M.; Chow, J.; Chithrani, D.; Lee, M.; Jaffray, D. SU-E-T-668: Comparison of the Physical Characteristics of Secondary Electrons and Dose Enhancement from X-Ray Irradiation of Gold Nanoparticles Using Monte Carlo Simulation. *Med. Phys.* **2011**, *38* (6Part21), 3643–3644. <https://doi.org/10.1118/1.3612631>.
- (205) Retif, P.; Reinhard, A.; Paquot, H.; Jouan-Hureau, V.; Chateau, A.; Sancey, L.; Barberi-Heyob, M.; Pinel, S.; Bastogne, T. Monte Carlo Simulations Guided by Imaging to Predict the in Vitro Ranking of Radiosensitizing Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *Volume 11*, 6169–6179. <https://doi.org/10.2147/IJN.S111320>.
- (206) Retif, P.; Bastogne, T.; Barberi-Heyob, M. Robustness Analysis of a Geant4-GATE Simulator for Nanoradiosensitizers Characterization. *IEEE Trans. NanoBioscience* **2016**, *15* (3), 209–217. <https://doi.org/10.1109/TNB.2016.2527720>.
- (207) Paquot, H.; Daouk, J.; Chateau, A.; Rétif, P.; Barberi-Heyob, M.; Pinel, S. Radiation-Induced Mitotic Catastrophe Enhanced by Gold Nanoparticles: Assessment with a Specific Automated Image Processing Workflow. *Radiat. Res.* **2019**, *192* (1), 13. <https://doi.org/10.1667/RR14962.1>.
- (208) Sarrut, D.; Bardiès, M.; Boussion, N.; Freud, N.; Jan, S.; Létang, J.-M.; Loudos, G.; Maigne, L.; Marcatili, S.; Mauxion, T.; Papadimitroulas, P.; Perrot, Y.; Pietrzyk, U.; Robert, C.; Schaart, D. R.; Visvikis, D.; Buvat, I. A Review of the Use and Potential of the GATE Monte Carlo Simulation Code for Radiation Therapy and Dosimetry Applications: GATE for Dosimetry. *Med. Phys.* **2014**, *41* (6Part1), 064301. <https://doi.org/10.1118/1.4871617>.
- (209) Zygmanski, P.; Sajo, E. Nanoscale Radiation Transport and Clinical Beam Modeling for Gold Nanoparticle Dose Enhanced Radiotherapy (GNPT) Using X-Rays. *Br. J. Radiol.* **2016**, *89* (1059), 20150200. <https://doi.org/10.1259/bjr.20150200>.
- (210) Chow, J. C. L. Photon and Electron Interactions with Gold Nanoparticles. In *Nanobiomaterials in Medical Imaging*; Elsevier, **2016**; pp 45–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-41736-5.00002-9>.
- (211) Denkova, A. G.; Liu, H.; Men, Y.; Eelkema, R. Enhanced Cancer Therapy by Combining Radiation and Chemical Effects Mediated by Nanocarriers. *Adv. Ther.* **2020**, *3* (3), 1900177. <https://doi.org/10.1002/adtp.201900177>.
- (212) Li, J.; Li, J. J.; Zhang, J.; Wang, X.; Kawazoe, N.; Chen, G. Gold Nanoparticle Size and Shape Influence on Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells. *Nanoscale* **2016**, *8* (15), 7992–8007. <https://doi.org/10.1039/C5NR08808A>.
- (213) Ma, N.; Wu, F.-G.; Zhang, X.; Jiang, Y.-W.; Jia, H.-R.; Wang, H.-Y.; Li, Y.-H.; Liu, P.; Gu, N.; Chen, Z. Shape-Dependent Radiosensitization Effect of Gold Nanostructures in Cancer Radiotherapy: Comparison of Gold Nanoparticles, Nanospikes, and Nanorods. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (15), 13037–13048. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01112>.
- (214) Zhang, L.; Su, H.; Wang, H.; Li, Q.; Li, X.; Zhou, C.; Xu, J.; Chai, Y.; Liang, X.; Xiong, L.; Zhang, C. Tumor Chemo-Radiotherapy with Rod-Shaped and Spherical Gold Nano Probes: Shape and Active Targeting Both Matter. *Theranostics* **2019**, *9* (7), 1893–1908. <https://doi.org/10.7150/thno.30523>.
- (215) Geng, Y.; Dalhaimer, P.; Cai, S.; Tsai, R.; Tewari, M.; Minko, T.; Discher, D. E. Shape Effects of Filaments versus Spherical Particles in Flow and Drug Delivery. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2* (4), 249–255. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.70>.
- (216) Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A. M. Liposomes and Nanoparticles: Nanosized Vehicles for Drug Delivery in Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30* (11), 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.08.004>.
- (217) Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. PEGylated Nanoparticles for Biological and Pharmaceutical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55* (3), 403–419. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00226-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00226-0).

- (218) Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jahnen-Dechent, W. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* **2007**, *3* (11), 1941–1949. <https://doi.org/10.1002/sml.200700378>.
- (219) Wang, S.; Lu, W.; Tovmachenko, O.; Rai, U. S.; Yu, H.; Ray, P. C. Challenge in Understanding Size and Shape Dependent Toxicity of Gold Nanomaterials in Human Skin Keratinocytes. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *463* (1–3), 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.08.039>.
- (220) Akhter, S.; Ahmad, M. Z.; Ahmad, F. J.; Storm, G.; Kok, R. J. Gold Nanoparticles in Theranostic Oncology: Current State-of-the-Art. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9* (10), 1225–1243. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.716824>.
- (221) Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (4), 897–900. <https://doi.org/10.1021/bc049951i>.
- (222) Singh, N.; Jenkins, G. J. S.; Asadi, R.; Doak, S. H. Potential Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION). *Nano Rev.* **2010**, *1* (1), 5358. <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>.
- (223) Feng, Q.; Liu, Y.; Huang, J.; Chen, K.; Huang, J.; Xiao, K. Uptake, Distribution, Clearance, and Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles with Different Sizes and Coatings. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 2082. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19628-z>.
- (224) Abakumov, M. A.; Semkina, A. S.; Skorikov, A. S.; Vishnevskiy, D. A.; Ivanova, A. V.; Mironova, E.; Davydova, G. A.; Majouga, A. G.; Chekhonin, V. P. Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles: Size and Coating Effects. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2018**, *32* (12), e22225. <https://doi.org/10.1002/jbt.22225>.
- (225) Vakili-Ghartavol, R.; Momtazi-Borojeni, A. A.; Vakili-Ghartavol, Z.; Aiyelabegan, H. T.; Jaafari, M. R.; Rezayat, S. M.; Arbabi Bidgoli, S. Toxicity Assessment of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Different Tissues. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **2020**, *48* (1), 443–451. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1709855>.
- (226) Muggia, F. M.; Cortes-Funes, H.; Wasserman, T. H. Radiotherapy and Chemotherapy in Combined Clinical Trials: Problems and Promise. *Int. J. Radiat. Oncol.* **1978**, *4* (1–2), 161–171. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(78\)90133-5](https://doi.org/10.1016/0360-3016(78)90133-5).
- (227) Steel, G. G. The Search for Therapeutic Gain in the Combination of Radiotherapy and Chemotherapy. *Radiother. Oncol.* **1988**, *11* (1), 31–53. [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(88\)90044-8](https://doi.org/10.1016/0167-8140(88)90044-8).
- (228) Tannock, I. F. Combined Modality Treatment with Radiotherapy and Chemotherapy. *Radiother. Oncol.* **1989**, *16* (2), 83–101. [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(89\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-8140(89)90025-X).
- (229) Duchesne, G. M. Fundamental Bases of Combined Therapy in Lung Cancer: Cell Resistance to Chemotherapy and Radiotherapy. *Lung Cancer* **1994**, *10*, S67–S72. [https://doi.org/10.1016/0169-5002\(94\)91668-3](https://doi.org/10.1016/0169-5002(94)91668-3).
- (230) Yang, S.-H.; Kuo, T.-C.; Wu, H.; Guo, J.-C.; Hsu, C.; Hsu, C.-H.; Tien, Y.-W.; Yeh, K.-H.; Cheng, A.-L.; Kuo, S.-H. Perspectives on the Combination of Radiotherapy and Targeted Therapy with DNA Repair Inhibitors in the Treatment of Pancreatic Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22* (32), 7275. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i32.7275>.
- (231) Qiu, Z.; Oleinick, N. L.; Zhang, J. ATR/CHK1 Inhibitors and Cancer Therapy. *Radiother. Oncol.* **2018**, *126* (3), 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.09.043>.
- (232) Lu, Q.-B. Molecular Reaction Mechanisms of Combination Treatments of Low-Dose Cisplatin with Radiotherapy and Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (11), 2601–2604. <https://doi.org/10.1021/jm061416b>.
- (233) Werner, M. E.; Cummings, N. D.; Sethi, M.; Wang, E. C.; Sukumar, R.; Moore, D. T.; Wang, A. Z. Preclinical Evaluation of Genexol-PM, a Nanoparticle Formulation of Paclitaxel, as a Novel

- Radiosensitizer for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2013**, *86* (3), 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.02.009>.
- (234) Wu, M.; Liu, J.; Hu, C.; Li, D.; Yang, J.; Wu, Z.; Yang, L.; Chen, Y.; Fu, S.; Wu, J. Olaparib Nanoparticles Potentiated Radiosensitization Effects on Lung Cancer. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *Volume 13*, 8461–8472. <https://doi.org/10.2147/IJN.S181546>.
- (235) Chen, E. M.; Quijano, A. R.; Seo, Y.-E.; Jackson, C.; Josowitz, A. D.; Noorbakhsh, S.; Merletti, A.; Sundaram, R. K.; Focarete, M. L.; Jiang, Z.; Bindra, R. S.; Saltzman, W. M. Biodegradable PEG-Poly( $\omega$ -Pentadecalactone-Co-p-Dioxanone) Nanoparticles for Enhanced and Sustained Drug Delivery to Treat Brain Tumors. *Biomaterials* **2018**, *178*, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.024>.
- (236) Au, K. M.; Min, Y.; Tian, X.; Zhang, L.; Perello, V.; Caster, J. M.; Wang, A. Z. Improving Cancer Chemoradiotherapy Treatment by Dual Controlled Release of Wortmannin and Docetaxel in Polymeric Nanoparticles. *ACS Nano* **2015**, *9* (9), 8976–8996. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b02913>.
- (237) Tian, X.; Nguyen, M.; Foote, H. P.; Caster, J. M.; Roche, K. C.; Peters, C. G.; Wu, P.; Jayaraman, L.; Garmey, E. G.; Tepper, J. E.; Eliasof, S.; Wang, A. Z. CRLX101, a Nanoparticle–Drug Conjugate Containing Camptothecin, Improves Rectal Cancer Chemoradiotherapy by Inhibiting DNA Repair and HIF1 $\alpha$ . *Cancer Res.* **2017**, *77* (1), 112–122. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2951>.
- (238) Tian, X.; Lara, H.; Wagner, K. T.; Saripalli, S.; Hyder, S. N.; Foote, M.; Sethi, M.; Wang, E.; Caster, J. M.; Zhang, L.; Wang, A. Z. Improving DNA Double-Strand Repair Inhibitor KU55933 Therapeutic Index in Cancer Radiotherapy Using Nanoparticle Drug Delivery. *Nanoscale* **2015**, *7* (47), 20211–20219. <https://doi.org/10.1039/C5NR05869D>.
- (239) Stapleton, S.; Jaffray, D.; Milosevic, M. Radiation Effects on the Tumor Microenvironment: Implications for Nanomedicine Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *109*, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.021>.
- (240) Yi, X.; Chen, L.; Chen, J.; Maiti, D.; Chai, Z.; Liu, Z.; Yang, K. Biomimetic Copper Sulfide for Chemo-Radiotherapy: Enhanced Uptake and Reduced Efflux of Nanoparticles for Tumor Cells under Ionizing Radiation. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28* (9), 1705161. <https://doi.org/10.1002/adfm.201705161>.
- (241) Caster, J. M.; Yu, S. K.; Patel, A. N.; Newman, N. J.; Lee, Z. J.; Warner, S. B.; Wagner, K. T.; Roche, K. C.; Tian, X.; Min, Y.; Wang, A. Z. Effect of Particle Size on the Biodistribution, Toxicity, and Efficacy of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles in Chemoradiotherapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2017**, *13* (5), 1673–1683. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.002>.
- (242) Krishnan, L.; Krishnan, E. C.; Jewell, W. R. Immediate Effect of Irradiation on Microvasculature. *Int. J. Radiat. Oncol.* **1988**, *15* (1), 147–150. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(88\)90359-8](https://doi.org/10.1016/0360-3016(88)90359-8).
- (243) Setua, S.; Ouberai, M.; Piccirillo, S. G.; Watts, C.; Welland, M. Cisplatin-Tethered Gold Nanospheres for Multimodal Chemo-Radiotherapy of Glioblastoma. *Nanoscale* **2014**, *6* (18), 10865–10873. <https://doi.org/10.1039/C4NR03693J>.
- (244) Fathy, M. M.; Mohamed, F. S.; Elbially, N.; Elshemey, W. M. Multifunctional Chitosan-Capped Gold Nanoparticles for Enhanced Cancer Chemo-Radiotherapy: An In Vitro Study. *Phys. Med.* **2018**, *48*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2018.04.002>.
- (245) Li, T.; Zhang, M.; Wang, J.; Wang, T.; Yao, Y.; Zhang, X.; Zhang, C.; Zhang, N. Thermosensitive Hydrogel Co-Loaded with Gold Nanoparticles and Doxorubicin for Effective Chemoradiotherapy. *AAPS J.* **2016**, *18* (1), 146–155. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9828-3>.
- (246) Ito, T.; Tanabe, K.; Yamada, H.; Hatta, H.; Nishimoto, S. Radiation- and Photo-Induced Activation of 5-Fluorouracil Prodrugs as a Strategy for the Selective Treatment of Solid Tumors. *Molecules* **2008**, *13* (10), 2370–2384. <https://doi.org/10.3390/molecules13102370>.

- (247) Tanabe, K.; Ishizaki, J.; Ando, Y.; Ito, T.; Nishimoto, S. Reductive Activation of 5-Fluorodeoxyuridine Prodrug Possessing Azide Methyl Group by Hypoxic X-Irradiation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (4), 1682–1685. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.12.106>.
- (248) Tanabe, K.; Zhang, Z.; Ito, T.; Hatta, H.; Nishimoto, S. Current Molecular Design of Intelligent Drugs and Imaging Probes Targeting Tumor-Specific Microenvironments. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (23), 3745. <https://doi.org/10.1039/b711244k>.
- (249) Deng, W.; Chen, W.; Clement, S.; Guller, A.; Zhao, Z.; Engel, A.; Goldys, E. M. Controlled Gene and Drug Release from a Liposomal Delivery Platform Triggered by X-Ray Radiation. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 2713. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05118-3>.





**CHAPITRE 2**  
**Formation et stabilité**  
**des mésostructures dans**  
**les systèmes**  
**ternaires « Ouzo »**





# SOMMAIRE

---

<b>CHAPITRE 2 Formation et stabilité des mésostructures dans les systèmes ternaires « Ouzo »</b>	<b>99</b>
<b>I Étude du système BHT/THF/H<sub>2</sub>O</b>	<b>105</b>
<b>I.1 Construction du diagramme de phase</b>	<b>105</b>
I.1.a Par observation visuelle	105
I.1.b Détermination de la binodale par COSMO-RS	105
I.1.c Focalisation sur une zone d'intérêt du diagramme de phase	106
<b>I.2 Investigation de la ligne à <math>\Phi_{\text{THF}} = 0,2</math></b>	<b>107</b>
I.2.a Analyse de la stabilité des échantillons par analyses NTA et DLS	108
I.2.b Analyse de la stabilité des échantillons par SMLS (Static Multiple Light Scattering)	109
<b>I.3 Investigation de la ligne à <math>\Phi_{\text{THF}} = 0,1</math> et <math>\Phi_{\text{THF}} = 0,15</math></b>	<b>111</b>
I.3.a Mise en évidence d'un domaine Ouzo limpide	112
I.3.b Influence des conditions de mélange	113
<b>I.4 Etude de la stabilité des gouttelettes par la présence d'une charge à la surface</b>	<b>114</b>
<b>I.5 Évolution de la composition des gouttelettes du domaine monophasique au domaine métastable</b>	<b>115</b>
<b>I.6 Conclusion intermédiaire de la partie I</b>	<b>118</b>
<b>II Étude des systèmes avec une huile comme soluté hydrophobe.</b>	<b>118</b>
<b>II.1 Construction des diagrammes de phase par observation visuelle</b>	<b>118</b>
<b>II.2 Détermination de la binodale par analyse SMLS (et NTA)</b>	<b>119</b>
II.2.a Pour le système limonène/DMSO/H <sub>2</sub> O	119
II.2.b Pour le système $\alpha$ -tocophérol/THF/H <sub>2</sub> O	122
<b>II.3 Comparaison globale des 2 systèmes étudiés avec le BHT/THF/H<sub>2</sub>O</b>	<b>123</b>
<b>III Étude du système BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O : cas d'un soluté solide fluorescent</b>	<b>124</b>
<b>III.1 Construction d'un diagramme de phase selon la fluorescence du BODIPY</b>	<b>124</b>
<b>III.2 Détermination de la composition de la goutte par fluorescence</b>	<b>127</b>
<b>III.3 Analyse DLS et Mesure de la mobilité électrophorétique</b>	<b>127</b>
<b>IV Conclusions et perspectives</b>	<b>130</b>
<b>V Références Bibliographiques</b>	<b>133</b>



## CHAPITRE 2 : FORMATION ET STABILITÉ DES MÉSOSTRUCTURES DANS LES SYSTÈMES TERNAIRES « OUZO »

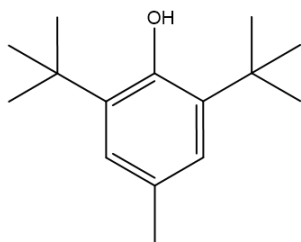
---

Jusqu'à présent, la plupart des auteurs ont assimilé la limite de la turbidité à la frontière du domaine Ouzo. Cela provient du fait que le concept d'émulsion Ouzo a été développé pour expliquer le caractère trouble de cette boisson, mais la réciproque - tous les échantillons dans le domaine Ouzo devraient être troubles - n'est pas nécessairement vraie.

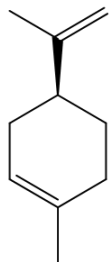
Plus généralement, c'est une erreur courante d'identifier la binodale avec la courbe de turbidité, comme l'ont récemment souligné Arce *et al.*<sup>1</sup> Dans notre groupe, nous avons utilisé le système BHT/THF/H<sub>2</sub>O comme système modèle. Le choix de ce système a été motivé par le fait que le BHT, généralement présent dans le THF commercial comme piègeur de radicaux, est connu pour générer des gouttelettes submicroniques.<sup>2,3</sup> Dans ce système, nous avons observé des échantillons transparents contenant des gouttelettes d'environ 100 nm. Ces échantillons ont été classés comme SFME car ils ne semblaient pas évoluer dans le temps.<sup>4</sup> Il est intéressant de noter que cela suggère que les échantillons dans le domaine Ouzo pourraient également sembler transparents puisque nous avons observé une continuité de taille entre les deux domaines.

Dans le but de trouver une méthode objective pour déterminer les limites du domaine Ouzo, nous avons étudié en détail le système modèle BHT/THF/H<sub>2</sub>O en utilisant la diffusion dynamique de la lumière (DLS), l'analyse du suivi des nanoparticules (NTA), la diffusion multiple statique de la lumière (SMLS), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la mobilité électrophorétique. En particulier, nous considérons la stabilité (c'est-à-dire l'absence d'évolution de la taille des gouttelettes) comme un critère permettant de distinguer le domaine SFME (stable) du domaine Ouzo (croissance lente des gouttelettes). Nous avons également étudié trois nouveaux systèmes (solutés solides et liquides, deux solvants différents) :  $\alpha$ -tocophérol/THF/H<sub>2</sub>O, limonène/DMSO/H<sub>2</sub>O et BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O.

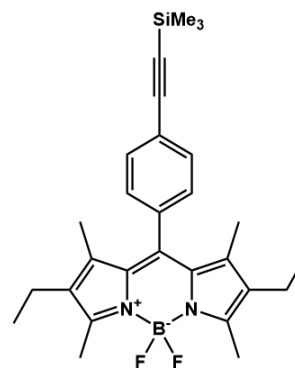
Les structures chimiques des molécules hydrophobes utilisées pour ce chapitre, ainsi que leurs propriétés physico-chimiques sont regroupées dans la Figure 83 ci-dessous :



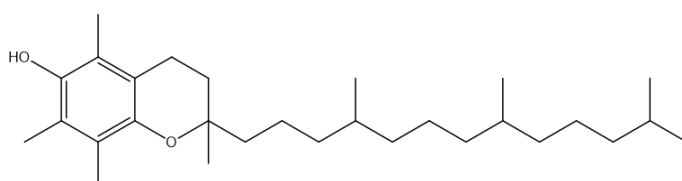
**BHT**  
*Mw* : 220,4 g/mol  
*LogP* : 5,1  
*S<sub>eau</sub>* :  $2,7 \cdot 10^{-6}$  mol/L



**S-(-)-Limonène**  
*Mw* : 136,2 g/mol  
*LogP* : 3,2 – 4,5  
*S<sub>eau</sub>* :  $5,6 \cdot 10^{-5}$  mol/L



**BODIPY**  
*Mw* : 475,8 g/mol  
*S<sub>eau</sub>* :  $7,2 \cdot 10^{-11}$  mol/L



**(±)-α-Tocophérol  
ou Vitamine E**  
*Mw* : 430,7 g/mol  
*LogP* : 8,8 – 10,5  
*S<sub>eau</sub>* :  $4,4 \cdot 10^{-6}$  mol/L

Figure 83 : Structures chimiques des solutés hydrophobes utilisés pour ce chapitre.

# I Étude du système BHT/THF/H<sub>2</sub>O

## I.1 Construction du diagramme de phase

### I.1.a Par observation visuelle

Tous les échantillons de cette étude ont été préparés par addition d'eau à la solution organique en une seule fois, et aucun tensioactif n'a été utilisé pour stabiliser les gouttelettes. Nous avons d'abord construit un diagramme de phase BHT/THF/H<sub>2</sub>O par observations visuelles (voir Figure 84a). Nous avons adopté la représentation proposée par Vitale et Katz où les fractions de masse du soluté et du solvant sont représentées respectivement par l'axe horizontal et l'axe vertical.<sup>5</sup> La fraction massique de l'eau est  $\Phi_{\text{eau}} = 1 - (\Phi_{\text{THF}} + \Phi_{\text{BHT}})$ . Puisque la région d'intérêt est située à de très petites fractions massiques de BHT, l'axe correspondant est représenté sur une échelle logarithmique.

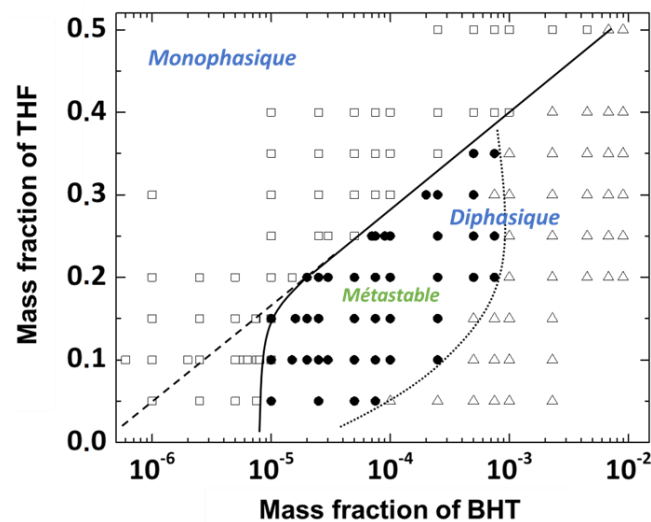


Figure 84 : Représentation semi-logarithmique du diagramme de phase BHT/THF/H<sub>2</sub>O déterminé par observation visuelle : (□) échantillons limpides ; (●) échantillons troubles ; (Δ) échantillons diphasiques. (—) courbe de turbidité, (- - -) extrapolation linéaire de la courbe de turbidité, (...) limite entre les échantillons troubles et macroscopiquement diphasiques.

Tous les échantillons ont été observés typiquement entre 10 et 30 min après la préparation. La ligne pleine (—) représente le début de la turbidité. A faible fraction de THF, le trouble est très subtil et difficile à détecter à l'œil nu. Dans ce cas, nous avons utilisé la lumière éclairer les échantillons. À  $\Phi_{\text{THF}} > 0,2$ , la transition entre les compositions transparentes et les compositions troubles est plus évidente et peut être détectée sans lumière. À des concentrations élevées de BHT, les échantillons forment rapidement une fine couche supérieure turbide, riche en huile (Δ). Nous considérons cette limite (ligne pointillée : ..... ) comme la ligne spinodale.

### I.1.b Détermination de la binodale par COSMO-RS

La prédiction des courbes binodales en utilisant des méthodes semi-empiriques pour calculer l'équilibre liquide-liquide donne généralement une ligne droite dans la représentation

semi-Log.<sup>6</sup> Nos propres calculs de la courbe binodale en utilisant COSMO-RS (Figure 85) donnent aussi une ligne presque droite, mais légèrement décalée vers de plus grandes fractions de masse de BHT par rapport aux données expérimentales. Par conséquent, nous supposons que la partie linéaire de la courbe de turbidité observée dans la partie supérieure du diagramme est une bonne approximation de la binodale. La courbe expérimentale s'écarte clairement de ce comportement linéaire attendu pour des fractions massiques de THF inférieures à 0,2.

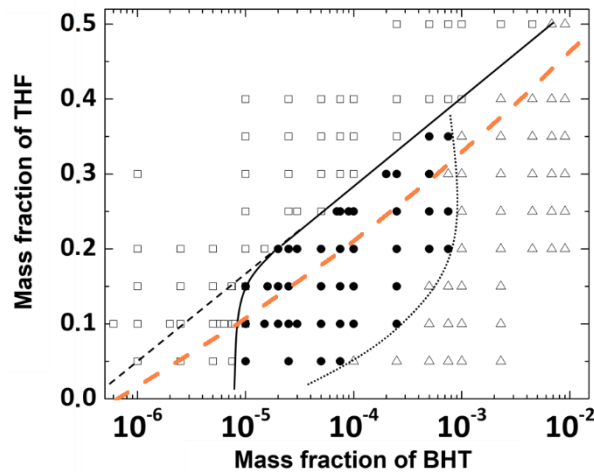


Figure 85 : Diagramme de phase BHT/THF/H<sub>2</sub>O déterminé par observation visuelle : (□) échantillons limpides ; (●) échantillons troubles ; (Δ) échantillons diphasiques. (—) courbe de turbidité, (- - -) extrapolation linéaire de la courbe d'opacité, (...) limite entre les échantillons troubles et macroscopiquement diphasiques, (- - -) courbe binodale calculée par COSMO-RS.

### 1.1.c Focalisation sur une zone d'intérêt du diagramme de phase

Dans ce qui suit, nous étudions plus spécifiquement les séries d'échantillons  $a_n$ ,  $b_n$ ,  $c_n$  et  $d_n$  telles que représentées dans la Figure 86 avec un zoom sur la zone d'intérêt (voir Tableau 1 pour les compositions).

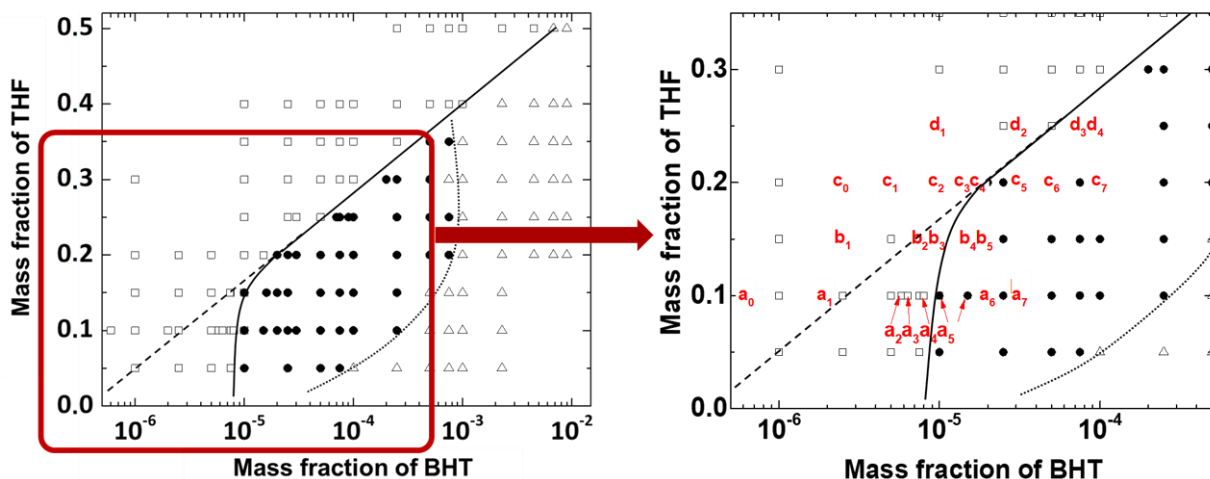


Figure 86 : Focalisation sur la zone d'intérêt du diagramme de phase BHT/THF/H<sub>2</sub>O, avec  $a_n$  pour les échantillons à  $\Phi_{THF} = 0,1$ ,  $b_n$  à  $\Phi_{THF} = 0,15$ ,  $c_n$  à  $\Phi_{THF} = 0,2$  et  $d_n$  à  $\Phi_{THF} = 0,25$ .

Tableau 1 : Composition des échantillons de la série an-dn dans le système BHT/THF/H<sub>2</sub>O, et diamètre hydrodynamique moyen de la distribution (DH) obtenu par NTA à t = 0 et t = 3 h.

Sample	Fraction massique de BHT	Fraction massique de THF	D <sub>H</sub> à t <sub>0</sub> (nm)	D <sub>H</sub> à t <sub>3h</sub> (nm)
a <sub>0</sub>	6 × 10 <sup>-7</sup>	0,1	69,9 ± 4,3	155,8 ± 2,8
a <sub>1</sub>	2 × 10 <sup>-6</sup>		62,4 ± 4,5	163,9 ± 5,1
a <sub>2</sub>	5,8 × 10 <sup>-6</sup>		64,4 ± 3,9	125,8 ± 2,1
a <sub>3</sub>	6,35 × 10 <sup>-6</sup>		70,8 ± 0,8	113,2 ± 1,4
a <sub>4</sub>	8 × 10 <sup>-6</sup>		67,4 ± 2,0	120,4 ± 12,2
a <sub>5</sub>	1 × 10 <sup>-5</sup> – 1,5 × 10 <sup>-5</sup>		121,7 ± 3,6	198,2 ± 7,9
a <sub>6</sub>	2 × 10 <sup>-5</sup>		141,9 ± 1,4	248,1 ± 6,5
a <sub>7</sub>	3 × 10 <sup>-5</sup>		-	-
b <sub>1</sub>	2,5 × 10 <sup>-6</sup>	0,15	-	-
b <sub>2</sub>	7,4 × 10 <sup>-6</sup>		-	-
b <sub>3</sub>	1 × 10 <sup>-5</sup>		-	-
b <sub>4</sub>	1,6 × 10 <sup>-5</sup>		-	-
b <sub>5</sub>	2 × 10 <sup>-5</sup>		-	-
c <sub>0</sub>	2,5 × 10 <sup>-6</sup>	0,2	85,3 ± 2,1	92,5 ± 5,9
c <sub>1</sub>	5 × 10 <sup>-6</sup>		87,5 ± 2,7	89,9 ± 8,4
c <sub>2</sub>	1 × 10 <sup>-5</sup>		93,5 ± 0,6	107,0 ± 2,1
c <sub>3</sub>	1,5 × 10 <sup>-5</sup>		95,2 ± 4,7	98,7 ± 1,5
c <sub>4</sub>	2 × 10 <sup>-5</sup>		69,9 ± 4,3	156,6 ± 3,0
c <sub>5</sub>	3 × 10 <sup>-5</sup>		-	-
c <sub>6</sub>	5 × 10 <sup>-5</sup>		231,9 ± 13,8	404,6 ± 28,6
c <sub>7</sub>	1 × 10 <sup>-4</sup>		-	-
d <sub>1</sub>	1 × 10 <sup>-5</sup>	0,25	-	-
d <sub>2</sub>	3 × 10 <sup>-5</sup>		-	-
d <sub>3</sub>	7 × 10 <sup>-5</sup>		-	-
d <sub>4</sub>	9 × 10 <sup>-5</sup>		-	-

## I.2 Investigation de la ligne à $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$

La ligne de composition  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  (échantillons c<sub>n</sub> de la Figure 87 et du Tableau 1) a été sélectionnée pour une première série de mesures car l'emplacement de la courbe binodale est sans ambiguïté. En effet, la limite de turbidité est superposée à l'extrapolation de la binodale (Figure 87).



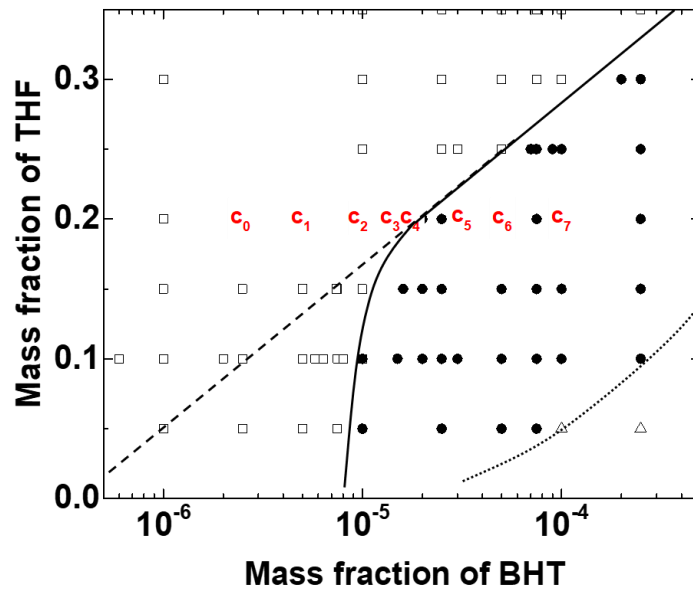


Figure 87 : Investigation des échantillons  $c_n$  de la ligne à  $\Phi_{THF} = 0,2$  du diagramme de phase BHT/THF/H<sub>2</sub>O.

### 1.2.a Analyse de la stabilité des échantillons par analyses NTA et DLS

Des échantillons de composition allant de  $\Phi_{BHT} = 2,5 \times 10^{-6}$  à  $5 \times 10^{-5}$  ( $c_0$ - $c_6$ ) ont été analysés à l'aide du NTA environ 5 min après la préparation de l'échantillon, et également après 3 h pour évaluer la stabilité de l'échantillon (Figure 88.a). Il est évident que les échantillons  $c_0$ - $c_3$ , qui semblent transparents, contiennent en fait des particules d'un diamètre compris entre 60 et 80 nm et ne montrent aucune évolution significative dans les 3 h. Au-delà de la courbe de turbidité ( $c_5$ - $c_7$ ), les échantillons deviennent plus polydisperses et présentent des tailles plus grandes (>100 nm) qui dépassent la limite du NTA (1  $\mu$ m) après 3 h. Un exemple de ce comportement est l'échantillon  $c_6$ , représenté sur la Figure 88.a.

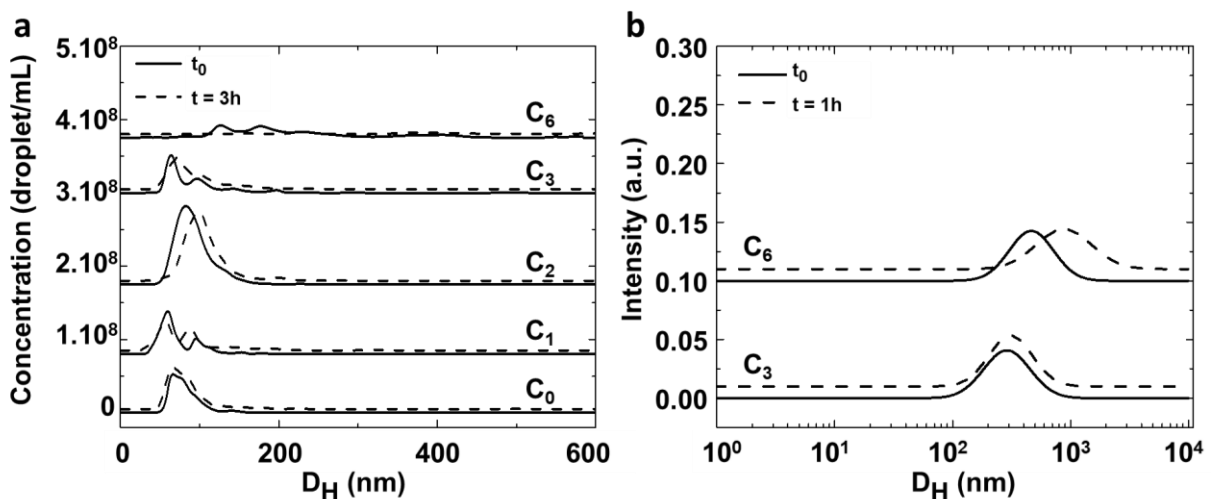


Figure 88 : Distribution de taille du système BHT/THF/H<sub>2</sub>O mesurée par (a) NTA au temps 0 (—) et 3 h (---) pour les compositions  $c_0$ - $c_6$  et par (b) DLS au temps 0 (—) et 3 h (---) pour les compositions  $c_3$  et  $c_6$  comme indiqué sur la Figure 86.

Ces échantillons ont également été examinés à l'aide de la DLS (Figure 88.b). Pour les échantillons les plus dilués ( $c_0$ - $c_2$ ), l'intensité diffusée est extrêmement faible et les corrélogrammes sont difficiles à ajuster dû à la présence de quelques très grosses particules ( $>1 \mu\text{m}$ ). La Figure 89 montre l'effet de ces grandes particules sur le corrélogramme de la composition  $c_1$ , ainsi que l'observation visuelle des points de diffusion correspondants à l'aide du NTA. En revanche, les échantillons  $c_3$ - $c_6$  ont pu être analysés par DLS. La Figure 88.b montre l'histogramme de taille pondéré en fonction de l'intensité pour les échantillons  $c_3$  et  $c_6$ , peu après le mélange et après une heure. Comme prévu, la taille moyenne mesurée par DLS ( $225,6 \pm 9,0 \text{ nm}$  et  $352,7 \pm 11,4 \text{ nm}$  pour les échantillons  $c_3$  et  $c_6$  à  $t = 0$  respectivement) est plus grande que celles mesurées par NTA ( $95,2 \pm 4,7 \text{ nm}$  et  $231,9 \pm 13,8 \text{ nm}$  respectivement). De plus, les résultats confirment que  $c_3$  n'évolue pas avec le temps alors que la taille moyenne des particules augmente sur une heure pour  $c_6$ .

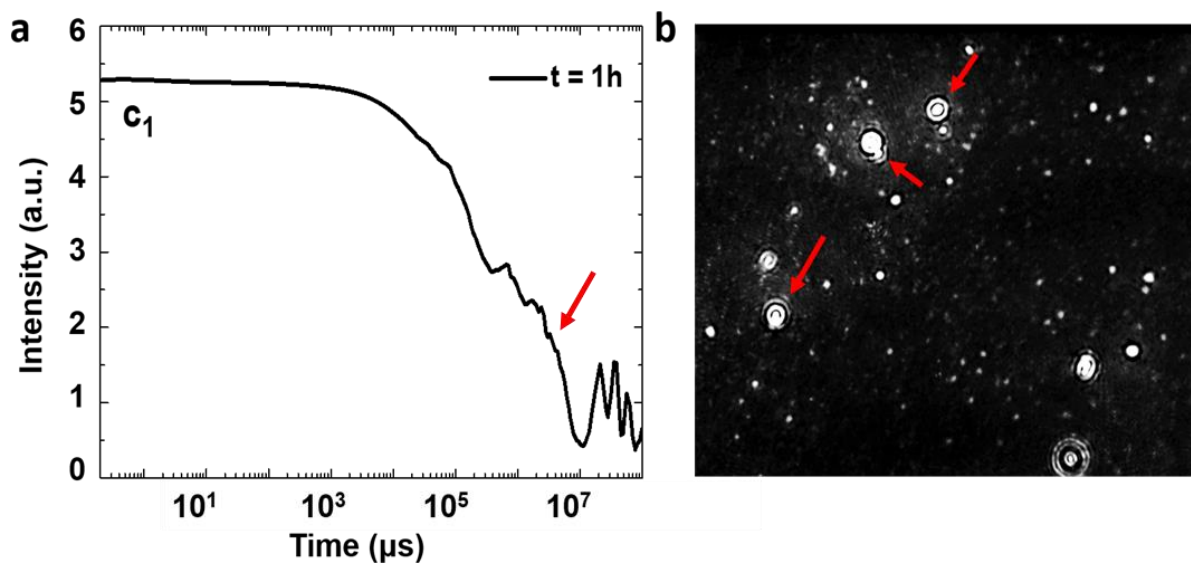


Figure 89 : Échantillon  $c_1$  ( $\Phi_{\text{BHT}} = 2,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$ ). (a) Corrélogramme de l'analyse DLS et (b) cliché de la cellule éclairée pendant l'analyse NTA, montrant la diffusion des plus grosses gouttelettes.

### 1.2.b Analyse de la stabilité des échantillons par SMLS (Static Multiple Light Scattering)

Il est important de noter que les systèmes d'Ouzo étudiés dans la littérature sont souvent stabilisés par l'ajout de surfactant pour empêcher la coalescence.<sup>6,7</sup> Dans notre cas, nous avons supposé que le contrôle de la stabilité des échantillons devait être une méthode de choix pour déterminer avec précision la courbe binodale.

Dans ce but, nous avons utilisé le SMLS. Le principe est de surveiller les propriétés optiques (transmission et/ou rétrodiffusion) au cours du temps et sur toute la hauteur de l'échantillon. La coalescence ou le mûrissement sont généralement caractérisés par une évolution similaire du signal optique sur toute la hauteur de l'échantillon, alors que la sédimentation ou le crémage provoquent un signal optique vertical irrégulier. Par exemple, la Figure 90 montre la variation temporelle de la transmission (en valeurs relatives) pour deux échantillons situés de part et d'autre de la courbe binodale :  $c_3$ , étant totalement transparent et  $c_5$ , légèrement trouble. La transmission est mesurée sur toute la hauteur du tube. Les

comportements cinétiques de ces deux échantillons sont étonnamment différents : l'échantillon  $c_3$  reste stable pendant les 14 h de suivi, alors que la transmission de l'échantillon  $c_5$  diminue clairement avec le temps, sur toute la hauteur de l'échantillon. De manière très intéressante, l'évolution de l'échantillon s'arrête après quelques heures, mais aucun signe de crémage ou de sédimentation n'a été observé. Ceci suggère que le(s) mécanisme(s) responsable(s) de la croissance des gouttelettes/particules est (sont) entravé(s) à un moment donné. Une hypothèse est que les molécules (libres ou sous forme de très petits agrégats), servant de réservoir aux gouttelettes, sont consommées.<sup>8</sup> Alternativement, la coalescence des gouttelettes peut s'arrêter lorsque leur surface est efficacement couverte par des agents stabilisants, par exemple des nanoparticules.<sup>4</sup>

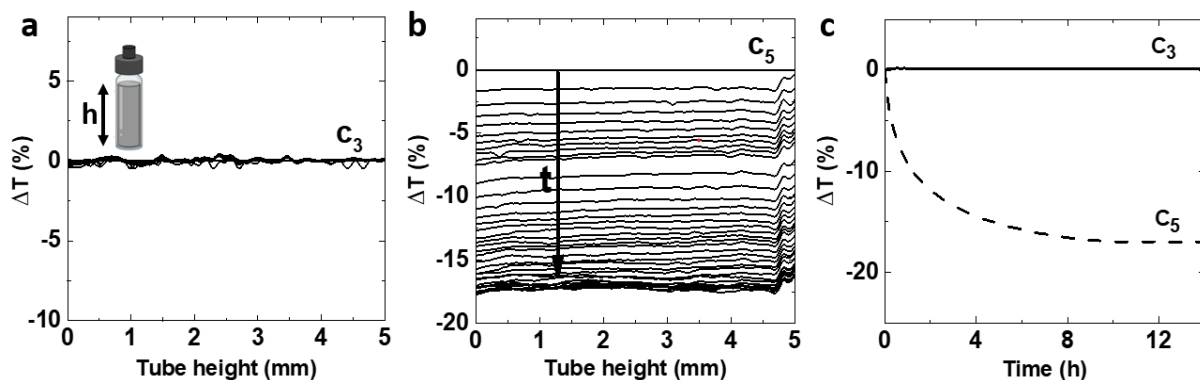


Figure 90 : Analyse de la stabilité des échantillons le long de la ligne de composition  $\Phi_{THF} = 0,2$  par SMLS. (a) transmission de l'échantillon  $c_3$  le long de la hauteur du tube pour différents temps, par rapport à la transmission à  $t = 0$  ; (b) idem pour l'échantillon  $c_5$  ; (c) évolution temporelle de leur transmission relative mesurée à mi-hauteur : ligne pleine (—) : échantillons limpides ; ligne pointillée (- - -) : échantillons troubles.

La stabilité des échantillons  $c_1$  à  $c_7$  a été étudiée, et l'évolution temporelle de la transmission mesurée à mi-hauteur est présentée dans la Figure 91 ci-dessous. En accord avec les résultats précédents, les compositions  $c_1$  à  $c_3$  (échantillons limpides) sont stables sur la période considérée, alors que  $c_5$  à  $c_7$  (échantillons troubles) montrent une diminution significative de leur transmittance. Ainsi, l'analyse SMLS montre une transition claire dans la stabilité colloïdale des échantillons. Les mesures NTA et DLS effectuées à différents moments confirment le comportement de stabilité des échantillons mais sont moins pratiques à utiliser à cet égard.

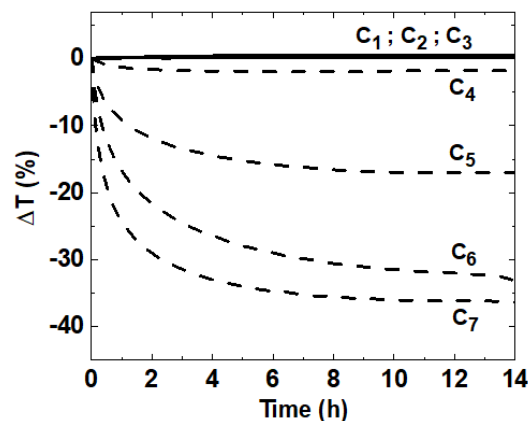


Figure 91 : Analyse de la stabilité par SMLS : transmission relative mesurée à mi-hauteur des échantillons le long de la ligne de composition  $\Phi_{THF} = 0,2$ . Ligne pleine (—) : échantillons limpides ; ligne pointillée (- - -) : échantillons troubles.

Par ailleurs, l'analyse SMLS des échantillons  $d_1$  à  $d_4$  (Figure 92) confirme la tendance constatée pour les échantillons  $c_n$  de la ligne à  $\Phi_{THF} = 0,2$ . En effet, une stabilité dans le temps des échantillons limpides ( $d_1$  et  $d_2$ ) est observée, contrairement aux échantillons troubles ( $d_3$  et  $d_4$ ).

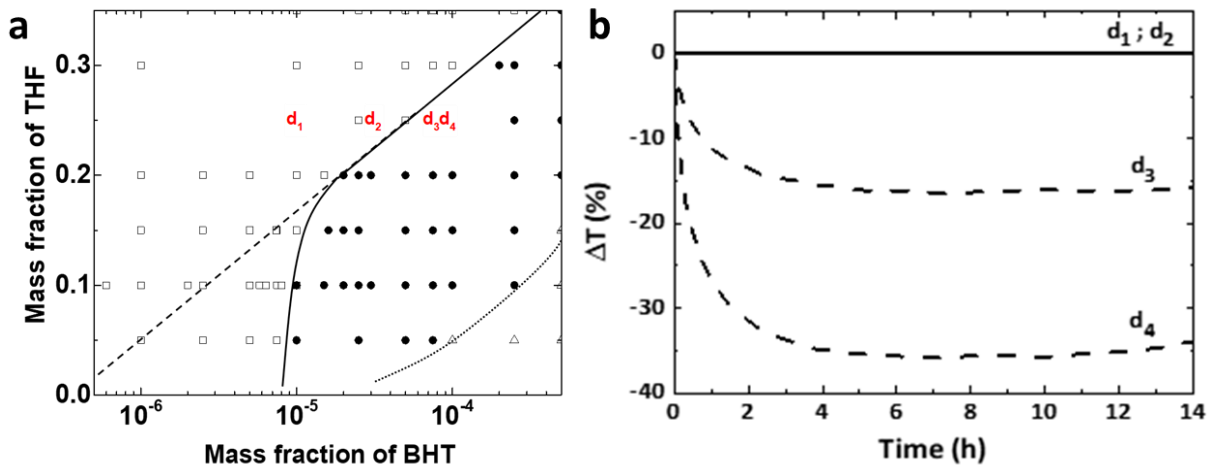


Figure 92 : (a) Focalisation sur les échantillons  $d_n$  de la ligne à  $\Phi_{THF} = 0,25$  du diagramme de phase BHT/THF/ $H_2O$ . (b) Analyse de la stabilité par SMLS : transmission relative mesurée à mi-hauteur des échantillons le long de la ligne de composition  $\Phi_{THF} = 0,25$ . Ligne pleine (—) : échantillons limpides ; ligne pointillée (- - -) : échantillons troubles.

### 1.3 Investigation de la ligne à $\Phi_{THF} = 0,1$ et $\Phi_{THF} = 0,15$

Encouragés par les résultats précédents, nous avons suivi la stabilité des échantillons le long des lignes de composition  $\Phi_{THF} = 0,1$  et  $\Phi_{THF} = 0,15$  (échantillons  $a_1$ - $a_7$  et  $b_1$ - $b_5$  respectivement, Figure 93 et Tableau 1).

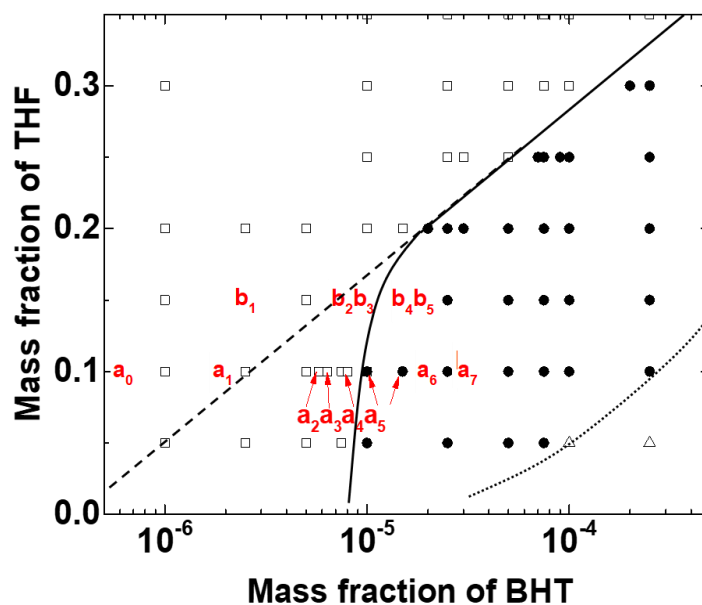


Figure 93 : Représentation des échantillons  $a_n$  de la ligne à  $\Phi_{THF} = 0,1$  et  $b_n$  de la ligne à  $\Phi_{THF} = 0,15$  sur le diagramme de phase BHT/THF/ $H_2O$ .

### 1.3.a Mise en évidence d'un domaine Ouzo limpide

Les échantillons  $a_0$  et  $a_1$  sont stables d'après l'analyse SMLS (Figure 94.a), tandis que les échantillons  $a_2$ - $a_7$  évoluent tous au cours du temps, avec une cinétique plus rapide lorsque la concentration en BHT augmente. De même, les compositions  $b_1$ - $b_2$  sont stables, et  $b_3$ - $b_5$  instables (Figure 94.b).

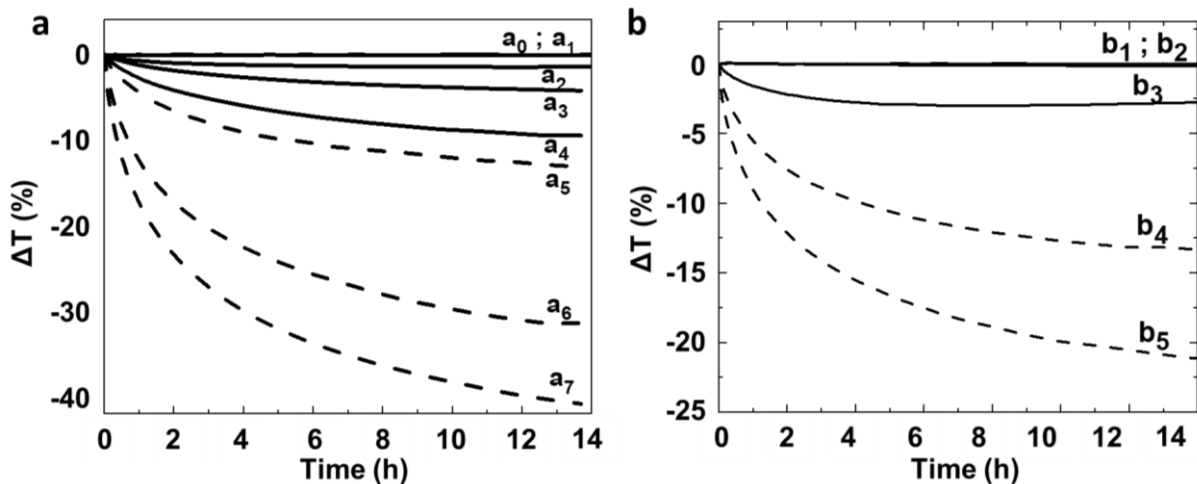


Figure 94 : Analyse de la stabilité par SMLS : transmission relative mesurée à mi-hauteur des échantillons  $a_n$  le long de la ligne de composition  $\Phi_{THF} = 0,1$  ; (b) et des échantillons  $b_n$  le long de la ligne de composition  $\Phi_{THF} = 0,15$ . Ligne pleine (—) : échantillons limpides ; ligne pointillée (- - -) : échantillons troubles.

De manière très intéressante, les échantillons  $a_2$ - $a_4$  et  $b_3$  semblent totalement transparents d'après le diagramme de phase (Figure 93), mais sont en fait instables. Cela confirme le fait que la détermination visuelle de la ligne binodale n'est pas une méthode efficace. D'autre part, la transition entre les compositions stables et instables est cohérente avec la ligne droite extrapolée de la Figure 93, pour les deux séries  $a_n$  et  $b_n$ .

Ensuite, nous avons analysé les compositions dans la zone située entre la courbe de turbidité et la ligne pointillée extrapolée ( $a_2$  à  $a_4$ ). La Figure 95 montre leur distribution de taille au moment initial  $t_0$  et après 3 h. Les trois échantillons contiennent clairement une distribution étroite de particules dont la taille augmente avec le temps, ce qui confirme que ces compositions sont en fait métastables.

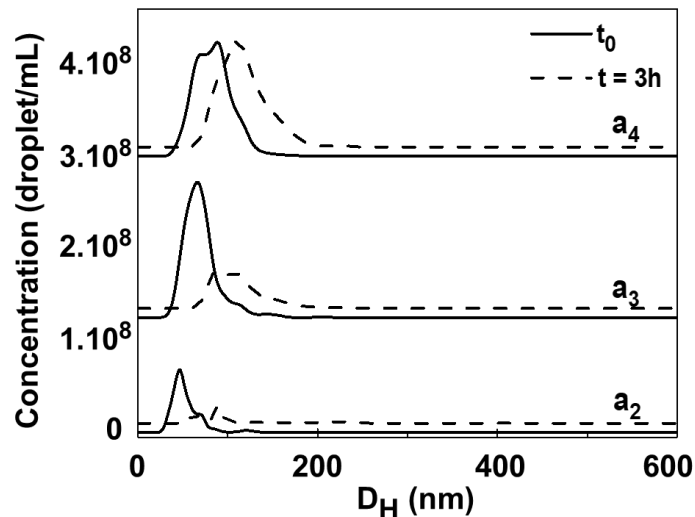


Figure 95 : Distribution de taille du système BHT/THF/H<sub>2</sub>O mesurée par NTA au temps  $t_0$  (—) et  $t = 3 \text{ h}$  (- - -) pour les compositions  $a_2$  à  $a_4$ .

### 1.3.b Influence des conditions de mélange

Certains auteurs ont suggéré que parce que l'effet Ouzo est considéré comme une émulsification spontanée, il ne nécessite aucun mélange et les modes de mélange ne devraient pas avoir d'effet sur la distribution de taille finale. Cependant, ce n'est pas le cas. Les conditions de nucléation dans le domaine Ouzo sont sensibles aux conditions de mélange.<sup>9,10</sup> Un taux de mélange rapide (comparé au taux de nucléation) favorise une nucléation homogène. Par conséquent, il nous a semblé nécessaire de vérifier si les habitudes des différents opérateurs en matière de mélange pouvaient influencer nos résultats.

Pour ce faire, deux types de mélange typiques des conditions standard de laboratoire ont été comparés. Dans le premier cas (dit "mélange manuel", trait plein de la Figure 96), le flacon a été délicatement retourné à l'envers 3 fois. Dans le second cas, il a été fortement mélangé à l'aide d'un vortex pendant 10 secondes (trait pointillé de la Figure 96). La Figure 96 montre l'analyse de stabilité des échantillons  $a_0$  et  $a_2$  pour les deux conditions de mélange. Comme prévu, dans le domaine thermodynamiquement stable ( $a_0$ ), les échantillons ne montrent aucune évolution, pour les deux méthodes de mélange. Pour l'échantillon  $a_2$  (dans le domaine métastable), l'échantillon évolue dans les deux cas, bien qu'avec une dynamique différente. En conclusion, la localisation de la binodale telle que déterminée par SMLS ne semble pas être influencée par le mode de mélange.

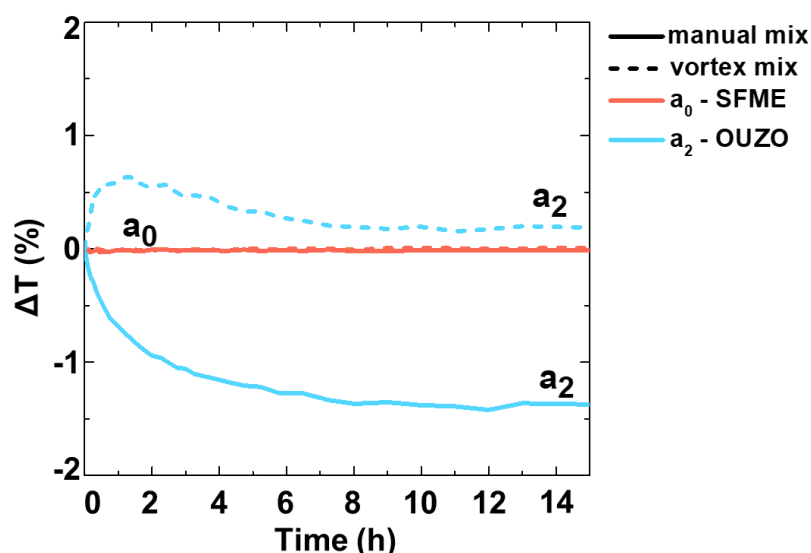


Figure 96 : Analyse de la stabilité par SMLS selon les conditions de mélange avec (—) pour un « mélange manuel » et (- - -) pour un mélange au vortex. Transmission relative mesurée à mi-hauteur des échantillons  $a_0$  (avant la binodale – domaine SFME ; trait rouge) et  $a_2$  (après la binodale – domaine Ouzo dit limpide ; trait bleu).

#### I.4 Etude de la stabilité des gouttelettes par la présence d'une charge à la surface

Comme mentionné précédemment, la présence d'une charge électrostatique inhibant la coalescence est l'explication la plus probable de l'évolution lente des gouttelettes d'Ouzo sur le long terme.

Nous avons alors examiné la mobilité électrophorétique des agrégats le long des lignes de composition  $\Phi_{\text{THF}} = 0,1$  et  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  (Figure 97). Les fractions massiques de BHT ont été normalisées par rapport à leur valeur au niveau de la courbe binodale (courbe en pointillés dans la Figure 86), respectivement  $\Phi_{\text{BHT}}^* = 3,5 \times 10^{-6}$  et  $\Phi_{\text{BHT}}^* = 2 \times 10^{-5}$ . Il est frappant de constater que pour les deux courbes, la mobilité électrophorétique est négative et atteint un minimum à la transition entre le domaine SFME et le domaine métastable. Puisque le pH de ces mélanges ( $\text{pH} = 7 \pm 0,5$  et  $6,5 \pm 0,5$  pour  $\Phi_{\text{THF}} = 0,1$  et  $0,2$  respectivement) est relativement constant lorsque l'on fait varier la quantité de BHT (Figure 98), ceci ne peut être attribué à un changement de concentration en  $\text{OH}^-$ . Les valeurs fortement négatives (proches de -80 mV en termes de potentiel zêta) atteintes pour  $\Phi_{\text{THF}} = 0,1$  expliquent l'évolution très lente des compositions  $a_2$ - $a_6$  qui a été révélée par SMLS (Figure 94.a).

Il est connu depuis longtemps que les interfaces hydrophobes dans l'eau portent souvent une charge négative. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène, notamment l'adsorption interfaciale d'ions négatifs endogènes tels que les carbonates ou les hydroxydes d'eau, ou la présence d'impuretés ionisables.<sup>11,12</sup> Alternativement, certains travaux théoriques supposent que les charges de surface proviennent de la densité de charge asymétrique des molécules d'eau à proximité de l'interface.<sup>13</sup> Il est intéressant de noter que la coalescence de gouttelettes se repoussant électrostatiquement peut même conduire à un affinement de la distribution de taille.<sup>10</sup> À l'heure actuelle, nous n'avons pas d'interprétation claire de l'augmentation de la charge de surface à proximité de la binodale. Cela pourrait indiquer un changement dans la structure des gouttelettes, avec une interface plus nette après la courbe binodale que dans le domaine SFME.

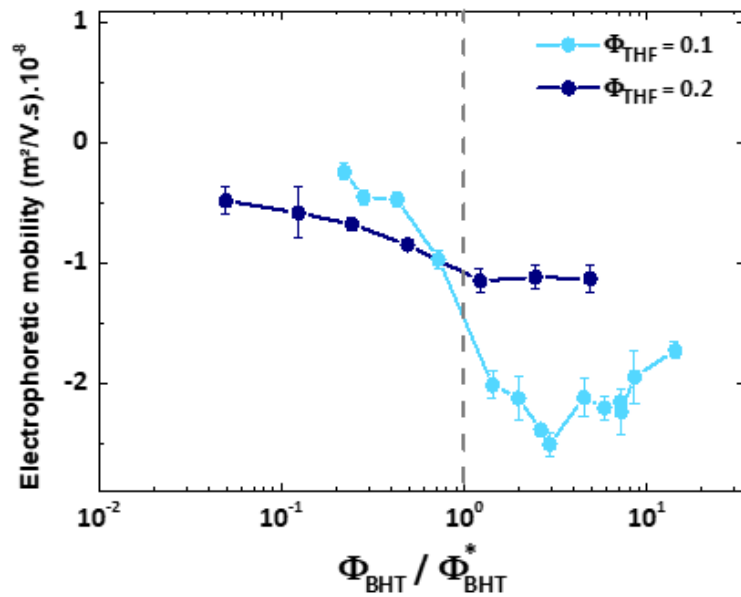


Figure 97 : Mobilité électrophorétique en fonction de la concentration normalisée en BHT, pour deux compositions de THF (● :  $\Phi_{THF} = 0,1$  et ● :  $\Phi_{THF} = 0,2$ ).  $\Phi_{BHT}^*$  représente la fraction massique de BHT au niveau de la binodale. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de 3 mesures.

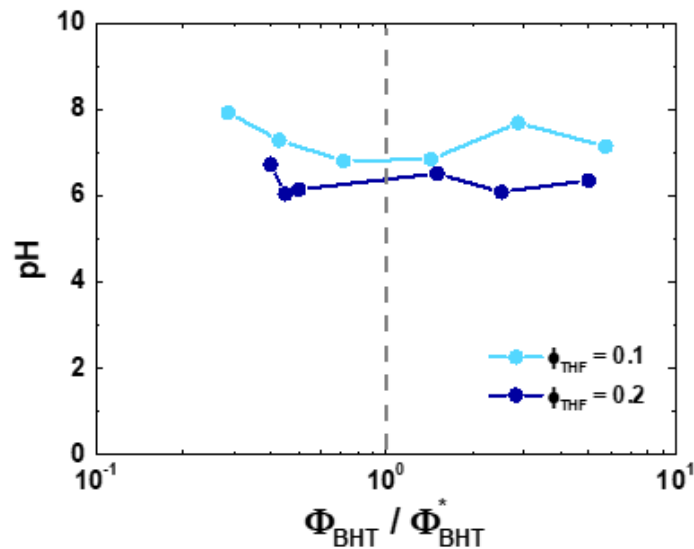


Figure 98 : Mesure du pH en fonction de la fraction massique en BHT pour le long des lignes de composition de THF (● :  $\Phi_{THF} = 0,1$  et ● :  $\Phi_{THF} = 0,2$ ).  $\Phi_{BHT}^*$  représente la fraction massique de BHT au niveau de la binodale.

### 1.5 Évolution de la composition des gouttelettes du domaine monophasique au domaine métastable

Afin de suivre plus en détail la transition du domaine monophasique à celui de l'Ouzo, notamment en termes d'environnement et de mobilité du BHT, nous avons enregistré les spectres RMN 1D  $^1H$  des échantillons  $c_2$ - $c_3$  (domaine SFME, rappel de la Figure 87),  $c_4$  (proche de la binodale) et  $c_6$  (domaine Ouzo). Ces spectres sont présentés dans la Figure 99 (spectres b à e) avec celui du BHT solubilisé dans du THF- $d_8$  deutéré (spectre a).

Nous pouvons observer dans les spectres b-c un seul ensemble de signaux BHT pour les compositions  $c_2$  et  $c_3$  (domaine SFME). De plus, les déplacements chimiques des protons



méthyles ( $\blacktriangle$ ) sont significativement déplacés vers le haut champ par rapport à ceux du BHT solubilisé dans le THF. Ces observations sont cohérentes avec un BHT principalement dissous dans la phase continue composée de THF/H<sub>2</sub>O, et éventuellement en échange rapide avec les gouttelettes de SFME. En revanche, les compositions  $c_4$  et  $c_6$  montrent deux ensembles de signaux (symboles pleins et vides dans les spectres d-e). Cela révèle que le BHT est partagé entre deux environnements différents, très probablement la phase dispersée et la phase continue, avec un échange lent à l'échelle de temps du déplacement chimique. Cela suggère fortement que les gouttelettes qui apparaissent au-delà de la courbe binodale ont une composition différente de celle du domaine SFME. Dans une étude précédente du système *trans*-anéthol/éthanol/H<sub>2</sub>O, un comportement similaire a été trouvé, et l'effet systématique de démultiplication pour les résonances <sup>1</sup>H de la forme 1 (BHT dans la phase continue) par rapport à la forme 2 (BHT dans la phase dispersée), a été attribué à un environnement plus hydrophile.<sup>8</sup> De plus, l'intégration des signaux montre clairement que la proportion de BHT dans la phase dispersée augmente avec la quantité totale de BHT : elle représente plus de 60 % du BHT pour l'échantillon  $c_6$ .

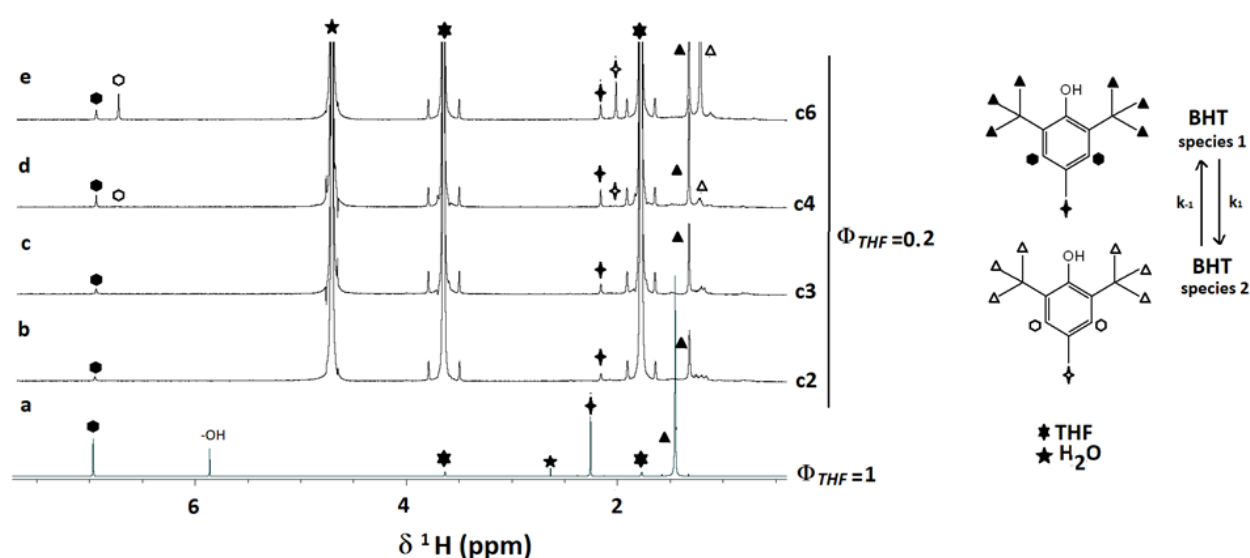


Figure 99 : Spectres RMN 1D <sup>1</sup>H du BHT (a) solubilisé dans le THF-d8 et (b-e) pour les échantillons le long de la ligne de composition  $\Phi_{THF-d8} = 0,2$  (b pour  $c_2$  :  $\Phi_{BHT} = 10^{-5}$  ; c pour  $c_3$  :  $\Phi_{BHT} = 1,5 \cdot 10^{-5}$  ; d pour  $c_4$  :  $\Phi_{BHT} = 3 \cdot 10^{-5}$  ; e pour  $c_6$  :  $\Phi_{BHT} = 5 \cdot 10^{-5}$ ). Les résonances de protons des deux espèces du BHT sont identifiées par des symboles pleins et ouverts ( $\blacktriangle/\triangle$ ,  $\bullet/\circ$  et  $\blacklozenge/\lozenge$ ) comme indiqué sur le schéma à droite. Les pics de solvant sont identifiés par : H<sub>2</sub>O ( $\blackstar$ ) et THF ( $\star$ ).

Pour confirmer l'origine de ces deux ensembles de signaux, nous avons enregistré le spectre 2D <sup>1</sup>H NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) de l'échantillon  $c_6$  (Figure 100.a). Cette expérience met en évidence :

- des corrélations spatiales (nOes, distance inférieure à 5 Å) entre deux protons différents (les pics croisés hors-diagonale verts),
- et la présence de deux espèces en échange chimique (les pics croisés hors-diagonale bleus).<sup>14-16</sup>

Cette dernière observation confirme la présence de deux espèces liquides de BHT en échange, une dans la phase continue (forme 1) et l'autre dans la phase dispersée (forme 2). La cinétique

de la constante d'échange a été estimée à  $k_1$  et  $k_{-1}$  à  $0,23 \text{ s}^{-1}$  et  $0,16 \text{ s}^{-1}$  respectivement.<sup>17</sup> Cet échange entre les phases continue et dispersée est très clairement démontrée.

Ensuite, nous avons enregistré des spectres DOSY qui permettent de discriminer les espèces chimiques contenues dans un mélange en solution en fonction de leur coefficient d'auto-diffusion. Comme le montre la Figure 100.b, les deux espèces de BHT coexistant en solution pour l'échantillon  $c_6$  n'ont pas le même coefficient d'auto-diffusion. Le BHT contenu dans la phase continue diffuse plus rapidement ( $\sim 5 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) que le BHT contenu dans les gouttelettes de la phase dispersée ( $\sim 2 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Ce résultat peut être expliqué par une viscosité significativement plus élevée dans la phase dispersée par rapport à la phase continue, en raison de la concentration élevée de BHT au sein des gouttelettes.

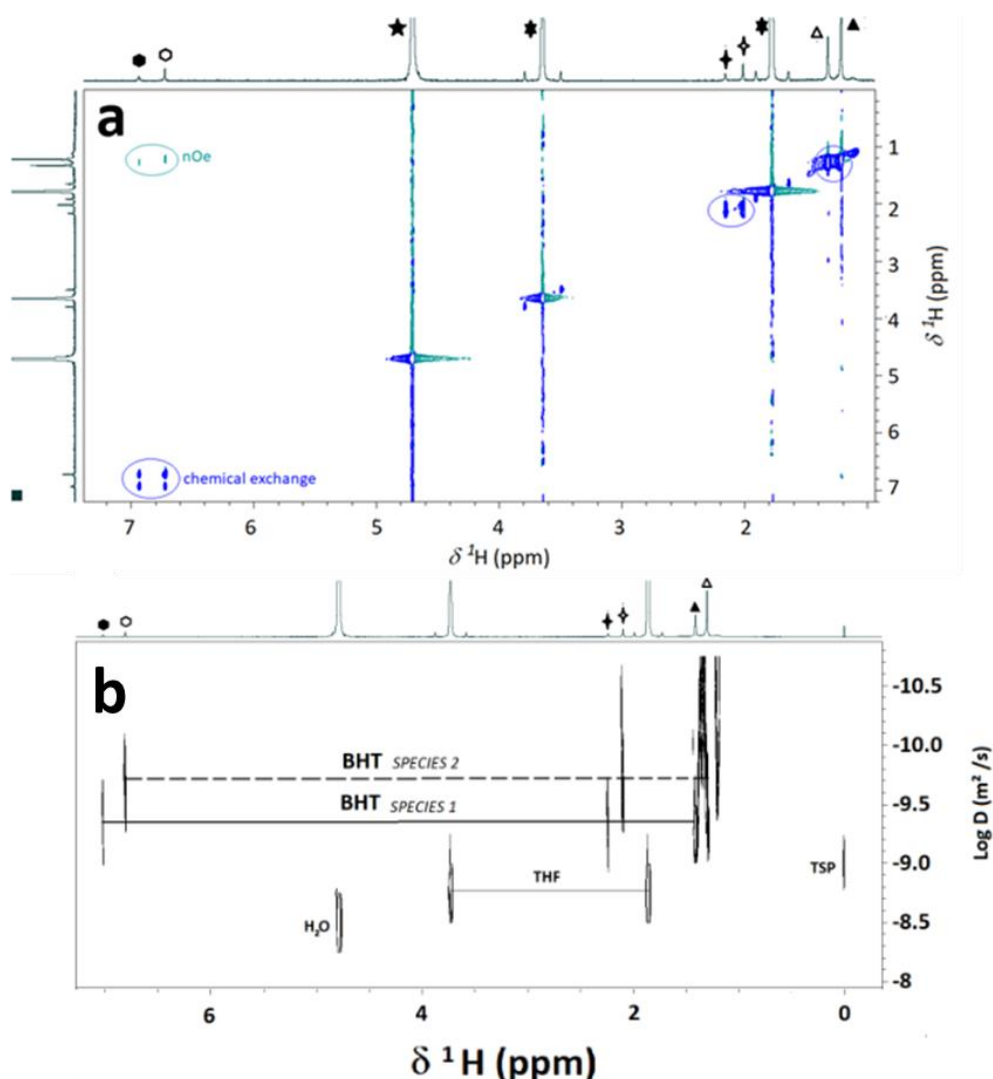


Figure 100 : Spectres RMN (a) 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY et (b) pseudo-2D  $^1\text{H}$  DOSY de l'échantillon  $c_6$  ( $\Phi_{\text{BHT}} = 5 \cdot 10^{-5}$ ) dans  $\Phi_{\text{THF-d8}} = 0,2$ .

L'analyse RMN de l'échantillon  $a_6$  (Figure 101, échantillon turbide dans le domaine métastable à  $\Phi_{\text{THF}} = 0,1$  Figure 93) donne des conclusions similaires à celles de l'échantillon de composition  $c_6$  présenté ci-dessus : deux espèces liquides de BHT coexistent en solution et présentent un coefficient de diffusion différent ( $\sim 6,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  et  $\sim 1,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ,

correspondant respectivement au BHT dans les phases continue et dispersée). Par ailleurs, la viscosité des mélanges THF/H<sub>2</sub>O<sup>18</sup> est significativement plus faible pour la composition a<sub>6</sub> ( $\Phi_{\text{THF}} = 0,1$  ;  $\eta = 1,2$  cP) par rapport à la composition c<sub>6</sub> ( $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  ;  $\eta = 1,5$  cP), ce qui est cohérent avec la diffusion plus rapide du BHT dissous dans l'échantillon a<sub>6</sub>. L'espèce prédominante est le BHT dans la phase dispersée et représente ~ 75 % du BHT total. Malheureusement, malgré l'utilisation d'une crysonde plus sensible, l'analyse des échantillons avec une plus faible concentration de BHT n'a pas été possible.

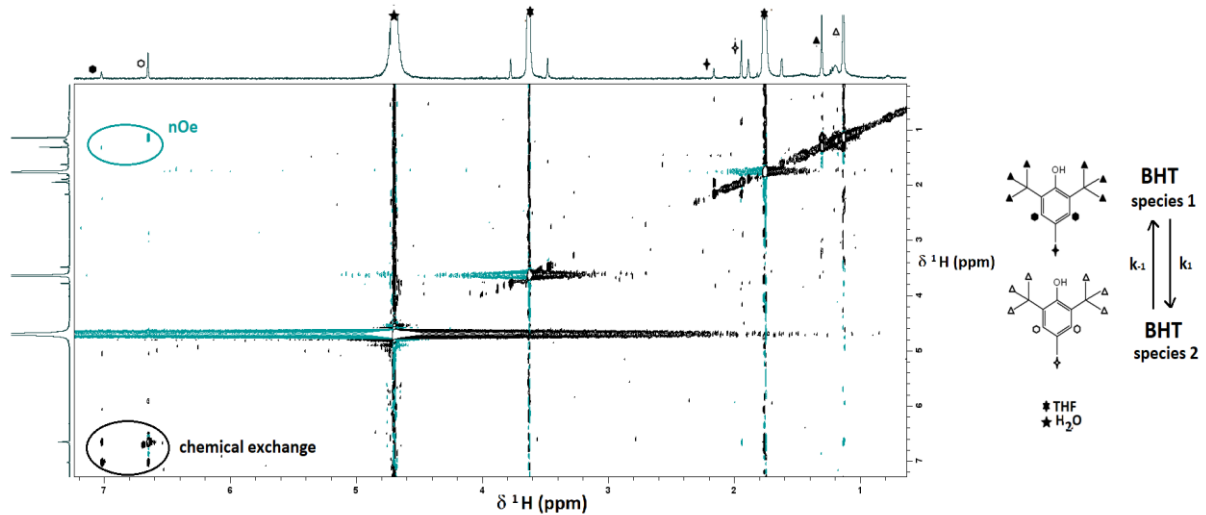


Figure 101 : Spectre RMN 2D <sup>1</sup>H NOESY du BHT pour l'échantillon a<sub>6</sub> ( $\Phi_{\text{THF-d8}} = 0,1$  et  $\Phi_{\text{BHT}} = 2,5 \cdot 10^{-5}$ ). Les résonances des protons du BHT sont identifiées par des symboles en fonction de leur environnement chimique comme indiqué sur les molécules dessinées à droite du spectre.

## I.6 Conclusion intermédiaire de la partie I

A ce stade, nous avons confirmé qu'une simple observation visuelle n'est pas appropriée pour déterminer l'emplacement de la courbe binodale dans le système BHT/THF/H<sub>2</sub>O à de faibles concentrations de soluté. Le suivi de l'évolution de l'échantillon par des techniques de diffusion de la lumière telles que la SMLS, mais aussi le NTA ou la DLS permet de retrouver la forme linéaire attendue de la courbe binodale dans la représentation standard semi-Log.

Quant aux expériences RMN, elles ont permis de :

- Révéler l'état physique du BHT au sein des gouttelettes du domaine Ouzo,
- Démontrer la dynamique d'échange entre les molécules de BHT présentes dans la phase dispersée et dans la phase continue.

Afin de généraliser ces résultats, nous avons décidé d'étudier de nouveaux systèmes.

## II Étude des systèmes avec une huile comme soluté hydrophobe.

### II.1 Construction des diagrammes de phase par observation visuelle

Nous avons considéré les systèmes  $\alpha$ -tocophérol/THF/H<sub>2</sub>O et limonène/DMSO/H<sub>2</sub>O. Le limonène et l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) sont tous deux des huiles. Les diagrammes de phase ont d'abord été construits par observation visuelle des échantillons entre limpides, troubles et diphasiques comme pour le système BHT/THF/H<sub>2</sub>O. Comme précédemment, la courbe de turbidité s'écarte de la binodale aux faibles fractions de solvant (Figure 102).

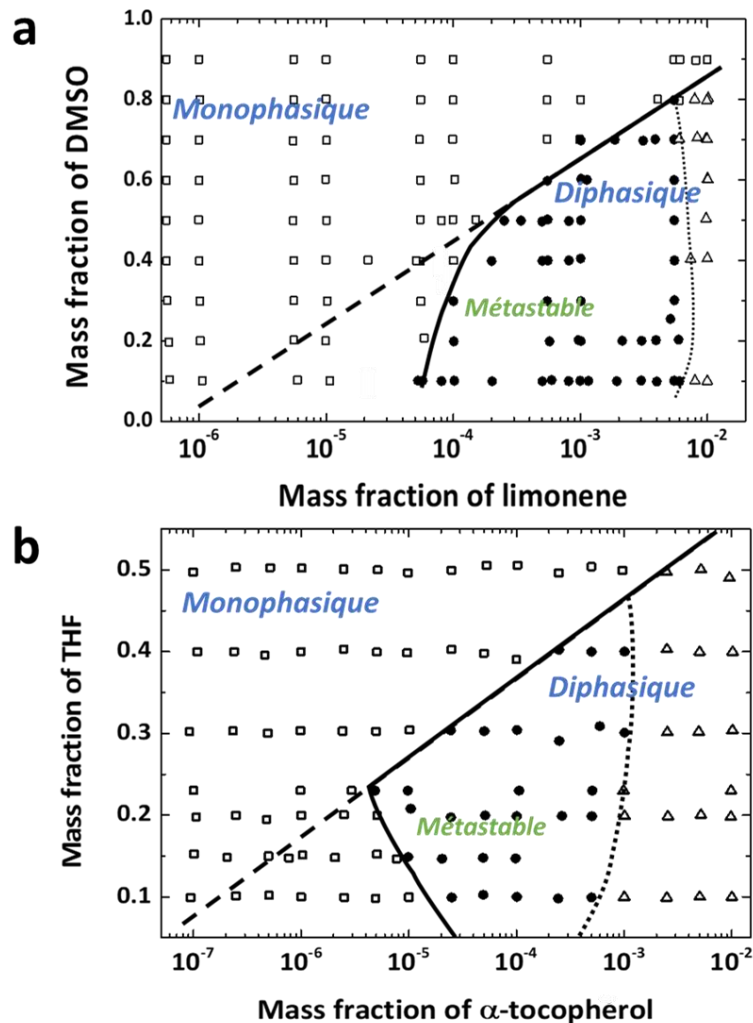


Figure 102 : Représentation semi-logarithmique du diagramme de phase déterminé par observation visuelle des systèmes (a) limonène/DMSO/H<sub>2</sub>O et (b)  $\alpha$ -tocophérol/THF/H<sub>2</sub>O. Avec (□) échantillons limpides ; (●) échantillons troubles ; (Δ) échantillons diphasiques. (—) courbe de turbidité, (- - -) extrapolation linéaire de la courbe de turbidité, (...) limite entre les échantillons troubles et macroscopiquement diphasiques.

## II.2 Détermination de la binodale par analyse SMLS (et NTA)

### II.2.a Pour le système limonène/DMSO/H<sub>2</sub>O

L'analyse SMLS a été réalisée pour les compositions d'intérêt du système limonène/DMSO/H<sub>2</sub>O (Figure 103). L'analyse de stabilité confirme que la courbe binodale correspond à la ligne droite extrapolée à partir des concentrations élevées. En effet, les

compositions avant la binodale sont stables, alors que les compositions après cette courbe évoluent avec le temps. Nous avons aussi constaté pour ce système que la localisation de la binodale déterminée par SMLS ne paraît pas influencée par le type de mélange (vortex ou manuel), mais le mélange au vortex semble ici ralentir l'évolution des échantillons  $d_4$  et  $d_5$  dans le domaine métastable comparé au mélange manuel (Figure 104).

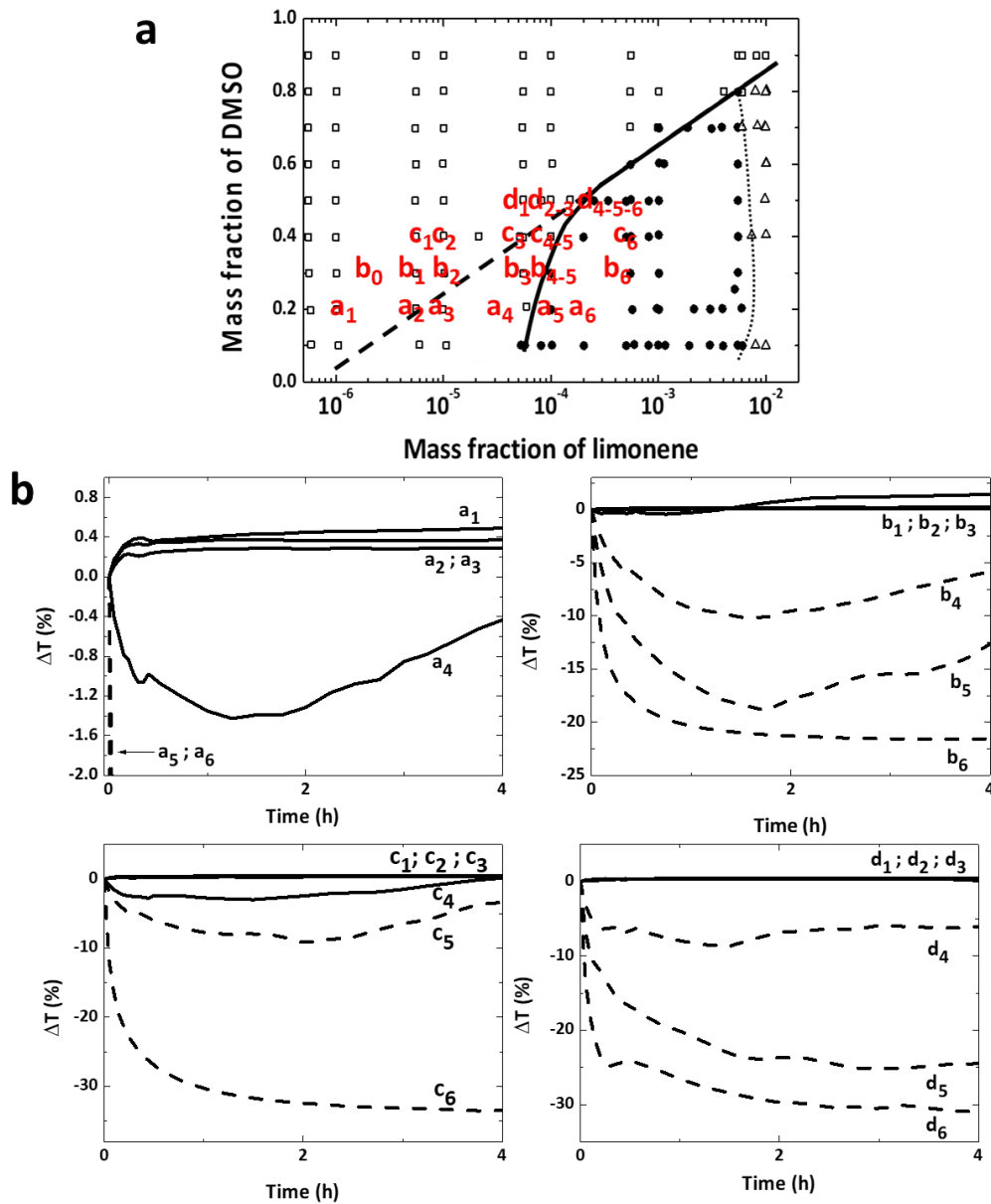


Figure 103 : (a) Diagramme de phase du système limonene/DMSO/H<sub>2</sub>O, avec  $a_n$  pour les échantillons à  $\Phi_{DMSO} = 0,2$ ,  $b_n$  à  $\Phi_{DMSO} = 0,3$ ,  $c_n$  à  $\Phi_{DMSO} = 0,4$  et  $d_n$  à  $\Phi_{DMSO} = 0,5$ . (b) Analyse de la stabilité par SMLS : transmission relative mesurée à mi-hauteur des échantillons  $a_n$  à  $d_n$ . Ligne pleine (—) : échantillons limpides ; ligne pointillée (---) : échantillons troubles.

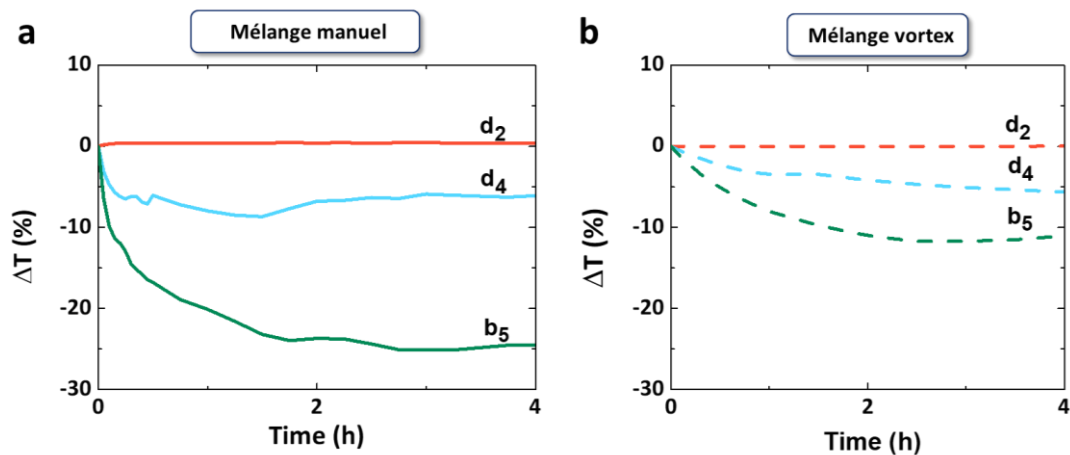


Figure 104 : Analyse de la stabilité par SMLS selon les conditions de mélange avec (a) (—) pour un « mélange manuel » et (b) (- - -) pour un mélange au vortex. Transmission relative mesurée à mi-hauteur des échantillons  $d_2$  (avant la binodale – domaine SFME ; trait rouge) et  $d_4$ - $d_5$  (après la binodale – domaine métastable ; trait bleu et trait vert).

Comme pour le système BHT/THF/H<sub>2</sub>O, nous avons analysé au NTA (Figure 105.a) les compositions de la série d'échantillons  $b_n$  ( $\Phi_{\text{THF}} = 0,3$ ) :

- avant la courbe binodale (ligne extrapolée de la Figure 103.a ; échantillons  $b_0$  à  $\Phi_{\text{BHT}} = 2.10^{-6}$ ,  $b_1$  à  $\Phi_{\text{BHT}} = 5.10^{-6}$  et  $b_2$  à  $\Phi_{\text{BHT}} = 10^{-5}$ ),
- dans la zone située entre la courbe de turbidité et la binodale ( $b_3$  à  $\Phi_{\text{BHT}} = 5.10^{-5}$ ),
- ainsi qu'après la courbe de turbidité (à  $\Phi_{\text{BHT}} = 2.10^{-4}$ , après le point  $b_5$ ).

Ces analyses NTA ont permis de confirmer ce que nous avons observé dans les Figure 88 et Figure 95 pour le système BHT/THF/H<sub>2</sub>O. En effet, les échantillons limpides avant la binodale,  $b_0$ - $b_2$ , comportent des particules ayant un diamètre compris entre 50 et 90 nm qui ne semblent pas évoluer après 3h. Après cette courbe binodale, l'échantillon  $b_3$  qui semble limpide évolue au cours du temps (diamètre valant  $\sim 60$  nm à  $t_0$  et  $\sim 142$  nm à 3 h). Il appartient alors au domaine métastable. Enfin, l'échantillon se situant après la courbe de turbidité du digramme de phase ( $>b_5$ ) devient plus polydispersé avec de plus grandes tailles qu'avant ( $>100$  nm) et qui dépassent la limite du NTA (1  $\mu\text{m}$ ) après 3 h. Le NTA a mesuré aussi du bruit pour ce dernier échantillon dû à une trop importante diffusion de la lumière des objets présents. C'est pour cette raison que l'on peut observer un petit pic NTA dans les petites tailles à  $t_0$ .

Nous avons aussi observé la distribution de taille de quelques échantillons à  $\Phi_{\text{THF}} = 0,5$ , où il n'y a pas d'ambiguïté pour la localisation de la binodale. Dans la Figure 105.b, il semble évident que les échantillons présentent une monodispersité en termes de distribution de taille, avec des tailles autour de 80-90 nm. En revanche, la distribution s'élargit après la binodale avec l'apparition de plus grosses gouttes.

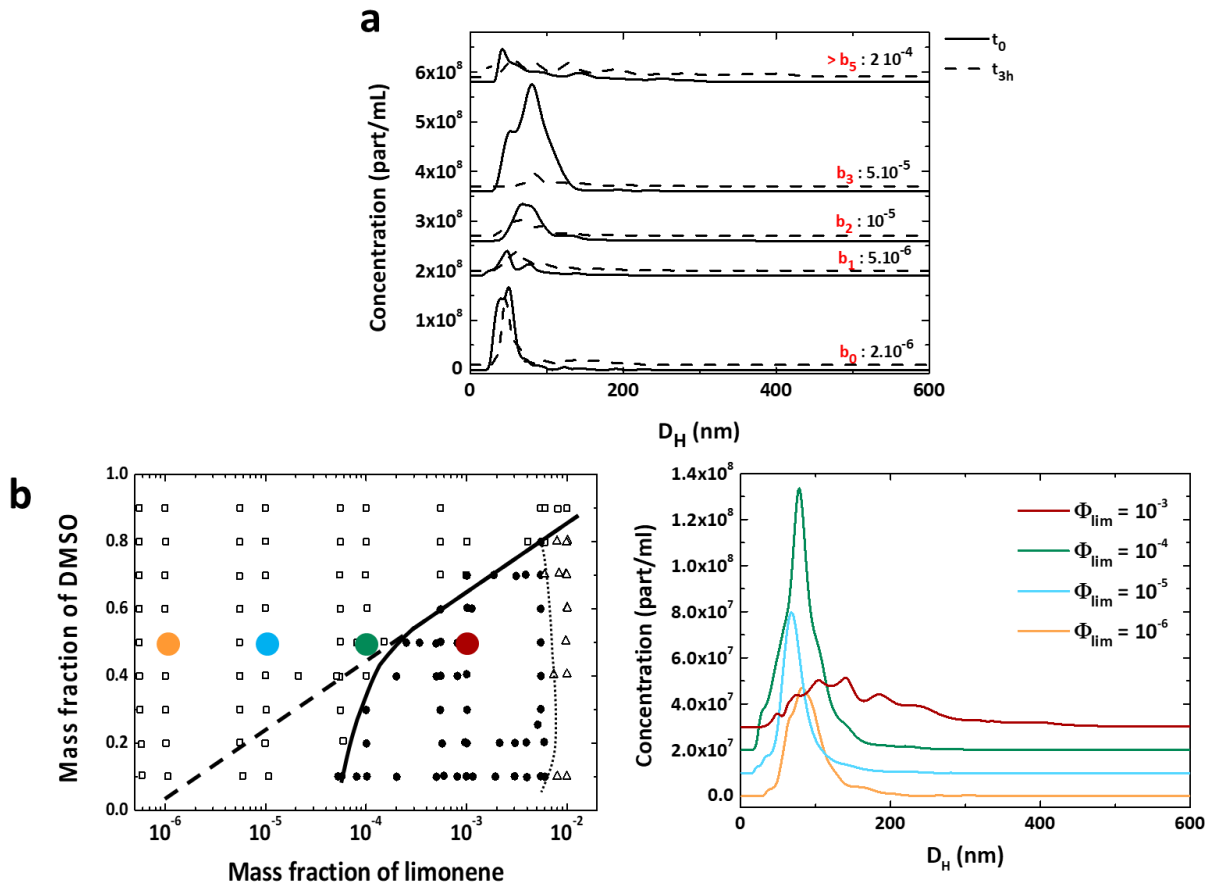


Figure 105 : Distribution de taille du système limonene/THF/H<sub>2</sub>O mesurée par NTA. (a) à  $\Phi_{THF} = 0,3$  au temps 0 (—) et 3 h (- -) pour les compositions  $b_2$  à  $>b_5$ . (b) à  $\Phi_{THF} = 0,5$  au temps 0 (—) à droite pour les compositions représentées sur le diagramme de phase à gauche en fonction des couleurs : (●)  $\Phi_{limonène} = 10^{-6}$  ; (●)  $\Phi_{limonène} = 10^{-5}$  ; (●)  $\Phi_{limonène} = 10^{-4}$  ; (●)  $\Phi_{limonène} = 10^{-3}$ .

## II.2.b Pour le système $\alpha$ -tocophérol/THF/H<sub>2</sub>O

Dans le cas du système  $\alpha$ -tocophérol/THF/H<sub>2</sub>O, les variations de transmission des échantillons autour de la courbe binodale sont trop faibles pour identifier correctement la transition. Ceci est dû au fait que la fraction massique d' $\alpha$ -tocophérol au niveau de la binodale est inférieure à  $10^{-6}$ , pour la ligne correspondante ( $\Phi_{THF} = 0,15$ , Figure 106.a et b). Cependant, avec les analyses NTA (Figure 106.c), nous pouvons assez clairement attribuer les différentes distributions de taille aux domaines :

- Limpide avant la binodale en noir, avec une stabilité de la taille après 3h.
- Limpide entre la binodale et la courbe de turbidité, avec une évolution de la taille au cours du temps (métastabilité).
- Turbide après la courbe de turbidité, avec une polydispersité en termes de distribution de taille.

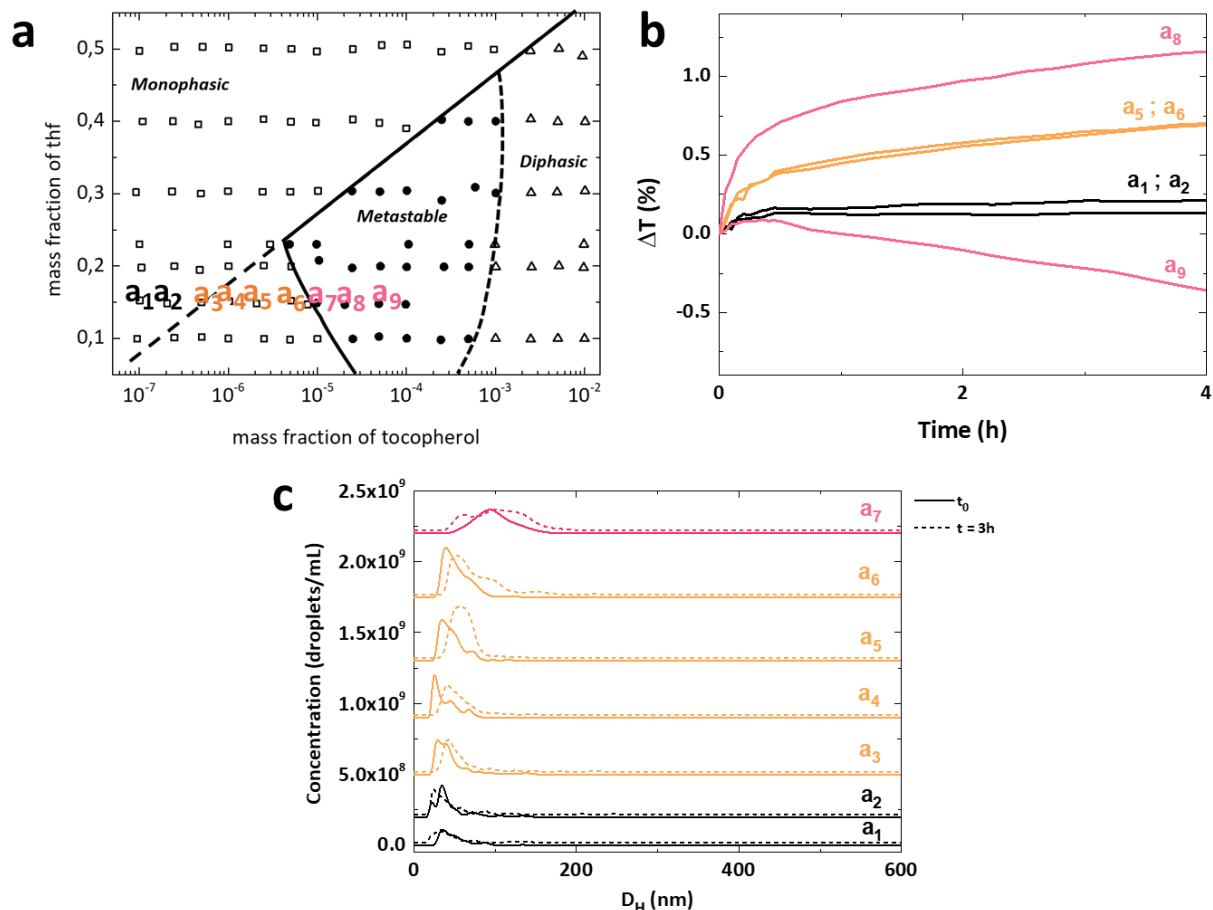


Figure 106 : (a) Diagramme de phase du système  $\alpha$ -tocophérol/THF/H<sub>2</sub>O, avec  $a_n$  pour les échantillons à  $\Phi_{\text{THF}} = 0,15$ . Les échantillons en noir sont avant la binodale (droite pointillée extrapolée), en orange entre la courbe de turbidité et la binodale, et en rose après la courbe de turbidité. (b) Analyse de la stabilité par SMLS : transmission relative mesurée à mi-hauteur des échantillons  $a_n$ . (c) Distribution de taille des échantillons  $a_n$  mesurée par NTA au temps  $t_0$  (—) et  $t = 3 \text{ h}$  (- -).

### II.3 Comparaison globale des 2 systèmes étudiés avec le BHT/THF/H<sub>2</sub>O

Une comparaison des analyses NTA a été réalisée pour les 3 systèmes étudiés jusqu'à présent (BHT/THF/H<sub>2</sub>O ; limonène/DMSO/H<sub>2</sub>O ;  $\alpha$ -tocophérol/THF/H<sub>2</sub>O). Et pour chaque ligne, le diamètre hydrodynamique moyen est représenté en fonction de la fraction massique du soluté,  $\Phi$ , normalisée par la fraction massique au niveau de la courbe de turbidité,  $\Phi^{**}$  (ligne pleine, Figure 107). Cette représentation met clairement en évidence, pour les trois systèmes, une augmentation soudaine (typiquement par un facteur 2) de la taille moyenne des gouttelettes au niveau de la courbe de turbidité. En revanche, la taille reste presque constante sur deux décades de fractions massiques inférieures à cette courbe. Au-delà de cette limite, la taille devient rapidement trop grande et/ou la distribution trop large pour être déterminée par NTA.

Il est intéressant de noter que ce résultat indique que la courbe de turbidité n'est pas une simple limite de détection mais a une signification physique. Notre compréhension de cette limite est qu'il existe à gauche un domaine Ouzo transparent constitué de petites gouttelettes (typiquement  $\leq 100 \text{ nm}$ ) avec une faible dispersité, et sur son côté droit un domaine Ouzo turbide avec des gouttelettes de grande taille et/ou polydisperses. À ce stade, il est intéressant de noter qu'il existe une continuité de taille entre les domaines SFME et



Ouzo. Une explication possible est que les agrégats de SFME existent dans le domaine Ouzo près de la frontière, telle une situation sursaturée. Cependant, le domaine Ouzo est finalement destiné à former deux phases séparées. Par conséquent, ces agrégats vont évoluer lentement pour former des gouttelettes d'Ouzo, et finalement une phase séparée.

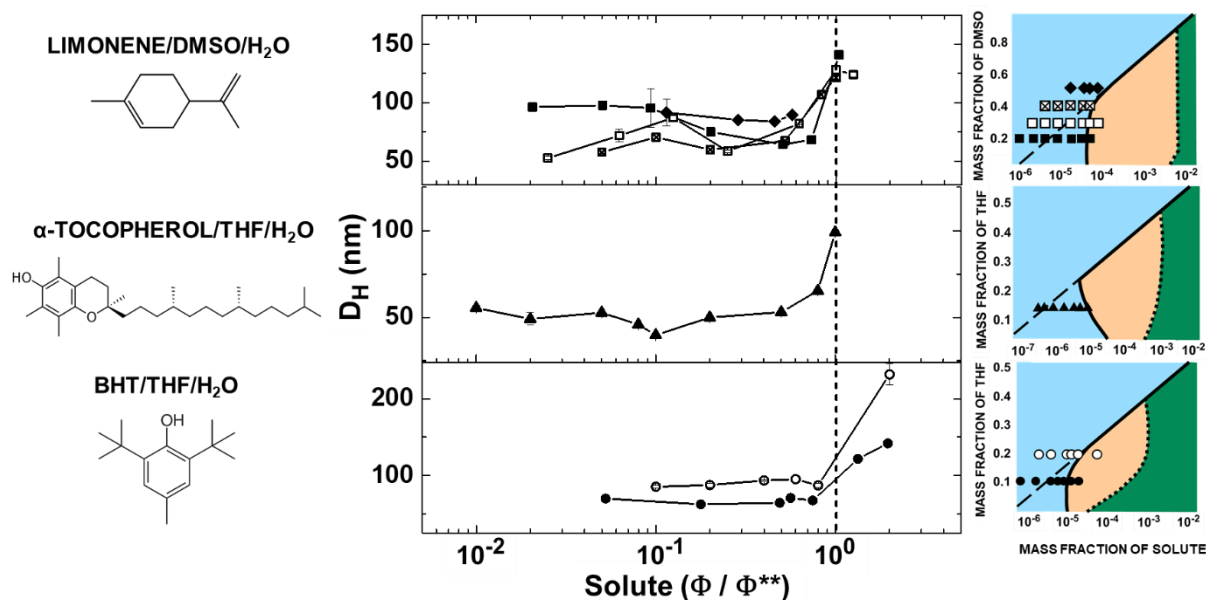


Figure 107 : De gauche à droite : Formule moléculaire des solutés ; diamètre hydrodynamique moyen ( $D_H$ ) mesuré à partir du NTA et tracé en fonction de la fraction massique du soluté ( $\Phi$ ) normalisée par les fractions massiques correspondantes à la courbe de turbidité ( $\Phi^{**}$ ) ; et diagrammes de phase construits par observation visuelle (bleu = limpide ; vert = diphasique ; orange = turbide).

### III Étude du système BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O : cas d'un soluté solide fluorescent

#### III.1 Construction d'un diagramme de phase selon la fluorescence du BODIPY

Nous avons utilisé un colorant BODIPY synthétisé dans nos laboratoires (Equipe COInt, Olivier Mongin) dont la structure est représentée dans la Figure 83. Ce composé produit une forte émission verte lorsqu'il est solubilisé dans des solvants organiques et une émission rouge plus faible à l'état solide (Figure 108).<sup>19</sup>

Nous avons étudié le système BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O. Contrairement aux systèmes précédents, il n'a pas été possible de déterminer la courbe de turbidité à cause de la fluorescence du BODIPY (Figure 109.a). Au lieu de cela, nous avons affiché la couleur des échantillons sous illumination UV dans un « diagramme d'émission » (Figure 109.b et c). Les échantillons très dilués ( $\Phi_{\text{BODIPY}} < 10^{-6}$ ) semblent sombres sur les Figure 109.b et c car ils émettent faiblement. Comme nous l'avons anticipé, l'émission verte est plus intense dans la région riche en solvant (partie haut-gauche du diagramme). En augmentant la quantité de colorant, l'émission verte diminue au profit de l'émission rouge, ce qui indique la présence de particules solides de BODIPY.

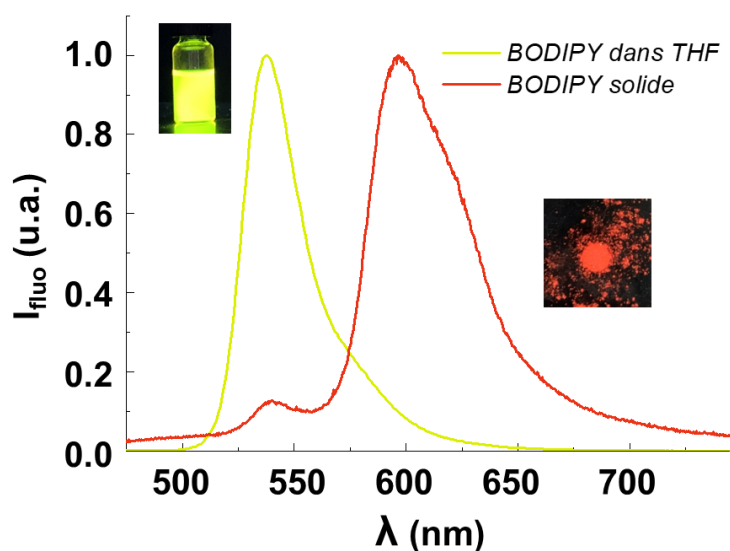


Figure 108 : Spectres d'émission de référence du colorant BODIPY pur (unités arbitraires) ; rouge : état solide (poudre) ; jaune : dissous dans le THF.<sup>19</sup>

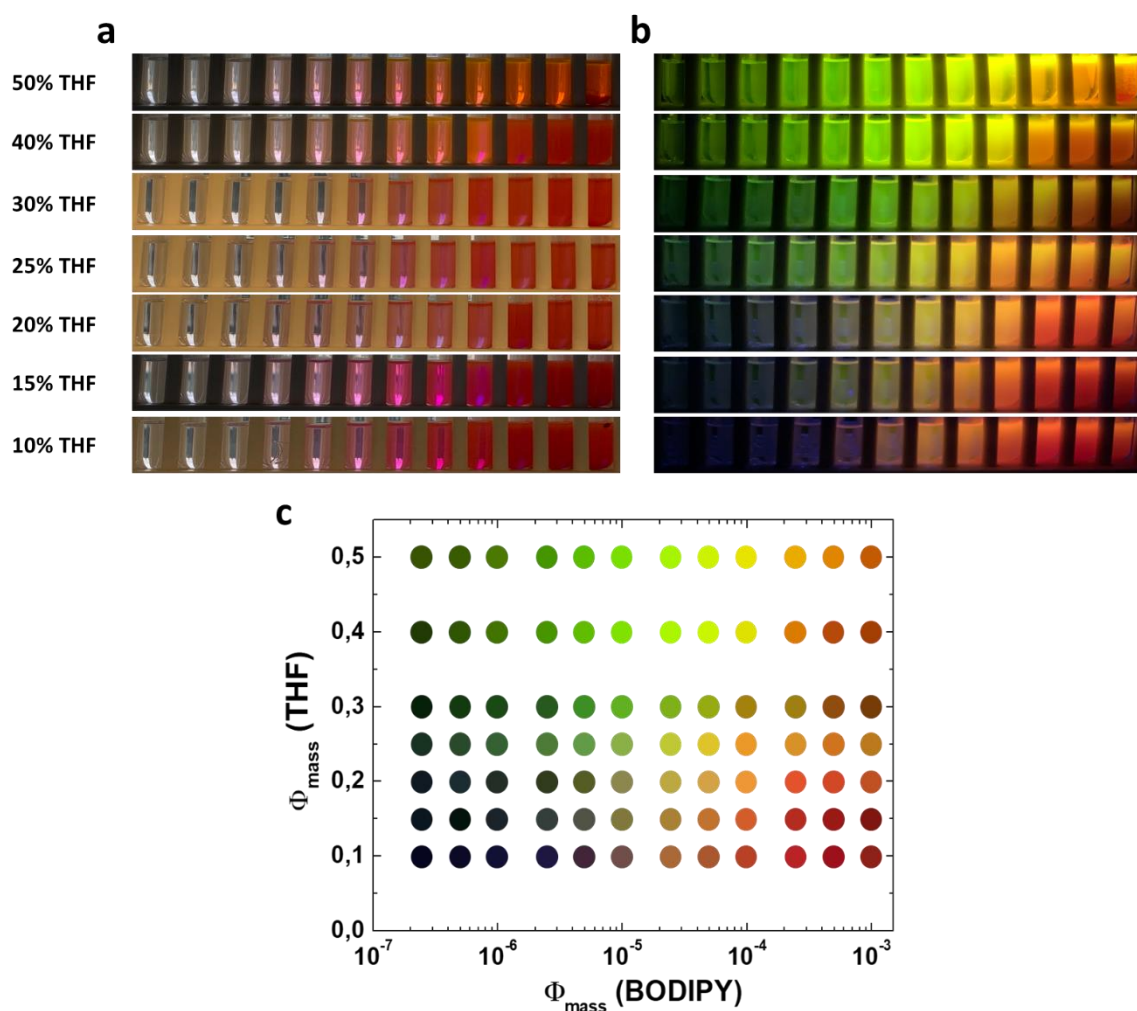


Figure 109 : (a-b) Photos des échantillons pour différentes fractions massiques de THF et de BODIPY prises (a) sans ou (b) avec illumination sous excitation UV à 365 nm. (c) Diagramme d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 365$  nm) selon les photos prises dans la figure (b).

Nous avons utilisé l'analyse de stabilité par SMLS (Figure 110.a) le long des lignes de composition  $\Phi_{\text{THF}} = 0,1, 0,2, 0,3$  et  $0,4$  pour construire la courbe binodale. Il est important de garder en tête que le SMLS utilise un laser proche infrarouge à 880 nm, qui est éloigné de la plage d'excitation du BODIPY. Pour chaque ligne, nous avons déterminé la limite entre les échantillons stables et évolutifs comme nous avons pu le faire précédemment pour les autres systèmes. Cela dessine une courbe linéaire que nous avons superposée au diagramme d'émission de la Figure 109.c (Figure 110.b).

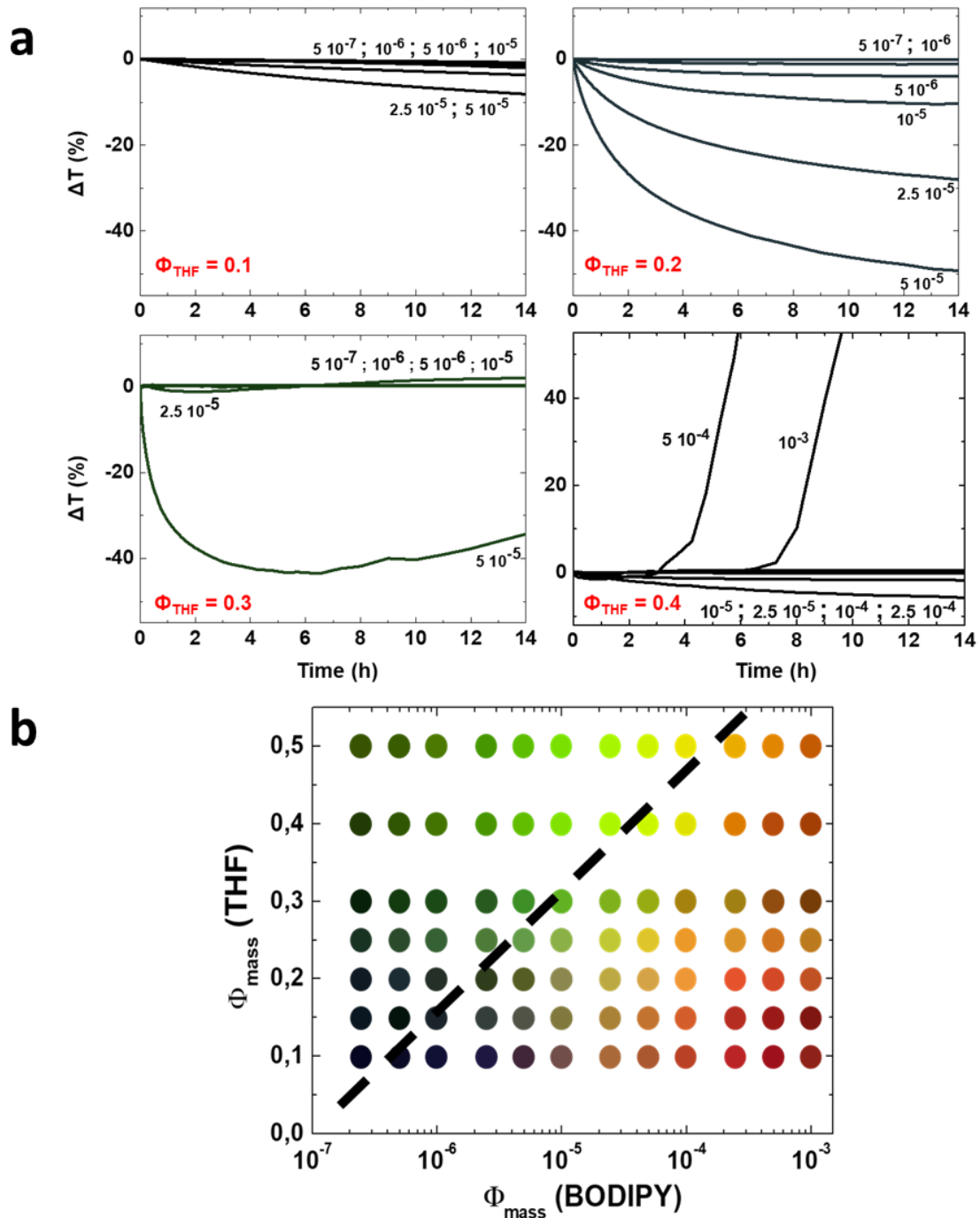


Figure 110 : Diagramme d'émission de fluorescence ( $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ). La ligne pointillée est la limite entre les échantillons stables et évolutifs dans le temps tels que déterminés par SMLS.

### III.2 Détermination de la composition de la goutte par fluorescence

On considère généralement abusivement que dans le cas des émulsions Ouzo, les gouttelettes sont principalement constituées de soluté, mais elles peuvent être plus ou moins gonflées par le solvant et même contenir des traces d'eau. La méthode la plus rigoureuse pour déterminer la composition des phases en équilibre est de construire les lignes de liaison dans le diagramme de phase.<sup>1</sup> Cependant, cette méthode n'est pas applicable lorsqu'un des composés est à une concentration extrêmement faible, comme c'est le cas ici. Les résultats de la partie I.5 concernant l'étude RMN du système BHT/THF/H<sub>2</sub>O montrent que la phase dispersée dans le domaine Ouzo peut rester liquide. Ici, nous avons profité d'un colorant fluorescent, qui est émissif dans les états liquide et solide avec des longueurs d'onde différentes, pour étudier l'état physique d'un soluté solide à travers le diagramme de phase.

D'après la Figure 111, la plupart des échantillons le long de la courbe binodale émettent une lumière verte. Nous avons centrifugé trois échantillons dont un proche de la binodale présentant une émission verte ( $f_0$  :  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  ;  $\Phi_{\text{BODIPY}} = 2,5 \cdot 10^{-6}$ ) et deux se trouvant au-delà de la courbe avec une émission jaune ( $f_1$  :  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  ;  $\Phi_{\text{BODIPY}} = 2,5 \cdot 10^{-5}$ ) et rouge ( $f_2$  :  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  ;  $\Phi_{\text{BODIPY}} = 2,5 \cdot 10^{-4}$ ). Pour l'échantillon  $f_0$ , la centrifugation n'a pas permis d'observer un culot, probablement dû à la trop faible concentration en BODIPY dans le système. En revanche, les culots des échantillons  $f_1$  et  $f_2$  émettent une lumière jaune et rouge sous irradiation respectivement (Figure 111), ce qui indique que la composition de la phase dispersée évolue du BODIPY gonflé par le solvant au BODIPY solide pur de façon continue.

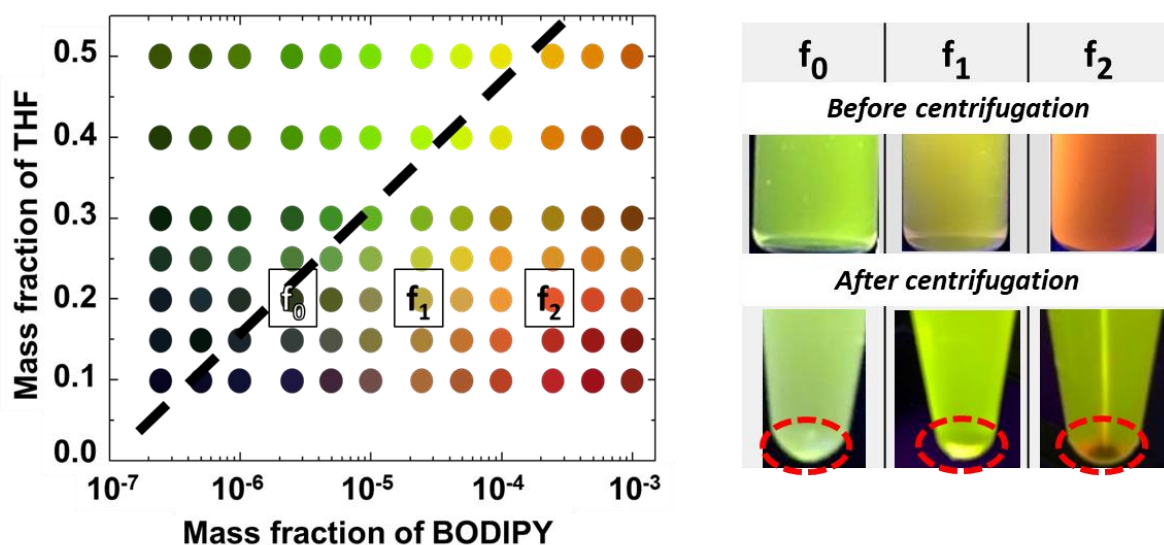


Figure 111 : A gauche : Diagramme de phase à partir de la fluorescence des échantillons, avec  $f_0$ ,  $f_1$  et  $f_2$  qui représentent les compositions que nous avons centrifugées ( $f_0$  :  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  et  $\Phi_{\text{BODIPY}} = 2,5 \cdot 10^{-6}$  ;  $f_1$  :  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  et  $\Phi_{\text{BODIPY}} = 2,5 \cdot 10^{-5}$  ;  $f_2$  :  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  et  $\Phi_{\text{BODIPY}} = 2,5 \cdot 10^{-4}$ ). A droite : photos des échantillons  $f_0$ ,  $f_1$  et  $f_2$  sous illumination UV à 365 nm. Les cercles rouges entourent les culots fluorescents après centrifugation des 3 échantillons.

### III.3 Analyse DLS et Mesure de la mobilité électrophorétique

L'analyse NTA s'est avérée limitée aux échantillons très dilués en raison de l'excitation de la fluorescence du BODIPY à la longueur d'onde de fonctionnement (405 nm), mais des mesures de DLS (longueur d'onde du laser de 638 nm) ont pu être réalisées. Par conséquent, nous avons suivi les échantillons pendant 3 h après leur préparation par mesure DLS.

Les résultats pour la ligne de composition  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  sont présentés dans la Figure 112. La première observation est qu'il existe un domaine SFME dans la gamme de concentration  $\Phi_{\text{BODIPY}} = 10^{-7}$ -  $2,5 \cdot 10^{-6}$ , avec des gouttelettes ayant un diamètre d'environ 100 nm et stables dans le temps. À des concentrations plus importantes ( $5 \cdot 10^{-6}$  et au-delà), la taille évolue avec le temps. Ces observations sont cohérentes avec les mesures du SMLS et confirment la localisation de la courbe binodale.

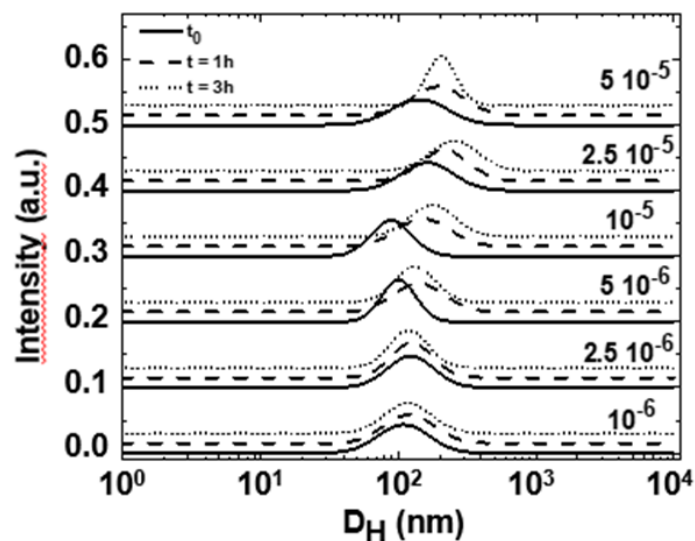


Figure 112 : Mesures DLS au temps initial  $t_0$  (—) ; après 1 h (- - -) ; après 3 h (· · · ·) de la ligne de composition  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  du système BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O.

Enfin, nous avons mesuré la mobilité électrophorétique des échantillons le long de la ligne de composition  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  (Figure 113) en utilisant un instrument Malvern Nanosizer fonctionnant à 633 nm. Comme précédemment, nous avons trouvé un maximum de mobilité (négative) au niveau de la binodale, lié à une charge fortement négative à l'interface. De plus, l'évolution de la mobilité électrophorétique est cohérente avec la stabilité colloïdale telle qu'observée avec l'analyse DLS et SMLS, à savoir une diminution de la charge de surface des gouttes qui sont alors moins stables après la binodale.

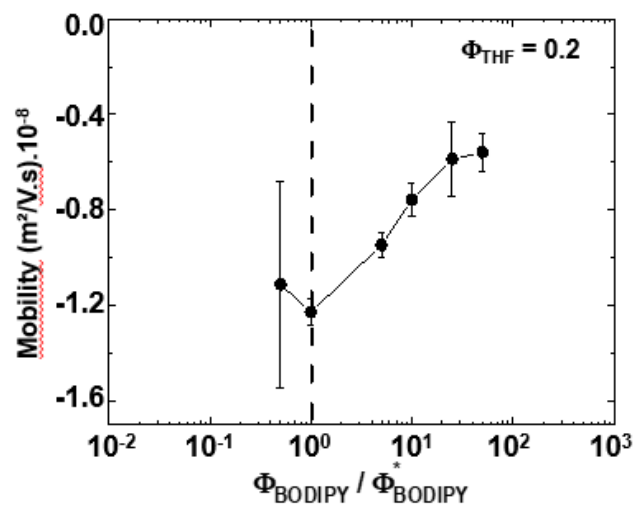


Figure 113 : Mobilité électrophorétique de la phase dispersée en fonction de la fraction massique de BODIPY normalisée par la fraction à la binodale de la ligne de composition  $\Phi_{\text{THF}} = 0,2$  du système BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O.

## IV Conclusions et perspectives

Dans le but de clarifier le comportement général des émulsions Ouzo et la méthodologie pour déterminer sans ambiguïté la courbe binodale, nous avons réalisé un examen minutieux de quatre systèmes ternaires, avec des solutés de faible poids moléculaire, à la fois liquides et solides. Contrairement à de nombreuses autres études, nous n'avons pas utilisé de tensioactif pour éviter toute interférence avec les systèmes vierges. Nous avons émis l'hypothèse que la combinaison de l'analyse DLS classique et du contrôle de la stabilité nous permettrait de délimiter le domaine Ouzo. Cette hypothèse n'est pas évidente, car des états sursaturés homogènes peuvent exister dans une zone métastable. Cependant, dans le cas de l'effet Ouzo, la nucléation est initiée puisque par définition des particules sont présentes. C'est la croissance des gouttelettes qui est cinétiquement bloquée ou ralentie.<sup>20</sup> Ainsi, les études de stabilité utilisant la SMLS, mais aussi le NTA ou la DLS, nous ont permis de discriminer efficacement les agrégats du domaine Ouzo (évoluant plus ou moins lentement) des agrégats du domaine SFME (thermodynamiquement stables), validant cette approche originale.

Dans la plupart des études réalisées à ce jour, les diagrammes de phase ont été établis sur la base d'une observation visuelle de la turbidité et/ou d'une analyse de la taille par microscopie électronique à balayage (MEB), DLS ou d'autres techniques d'analyse de la taille.<sup>5,21-23</sup> En outre, des tensioactifs peuvent être ajoutés au système pour assurer la stabilité colloïdale des particules pendant le temps d'analyse.<sup>21,24</sup> Par conséquent, les critères de définition du domaine Ouzo ont été variables. Ainsi, la limite entre le domaine monophasique et le domaine Ouzo est souvent considérée comme le début de la turbidité, déterminée par une observation visuelle. Dans d'autres cas, la mesure du rayon hydrodynamique moyen a été utilisée comme critère.<sup>4,21</sup> En effet, l'évolution de ce diamètre avec la concentration en soluté montre deux régimes : un régime constant et un régime où la taille augmente avec la concentration en soluté. La transition entre ces deux régimes a été interprétée comme la frontière entre le domaine SFME et celui de l'Ouzo. Il faut noter que plusieurs travaux sont basés sur l'hypothèse qu'un système Ouzo doit être turbide et ne fournissent pas d'analyse sur la zone transparente.<sup>5,25</sup> En ce qui concerne la limite à des hautes concentrations du domaine Ouzo, les études basées sur la microscopie électronique à balayage (MEB, principalement dans le cas des polymères) ont utilisé un critère de taille-dispersité pour définir les domaines "stables" et "instables" de l'Ouzo.<sup>6,23</sup> Dans d'autres cas, des compositions qui étaient troubles mais qui n'étaient pas en séparation de phase (crémage ou sédimentation) après un "certain temps" ont été considérées comme des émulsions Ouzo.<sup>26</sup>

Alors que nous avons abordé le cas d'un soluté de faible poids moléculaire (solide ou liquide), de nombreuses autres études ont porté sur la nanopréciipitation de polymères par déplacement de solvant. Des différences significatives peuvent être notées. En effet, dans le cas des polymères, la limite de solubilité est peu dépendante de la concentration en polymère, ce qui se traduirait par une ligne presque horizontale dans la représentation de la Figure 84.<sup>6,23</sup> De plus, des études détaillées de la dépendance de la taille des particules avec la concentration en solvant et/ou en polymère ont montré que les particules de polymère se forment par un mécanisme de nucléation-agrégation, favorisant une distribution de taille étroite.<sup>6</sup> En fait, la surface du domaine où l'on observe des particules avec une faible distribution de taille est généralement beaucoup plus grande que pour les composés de faible poids moléculaire. Nous pensons que dans le cas des polymères, la nucléation-croissance

permet d'obtenir facilement des particules de taille homogène (que l'on appelle « Ouzo stable »), et que des compositions polydisperses contenant des particules de taille micronique (appelées "Ouzo instable") apparaissent au voisinage de la courbe spinodale. Il faut également noter que les tensioactifs sont couramment utilisés pour limiter l'agrégation des particules de polymère et peuvent influencer les conditions de nucléation, notamment en réduisant le rayon critique de nucléation.<sup>22,27</sup>

Le contrôle de l'état physique des nanoprécipités (liquide, solide amorphe ou cristallin) est très important, car il régit la solubilité et les propriétés thérapeutiques de certains médicaments. Bien que la plupart des études montrent que la nanoprécipitation conduit rarement à une structure cristalline, les raisons de ce phénomène sont encore débattues.<sup>27</sup> Une hypothèse est la présence de solvant, agissant comme un plastifiant des particules, mais les preuves expérimentales manquent. La technique SANS, en particulier avec la variation du contraste, pourrait être utilisée en combinaison avec des modèles pour déterminer la composition et la structure (homogène, cœur-coquille) des gouttelettes/particules à des dilutions modérées.<sup>2,28</sup> Ainsi, une précédente étude par la technique SANS a suggéré que les agrégats formés dans le domaine SFME du système BHT/THF/D<sub>2</sub>O consistent en un petit noyau de BHT entouré d'une grande enveloppe de THF.<sup>2</sup> Néanmoins, nos mesures de RMN et d'émission de fluorescence ont ici clairement établi la présence de solvant avec le soluté dans la phase dispersée. Il faut garder à l'esprit que quelques études RMN de l'effet Ouzo ont déjà été réalisées sur des solutés liquides à 25 °C (anéthole ou toluène) et visaient à caractériser la dynamique d'échange entre les phases dispersée et continue.<sup>8,26</sup>

La métastabilité des gouttelettes est l'une des caractéristiques les plus intrigantes des émulsions Ouzo. Bien que le taux de coalescence des gouttelettes diminue avec la concentration, la dilution généralement élevée du domaine Ouzo ne suffit pas à expliquer leur stabilité, parfois sur plusieurs mois.<sup>20</sup> L'adsorption d'espèces chargées à l'interface a été proposée comme une explication alternative, et des preuves expérimentales de l'existence d'une charge de surface négative sur les émulsions produites par déplacement de solvant ont été fournies.<sup>11,12,29</sup> Cette charge de surface dépend évidemment du pH et peut être due soit à l'adsorption directe d'ions endogènes CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou OH<sup>-</sup> à l'interface, soit à la réaction des ions hydroxyles avec des impuretés acides. Dans notre cas, nos résultats de mesure pH discriminent l'adsorption d'ions OH<sup>-</sup> mais nous n'avons pas d'explication sur l'augmentation de la charge de surface négative au niveau de la binodale. Ici, pour la première fois, nous suivons l'évolution de la charge avec la composition des solutés hydrophobes, du domaine SFME au domaine Ouzo, et montrons un changement de régime au niveau de la binodale, qui peut être lié à un changement de la composition des objets dispersés.

En résumé, la combinaison de techniques conventionnelles (DLS, Nanoparticle Tracking Analysis ou NTA) et moins conventionnelles (RMN, analyse de stabilité par SMLS, mobilité électrophorétique, fluorescence) nous a permis de remettre en question les points de vue classiques sur les émulsifications spontanées. Nous montrons que les quatre systèmes présentent un domaine SFME, séparé du domaine Ouzo par la courbe binodale. Il n'y a pas de discontinuité de taille au niveau de la binodale mais cette transition peut être déterminée en contrôlant la stabilité colloïdale de l'échantillon. En outre, les gouttelettes portent une charge négative spontanée qui présente un maximum au niveau de la binodale. Il est important de noter que nous avons clairement démontré que les émulsions Ouzo peuvent être



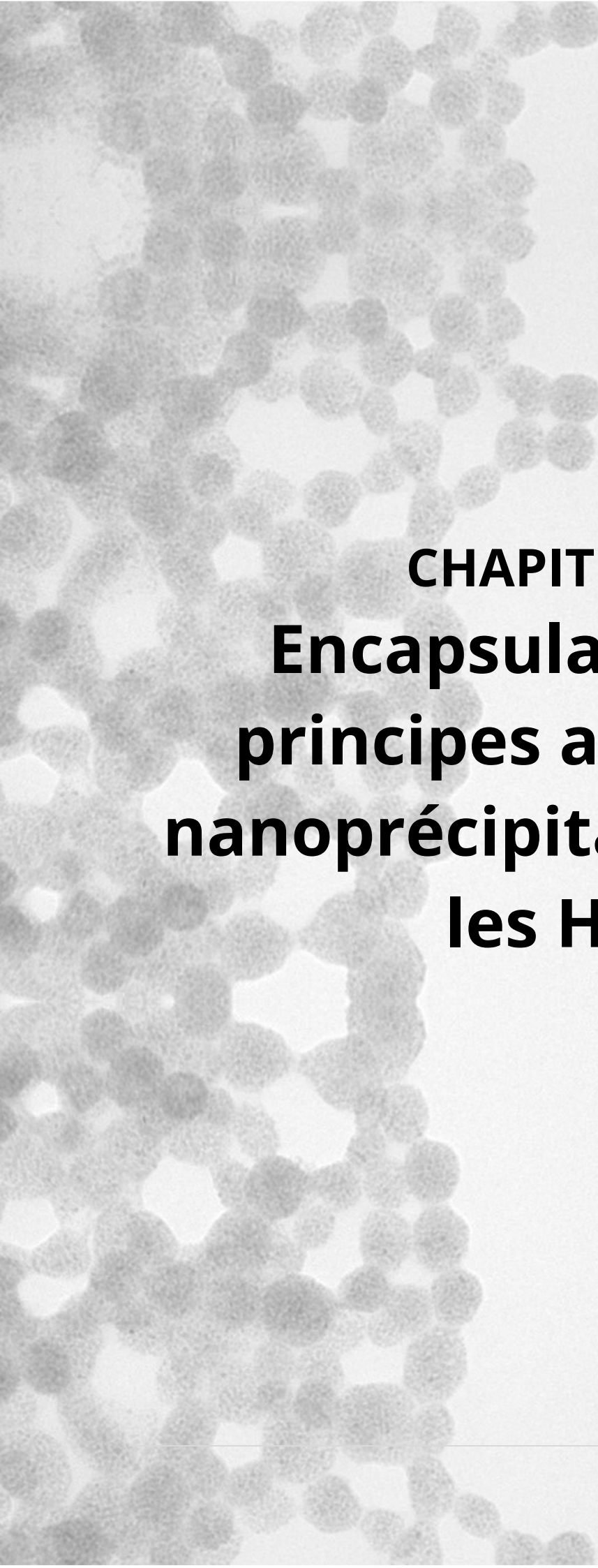
transparentes et être générées subtilement entre la courbe binodale et la courbe de turbidité. Par ailleurs, la courbe de turbidité marque l'augmentation abrupte de la polydispersité. Ces résultats remettent en cause la méthode d'observation visuelle pour identifier le domaine Ouzo, largement utilisée dans les processus de nanopréciipitation, et peuvent être utilisés comme un guide rationnel pour la conception de nanoparticules et de nanocapsules avec des polymères, des médicaments ou des matériaux inorganiques.

Il reste encore beaucoup à comprendre sur la transition entre les domaines SFME et Ouzo. Nous pensons que les travaux futurs devraient se concentrer sur l'analyse de la composition et de la structure de la phase dispersée dans les deux domaines. Des expériences cinétiques aux temps courts (de quelques millisecondes à quelques secondes en utilisant des dispositifs dits « stopped-flow ») peuvent également fournir des informations intéressantes sur les premiers moments de la nucléation des gouttelettes.

## V Références Bibliographiques

- (1) Arce, A.; Arce, A.; Rodriguez, O. Revising Concepts on Liquid–Liquid Extraction: Data Treatment and Data Reliability. *J. Chem. Eng. Data* **2022**, *67* (1), 286–296. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.1c00778>.
- (2) Li, Z.; Cheng, H.; Li, J.; Hao, J.; Zhang, L.; Hammouda, B.; Han, C. C. Large-Scale Structures in Tetrahydrofuran–Water Mixture with a Trace Amount of Antioxidant Butylhydroxytoluene (BHTA). *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (24), 7887–7895. <https://doi.org/10.1021/jp203777g>.
- (3) Bunkin, N. F.; Shkirin, A. V.; Lyakhov, G. A.; Kobelev, A. V.; Penkov, N. V.; Ugraitskaya, S. V.; Fesenko, E. E. Droplet-like Heterogeneity of Aqueous Tetrahydrofuran Solutions at the Submicrometer Scale. *J. Chem. Phys.* **2016**, *145* (18), 184501. <https://doi.org/10.1063/1.4966187>.
- (4) Goubault, C.; Igllicki, D.; Swain, R. A.; McVey, B. F. P.; Lefevre, B.; Rault, L.; Nayral, C.; Delpech, F.; Kahn, M. L.; Chevance, S.; Gauffre, F. Effect of Nanoparticles on Spontaneous Ouzo Emulsification. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *603*, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.06.104>.
- (5) Vitale, S. A.; Katz, J. L. Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid–Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect.” *Langmuir* **2003**, *19* (10), 4105–4110. <https://doi.org/10.1021/la026842o>.
- (6) Aubry, J.; Ganachaud, F.; Cohen Addad, J.-P.; Cabane, B. Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting: 1. Boundaries. *Langmuir* **2009**, *25* (4), 1970–1979. <https://doi.org/10.1021/la803000e>.
- (7) Ganachaud, F.; Katz, J. L. Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices. *ChemPhysChem* **2005**, *6* (2), 209–216. <https://doi.org/10.1002/cphc.200400527>.
- (8) Carteau, D.; Bassani, D.; Pianet, I. The “Ouzo Effect”: Following the Spontaneous Emulsification of Trans-Anethole in Water by NMR. *Comptes Rendus Chim.* **2008**, *11* (4–5), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2007.11.003>.
- (9) Botet, R.; Roger, K. How Do Interactions Control Droplet Size during Nanoprecipitation? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2016**, *22*, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.03.003>.
- (10) Roger, K.; Botet, R.; Cabane, B. Coalescence of Repelling Colloidal Droplets: A Route to Monodisperse Populations. *Langmuir* **2013**, *29* (19), 5689–5700. <https://doi.org/10.1021/la400498j>.
- (11) Yan, X.; Delgado, M.; Aubry, J.; Gribelin, O.; Stocco, A.; Boisson-Da Cruz, F.; Bernard, J.; Ganachaud, F. Central Role of Bicarbonate Anions in Charging Water/Hydrophobic Interfaces. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (1), 96–103. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.7b02993>.
- (12) Roger, K.; Cabane, B. Why Are Hydrophobic/Water Interfaces Negatively Charged? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (23), 5625–5628. <https://doi.org/10.1002/anie.201108228>.
- (13) Vácha, R.; Rick, S. W.; Jungwirth, P.; de Beer, A. G. F.; de Aguiar, H. B.; Samson, J.-S.; Roke, S. The Orientation and Charge of Water at the Hydrophobic Oil Droplet–Water Interface. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (26), 10204–10210. <https://doi.org/10.1021/ja202081x>.
- (14) Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. Investigation of Exchange Processes by Two-dimensional NMR Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71* (11), 4546–4553. <https://doi.org/10.1063/1.438208>.
- (15) Kaiser, R. Use of the Nuclear Overhauser Effect in the Analysis of High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra. *J. Chem. Phys.* **1963**, *39* (10), 2435–2442. <https://doi.org/10.1063/1.1734045>.
- (16) Anet, F. A. L.; Bourn, A. J. R. Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects <sup>1</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* (22), 5250–5251. <https://doi.org/10.1021/ja00950a048>.

- (17) Frunzi, M.; Baldwin, A. M.; Shibata, N.; Iwamatsu, S.-I.; Lawler, R. G.; Turro, N. J. Kinetics and Solvent-Dependent Thermodynamics of Water Capture by a Fullerene-Based Hydrophobic Nanocavity. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115* (5), 735–740. <https://doi.org/10.1021/jp110832m>.
- (18) Das, B.; Roy, M. N.; Hazra, D. Densities and Viscosities of the Binary Aqueous mixtures of Tetrahydrofuran and 1,2-Dimethoxyethane at 298, 308 and 318 K. *INDIAN J CHEM TECHNOL* **1994**, *5*.
- (19) Goubault, C.; Sciortino, F.; Mongin, O.; Jarry, U.; Bostoën, M.; Jakobczyk, H.; Burel, A.; Dutertre, S.; Troadec, M.-B.; Kahn, M. L.; Chevance, S.; Gauffre, F. The Ouzo Effect: A Tool to Elaborate High-Payload Nanocapsules. *J. Controlled Release* **2020**, *324*, 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.023>.
- (20) Sitnikova, N. L.; Sprik, R.; Wegdam, G.; Eiser, E. Spontaneously Formed *Trans* - Anethol/Water/Alcohol Emulsions: Mechanism of Formation and Stability. *Langmuir* **2005**, *21* (16), 7083–7089. <https://doi.org/10.1021/la046816l>.
- (21) Yan, X.; Alcouffe, P.; Sudre, G.; David, L.; Bernard, J.; Ganachaud, F. Modular Construction of Single-Component Polymer Nanocapsules through a One-Step Surfactant-Free Microemulsion Templated Synthesis. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (8), 1401–1404. <https://doi.org/10.1039/C6CC09701D>.
- (22) Beck-Broichsitter, M.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Solvent Selection Causes Remarkable Shifts of the “Ouzo Region” for Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation. *Nanoscale* **2015**, *7* (20), 9215–9221. <https://doi.org/10.1039/C5NR01695A>.
- (23) Pucci, C.; Cousin, F.; Dole, F.; Chapel, J.-P.; Schatz, C. Impact of the Formulation Pathway on the Colloidal State and Crystallinity of Poly-ε-Caprolactone Particles Prepared by Solvent Displacement. *Langmuir* **2018**, *34* (7), 2531–2542. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04198>.
- (24) Marcus, J.; Touraud, D.; Prévost, S.; Diat, O.; Zemb, T.; Kunz, W. Influence of Additives on the Structure of Surfactant-Free Microemulsions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (48), 32528–32538. <https://doi.org/10.1039/C5CP06364G>.
- (25) Beck-Broichsitter, M.; Rytting, E.; Lehardt, T.; Wang, X.; Kissel, T. Preparation of Nanoparticles by Solvent Displacement for Drug Delivery: A Shift in the “Ouzo Region” upon Drug Loading. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41* (2), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.06.007>.
- (26) Tehrani-Bagha, A. R.; Viladot, A.; Holmberg, K.; Nordstierna, L. An Ouzo Emulsion of Toluene in Water Characterized by NMR Diffusometry and Static Multiple Light Scattering. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, *494*, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.01.008>.
- (27) Lepeltier, E.; Bourgaux, C.; Couvreur, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo Effect”: Application to Drug Delivery Devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *71*, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.009>.
- (28) Prévost, S.; Krickl, S.; Marčelja, S.; Kunz, W.; Zemb, T.; Grillo, I. Spontaneous Ouzo Emulsions Coexist with Pre-Ouzo Ultraflexible Microemulsions. *Langmuir* **2021**, *37* (13), 3817–3827. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02935>.
- (29) Ma, A.; Xu, J.; Xu, H. Impact of Spontaneously Adsorbed Hydroxide Ions on Emulsification via Solvent Shifting. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (40), 23175–23180. <https://doi.org/10.1021/jp5076109>.



**CHAPITRE 3**  
**Encapsulation de**  
**principes actifs par**  
**nanoprécipitation dans**  
**les H®**

---



# SOMMAIRE

---

<b>CHAPITRE 3 Encapsulation de principes actifs par nanopréciipitation dans les H<sup>®</sup></b>	<b>135</b>
<b>I Stratégie d'encapsulation dans les H<sup>®</sup></b>	<b>141</b>
<b>II Étude du système Sorafénib/THF/H<sub>2</sub>O</b>	<b>142</b>
II.1 Étude du système à $\Phi_{\text{THF}} = 0,23$ (en l'absence de NP)	142
II.2 Étude des H <sup>®</sup> contenant du sorafénib nanoprécipité	144
II.3 Évaluation de l'encapsulation du sorafénib dans les H <sup>®</sup> et de sa libération (non contrôlée)	148
<b>III Comparaison avec une forme ionique : le sorafénib tosylate</b>	<b>149</b>
III.1 Détermination de la limite de solubilité du système sorafénib tosylate/THF/H <sub>2</sub> O	149
III.2 Étude de la charge à la surface des gouttelettes	151
III.3 Étude des H <sup>®</sup> contenant du sorafénib tosylate nanoprécipité	151
<b>IV Cas d'un soluté hydrophobe liquide : la vitamine E</b>	<b>153</b>
<b>V Étude du système paclitaxel/THF/H<sub>2</sub>O</b>	<b>155</b>
V.1 Détermination de la limite de solubilité du système paclitaxel/THF/H <sub>2</sub> O	155
V.2 Étude des H <sup>®</sup> contenant du paclitaxel	156
<b>VI Conclusions et perspectives</b>	<b>159</b>
<b>VII Références bibliographiques</b>	<b>160</b>



## CHAPITRE 3 : ENCAPSULATION DE PRINCIPES ACTIFS PAR NANOPRÉCIPITATION DANS LES HYBRIDOSOMES®

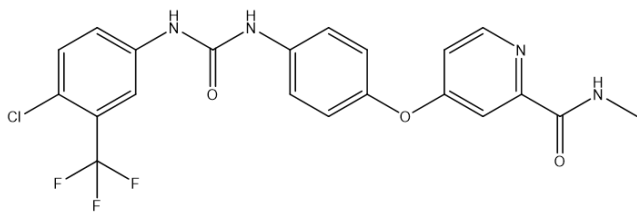
---

La nanoprécipitation de médicaments est une technique largement répandue pour la préparation de nanoparticules thérapeutiques. Elle se décline en divers procédés. Les particules finales comprennent le plus souvent une coque de polymère, co-nanoprécipitée avec les composés hydrophobes.<sup>1,2</sup> On comprend aisément l'intérêt qu'il peut y avoir à préparer des particules de médicaments purs ou recouverts simplement d'une couche protectrice (nanocapsules) : amélioration de la biodistribution, augmentation de la charge médicamenteuse et de l'efficacité thérapeutique, biocompatibilité, etc.<sup>3-5</sup>

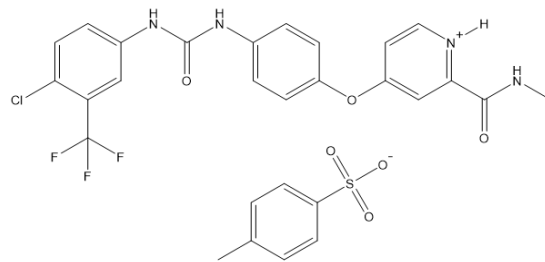
Parmi les diverses méthodes de nanoprécipitation, celle par déplacement de solvant est souvent préférée car elle requiert très peu d'énergie. Deux régions d'intérêt permettent de préparer des nanocapsules : SFME et Ouzo. Ganachaud *et al.* ont montré qu'il était possible de former des capsules d'huile recouverte de polymère en utilisant un glycopolymère dont le domaine de précipitation recouvre en partie soit le domaine SFME, soit le domaine Ouzo de l'huile.<sup>2</sup> Puis, la molécule thérapeutique d'intérêt peut être dissoute dans l'huile formant le cœur de la capsule, comme cela a été démontré avec l'encapsulation de camptothécine à partir de la nanoprécipitation du mygliol.<sup>2</sup> Puisque nombre de molécules thérapeutiques sont hydrophobes, il semblerait plus favorable que le cœur de la capsule soit entièrement constitué du médicament pour décupler la quantité du composé actif. Dans ce chapitre, nous avons donc cherché à encapsuler des principes actifs hydrophobes à l'intérieur de nanocapsules avec une coque hybride polymère/nanoparticules inorganiques (Hybridosomes®) formées à partir de l'effet Ouzo.

Les structures chimiques des principes actifs hydrophobes utilisées pour ce chapitre, ainsi que leurs propriétés physico-chimiques, sont regroupées dans la Figure 114 ci-dessous. Nous avons choisi en partie des médicaments chimiothérapeutiques (le sorafénib avec/sans tosylate contre le carcinome hépatocellulaire et le paclitaxel contre les cancers de l'ovaire, du sein et du poumon) afin d'observer les effets d'une thérapie combinée (chimio- et radiothérapie) par les H®, que nous verrons dans le chapitre 4.

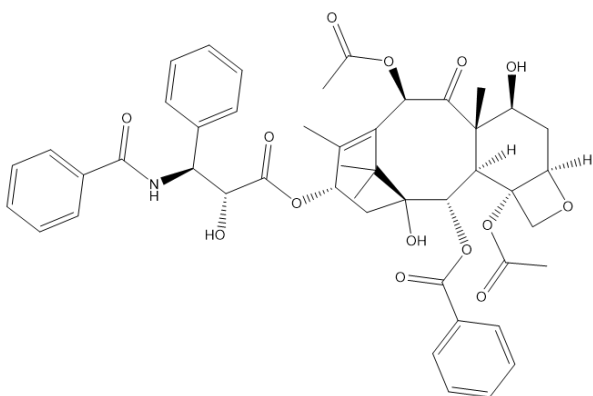




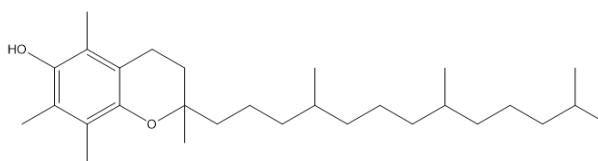
**Sorafénib**  
*M<sub>w</sub>* : 464,8 g/mol  
*LogP* : 4,3  
*S<sub>eau</sub>* : 3,7.10<sup>-6</sup> mol/L



**Sorafénib tosylate**  
*M<sub>w</sub>* : 637,0 g/mol  
*LogP* : 4 – 4,5  
*S<sub>eau</sub>* : 2,4.10<sup>-6</sup> mol/L



**Paclitaxel**  
*M<sub>w</sub>* : 853,9 g/mol  
*LogP* : 3,5  
*S<sub>eau</sub>* : 6,5.10<sup>-6</sup> mol/L



**Vitamine E**  
*M<sub>w</sub>* : 430,7 g/mol  
*LogP* : 8,8 – 10,5  
*S<sub>eau</sub>* : 4,4.10<sup>-6</sup> mol/L

Figure 114 : Structures chimiques et propriétés physico-chimiques (*M<sub>w</sub>* : masse moléculaire ; *LogP* : coefficient de partage entre les phases lipophile et aqueuse -octanol/eau ; *S<sub>eau</sub>* : la solubilité dans l'eau) des principes actifs hydrophobes utilisés pour ce chapitre.

## I Stratégie d'encapsulation dans les H<sup>®</sup>

Notre stratégie consiste à s'appuyer sur des particules organiques (éventuellement liquides ou solides) pour former des capsules de nanoparticules. *In fine*, nous souhaitons que le cœur soit enrichi en principe actif thérapeutique et que la coquille soit constituée de nanoparticules inorganiques. Nous souhaitons de surcroît que l'élaboration des capsules se déroule en une seule étape. Il s'agit donc de co-nanoprécipiter simultanément les solutés et les nanoparticules (Figure 115).

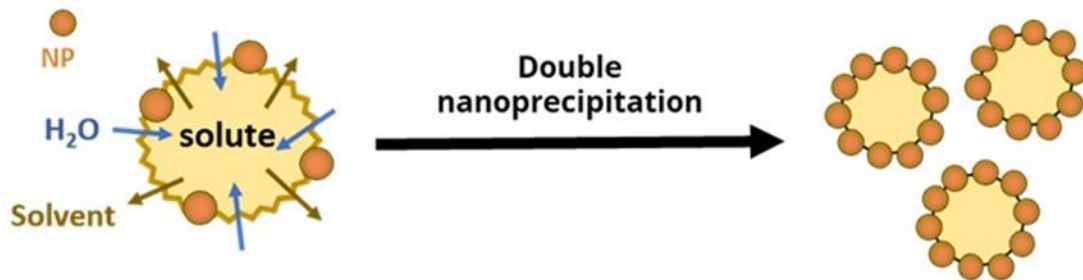


Figure 115 : Illustration schématique du principe de co-nanoprécipitation des nanoparticules inorganiques et du soluté thérapeutique.

Pour cela, une connaissance fine du comportement du soluté dans différentes conditions de déplacement de solvant est indispensable. En effet, selon la composition finale, on peut définir trois types de particules :

- **SFME** : il y a formation d'une microémulsion, c'est-à-dire d'un état à l'équilibre thermodynamique. Des particules bien monodisperses de diamètre inférieur à 100 nm sont le plus souvent observés.
- **Ouzo** : il y a formation de gouttes ou nanoparticules également bien monodisperses, mais qui évoluent avec le temps.
- **Ouzo polydisperse** (ou instable) : les gouttes formées présentent une polydispersité importante et évoluent rapidement avec le temps.

Dans le domaine diphasique, le système démixe rapidement en deux phases macroscopiques. Cette situation se produit au-delà de la courbe spinodale.

Dans le chapitre 2, nous avons présenté une méthodologie pour élaborer les diagrammes de phases de systèmes « Ouzo ». En particulier, nous avons mis en évidence que l'apparition de la turbidité n'est pas un critère suffisant pour caractériser la transition entre le domaine monophasique et le domaine Ouzo. En effet, les émulsions Ouzo peuvent apparaître tout à fait transparentes à de faibles concentrations de soluté. En revanche, la combinaison d'une étude de stabilité par SMLS et d'une caractérisation de la polydispersité des objets par NTA permet de distinguer le SFME, l'Ouzo et l'Ouzo polydisperse. De façon très intéressante, la présence des nanoparticules limite la coalescence des émulsions Ouzo et peut affiner leur distribution de façon très significative.<sup>6</sup>

Dans un premier temps, les systèmes composés actifs/THF/H<sub>2</sub>O sont caractérisés. Puis, les composés actifs démontrant une capacité à nanoprécipiter seront encapsulés via le procédé classique de fabrication des H<sup>®</sup>, résumé dans la Figure 116.

Les émulsions de médicaments hydrophobes sont préparées directement en présence des NP, initialement dispersées dans le THF (① et ②). Dans ce but, les particules sont dispersées dans la solution de THF contenant du principe actif. Ensuite, de l'eau est ajoutée rapidement pour atteindre la composition finale désirée. Environ 6 h après l'ajout de l'eau, le PAA-PEG est ajouté (③). Le rôle de ce polymère est double : il sert à la fois à réticuler les particules et à assurer leur stabilité colloïdale.<sup>7,8</sup> La même quantité de NP et de polymère a été utilisée pour toutes les compositions. Enfin, le solvant a été évaporé (17 h à environ 40°C) (④). Les suspensions sont ensuite purifiées par séparation magnétique et le culot est redispersé dans l'eau (⑤).

Dans le cas présent, nous utilisons des nanoparticules d'oxyde de fer (SPION). En effet, ces particules présentent une faible toxicité cellulaire et une bonne dégradabilité dans l'organisme. Du fait de leur caractère superparamagnétique, les particules individuelles présentent une susceptibilité magnétique beaucoup plus faibles que celles assemblées en capsules, ce qui permet la purification par séparation magnétique. Ces particules, synthétisées en présence d'octylamine et d'acide oléique, exposent à leur surface les chaînes alkyles de ces ligands, ce qui les rend extrêmement hydrophobes. Ces dernières nanoprécipitent sur toute la gamme de compositions étudiée après l'ajout de l'eau. La fraction massique de THF est maintenue à 23 % en masse pour tous les systèmes.

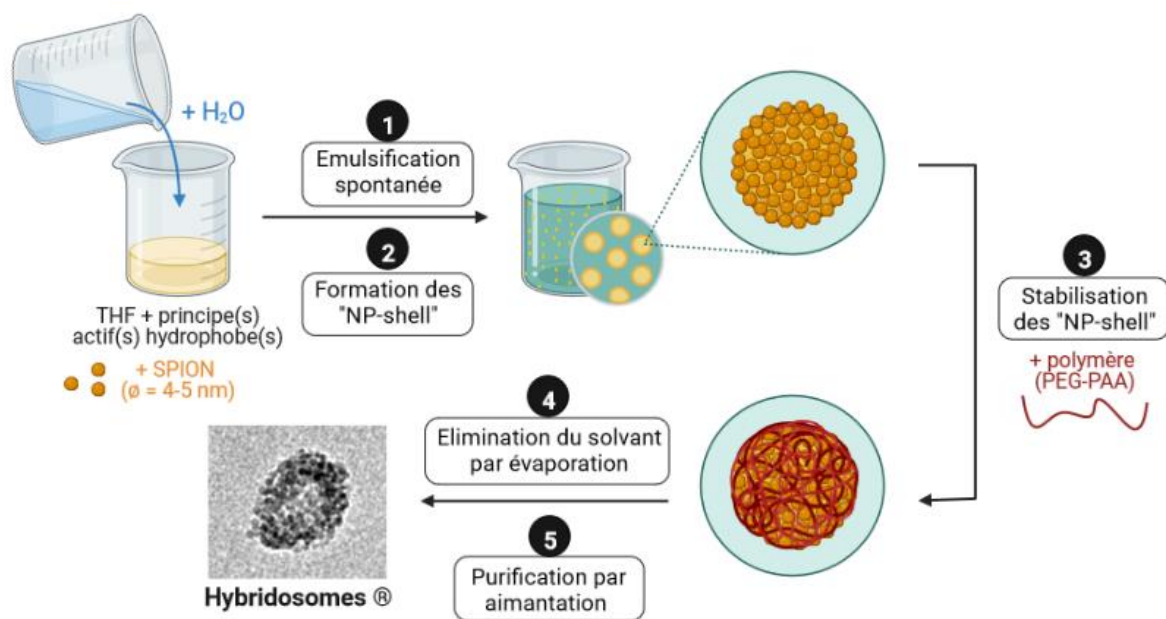


Figure 116 : Procédé de fabrication des H<sup>®</sup> et d'encapsulation de principe(s) actif(s). Ici, l'image MET correspond à des Hybridosomes<sup>®</sup> préparés à partir de BHT.<sup>7,9</sup>

## II Étude du système sorafénib/THF/H<sub>2</sub>O

### II.1 Étude du système à $\Phi_{\text{THF}} = 0,23$ (en l'absence de NP)

Suivant la méthodologie précédemment établie (chapitre 2), nous avons d'abord étudié une coupe transversale du diagramme de phase sorafénib/THF/H<sub>2</sub>O, en l'absence de nanoparticule. Dans ce but, nous avons préparé une série de compositions (S<sub>1</sub>-S<sub>10</sub>) de

concentrations croissantes de sorafénib, en maintenant la fraction massique de l'eau et du THF à 0,77 et 0,23 respectivement. Puis, nous avons observé visuellement leur apparence (limpide, trouble ou diphasique : Figure 102).

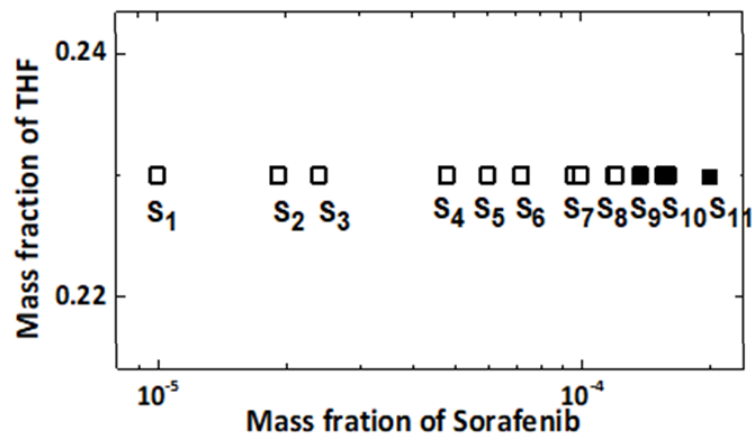


Figure 117 : Représentation semi-logarithmique de la ligne de composition  $S_n$  à  $\Phi_{THF} = 0,23$  déterminé par observation visuelle du système sorafénib/THF/H<sub>2</sub>O. Avec (□) échantillons limpides et (■) échantillons troubles.

La stabilité colloïdale des échantillons a été étudiée par SMLS, et leur distribution de taille par NTA (Figure 118). Les échantillons S<sub>1</sub>-S<sub>7</sub> présentent une distribution monomodale (Figure 118b) et ne montrent aucun signe d'évolution pendant 14 h après la préparation (Figure 118a), ce qui est typique du domaine SFME. En revanche, la Figure 118a montre que l'échantillon S<sub>10</sub> évolue avec le temps. Il présente déjà une large distribution de taille quelques minutes après le mélange (Figure 118b), ce qui est également le cas de S<sub>11</sub>. Ces échantillons sont des émulsions Ouzo (polydisperses). Notez que la limite de solubilité du sorafénib dans le mélange THF/H<sub>2</sub>O (23/77) est significativement plus grande que dans l'eau pure (0,25 mM et 3,7.10<sup>-6</sup> mM, respectivement).

La Figure 118c montre que la taille modale des gouttelettes présente deux régimes lorsque nous augmentons la quantité de sorafénib : elle est d'abord constante puis augmente fortement. La transition entre les deux régimes correspond (approximativement) au début de la turbidité des échantillons, comme indiqué par la ligne pointillée grise dans la Figure 118c. Au moment de la transition, la polydispersité de la distribution devient également significative. Par conséquent, nous n'avons pas pu définir un mode principal pour les échantillons S<sub>10</sub> et S<sub>11</sub>. La turbidité peut être expliquée par la présence de grosses gouttelettes dans la distribution. Ce résultat généralise les observations précédentes rapportées avec des solutés non médicamenteux dans le chapitre 2. D'après les résultats SMLS et NTA, la limite (binodale) entre les domaines SFME et Ouzo se trouve à une fraction massique de sorafénib autour de 1,3.10<sup>-4</sup>. Ici, la limite de turbidité coïncide avec la binodale.

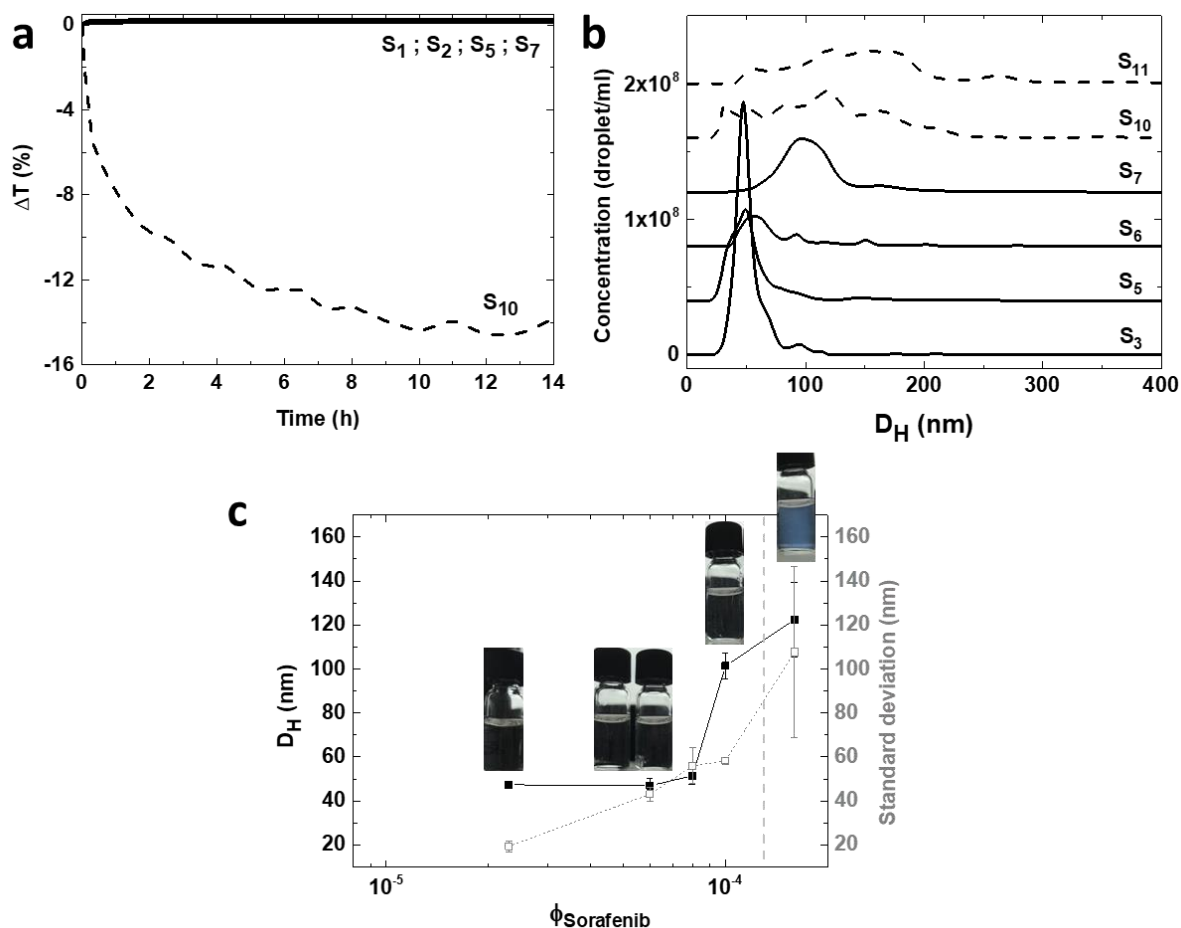


Figure 118 : Caractérisation des compositions  $S_0$ - $S_{11}$  dans le système sorafénib/THF/ $H_2O$ . (a) Analyse de la stabilité par SMLS : transmission relative mesurée à mi-hauteur des échantillons  $S_n$ . (b) Distribution de taille à  $\Phi_{THF} = 0,23$  mesurée par NTA, au temps  $t_0$  pour les compositions  $S_n$ . (c) Diamètre hydrodynamique (mode) et déviation standard des dispersions. Ligne pleine (—) : échantillons limpides et stables (SFME) ; ligne pointillée (- -) : échantillons troubles et métastables (Ouzo).

## II.2 Étude des H<sup>®</sup> contenant du sorafénib nanoprécipité

Après avoir étudié les émulsions du système sorafénib/THF/ $H_2O$ , les systèmes ont été nanoprécipités en présence des nanoparticules. La Figure 119 représente les distributions de taille mesurées par NTA après dispersion du culot dans l'eau (et dilution par 20 de la solution, pour éviter la diffusion trop importante de la lumière à cause d'une trop grande concentration en nano-objets), pour les mêmes compositions précédentes ( $S_1$ - $S_{11}$ ). La Figure 120 et la Figure 121 présentent les observations MET des échantillons.

Tel qu'anticipé, nous observons des capsules de nanoparticules (H<sup>®</sup>). De manière très intéressante, toutes les compositions, sauf  $S_3$ , sont monomodales en présence des NP, avec une taille (mode du diamètre hydrodynamique) constante autour de  $80 \pm 5$  nm (Figure 119a et b). Cependant, contrairement au cas sans NP, la distribution s'élargit lorsque la concentration en sorafénib diminue. Cette tendance est confirmée par les observations MET (Figure 120 et Figure 121). Notons que le rétrécissement de la distribution de taille de l'échantillon  $S_{10}$  en présence de NP est considérable par rapport à la distribution sans NP

(Figure 119c et Figure 121b). Ce phénomène est attribué à l'arrêt de la coalescence des gouttelettes de l'émulsion en présence de NP.<sup>6</sup> Cet effet résulte d'un phénomène de coalescence limitée, décrit initialement dans le cas des émulsions de Pickering, qui induit une stabilisation des gouttes. Il s'ensuit un élargissement du domaine Ouzo vers les fortes concentrations en soluté.

À de faibles concentrations de sorafénib, dans le domaine SFME, la MET révèle la présence d'un mélange de petites et de grandes capsules (Figure 120a et b ; Figure 121a), ce qui est cohérent avec la plus large distribution de taille de  $S_3$ ,  $S_5$  et  $S_7$  par rapport à  $S_{10}$  (domaine Ouzo), observée au NTA. Il est possible que des petites nanocapsules germent en périphérie (interne) des grosses capsules, ce qui est observable dans la Figure 121a. Pour ces compositions dans le SFME, nous nous sommes heurtés à des problèmes de reproductibilité, en observant parfois des mélanges de tailles et parfois une grande majorité de petites capsules.

Nous n'avons pas encore d'explication définitive de l'existence de petites et grandes capsules et au manque de reproductibilité dans le domaine SFME, mais nous pouvons proposer l'hypothèse suivante. Dans une vision simplifiée du mécanisme de nucléation spontanée de gouttes par déplacement de solvant, l'état de départ est une solution homogène. Cependant, cette situation est presque impossible à réaliser expérimentalement. En pratique, la phase organique (THF, sorafénib et nanoparticules) est vigoureusement mélangée à l'eau. Ce mélange produit des interfaces entre des domaines de composition différente. L'adsorption des nanoparticules à ces interfaces peut bloquer l'évolution de ces domaines. Le manque de reproductibilité serait alors lié à l'inhomogénéité des conditions de mélange. La présence de domaines de taille supérieure à  $1 \mu\text{m}$  dans le domaine SFME (mais pas dans le domaine Ouzo) suggère que la formation des agrégats est plus rapide dans le domaine Ouzo. En effet, pour les compositions du domaine Ouzo, l'état initial est fortement sursaturé, ce qui induit un taux de nucléation rapide.<sup>10</sup> Cependant, dans le domaine SFME, les agrégats sont en équilibre avec les molécules libres, et peuvent se former plus lentement.<sup>11</sup>

Ainsi, de manière intéressante, la présence de nanoparticules peut bloquer le système dans des états qui n'apparaissent que de manière transitoire et à des temps très courts en leur absence. Les nanoparticules, en figeant les interfaces, pourraient donc constituer un moyen d'observer le mécanisme de formation des agrégats par déplacement de solvant et permettre d'affiner notre compréhension dans la formation de ces systèmes.

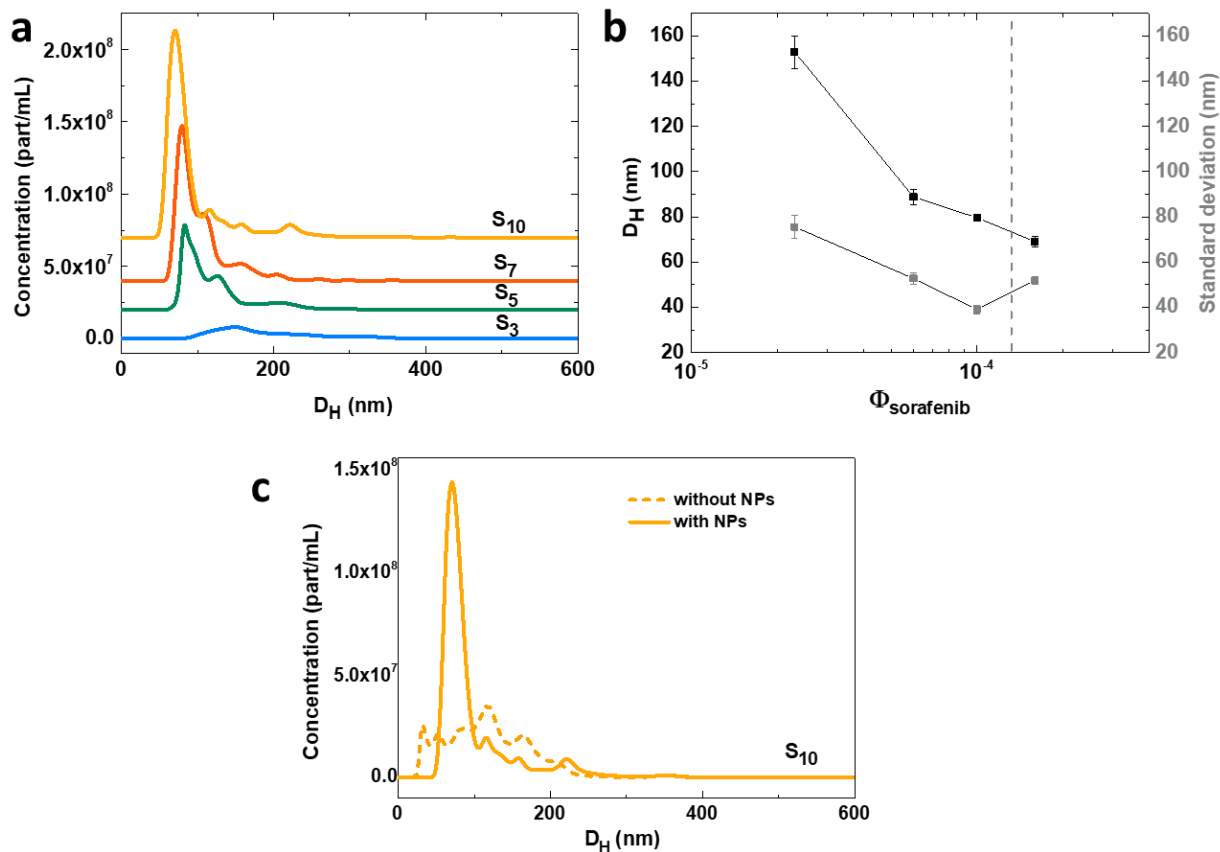


Figure 119 : Caractérisation des capsules d' $H^{\circ}$  sorafénib/SPION@PEG-PAA. (a) Distribution de taille (diamètre hydrodynamique) mesurée par NTA pour différentes fractions massiques  $S_n$  de sorafénib ( $S_3$  :  $2,5 \cdot 10^{-5}$  ;  $S_5$  :  $6 \cdot 10^{-5}$  ;  $S_7$  :  $10^{-4}$  ;  $S_{10}$  :  $1,8 \cdot 10^{-4}$ ). (b) Mode principal du diamètre hydrodynamique et polydispersité (écart-type) en fonction des teneurs en sorafénib. (c) Comparaison de la distribution de taille de la composition  $S_{10}$  avec et sans NP.

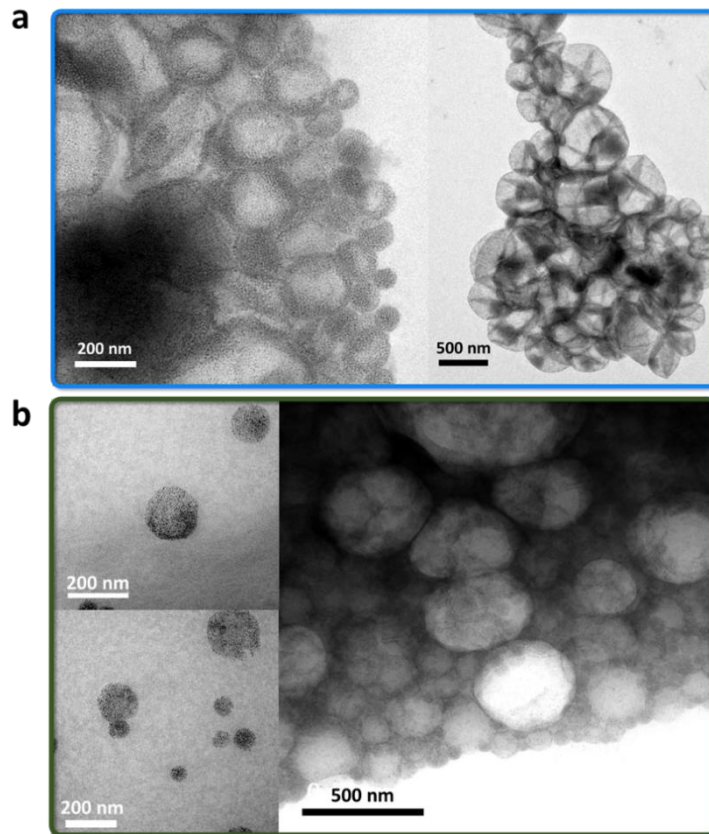


Figure 120 : Images MET d'émulsions de sorafénib en présence de NP (encapsulé dans les H<sup>®</sup>) formulé à partir du domaine SFME. Fraction massique de sorafénib : (a)  $S_3 = 2,5 \cdot 10^{-5}$  (bleu) et (b)  $S_5 = 6 \cdot 10^{-5}$  (vert). Le code couleur correspond aux histogrammes Figure 119.

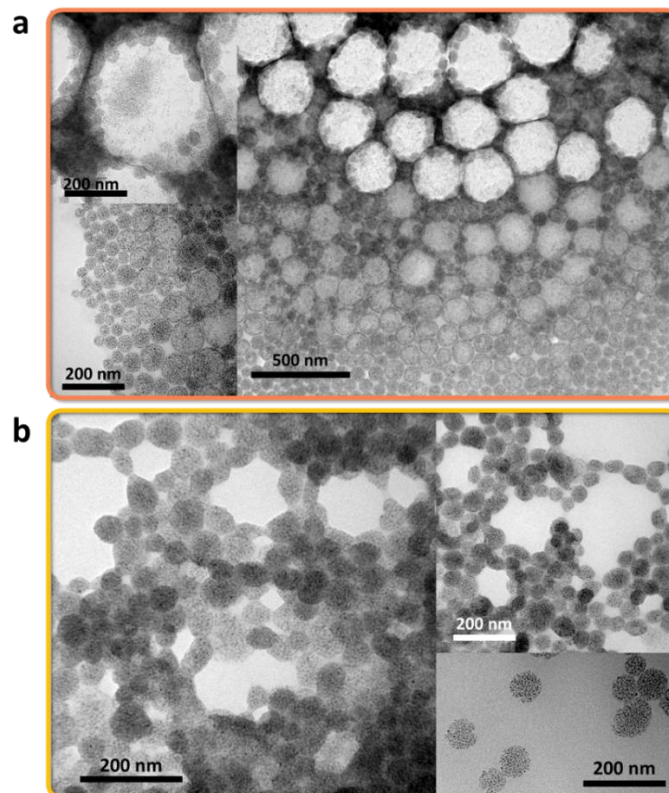


Figure 121 : Images MET d'émulsions de sorafénib en présence de NP (encapsulé dans les H<sup>®</sup>) formulés à partir du domaine Ouzo. Fraction massique de sorafénib : (a)  $S_7 = 10^{-4}$  (orange) et (b)  $S_{10} = 1,2 \cdot 10^{-4}$  (jaune). Le code couleur correspond aux histogrammes Figure 119.



### II.3 Évaluation de l'encapsulation du sorafénib dans les H<sup>®</sup> et de sa libération (non contrôlée)

Pour différentes compositions à la fois dans le domaine SFME et le domaine Ouzo, nous avons quantifié le rendement d'encapsulation, c'est-à-dire la fraction de sorafénib dans le cœur des capsules à la fin du processus par rapport à la quantité totale introduite initialement (Figure 122a). Pour ce faire, la quantité de sorafénib libérée dans les surnageants au cours des deux purifications a été mesurée par HPLC. Il est intéressant de noter que pendant la purification par séparation magnétique, seules les capsules magnétiques sont retirées de la solution. Par conséquent, si le sorafénib forme également un nanoprécipté isolé, celui-ci devrait rester dans le surnageant.

Dans tous les cas, le rendement d'encapsulation mesuré est proche de 85 % (tableau Figure 122a). Ce rendement d'encapsulation élevé peut paraître à première vue surprenant pour les échantillons du domaine SFME. En effet, dans ces conditions, la fraction massique en sorafénib dans l'échantillon est inférieure à la solubilité dans le mélange THF/H<sub>2</sub>O ( $\Phi_{\text{Sorafénib}}$  :  $1,2 \cdot 10^{-4}$ ). Cependant, la solubilité diminue jusqu'à  $1,7 \cdot 10^{-6}$  dans l'eau pure.<sup>12</sup> Ainsi le sorafénib peut se concentrer dans le noyau des capsules pendant l'étape d'évaporation.

La Figure 122b montre le taux de libération du sorafénib, après dispersion des capsules purifiées dans l'eau. La libération est très faible pendant les 5 premiers jours, puis commence à augmenter. Ce phénomène peut être lié à la formation lente des cristaux, qui sont parfois observés quelques jours après la formation des capsules. En effet, la forme cristalline est thermodynamiquement plus stable que le nanoprécipté (généralement amorphe). Ainsi, si des cristaux se forment, le sorafénib amorphe sera entraîné hors des nanocapsules. Cela pourrait déclencher sa libération, comme observé dans la Figure 122b.

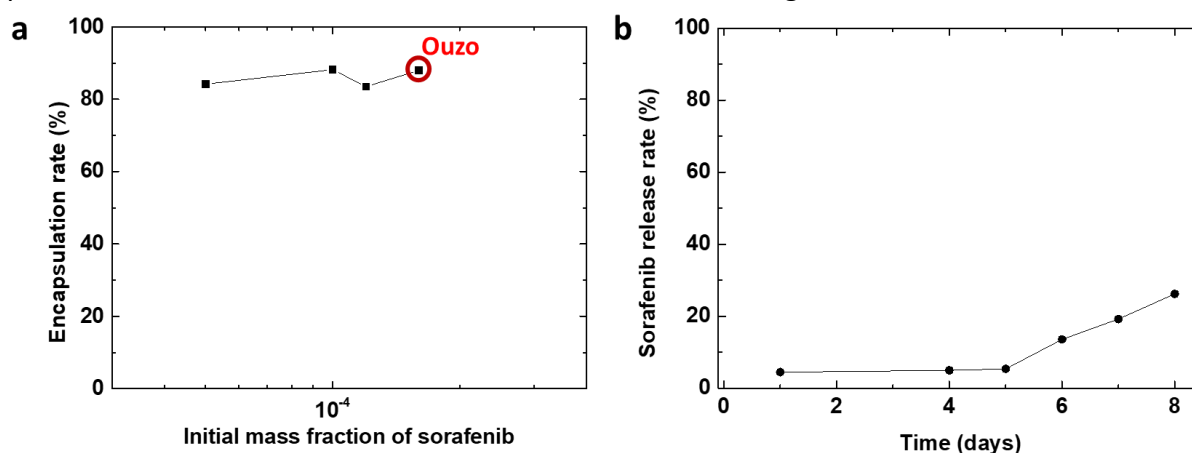


Figure 122 : (a) Rendement d'encapsulation pour différentes fractions massiques initiales de sorafénib et (b) cinétique de libération du sorafénib ( $\Phi_{\text{Sorafénib,initial}}$  :  $1,15 \cdot 10^{-4}$ ) dans le cœur des H<sup>®</sup>.

Dans la suite de ce chapitre, nous avons cherché à généraliser la formation de nanocapsules H<sup>®</sup> à partir de solutés ayant un LogP similaire, mais des propriétés physiques ou une structure moléculaire différentes.

### III Comparaison avec une forme ionique : le sorafénib tosylate

Le sorafénib est commercialisé sous la forme d'un sel de tosylate sous le nom de Nexavar® (Figure 166). Le sorafénib formulé avec le contre-ion acide présente également une faible solubilité aqueuse dépendante du pH et un logP comparable à la forme moléculaire.<sup>13</sup> Par ailleurs, le sorafénib tosylate est cristallin et chimiquement stable. Notre objectif ici est de comparer le cas du sel à celui de la forme moléculaire.

#### III.1 Détermination de la limite de solubilité du système sorafénib tosylate/THF/H<sub>2</sub>O

Nous avons d'abord observé visuellement les échantillons pour une fraction massique de THF de 0,23 (0,07 en fraction molaire, Figure 123), puis déterminé la limite de stabilité de la forme tosylate en utilisant le SMLS comme précédemment (Figure 124). Comme dans le cas du sorafénib moléculaire, la limite de solubilité déterminé par SMLS semble correspondre approximativement à celle observée visuellement, avec une évolution au cours du temps pour les échantillons troubles. Il est intéressant de noter que sa limite de solubilité est identique, en termes de fraction molaire, à celle de la forme moléculaire (fraction molaire :  $\Phi_{\text{sorafénib } \pm \text{ tosylate}} \sim 6 \cdot 10^{-6}$ ).

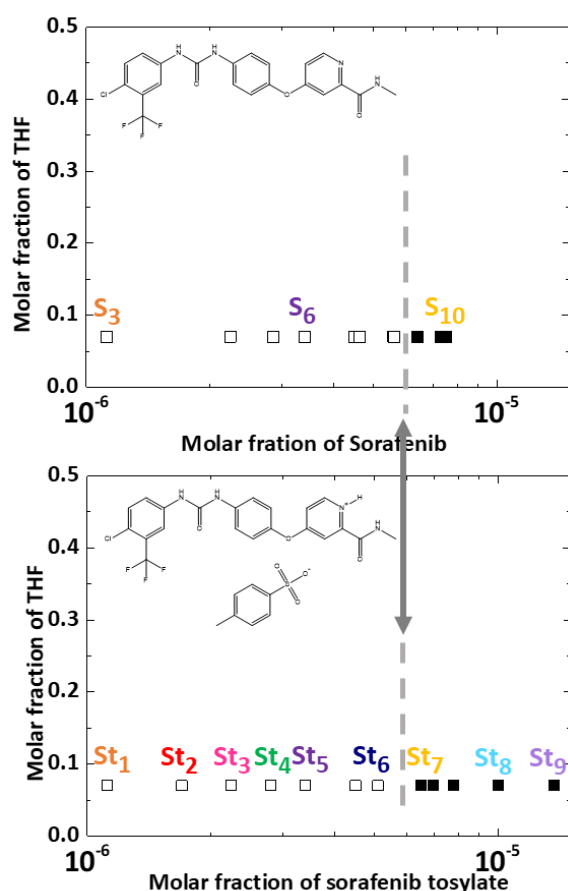


Figure 123 : Représentation semi-logarithmique de la ligne de composition  $St_n$  à  $\Phi_{\text{THF}} = 0,07$  (en fraction molaire,  $\Phi_{\text{THF}} = 0,23$  en fraction massique) en fonction des fractions molaires du sorafénib (haut) et du sorafénib tosylate (bas). Observation visuelle des échantillons (□) limpides et (■) troubles. Ligne pointillée grise : limite de solubilité.

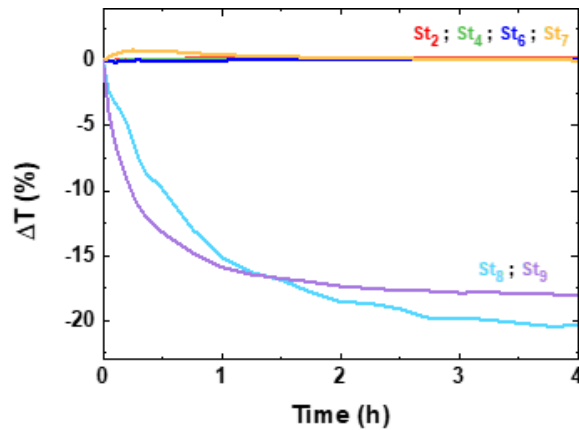


Figure 124 : Analyse par SMLS de la stabilité des compositions dans le système (sorafénib tosylate)/THF/H<sub>2</sub>O.

Ce résultat, qui peut être surprenant à première vue, est cohérent avec les valeurs de LogP des deux formes qui sont également très proches (entre 4 et 4,5, Figure 166). Cependant, d'après les mesures NTA faites pour le système sorafénib tosylate/THF/H<sub>2</sub>O (Figure 125), le diamètre des gouttelettes dans le domaine SFME est plus grand dans le cas du tosylate (environ 100 nm) que dans le cas de la forme neutre (environ 70 nm) pour des mêmes fractions molaires de soluté (Figure 125.b). Comme observé précédemment, la distribution de taille s'élargit après la limite de stabilité (dans le domaine de l'Ouzo). Cependant, elle reste plus étroite dans le cas de la forme tosylate (Figure 125.c).

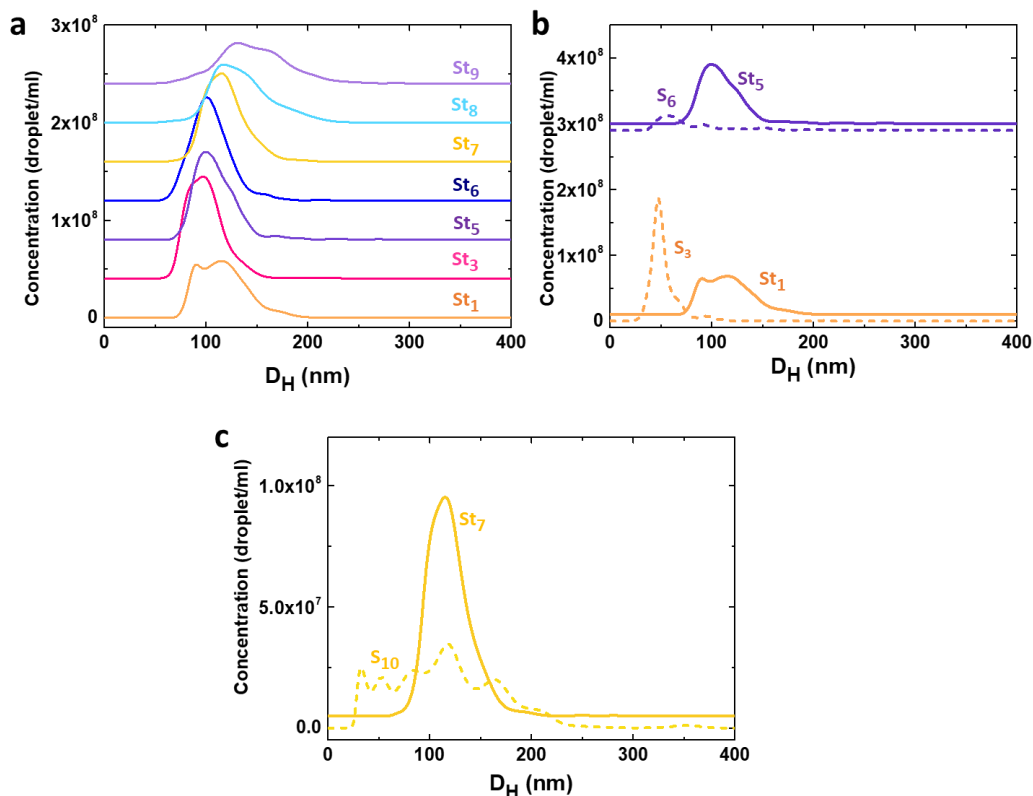


Figure 125 : Distribution de taille mesurée en utilisant l'analyse de suivi des nanoparticules (NTA). (a) compositions dans le système sorafénib tosylate/THF/H<sub>2</sub>O. (b) Comparaison des distributions de taille pour des compositions équivalentes en fraction molaire des systèmes « St<sub>n</sub> » sorafénib tosylate/THF/H<sub>2</sub>O (—) et « S<sub>n</sub> » sorafénib/THF/H<sub>2</sub>O (- - -) dans le domaine SFME. (c) comparaison des distributions de taille pour une composition équivalente en fraction molaire des systèmes sorafénib tosylate/THF/H<sub>2</sub>O (—) et sorafénib/THF/H<sub>2</sub>O (- - -) dans le domaine Ouzo. Les noms d'échantillons et leur code couleur sont représentés dans la Figure 123.

### III.2 Étude de la charge à la surface des gouttelettes

Comme la charge de surface des particules affecte à la fois la mesure du diamètre hydrodynamique et la stabilité colloïdale, nous avons également mesuré la mobilité électrophorétique des gouttelettes des deux formes le long de la ligne de dilution (Figure 126).<sup>14-17</sup>

Dans les deux cas, les gouttes possèdent une charge négative à leur surface (Figure 126.b). Il est à noter qu'un potentiel zêta négatif a toujours été observé aux interfaces des gouttelettes d'huile dans l'eau.<sup>18</sup> Les résultats présents suggèrent que cela peut également être le cas pour les solutés moléculaires et les sels.

Sauf aux plus basses concentrations (avant la binodale - droite pointillée), la forme ionique est moins chargée que la forme moléculaire (Figure 126.b). Comme la charge exerce une influence sur le diamètre hydrodynamique tel que mentionné précédemment, on peut donc conclure que les gouttes formées à partir du sorafénib tosylate ont une taille physique au moins deux fois plus grande que celles de la forme moléculaire (Figure 12.a). La charge négative des gouttes montre que le sorafénib tosylate n'est pas ou peu dissocié, ce qui est aussi cohérent avec sa faible solubilité dans l'eau.

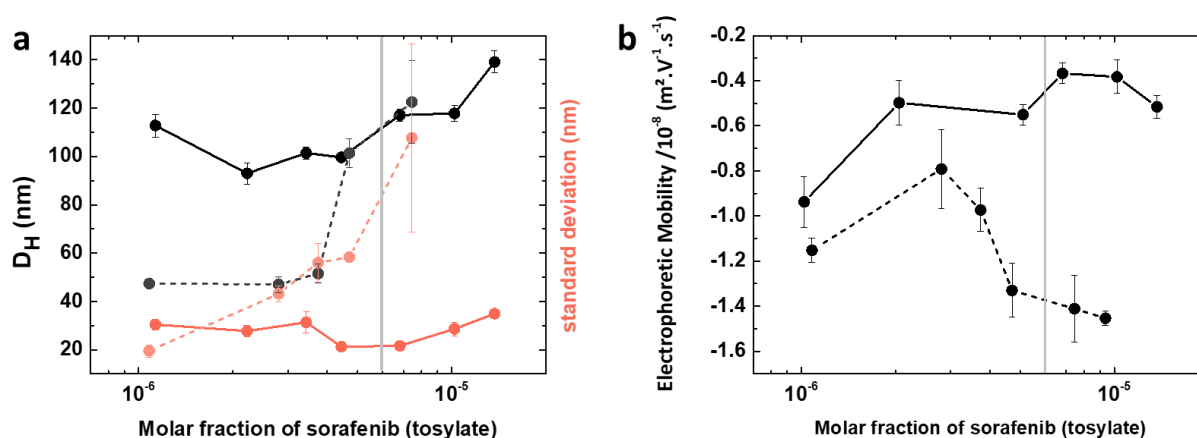


Figure 126 : Comparaison des formes moléculaires et ioniques du sorafénib dans les systèmes (sorafénib tosylate)/THF/H<sub>2</sub>O (—) et sorafénib/THF/H<sub>2</sub>O (- - -). (a) Mode principal du diamètre hydrodynamique (en noir) et de la polydispersité (écart-type, en rouge) mesurés par NTA. (b) Mobilité électrophorétique. La ligne grise représente la binodale pour les des deux systèmes.

### III.3 Étude des H<sup>®</sup> contenant du sorafénib tosylate nanoprecipité

Encouragés par l'observation que la forme ionique du sorafénib présente également des domaines SFME et Ouzo, nous avons essayé de préparer des nanocapsules, en utilisant le même protocole que précédemment.

Contrairement au cas précédent, les particules ne stabilisent pas le domaine Ouzo. Au contraire, des capsules de plusieurs microns ont été observées en MET (Figure 127). Cela peut être dû à une interaction entre les ligands des NP (octylamine et acide oléique) avec le sel de sorafénib, qui peut provoquer une réduction de la tension de surface, et donc des gouttelettes

plus grandes. Le NTA des dispersions dans le domaine SFME (Figure 129) suggère que les compositions les plus diluées (fraction molaire :  $\Phi_{St1}$  :  $1,1 \cdot 10^{-6}$  et  $\Phi_{St3}$  :  $2,2 \cdot 10^{-6}$  ;  $3,3 \cdot 10^{-5}$  et  $6,5 \cdot 10^{-5}$  respectivement en fraction massique) produisent principalement des capsules de l'ordre de 100 - 200 nm. Ceci est confirmé par les analyses MET (Figure 128), bien que de très grandes capsules ( $> 1 \mu\text{m}$ ) soient également visibles, et donc difficile à mesurer au NTA (Figure 129).

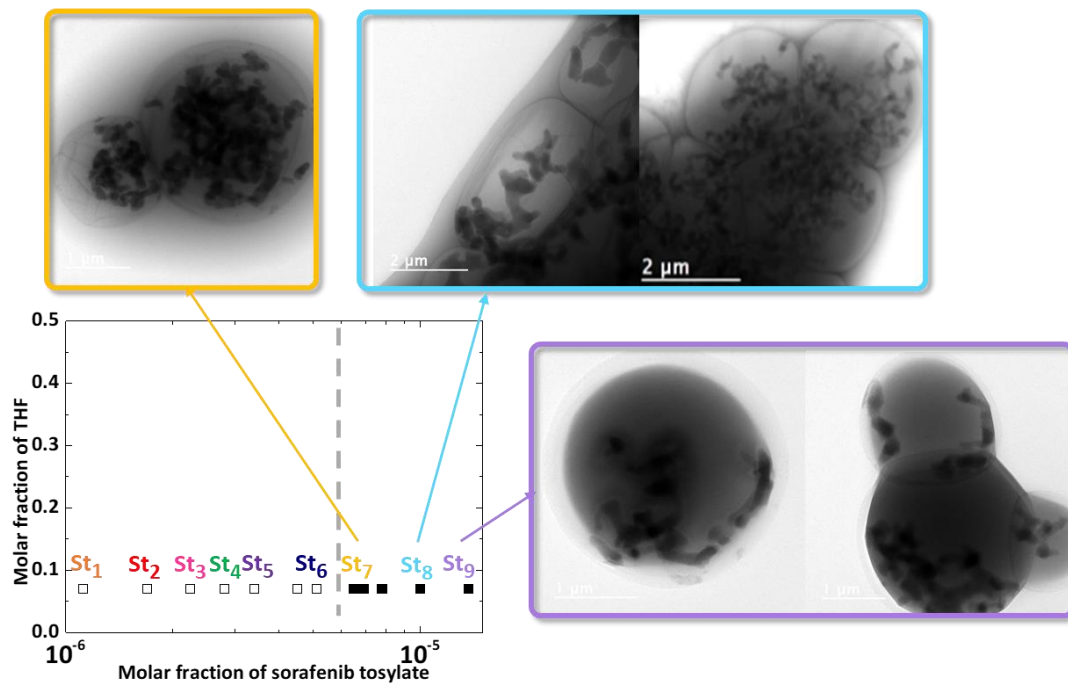


Figure 127 : Images MET des H<sup>®</sup> sorafénib tosylate/SPION@PEG-PAA pour des fractions molaires de sorafénib tosylate dans le domaine Ouzo ( $St_7$  :  $6,7 \cdot 10^{-6}$  ;  $St_8$  :  $10^{-5}$  ;  $St_9$  :  $1,4 \cdot 10^{-5}$ ).

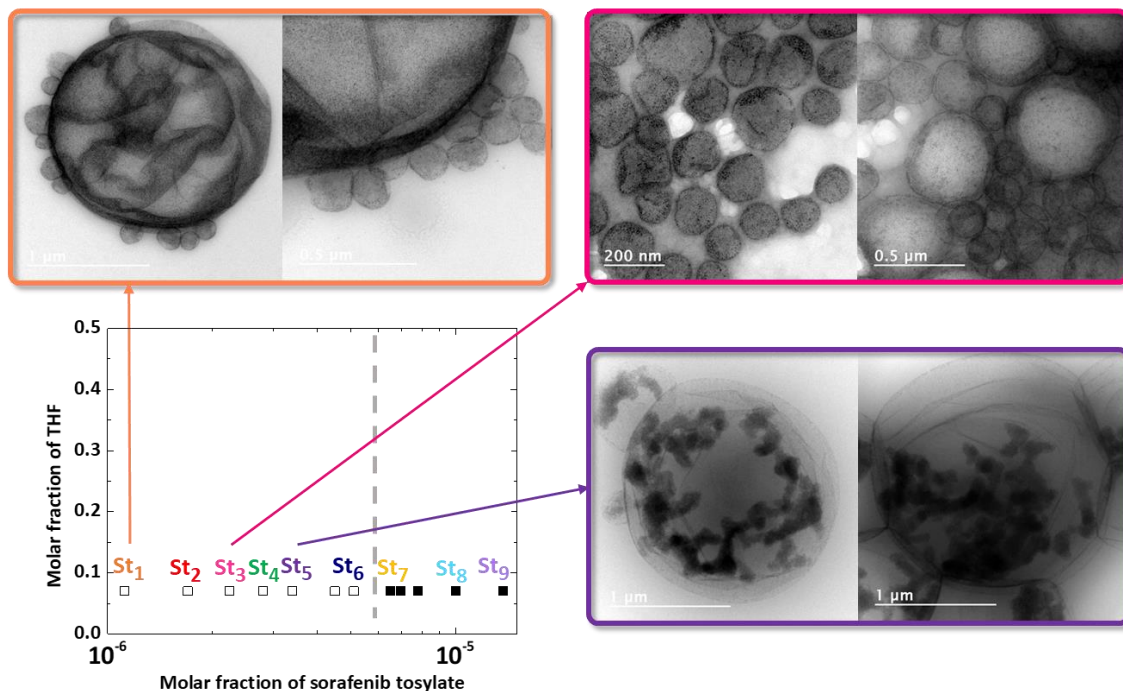


Figure 128 : Images MET des H<sup>®</sup> sorafénib tosylate/SPION@PEG-PAA pour des fractions molaires de sorafénib tosylate  $St_n$  dans le domaine SFME ( $St_1$  :  $1,1 \cdot 10^{-6}$  ;  $St_3$  :  $2,2 \cdot 10^{-6}$  ;  $St_5$  :  $3,4 \cdot 10^{-6}$ )

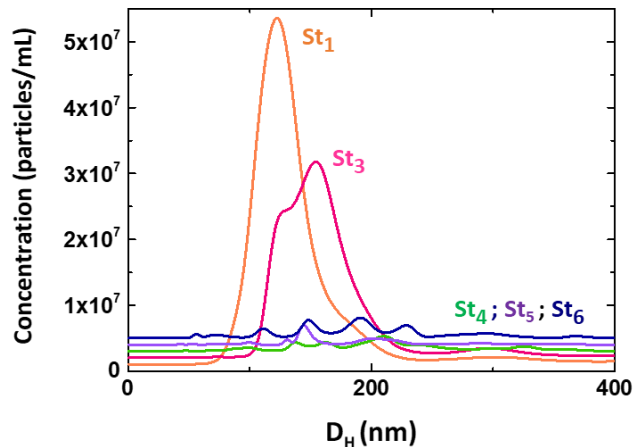


Figure 129 : Distribution de taille (diamètre hydrodynamique) mesurée par NTA des H<sup>®</sup> sorafénib tosylate/SPION@PEG-PAA, pour différentes fractions molaires  $St_n$  de sorafénib tosylate ( $St_1$  :  $1,1 \cdot 10^{-6}$  ;  $St_3$  :  $2,2 \cdot 10^{-6}$  ;  $St_4$  :  $2,8 \cdot 10^{-6}$  ;  $St_5$  :  $3,4 \cdot 10^{-6}$  ;  $St_6$  :  $5 \cdot 10^{-6}$ ).

#### IV Cas d'un soluté hydrophobe liquide : la vitamine E

Nous avons choisi le  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) comme exemple de soluté liquide. En effet, la nature solide ou liquide du soluté peut être un paramètre déterminant pour la formation des capsules, puisqu'elle peut affecter l'interaction des particules avec la phase sous-jacente, ainsi que leur dynamique.

Dans le domaine SFME, nous nous attendons à ce que la phase dispersée soit toujours liquide, même dans le cas de soluté solide, car elle est toujours gonflée de solvant. En revanche, dans le domaine de l'Ouzo, les particules contiennent moins de solvant à mesure que la concentration en soluté augmente. Par conséquent, un soluté solide peut former des particules très visqueuses voire solides.

Le diagramme de phase du système  $\alpha$ -tocophérol/THF/H<sub>2</sub>O a été étudié en détail dans le chapitre 2 du manuscrit. Ici, nous étudions l'élaboration de capsules pour différentes compositions, à la fois dans le domaine SFME et dans le domaine Ouzo. Le protocole, ainsi que les quantités de particules et de polymère, sont les mêmes que précédemment. La Figure 132 et la Figure 131 présentent des images MET, montrant que des capsules peuvent être formées à partir des domaines SFME et Ouzo. Dans le domaine SFME (Figure 132), la taille des capsules dépasse 1  $\mu$ m. Pour cette raison, nous n'avons pas pu analyser la dispersion correspondante en utilisant le NTA. En revanche, les capsules préparées à partir du domaine Ouzo, sont majoritairement inférieures à 100 nm d'après les images MET (Figure 131) et les mesures NTA (Figure 132). Leurs dispersions présentent une distribution de tailles remarquablement étroite, sauf pour l'échantillon le plus concentré (**fraction massique d' $\alpha$ -tocophérol :  $5 \cdot 10^{-4}$** ). Ceci est attendu, puisqu'on s'approche de la spinodale à composition élevée.

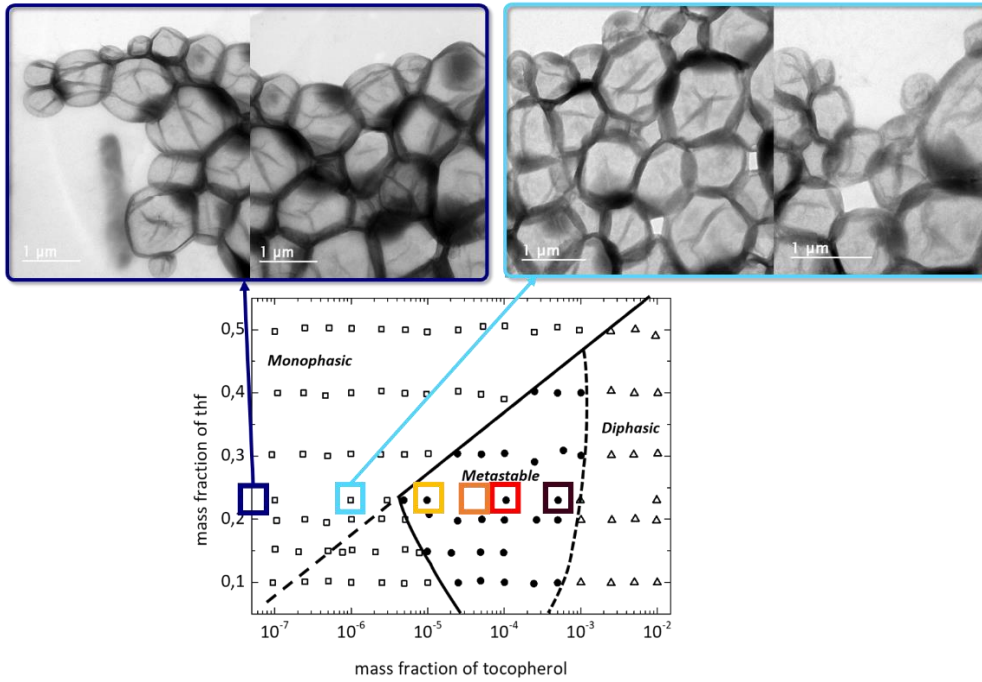


Figure 130 : Images MET d' $H^{\alpha}$ - $\alpha$ -tocophérol/SPION@PEG-PAA obtenus à partir de compositions dans le domaine SFME pour des fractions massiques de  $\Phi_{THF} = 0,23$ , (gauche)  $5 \cdot 10^{-8}$  et (droite)  $10^{-6}$  d' $\alpha$ -tocophérol.

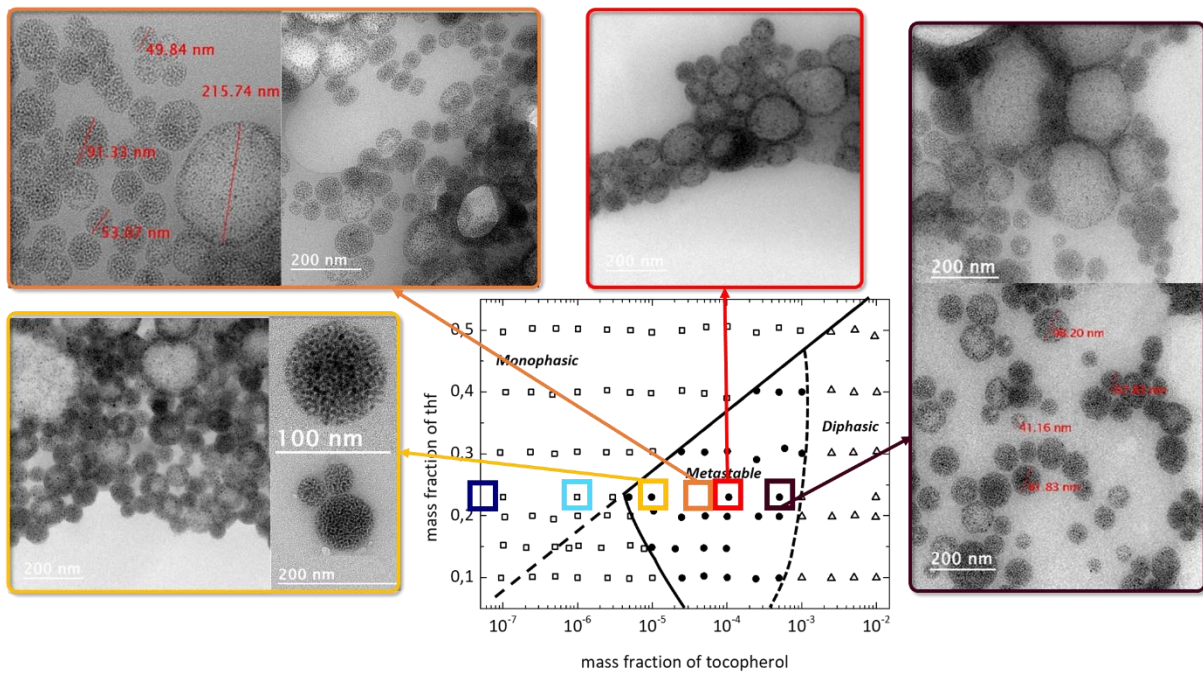


Figure 131 : Images MET d' $H^{\alpha}$ - $\alpha$ -tocophérol/SPION@PEG-PAA obtenus pour une fraction massique de  $\Phi_{THF} = 0,23$  et différentes compositions d' $\alpha$ -tocophérol et dans le domaine Ouzo (gauche)  $10^{-5}$ , (haut-gauche)  $5 \cdot 10^{-5}$ , (haut)  $10^{-4}$ , (droite)  $5 \cdot 10^{-4}$ .

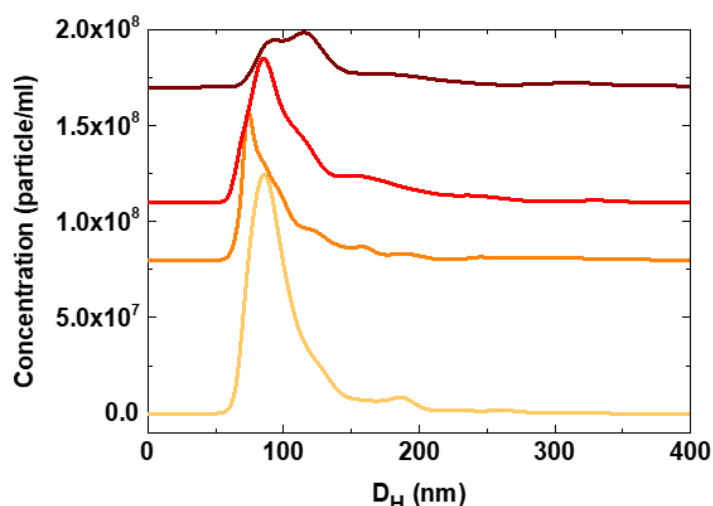


Figure 132 : Distributions de taille mesurées par NTA des H<sup>®</sup> α-tocophérol/SPION@PEG-PAA dans le domaine de l'Ouzo pour différentes compositions en α-tocophérol :  $10^{-5}$ ,  $5.10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5.10^{-4}$  ( $\Phi_{THF} = 0,23$ ).

## V Étude du système paclitaxel/THF/H<sub>2</sub>O.

### V.1 Détermination de la limite de solubilité du système paclitaxel/THF/H<sub>2</sub>O

Enfin, nous avons étudié le paclitaxel qui montre un comportement très différent des autres médicaments étudiés jusqu'à présent. En effet, le diagramme de phase de ce médicament ne montre aucun domaine Ouzo sur une large gamme de compositions (Figure 133.a). Au lieu de cela, au-delà de la courbe binodale, des cristaux macroscopiques se développent à partir de la solution. L'extrapolation de la binodale à la limite de l'eau pure est cohérente avec la limite de solubilité donnée dans la littérature ( $S_{eau} = 6,5.10^{-6}$  M, Figure 166). L'analyse SMLS (Figure 133.b) confirme la stabilité des compositions avant la binodale, le long d'une ligne horizontale ( $\Phi_{THF} = 0,23$ , similaire aux exemples précédents de ce chapitre) dans le diagramme de phase. Notez que ce comportement différent n'est pas lié à la solubilité dans l'eau, qui est du même ordre de grandeur pour tous les médicaments étudiés (Figure 166). Ceci est très probablement dû à la stabilité thermodynamique de la forme cristalline. De manière intéressante, des agrégats de taille bien définie ont été observés par mesure NTA dans le domaine monophasique, montrant à nouveau la présence d'un domaine SFME (Figure 133.c).



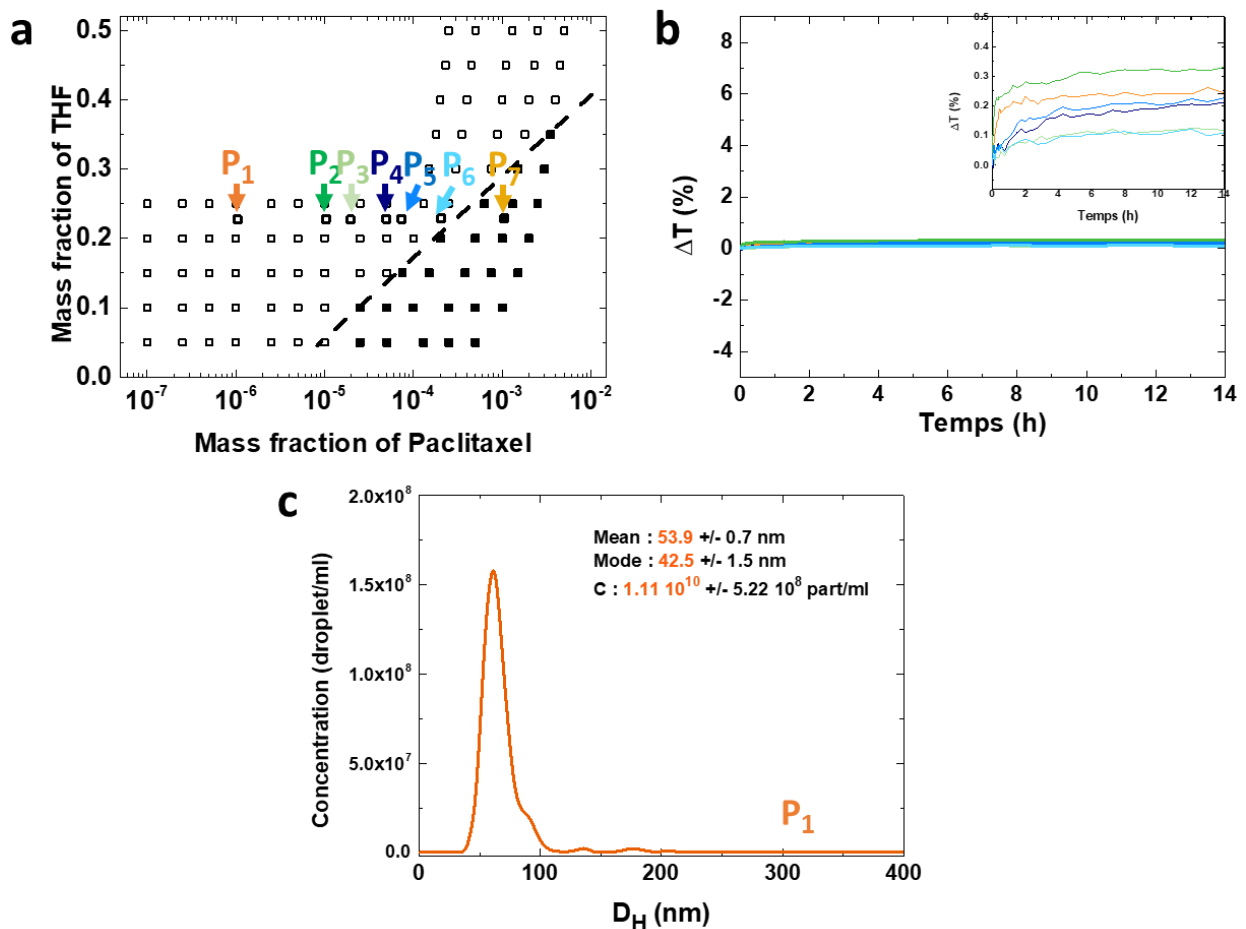


Figure 133 : Étude du système paclitaxel/THF/H<sub>2</sub>O (a) Diagramme de phase par observation visuelle. Carrés vides : échantillons transparents ; carrés pleins : cristaux. (b) Étude de la stabilité des compositions  $P_1$  à  $P_6$  en utilisant la méthode SMLS. (c) Analyse de suivi des nanoparticules (NTA) de la composition  $P_1$  ( $\Phi_{THF} = 0,23$  ;  $\Phi_{paclitaxel} = 10^{-6}$ ) montrant la présence d'une microémulsion sans tensioactif (SFME).

## V.2 Étude des H<sup>®</sup> contenant du paclitaxel

Nous avons étudié la possibilité d'élaborer des capsules à partir de trois compositions dans le domaine SFME ( $P_1$ ,  $P_2$  et  $P_5$  :  $\Phi_{paclitaxel} = 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  respectivement) et également pour une composition légèrement au-delà de la binodale ( $P_7$  :  $\Phi_{paclitaxel} = 10^{-3}$ ). Dans ce but, ces quatre compositions ont été préparées en présence de SPION avec la même concentration que précédemment.

La formation de cristaux de paclitaxel, dès l'ajout de l'eau, n'est observée que dans l'échantillon le plus concentré ( $P_7$  :  $\Phi_{paclitaxel} = 10^{-3}$ ). Lorsque le THF a été évaporé, des cristaux ont été observés pour la composition intermédiaire ( $P_5$  :  $\Phi_{paclitaxel} = 10^{-4}$ ). De manière intéressante, ce n'est pas le cas pour les compositions les plus faibles, malgré le fait que la quantité de paclitaxel dépasse la solubilité dans l'eau ( $P_1$ ,  $P_2$  :  $\Phi_{paclitaxel} = 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ).

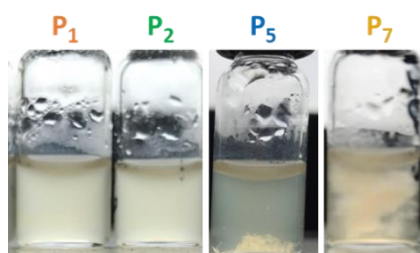


Figure 134 : Observation visuelle des échantillons préparés ( $H^{\circ}$  paclitaxel/SPION@PEG-PAA) à partir des compositions dans le domaine SFME ( $\Phi_{THF}=0,23$  et  $P_1, P_2 : \Phi_{paclitaxel} = 10^{-6}, 10^{-5}$ ) après évaporation, dans le domaine SFME proche binodale ( $P_5 : \Phi_{paclitaxel} = 10^{-4}$ ) après évaporation et dans le domaine au-delà de la binodale ( $P_7 : \Phi_{paclitaxel} = 10^{-3}$ ) après ajout de l'eau.

Tous les échantillons ont été examinés par MET (Figure 135 et Figure 136), après l'ajout du polymère et avant/après l'évaporation du THF. Les deux échantillons préparés à partir du domaine SFME ( $P_1, P_2$ ) ont formé des capsules (Figure 135). Pour la composition  $P_2$  ( $\Phi_{paclitaxel} = 10^{-5}$ ), des capsules de forme allongée sont observées avant évaporation (Figure 135.a). Après évaporation du THF, elles montrent une dispersion relativement importante en taille, principalement inférieure à  $1 \mu m$  (Figure 135.b). Plus près de la courbe binodale ( $P_5 : \Phi_{paclitaxel} = 10^{-4}$ ), des capsules plus grandes sont formées (Figure 136.a). Dans le cas de l'échantillon préparé au-delà de la limite de solubilité ( $P_7 : \Phi_{paclitaxel} = 10^{-3}$ ), aucune capsule n'a été observée (Figure 136.b), ce qui confirme que le paclitaxel n'a pas formé de nanoprécipité.

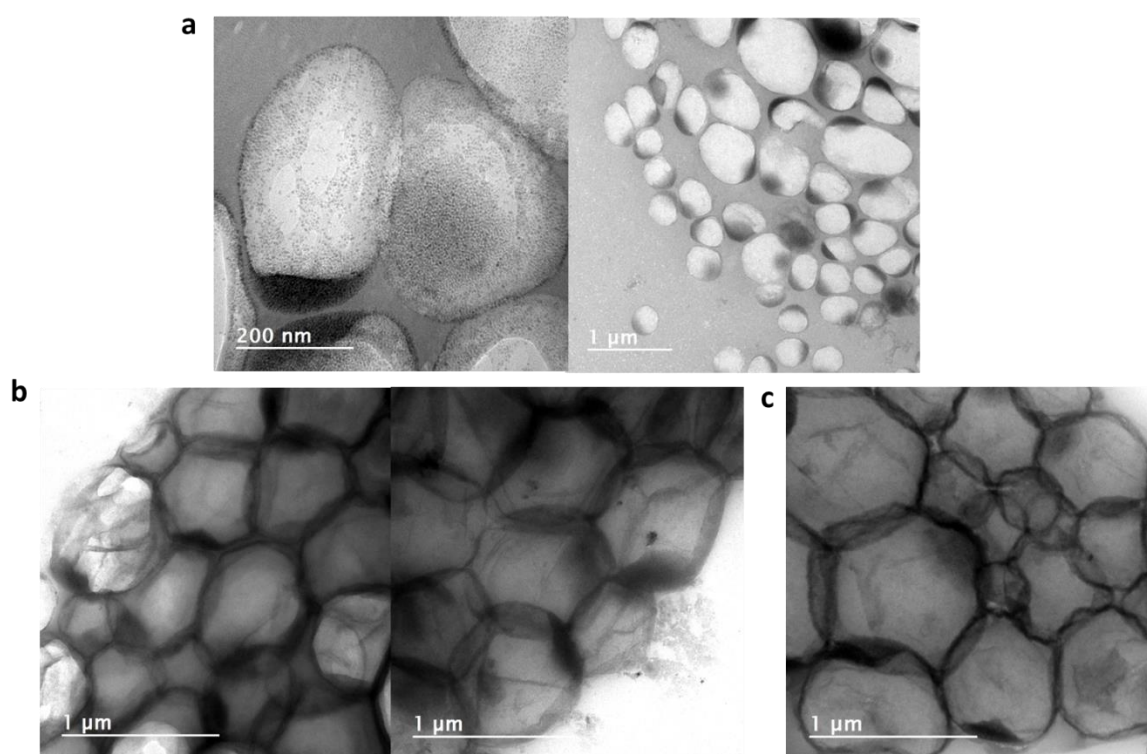


Figure 135 : Images MET de capsules préparées à partir des compositions dans le domaine SFME du système paclitaxel/THF/H<sub>2</sub>O ( $\Phi_{THF} = 0,23$ ) : (a)  $P_2$  ( $\Phi_{paclitaxel} = 10^{-5}$ ) avant et (b) après évaporation du solvant. (c)  $P_1$  ( $\Phi_{paclitaxel} = 10^{-6}$ ) après évaporation.

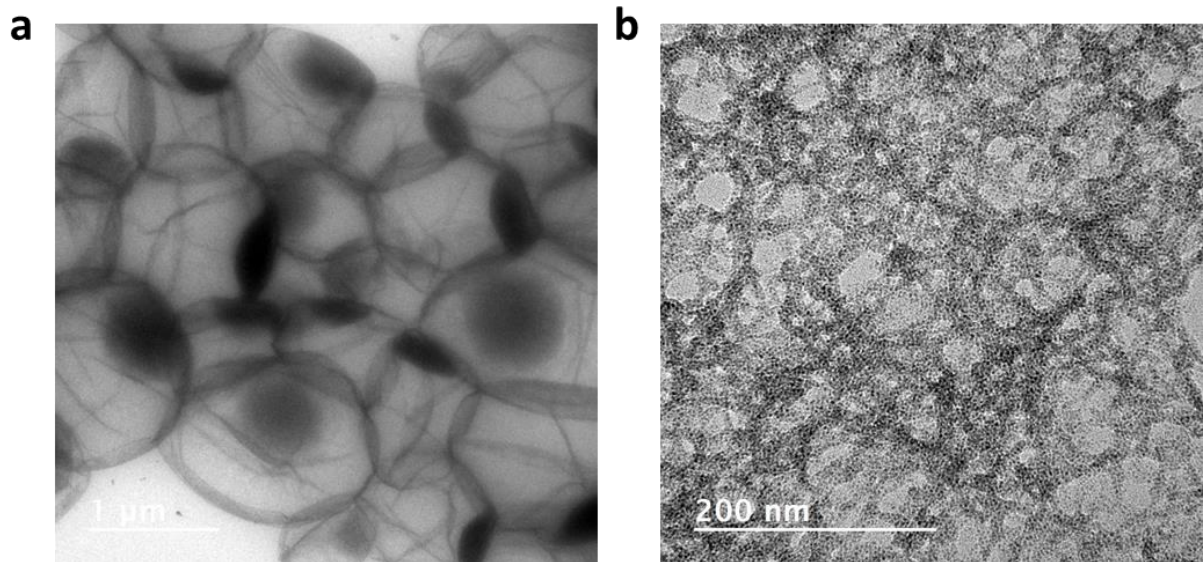


Figure 136 : Images MET de capsules préparées à partir des compositions du système PTX/THF/H<sub>2</sub>O ( $\Phi_{\text{THF}} = 0,23$ ) : (a) dans le domaine SFME (proche binodale,  $P_5$  :  $\Phi_{\text{paclitaxel}} = 10^{-4}$ ) après évaporation du solvant, (b) au-delà de la binodale ( $P_7$  :  $\Phi_{\text{paclitaxel}} = 10^{-3}$ ) avant évaporation du solvant.

## VI Conclusions et perspectives

Nous rapportons pour la première fois la synthèse de nanoparticules cœur-coquille, qui sont en fait des nanocapsules avec un cœur constitué uniquement de médicament et une coquille de nanoparticules. Cette synthèse est réalisée par un processus de co-nanoprécipitation « one-pot ».

Nous avons étudié l'encapsulation de quatre molécules dont les médicaments anticancéreux approuvés par la FDA et utilisés en clinique, sorafénib<sup>19</sup> et paclitaxel<sup>20</sup>, ayant des propriétés de solubilité similaires (solubilité dans l'eau et logP), mais différant par leur état physique (solide vs liquide) ou leur structure chimique (moléculaire vs sel). Cette étude est fortement basée sur nos connaissances antérieures de la nanoprécipitation par déplacement de solvant (chapitre 2). Suivant une stratégie rationnelle, nous avons d'abord étudié la nanoprécipitation des médicaments sélectionnés dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O pour identifier les compositions formant soit des émulsions Ouzo, soit des microémulsions sans tensioactif (SFME).

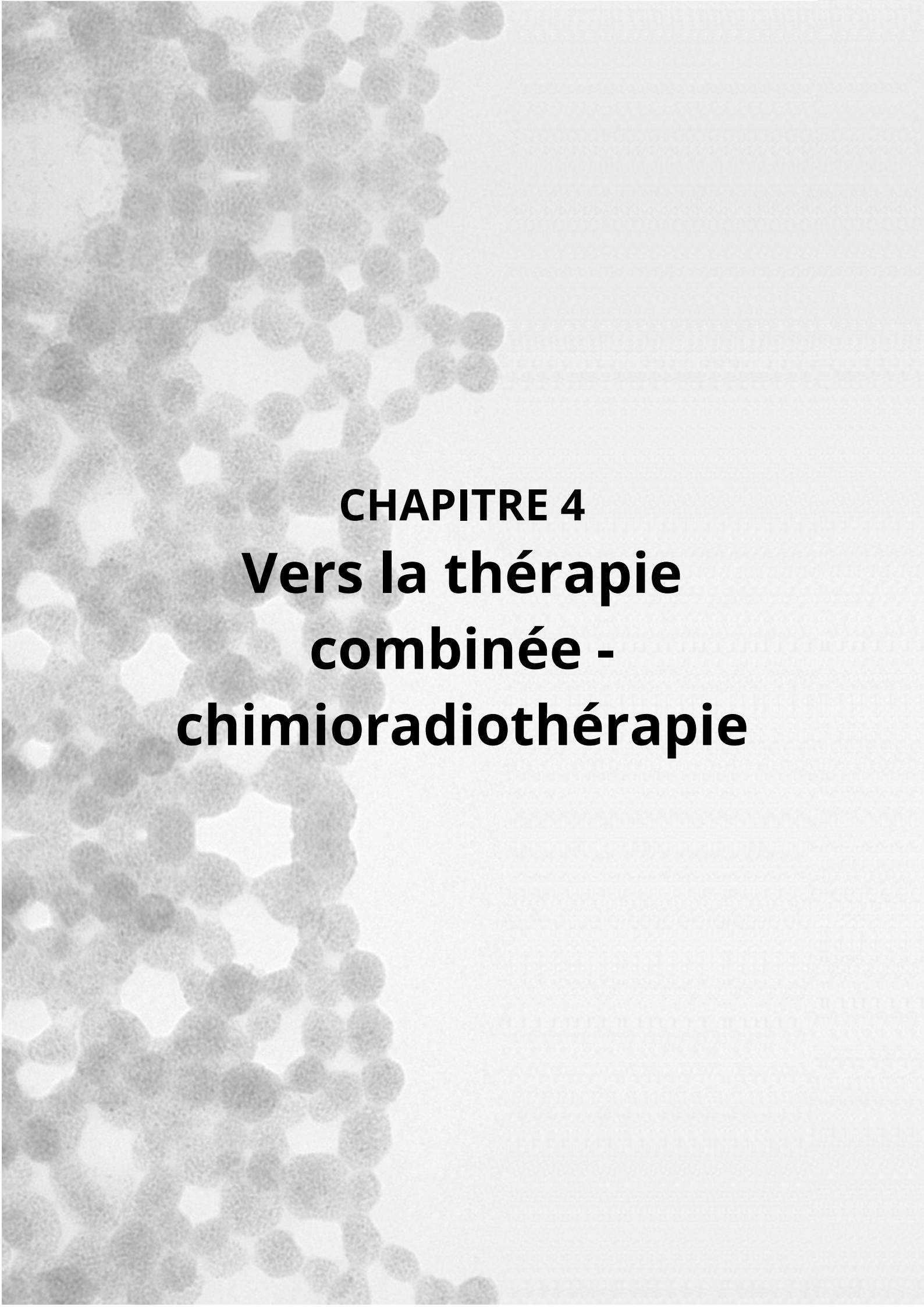
Ensuite, nous avons étudié l'effet de l'ajout de nanoparticules d'oxyde de fer (SPION) hydrophobes sur la taille et la stabilité du nanoprécipité. Nos principaux résultats sont les suivants. Dans les quatre cas, des capsules avec un cœur constitué de médicament peuvent être obtenues. Ensuite, le rendement d'encapsulation est très élevé (environ 80 %), ce qui signifie que la perte de médicament au cours du processus d'encapsulation reste faible. La taille finale des capsules dépend de la composition médicament/THF/H<sub>2</sub>O, les échantillons préparés dans le domaine Ouzo (de préférence proche de la binodale) donnant la plus petite taille. Il est intéressant de noter que la présence des nanoparticules étend le domaine Ouzo, permettant d'augmenter la concentration totale du médicament. Dans le domaine SFME, des capsules de petite taille (< 100 nm) et de très grande taille (1 µm) sont observées, avec quelques problèmes de reproductibilité. Nous pensons que cela pourrait être dû à un taux d'agrégation plus lent dans le domaine SFME par rapport au domaine Ouzo, une hypothèse qui devra faire l'objet d'études plus poussées. Les capsules sont préparées indifféremment à partir de médicaments liquides (vitamine E) ou solides (sorafénib, sorafénib tosylate, paclitaxel). Cependant, la cristallisation de la molécule peut entraver l'encapsulation car celle-ci puise le nanoprécipité du noyau de la capsule vers l'extérieur du cœur de l'H<sup>®</sup>. Ce problème pourrait être résolu dans des travaux futurs en utilisant un revêtement polymère pouvant imperméabiliser la capsule, mais rendant le relargage plus complexe (i.e. il faudra un stimulus externe, tel qu'un changement de pH, pour libérer le composé).<sup>21-25</sup> Cependant, certaines molécules, comme le paclitaxel, ne présentent pas de domaine Ouzo, et ne peuvent donc être encapsulées que dans le domaine SFME. Ganachaud *et al.* l'avaient déjà suggéré pour l'encapsulation de la camptothécine où les domaines de nanoprécipitation (Ouzo) du soluté hydrophobe, le miglyol, et du polymère, la coque, ne coïncidaient pas sur le diagramme de phase.<sup>2</sup> Ils avaient donc également utilisé le domaine SFME pour former les gouttelettes de soluté et élaborer des capsules de polymère.

## VII Références bibliographiques

- (1) Yan, X.; Delgado, M.; Fu, A.; Alcouffe, P.; Gouin, S. G.; Fleury, E.; Katz, J. L.; Ganachaud, F.; Bernard, J. Simple but Precise Engineering of Functional Nanocapsules through Nanoprecipitation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (27), 6910–6913. <https://doi.org/10.1002/anie.201402825>.
- (2) Yan, X.; Alcouffe, P.; Sudre, G.; David, L.; Bernard, J.; Ganachaud, F. Modular Construction of Single-Component Polymer Nanocapsules through a One-Step Surfactant-Free Microemulsion Templated Synthesis. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (8), 1401–1404. <https://doi.org/10.1039/C6CC09701D>.
- (3) Zhang, R.; Xing, R.; Jiao, T.; Ma, K.; Chen, C.; Ma, G.; Yan, X. Carrier-Free, Chemophotodynamic Dual Nanodrugs via Self-Assembly for Synergistic Antitumor Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (21), 13262–13269. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02416>.
- (4) Song, Q.; Wang, X.; Wang, Y.; Liang, Y.; Zhou, Y.; Song, X.; He, B.; Zhang, H.; Dai, W.; Wang, X.; Zhang, Q. Reduction Responsive Self-Assembled Nanoparticles Based on Disulfide-Linked Drug–Drug Conjugate with High Drug Loading and Antitumor Efficacy. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (1), 190–201. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00631>.
- (5) Khayata, N.; Abdelwahed, W.; Chehna, M. F.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation of Vitamin E Loaded Nanocapsules by the Nanoprecipitation Method: From Laboratory Scale to Large Scale Using a Membrane Contactor. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423* (2), 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.016>.
- (6) Goubault, C.; Igllicki, D.; Swain, R. A.; McVey, B. F. P.; Lefeuvre, B.; Rault, L.; Nayral, C.; Delpech, F.; Kahn, M. L.; Chevance, S.; Gauffre, F. Effect of Nanoparticles on Spontaneous Ouzo Emulsification. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *603*, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.06.104>.
- (7) Sciortino, F.; Casterou, G.; Eliat, P.-A.; Troadec, M.-B.; Gaillard, C.; Chevance, S.; Kahn, M. L.; Gauffre, F. Simple Engineering of Polymer-Nanoparticle Hybrid Nanocapsules. *ChemNanoMat* **2016**, *2* (8), 796–799. <https://doi.org/10.1002/cnma.201600155>.
- (8) Sciortino, F.; Thivolle, M.; Kahn, M. L.; Gaillard, C.; Chevance, S.; Gauffre, F. Structure and Elasticity of Composite Nanoparticle/Polymer Nanoshells (Hybridosomes®). *Soft Matter* **2017**, *13* (24), 4393–4400. <https://doi.org/10.1039/C7SM00705A>.
- (9) Sciortino, F.; Rydzek, G.; Grasset, F.; Kahn, M. L.; Hill, J. P.; Chevance, S.; Gauffre, F.; Ariga, K. Electro-Click Construction of Hybrid Nanocapsule Films with Triggered Delivery Properties. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (4), 2761–2770. <https://doi.org/10.1039/C7CP07506E>.
- (10) Vitale, S. A.; Katz, J. L. Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid–Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect.” *Langmuir* **2003**, *19* (10), 4105–4110. <https://doi.org/10.1021/la026842o>.
- (11) Han, Y.; Pan, N.; Li, D.; Liu, S.; Sun, B.; Chai, J.; Li, D. Formation Mechanism of Surfactant-Free Microemulsion and a Judgment on Whether It Can Be Formed in One Ternary System. *Chem. Eng. J.* **2022**, *437*, 135385. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135385>.
- (12) Liu, C.; Chen, Z.; Chen, Y.; Lu, J.; Li, Y.; Wang, S.; Wu, G.; Qian, F. Improving Oral Bioavailability of Sorafenib by Optimizing the “Spring” and “Parachute” Based on Molecular Interaction Mechanisms. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (2), 599–608. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00837>.
- (13) Bharate, S. S. Modulation of Biopharmaceutical Properties of Drugs Using Sulfonate Counterions: A Critical Analysis of FDA-Approved Pharmaceutical Salts. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *66*, 102913. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102913>.
- (14) Botet, R.; Roger, K. How Do Interactions Control Droplet Size during Nanoprecipitation? *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2016**, *22*, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.03.003>.

- (15) Yan, X.; Delgado, M.; Aubry, J.; Gribelin, O.; Stocco, A.; Boisson-Da Cruz, F.; Bernard, J.; Ganachaud, F. Central Role of Bicarbonate Anions in Charging Water/Hydrophobic Interfaces. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (1), 96–103. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.7b02993>.
- (16) Roger, K.; Eissa, M.; Elaissari, A.; Cabane, B. Surface Charge of Polymer Particles in Water: The Role of Ionic End-Groups. *Langmuir* **2013**, *29* (36), 11244–11250. <https://doi.org/10.1021/la4019053>.
- (17) Roger, K.; Botet, R.; Cabane, B. Coalescence of Repelling Colloidal Droplets: A Route to Monodisperse Populations. *Langmuir* **2013**, *29* (19), 5689–5700. <https://doi.org/10.1021/la400498j>.
- (18) Stachurski, J.; Michałek, M. The Effect of the  $\zeta$  Potential on the Stability of a Non-Polar Oil-in-Water Emulsion. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *184* (2), 433–436. <https://doi.org/10.1006/jcis.1996.0637>.
- (19) Keating, G. M.; Santoro, A. Sorafenib: A Review of Its Use in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Drugs* **2009**, *69* (2), 223–240. <https://doi.org/10.2165/00003495-200969020-00006>.
- (20) Markman, M.; Mekhail, T. M. Paclitaxel in Cancer Therapy. *Expert Opin. Pharmacother.* **2002**, *3* (6), 755–766. <https://doi.org/10.1517/14656566.3.6.755>.
- (21) Jia, L.; Pang, M.; Fan, M.; Tan, X.; Wang, Y.; Huang, M.; Liu, Y.; Wang, Q.; Zhu, Y.; Yang, X. A PH-Responsive Pickering Nanoemulsion for Specified Spatial Delivery of Immune Checkpoint Inhibitor and Chemotherapy Agent to Tumors. *Theranostics* **2020**, *10* (22), 9956–9969. <https://doi.org/10.7150/thno.46089>.
- (22) Dieng, S. M.; Anton, N.; Bouriat, P.; Thioune, O.; Sy, P. M.; Massaddeq, N.; Enharrar, S.; Diarra, M.; Vandamme, T. Pickering Nano-Emulsions Stabilized by Solid Lipid Nanoparticles as a Temperature Sensitive Drug Delivery System. *Soft Matter* **2019**, *15* (40), 8164–8174. <https://doi.org/10.1039/C9SM01283D>.
- (23) Ji, Q.; Guo, C.; Yu, X.; Ochs, C. J.; Hill, J. P.; Caruso, F.; Nakazawa, H.; Ariga, K. Flake-Shell Capsules: Adjustable Inorganic Structures. *Small* **2012**, *8* (15), 2345–2349. <https://doi.org/10.1002/sml.201200317>.
- (24) Deng, Z.; Zhen, Z.; Hu, X.; Wu, S.; Xu, Z.; Chu, P. K. Hollow Chitosan–Silica Nanospheres as PH-Sensitive Targeted Delivery Carriers in Breast Cancer Therapy. *Biomaterials* **2011**, *32* (21), 4976–4986. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.050>.
- (25) Rahim, M. A.; Jan, N.; Khan, S.; Shah, H.; Madni, A.; Khan, A.; Jabar, A.; Khan, S.; Elhissi, A.; Hussain, Z.; Aziz, H. C.; Sohail, M.; Khan, M.; Thu, H. E. Recent Advancements in Stimuli Responsive Drug Delivery Platforms for Active and Passive Cancer Targeting. *Cancers* **2021**, *13* (4), 670. <https://doi.org/10.3390/cancers13040670>.



The background of the slide is a grayscale microscopic image showing a dense field of cells, likely cancer cells, with prominent nuclei and some mitotic figures. The cells are arranged in a somewhat disorganized pattern, typical of a tumor tissue section.

**CHAPITRE 4**  
**Vers la thérapie**  
**combinée -**  
**chimioradiothérapie**





# SOMMAIRE

---

<b>CHAPITRE 4 Vers la thérapie combinée - chimioradiothérapie</b>	<b>163</b>
<b>I Utilisation des Hybridosomes® pour la chimiothérapie</b>	<b>168</b>
<b>I.1 Choix du sorafénib</b>	<b>168</b>
<b>I.2 Évaluation des effets chimiothérapeutiques</b>	<b>168</b>
I.2.a Lignée cellulaire HuH-7 et protocole de culture cellulaire	169
I.2.b Test de viabilité en présence des différents contrôles : médicaments non-formulés en H®	170
I.2.c Test de viabilité en présence d'H® avec ou sans Sorafénib encapsulé	171
<b>II Utilisation des Hybridosomes® pour la thérapie combinée</b>	<b>172</b>
<b>II.1 Stratégie de potentialisation de la radiothérapie par l'utilisation de nanoparticules radiosensibilisantes</b>	<b>172</b>
II.1.a Intérêt de l'utilisation des nanoparticules d'or (AuNP).	172
II.1.b Elaboration des H® contenant seulement des AuNP	173
II.1.b.i Synthèse des AuNP	173
II.1.b.ii Choix du polymère et élaboration des H® BHT/AuNP@polymère	174
II.1.b.iii Elaboration des H® sorafénib/AuNP@PVPA	175
<b>II.2 Évaluation des effets chimioradiothérapeutiques des H®</b>	<b>180</b>
II.2.a Évaluation de l'activité chimiothérapeutique des H® AuNP@PVPA avec/sans sorafénib.	180
II.2.b Evaluation de l'activité chimioradiothérapeutique du sorafénib formulé en H®	181
II.2.b.i Détermination de la dose d'irradiation adéquate	181
II.2.b.ii Tests cellulaires de thérapie combinée	184
<b>III Conclusions et perspectives</b>	<b>187</b>
<b>IV Références bibliographiques</b>	<b>189</b>



## CHAPITRE 4 : VERS LA THÉRAPIE COMBINÉE – CHIMIORADIOTHÉRAPIE

---

Les atomes à haut numéro atomique  $Z$ , comme l'or ( $Z = 79$ ), sont connus pour procurer un effet radiosensibilisant. En effet, les éléments à haut  $Z$  présentent une absorption élevée des photons. Ainsi, des particules composées d'éléments à haut  $Z$  ont été utilisées pour la radiosensibilisation car elles réduisent l'endommagement des tissus sains environnants, diminuent la dose de radiation administrée<sup>1</sup> et sont le plus souvent biocompatibles.<sup>2,3</sup> De nombreuses études utilisent les nanoparticules d'or, aujourd'hui, considérées comme une innovation majeure dans le domaine de la radiothérapie, pour améliorer les thérapies anticancéreuses.<sup>4-8</sup>

Des premiers résultats encourageants ont pu être obtenus au cours de la thèse de Clément Goubault dans le traitement d'un modèle murin de glioblastome par radiothérapie<sup>9</sup>. La meilleure efficacité a été observée pour des H<sup>®</sup> constitués d'un mélange de nanoparticules d'oxyde de fer (SPION) et d'une petite quantité de nanoparticules d'or (AuNP). Par ailleurs, la possibilité d'encapsulation de principes actifs dans le cœur des H<sup>®</sup>, que nous avons démontrée dans le chapitre 3, nous a amené à viser une stratégie combinant la coque d'AuNP radiosensibilisante avec l'encapsulation d'un principe actif chimiothérapeutique. Ainsi, un même objet pourrait permettre la libération du médicament de façon concomitante à l'application de rayonnements ionisants (thérapie combinée). Nous pourrions même espérer un effet synergique de la chimiothérapie avec la radiothérapie, comme augmenter la sensibilité des cellules tumorales aux rayons X.<sup>10,11</sup> En effet, quelques études mettant en jeu des nanoparticules d'or avec des médicaments chimiothérapeutiques ont montré des résultats probants.<sup>11-14</sup>

Dans ce chapitre, nous avons étudié, dans un premier temps, les effets chimiothérapeutiques *in vitro* d'un principe actif, le sorafénib (cf. chapitre 3), encapsulé dans nos H<sup>®</sup> de référence, c'est-à-dire constitué d'une coque de SPION stabilisés par du PEG-PAA (H<sup>®</sup> Sorafénib/SPION@PEG-PAA). Nous avons, dans un second temps, cherché à concevoir des H<sup>®</sup> entièrement constitués d'or au niveau de la coque et à en tester les effets radiosensibilisants combinés avec l'encapsulation du principe actif chimiothérapeutique (H<sup>®</sup> sorafénib/AuNP@PVPA).

## I Utilisation des Hybridosomes® pour la chimiothérapie

Dans cette partie, nous allons étudier les effets chimiothérapeutiques d'un médicament, le sorafénib, que nous avons réussi à encapsuler dans des Hybridosomes® dont la coque est composée de nanoparticules d'oxyde de fer (SPION : Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + ligands octylamine/acide oléique) et de polymère PEG<sub>2k</sub>-PAA<sub>7k</sub>. Pour simplifier la notation, nous les avons appelés H® sorafénib/SPION@PEG-PAA. Par soucis de comparaison, nous avons utilisé comme contrôle, c'est-à-dire sans sorafénib, des H® contenant du BHT, nommés H® BHT/SPION@PEG-PAA.

### I.1 Choix du sorafénib

Le sorafénib est proposé pour le traitement standard des patients atteints de carcinome hépatocellulaire (CHC) avancé.<sup>15</sup> Les cellules du CHC peuvent rapidement modifier leur métabolisme selon l'environnement pour maintenir leur tumorigénicité et leur capacité proliférative, ce qui en fait un candidat idéal pour tester les capacités chimiothérapeutiques.<sup>16</sup> Il peut aussi être prescrit dans le cas de carcinomes rénal avancé et thyroïdien différencié.<sup>15</sup> Il est commercialisé sous le nom du médicament NEXAVAR® (sous la forme de sorafénib tosylate). Ce traitement est délivré en comprimés aux patients, avec une dose classique de 800 mg/j soit  $1,26 \cdot 10^{-3}$  mol/j.<sup>15</sup>

Plusieurs raisons nous ont amenés à choisir le sorafénib (sous sa forme neutre) comme médicament modèle pour notre preuve de concept :

- Tout d'abord, son encapsulation dans les H® SPION@PEG-PAA est efficace avec un taux d'encapsulation d'au moins 85 % (chapitre 3).
- La taille des H® n'excédait pas les 100 nm, un bon point pour la biodistribution.<sup>17,18</sup>
- Les deux traitements (chimio- ou radiothérapie) ont démontré individuellement leur efficacité anti-tumorale.<sup>19,20</sup>
- Des études ont prouvé l'intérêt à combiner la radiothérapie avec ce principe actif, puisque le sorafénib augmenterait l'efficacité des effets des rayonnements.<sup>10,19,21-23</sup> Il est important de noter que dans ces études, le sorafénib n'est pas encapsulé, mais solubilisé pour des tests *in vitro* ou *in vivo*. Dans le cas des tests *in vivo*, le traitement est administré par voie orale (sur modèle murin ou sur modèle humain atteint de CHC).

### I.2 Évaluation des effets chimiothérapeutiques

Les tests cellulaires ont été réalisés par Rémy Le Guével et Hélène Solhi (ImPACcell).

## 1.2.a Lignée cellulaire HuH-7 et protocole de culture cellulaire

Pour évaluer les effets anti-cancéreux du sorafénib *in vitro*, nous avons construit les profils de viabilité des cellules, c'est-à-dire le pourcentage de cellules viables en fonction de la concentration en composé chimique. À partir de ces profils, qui sont en général des courbes sigmoïdes, nous pouvons : i) quantifier le pourcentage de cellules tuées (ou l'amplitude réponse), et ii) déterminer l'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice médiane, ou « Half-maximal inhibitory concentration », c'est-à-dire ici la concentration nécessaire pour atteindre la moitié de la quantité totale de cellules tuées)<sup>24</sup>. Cette dernière mesure est couramment utilisée pour évaluer l'efficacité d'un médicament. Toutefois, il faut garder à l'esprit que ces informations peuvent dépendre de la lignée cellulaire expérimentale utilisée. Dans notre cas, nous avons choisi une lignée HuH-7 (carcinome hépatocellulaire) ayant subi une modification d'un gène pour exprimer la luciférase (HuH-7-Luc), une enzyme clé permettant la bioluminescence. Nous avons utilisé cette lignée modifiée dans le but de suivre *in vivo* la croissance tumorale et donc l'effet de nos capsules dans un modèle murin grâce à la bioluminescence. Cette approche n'a pas été abordée dans ce manuscrit, car elle n'a pas encore été réalisée.

Les doses classiques de sorafénib pour déterminer l'IC<sub>50</sub> *via* des tests cellulaires sur la lignée HuH-7 sont typiquement sur une gamme de 0 à environ 30-40  $\mu\text{M}$ <sup>25-29</sup>, pouvant même aller jusqu'à 100  $\mu\text{M}$ .<sup>29</sup> Dans notre cas, les concentrations en sorafénib utilisées pour les tests cellulaires se situent entre 0 et 25  $\mu\text{M}$ . Les cellules ont été incubées en présence des H<sup>®</sup> dans un milieu cellulaire DMEM (cf. chapitre 5, Matériels et Méthodes) pendant 48 h et les analyses sont réalisées en triplicata. Du sérum (10% de FBS, sérum fœtal de bovin) a été ajouté au milieu de culture cellulaire. Dans une étude précédente d'encapsulation du BODIPY dans les H<sup>®</sup>, une petite quantité de ce fluorophore semblait se transférer du cœur des capsules hybrides vers le sérum fœtal de bovin avec le temps.<sup>30</sup> Nous avons donc quantifié la libération non contrôlée du sorafénib dans le milieu en présence de sérum et en absence des cellules HuH-7-Luc. Pour cela, nous avons réalisé un dosage HPLC du sorafénib ( $C_{\text{sorafénib,initiale}} = 0,24$  mM) dans le surnageant du milieu biologique contenant les H<sup>®</sup> pendant la durée d'incubation (48 h). Environ 20 % du sorafénib est relargué dans le surnageant du milieu cellulaire (Figure 137). En comparaison, le taux de relargage du sorafénib dans l'eau est d'environ 5 % dans les 5 premiers jours.

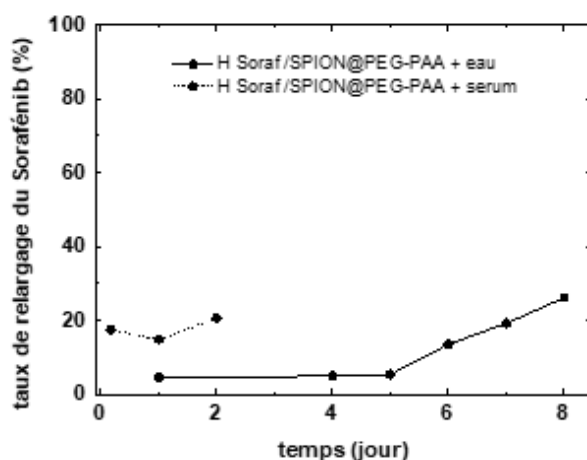


Figure 137 : Libération du sorafénib initialement encapsulé (0,24 mM) dans les H<sup>®</sup> SPION@PEG-PAA en fonction du temps et du milieu de suspension des capsules, avec (—) pour les H<sup>®</sup> en solution aqueuse et (· · ·) pour les H<sup>®</sup> en solution dans le milieu de culture cellulaire contenant du sérum de veau fœtal (FBS).

## 1.2.b Test de viabilité en présence des différents contrôles : médicaments non-formulés en H®

Une méthode colorimétrique a été utilisée pour évaluer la viabilité des cellules. Les cellules ont été colorées avec du Hoechst 33342, puis comptées à l'aide d'un lecteur dédié à la mesure et l'analyse visuelle du contenu cellulaire. Le DMSO a été testé pour vérifier qu'il n'a pas d'effet toxique (Figure 138.a) sur la culture cellulaire en tant que contrôle. Le pourcentage de cellules résiduelles est très élevé (87%), et la courbe ne présente pas un profil sigmoïdal. Par conséquent, le DMSO est considéré non toxique pour les gammes de concentrations testées dans le milieu cellulaire. La doxorubicine, toxique pour les cellules (au point d'inflexion :  $IC_{50} = 0,04 \mu M$ , Figure 138.b), a servi aussi à contrôler si le test réalisé était fiable. Enfin, nous avons solubilisé du sorafénib et du sorafénib tosylate (NEXAVAR®) dans du DMSO pour tester la viabilité des cellules en leur présence. Leurs valeurs d' $IC_{50}$  très comparables ( $IC_{50} = 13 \mu M$ , Figure 138.c et d) ont été prises en compte comme référence pour la suite. Les deux présentent une toxicité élevée pour les cellules avec un pourcentage de cellules tuées proche des 100 %.<sup>25</sup> Ainsi, ils sont très efficaces sur la lignée HuH-7-Luc.

La Figure 138 présente les profils d'inhibition ( $IC_{50}$  et pourcentage de cellules tuées après 48h d'incubation) des activités biologiques, induite par les composés de référence (sorafénib avec/sans tosylate) et les contrôles (DMSO, doxorubicine) :

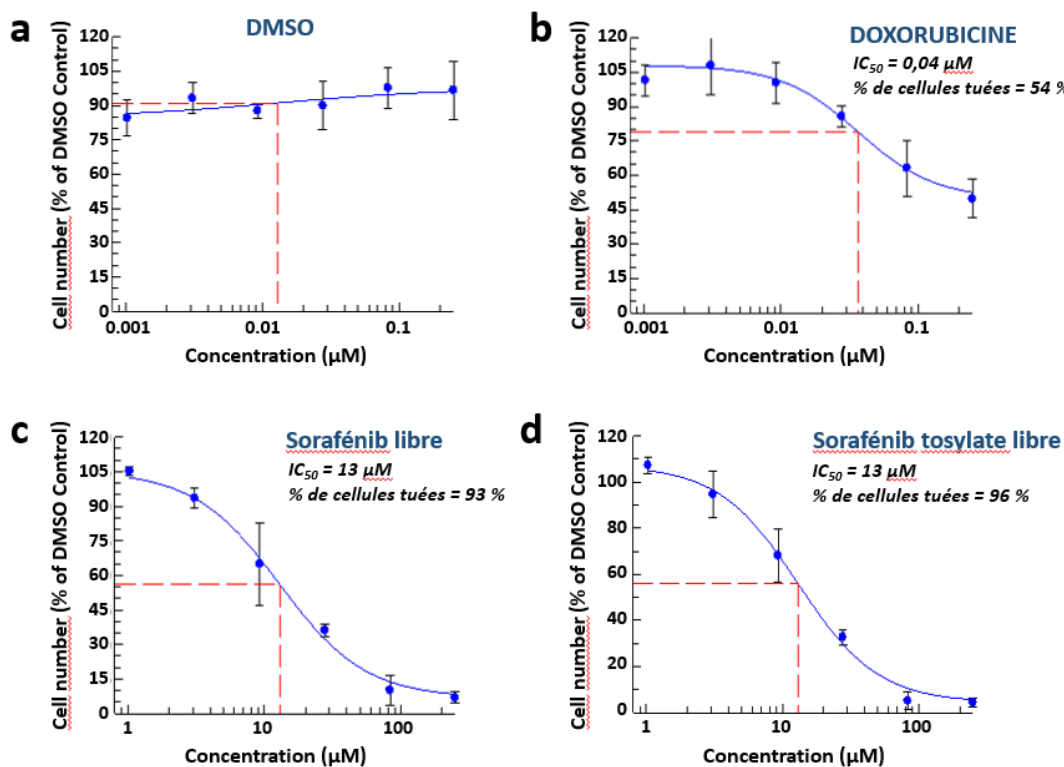


Figure 138 : Profil de viabilité des cellules HuH-7-Luc en présence des composés testés : les références (sorafénib ± tosylate) et les contrôles (DMSO et doxorubicine). Courbes sigmoïdales à partir du modèle dose-réponse où l' $IC_{50}$  correspond au point d'inflexion située à l'intersection des courbes rouges en pointillés. Le pourcentage de cellules tuées est extrapolé aux fortes concentrations.

### 1.2.c Test de viabilité en présence d'H<sup>®</sup> avec ou sans Sorafénib encapsulé

Les résultats *in vitro* des H<sup>®</sup> SPION@PEG-PAA avec ou sans sorafénib encapsulé sont représentés dans la Figure 85.

Pour les H<sup>®</sup> ne contenant pas de sorafénib (H<sup>®</sup> BHT/SPION@PEG-PAA), l'axe de la concentration ( $\mu\text{M}$ ) en abscisse est en équivalent de sorafénib (c'est-à-dire la même quantité d'H<sup>®</sup> que pour atteindre la concentration indiquée en sorafénib avec le système H<sup>®</sup> + sorafénib) afin de simplifier la comparaison avec le système encapsulant le médicament (Figure 85.a). Ce test de viabilité permet de vérifier la toxicité des H<sup>®</sup> sans sorafénib, dans le but de s'assurer que l'activité inhibitrice observée sur les cellules en culture est bel et bien liée au sorafénib encapsulé, et non à la formulation de la capsule. D'après la Figure 85.a, la courbe est sigmoïdale et présente un plateau aux faibles concentrations, puis une chute du pourcentage de cellules viables (avec un facteur de pente de -5 aux fortes concentrations équivalentes de sorafénib). Cela pourrait provenir du BHT encapsulé dans nos H<sup>®</sup> (qui remplace le médicament). Il faudrait alors tester la cytotoxicité du BHT seul. Pour conclure, les capsules « vides » (sans sorafénib, H<sup>®</sup> BHT/SPION@PEG-PAA), présentent seulement une toxicité aux très fortes concentrations, environ un ordre de grandeur au-dessus de celle où nous observons l'IC<sub>50</sub> pour le système H<sup>®</sup> sorafénib/SPION@PEG-PAA). Cela signifierait donc que la cytotoxicité observée pour le système H<sup>®</sup> sorafénib/SPION@PEG-PAA pourrait provenir exclusivement du sorafénib encapsulé, et non de la capsule en tant que tel.

Les résultats *in vitro* ont démontré que le sorafénib a bien été encapsulé dans les H<sup>®</sup> puis délivré dans le milieu cellulaire, avec une activité inhibitrice comparable au médicament libre en solution (non encapsulé). En effet, l'IC<sub>50</sub> de l'échantillon contenant le sorafénib encapsulé est de 19  $\mu\text{M}$  (H<sup>®</sup> Sorafénib/SPION@PEG-PAA, Figure 85.b), donc comparable à 13  $\mu\text{M}$ , valeur précédemment déterminée pour le sorafénib non encapsulé (Figure 85.c). Par ailleurs, presque 100 % des cellules ont été tuées par le sorafénib délivré par les H<sup>®</sup>. Le système semble alors efficace en test *in vitro* sur la lignée HuH-7-Luc.



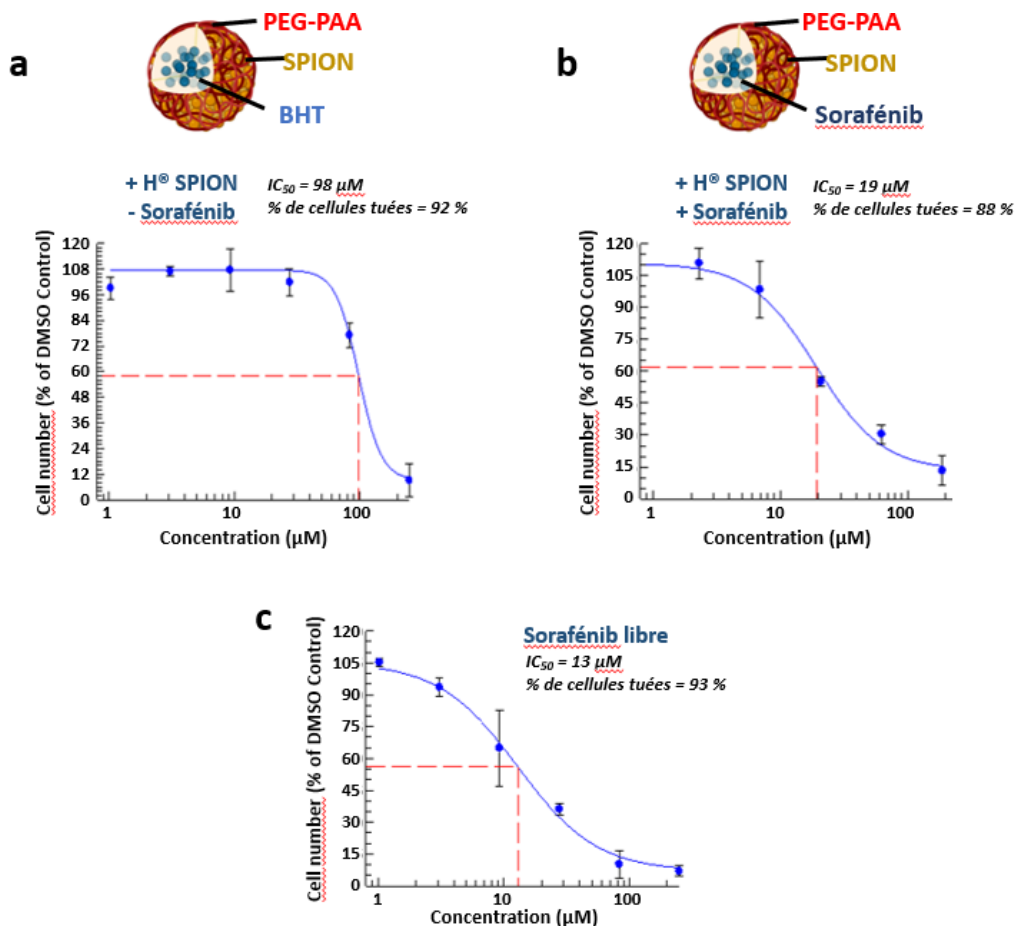


Figure 139 : Profil de viabilité des cellules HuH-7-Luc en présence des composés : H<sup>187</sup>SPION/PEG-PAA (a) n'encapsulant pas le sorafénib, (b) contenant du sorafénib dans le cœur hydrophobe. (c) Rappel du profil de viabilité du sorafénib libre, non formulé en H<sup>187</sup>.

## II Utilisation des Hybridosomes<sup>®</sup> pour la thérapie combinée

### II.1 Stratégie de potentialisation de la radiothérapie par l'utilisation de nanoparticules radiosensibilisantes

#### II.1.a Intérêt de l'utilisation des nanoparticules d'or (AuNP).

De nombreuses études ont montré que l'utilisation de nanoparticules à haut Z (comme l'or) permettait de diminuer la dose administrée et de la délivrer plus localement.<sup>1,9</sup> À noter que l'effet radiosensibilisant est également observable pour des nanoparticules composés d'atomes ayant un Z plus faible, bien que moins significatif.<sup>31</sup> De plus, cet effet potentialisant semble être corrélé au nombre de nanoparticules colocalisées dans la cellule, comme l'ont montré les travaux de modélisation de notre collaborateur Paul Rétif (CHR Metz-Thiobille, CRAN)<sup>9</sup> et les travaux de Roeske *et al.*<sup>31</sup>

Forts des bons résultats obtenus précédemment avec des H<sup>187</sup> AuNP-SPION sur le traitement par radiothérapie du glioblastome murin, nous avons tenté de modéliser quelle

serait l'efficacité du dépôt de dose avec des AuNP de 10 nm de diamètre, individuelles ou assemblées de façon contrôlée en Hybridosomes® (diamètre de 80 nm). Ainsi, en utilisant un outil de modélisation et des calculs théoriques du dépôt de dose de rayonnement sur deux types de systèmes constitués entièrement d'or (l'un avec des AuNP assemblées en H®, l'autre avec des AuNP distribuées aléatoirement dans une zone définie, Figure 140), Paul Rétif a pu mettre en évidence une différence sur la qualité de la dose relative déposée en fonction de l'échelle logarithmique de couleur (violet pour 1 % de dose locale mesurée, et jaune pour 100 %). À prime abord, l'organisation des AuNP en H® semblerait responsable d'une forte potentialisation du rayonnement appliqué lors de la radiothérapie (à gauche). La dose de rayonnement semble être augmentée très fortement localement (couleur jaune correspondant à ~ 100 %). En revanche, les nanoparticules d'or non groupées et distribuées aléatoirement semblent diminuer l'effet radiosensibilisant, avec une dose plus diffuse autour d'elles (à droite, couleur rose/violette pour une dose de rayonnement se rapprochant des 1 % d'après l'échelle de couleurs).

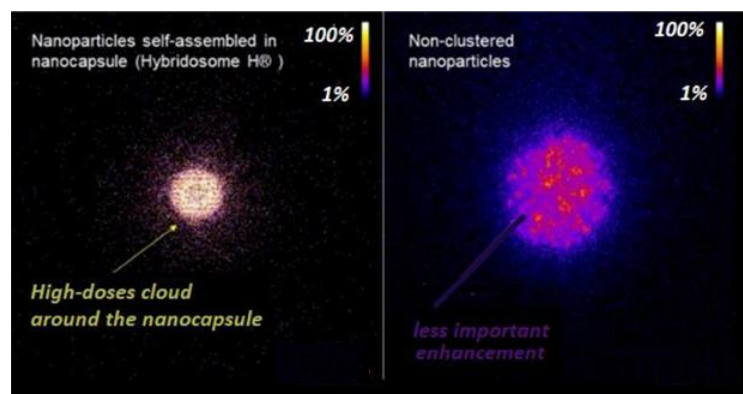


Figure 140 : Modélisation et visualisation de la dose (rayonnement) dans une section définie : à gauche, autour d'un H® (diamètre de 80 nm) composé de 100% d'AuNP (diamètre de 10 nm) auto-assemblées au niveau de la coque ; à droite, AuNP de 10 nm de diamètre non agglomérées (200x200x200 nm<sup>3</sup>) - même échelle de dose relative.

Considérant cet effet radiosensibilisant accru des AuNP, potentiellement dû à leur auto-assemblage, nous avons souhaité nous orienter vers la conception d'H® avec une coque composée exclusivement d'AuNP pour en évaluer les effets *in vitro*.

## II.1.b Elaboration des H® contenant seulement des AuNP

### II.1.b.i Synthèse des AuNP

La synthèse des AuNPs que nous avons utilisées pour ce chapitre a été développée par Olivier Gazil avec qui j'ai pu collaborer pour élaborer les H® à base de nanoparticules d'or.<sup>32</sup> Il s'agit d'AuNP entourées de triphénylphosphine (PPh<sub>3</sub>) et présentant une taille de 2,9 ± 0,6 nm. Ces particules, bien que plus petites que celles utilisées dans les études précédentes et dans la simulation précédente, ont été utilisées par soucis de stabilité. De nombreux tests ont démontré qu'il est difficile d'obtenir des H® stables composés exclusivement de nanoparticules d'or 10 nm, étant donné leur densité élevée. Le protocole complet de synthèse est disponible dans la partie V du chapitre 5 (Matériels et Méthodes).

### II.1.b.ii Choix du polymère et élaboration des H<sup>®</sup> BHT/AuNP@polymère

Pour élaborer les H<sup>®</sup> à partir de BHT comme soluté hydrophobe, nous avons choisi de travailler aux concentrations correspondantes à la croix rouge dans la Figure 141 (fractions massiques :  $\Phi_{\text{BHT}} = 4,3 \cdot 10^{-3}$  ;  $\Phi_{\text{THF}} = 0,23$  ;  $\Phi_{\text{H}_2\text{O}} = 0,77$ ). La mesure du potentiel zêta de l'émulsion (chargée négativement) a révélé que l'ajout des AuNP (16,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) à la surface des gouttes donne un potentiel zêta proche de la neutralité pour les NP-shell (gouttelettes d'émulsion avec des NP adsorbées à leur surface) formées. Après l'étape d'évaporation du solvant organique, on observe une charge positive élevée ( $\xi = 63 \pm 2$  mV) et une stabilité accrue des objets.

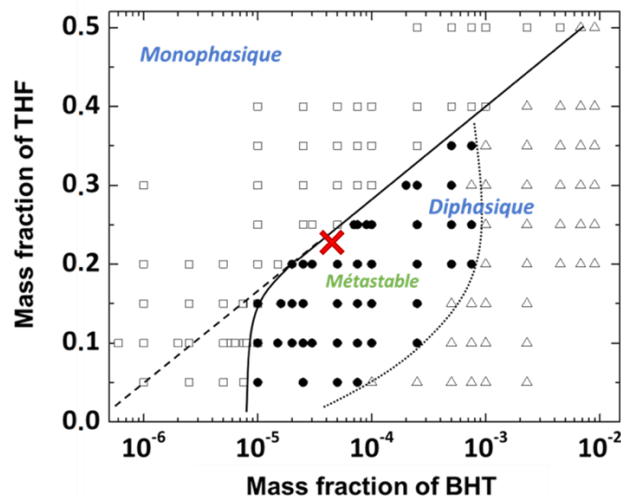


Figure 141 : Représentation semi-logarithmique du diagramme de phase BHT/THF/H<sub>2</sub>O déterminé par observation visuelle : (□) échantillons limpides ; (●) échantillons troubles ; (Δ) échantillons diphasiques. X : localisation de l'échantillon dans le domaine métastable du diagramme de phase.

Il est important de noter que le ligand PPH<sub>3</sub> (solubilité dans l'eau :  $6,48 \cdot 10^{-4}$  mM) semble pouvoir former une émulsion instantanée aux mêmes concentrations que celles utilisées pour fabriquer les capsules. En effet, une mesure DLS a révélé une population de gouttes avec un diamètre d'environ 120 nm. Ce ligand pourrait alors avoir, à lui seul, un effet sur la formation des H<sup>®</sup> (e.g. les ligands des SPION discutés dans la partie II.3.1 du chapitre 1).

Après plusieurs essais de stabilisation des NP-shell, illustrés à la Figure 142 et décrit dans le chapitre 5, le PVPA a été choisi comme meilleur candidat pour former et stabiliser les H<sup>®</sup> d'or. Le PVPA est un polyélectrolyte chargé négativement possédant un pKa de  $\sim 2,7$ .<sup>33</sup> Grâce à sa charge négative, le PVPA s'adsorbe préférentiellement à la surface des NP-shell chargées positivement par interactions électrostatiques, ce qui leur confère une robustesse élevée. Le potentiel zêta final des H<sup>®</sup> BHT/AuNP@PVPA s'élève à  $-54 \pm 3$  mV, confirmant la stabilité des objets en solution par forces répulsives ( $\xi > \pm 30$  mV).

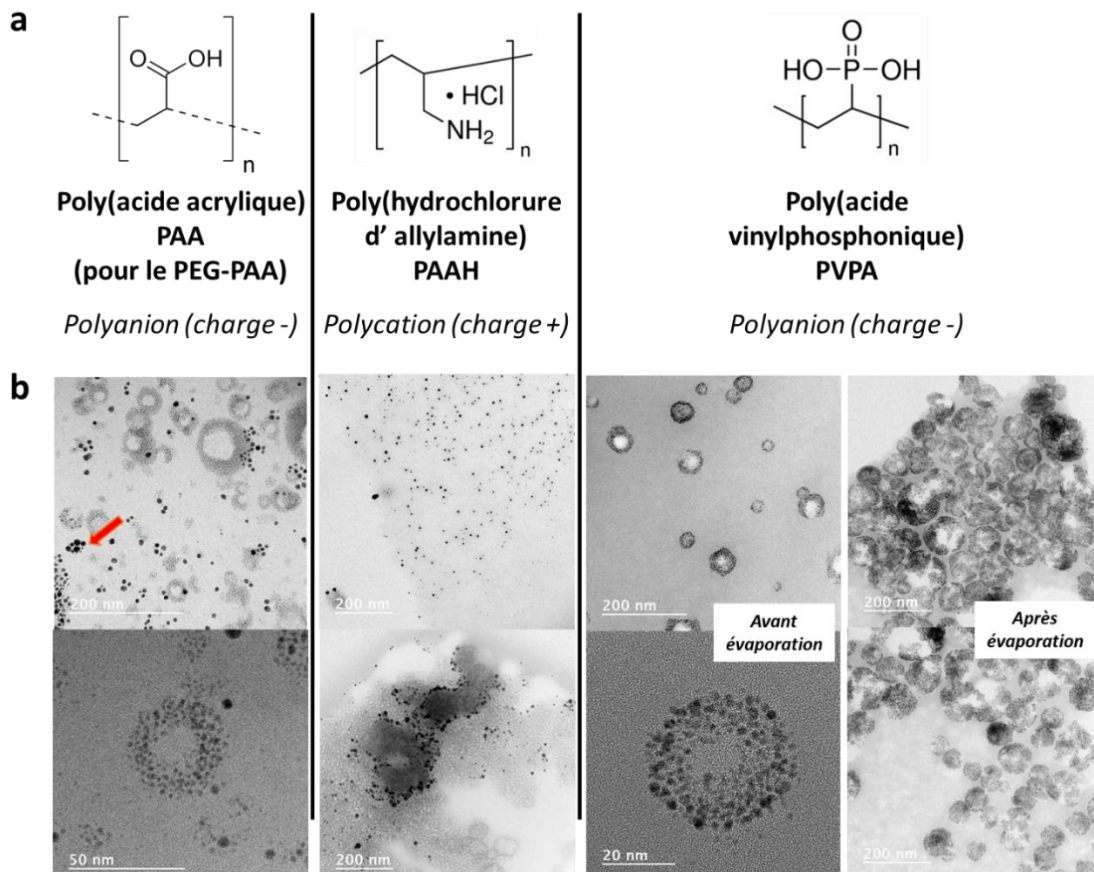


Figure 142 : Capacité de différents polymères à stabiliser des  $H^{\text{BHT}}$ /PVPA@Polymère. (a) Structure chimique des polymères utilisés ; (b) images MET des  $H^{\text{BHT}}$ /AuNP@polymère (polymère = PEG-PAA dans la première colonne, PAAH dans la seconde colonne et PVPA dans la troisième colonne avant et après évaporation du solvant).

Nous avons mesuré la taille finale des objets stabilisés par à du PVPA par NTA. Les  $H^{\text{BHT}}$  ont montré une distribution étroite avec un diamètre de  $71,7 \pm 1,5$  nm (Figure 143).

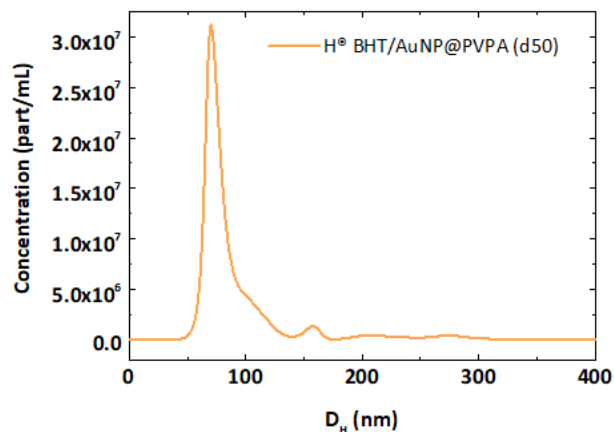


Figure 143 : Distribution de taille des  $H^{\text{BHT}}$ /AuNP@PVPA mesurée par NTA.

### II.1.b.iii Élaboration des $H^{\text{BHT}}$ sorafénib/AuNP@PVPA

Nous avons cherché à encapsuler le sorafénib dans les capsules d'or (fractions massiques :  $\Phi_{\text{sorafénib}} = 1,15 \cdot 10^{-4}$  ;  $\Phi_{\text{THF}} = 0,23$  ;  $\Phi_{\text{eau}} = 0,77$ ). Nous avons choisi cette fraction de

sorafénib car nous avons obtenu des Hybridosomes® faiblement polydisperses et de taille intéressante pour la biodistribution à partir de nanoparticules d'oxyde de fer entre les fractions massiques  $10^{-4}$  et  $1,6 \cdot 10^{-3}$  de sorafénib dans le chapitre 3.

Dans un premier temps, nous avons souhaité simplifier le procédé en solubilisant à la fois le sorafénib et le précurseur d'or dans une même solution de THF (sans BHT). Cette solution a été utilisée afin d'effectuer la synthèse des nanoparticules, ainsi que la formation de l'émulsion en une seule et même étape. Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir de capsules. Les images MET (Figure 144.a) ont révélé une structure agglomérée qui s'est avérée être notre ligand  $\text{PPh}_3$  d'après les analyses EDX (Figure 144.b, spectre 1). En ce qui concerne le spectre EDX ②, il correspondait bien aux AuNP emprisonnées dans ces agrégats, sans assemblage apparent. Il est probable que le sorafénib soit entré en compétition avec le ligand  $\text{PPh}_3$  lors de la synthèse des nanoparticules d'or, forçant le ligand à nanoprécipiter sous cette forme agrégée. Nous avons donc gardé la même procédure que pour l'élaboration des H® BHT/AuNP@PVPA, à savoir la synthèse des nanoparticules d'or dans un premier temps, suivi par la formation de l'émulsion dans un deuxième temps.

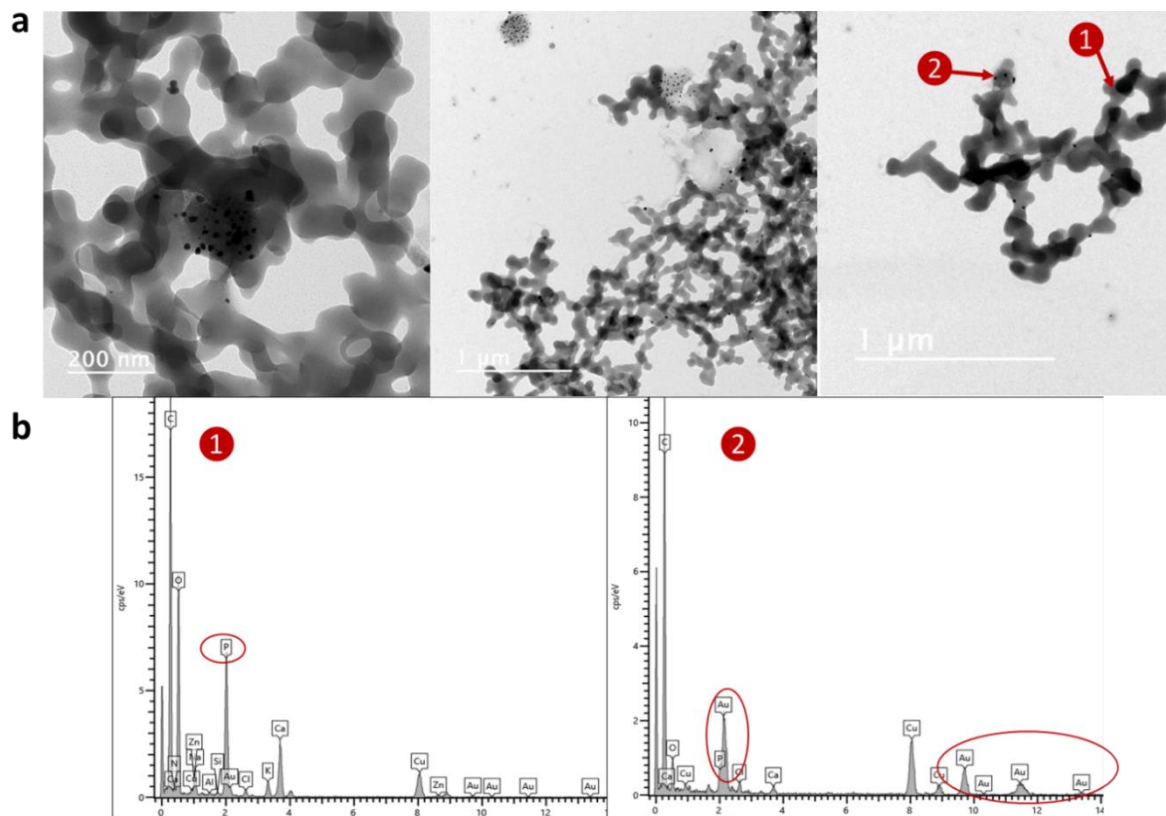


Figure 144 : Solubilisation du sorafénib et du précurseur d'or dans une seule et même solution de THF, pour former en une seule étape les NP et réaliser l'encapsulation du médicament. (a) Images MET des agglomérats de ligand  $\text{PPh}_3$  avec quelques incrustations de AuNP non assemblées. (b) Analyses EDX confirmant la présence de phosphore (provenant du ligand) en ①, et la présence d'or (provenant des AuNP non assemblées) en ②.

Le temps d'ajout du polymère après émulsification a été modifié, puisque nous avons constaté qu'attendre une heure avant l'ajout du polymère était une durée suffisante pour former des Hybridosomes® uniformes et en grande quantité (Figure 146.b). Une distribution de taille monodisperse et étroite des H® a été mise en évidence par mesure NTA, avec un diamètre de  $123 \pm 2$  nm (Figure 145). Aussi, l'évaporation du THF a apporté une robustesse et

une consolidation dans la structure des capsules, car elles paraissent plus compactes, en comparaison aux images MET avant l'évaporation du solvant organique (Figure 146.a). Nous avons donc optimisé le processus en raccourcissant leur temps de synthèse. En revanche, un ajout du polymère 6 h après l'élaboration des NP-shell a conduit à de plus grosses capsules, affichant une densité plus élevée (Figure 147).

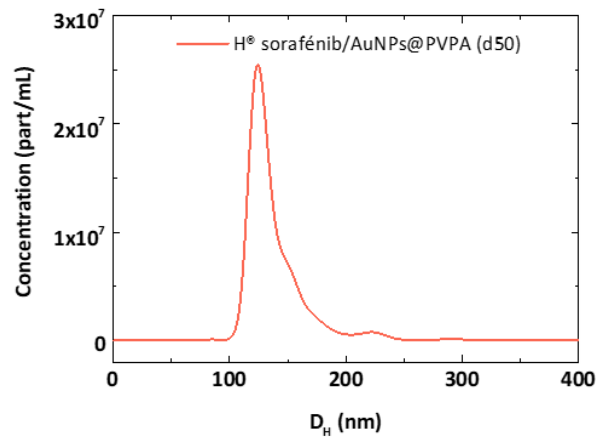


Figure 145 : Distribution de taille des H<sup>®</sup> sorafénib/AuNP@PVPA mesurée par NTA.

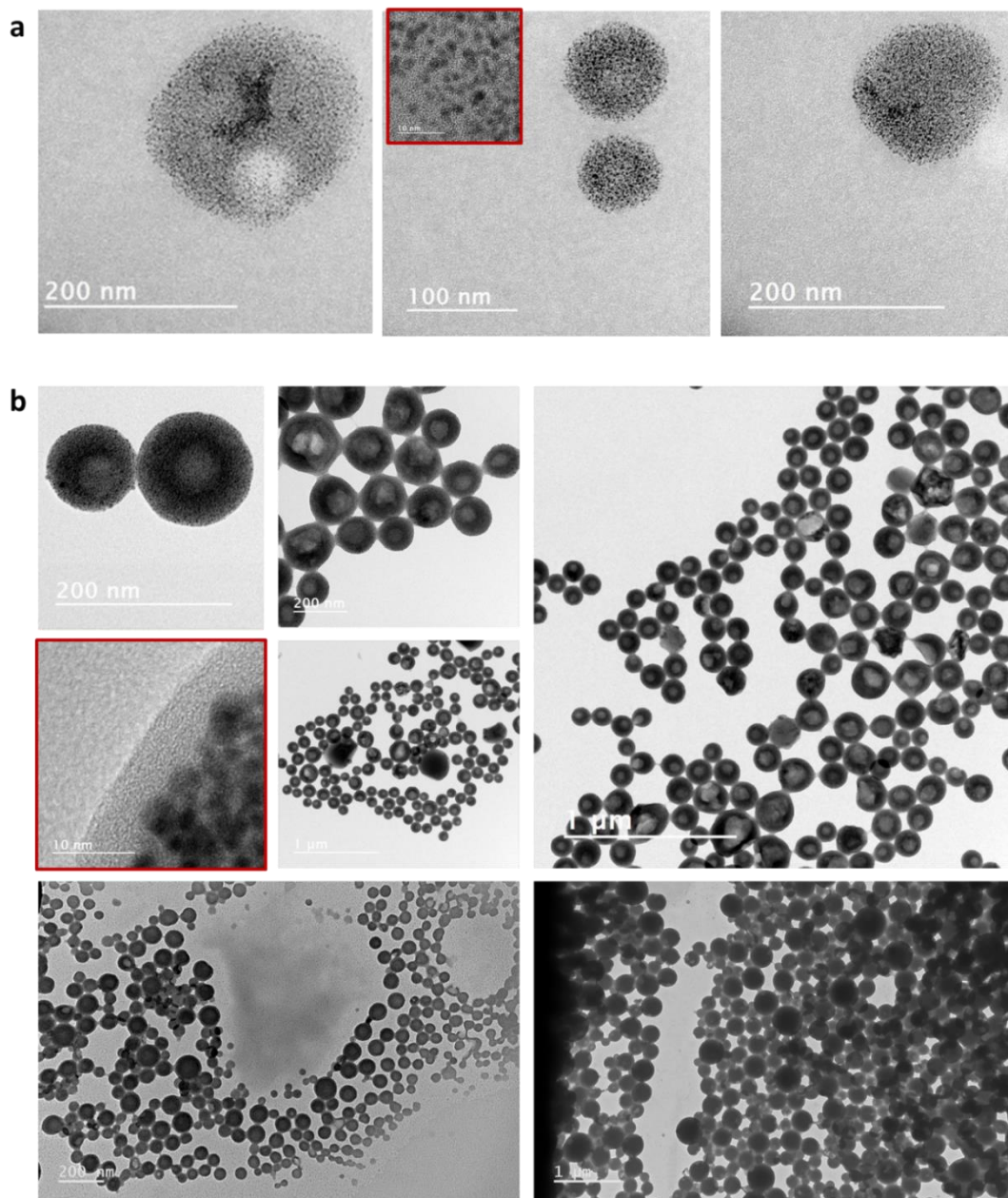


Figure 146 : Images MET des H<sup>®</sup> sorafénib/AuNP@PVPA avec l'ajout du polymère 1 h après l'élaboration des NP-Shell. (a) Avant et (b) après l'étape d'évaporation du solvant organique. Les images entourées en rouge sont en haute résolution, montrant les nanoparticules des capsules assemblées de façon ± compacte.

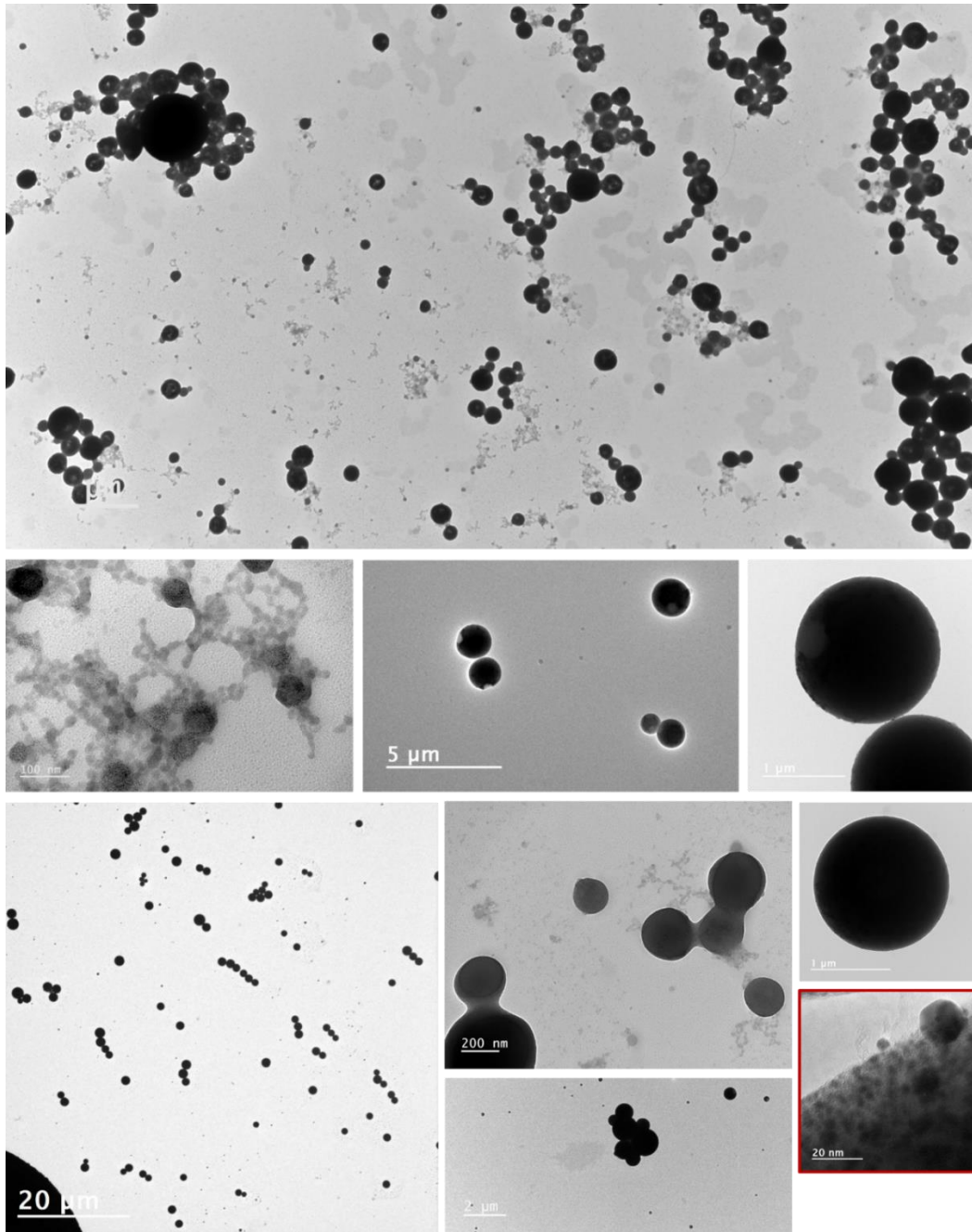


Figure 147 : Images MET des H<sup>®</sup> sorafénib/AuNP@PVPA avec l'ajout du polymère 6 heures après l'élaboration des NP-Shell (après évaporation du solvant). L'image entourée en rouge est en haute résolution, montrant les nanoparticules assemblées de façon compacte et la densité de la capsule.

Le taux d'encapsulation du sorafénib a été déterminé par dosage HPLC. Pour cela, le surnageant a été dosé après chaque étape de purification. Le taux d'encapsulation correspondant a été trouvé supérieur à 88 %. Ce résultat s'est avéré encourageant pour les tests *in vitro*, car nous avons réussi à concevoir des H<sup>®</sup> entièrement recouverts d'or et pouvant encapsuler une grande quantité de sorafénib. Nous avons aussi souhaité quantifier le sorafénib relargué et transféré vers le sérum du milieu de culture (sans cellules HuH-7-Luc) pendant la période d'incubation, comme nous l'avons fait dans le cas des H<sup>®</sup> sorafénib/SPION@PEG-PAA dans la partie I.2 de ce chapitre. Il s'est avéré qu'environ 15% était libéré de façon non contrôlée dans le milieu de culture contenant le sérum sans HuH-7-Luc



(Figure 148). En revanche, moins de 10 % de la charge est libérée dans de l'eau. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec les H<sup>®</sup> faits à base de SPION.

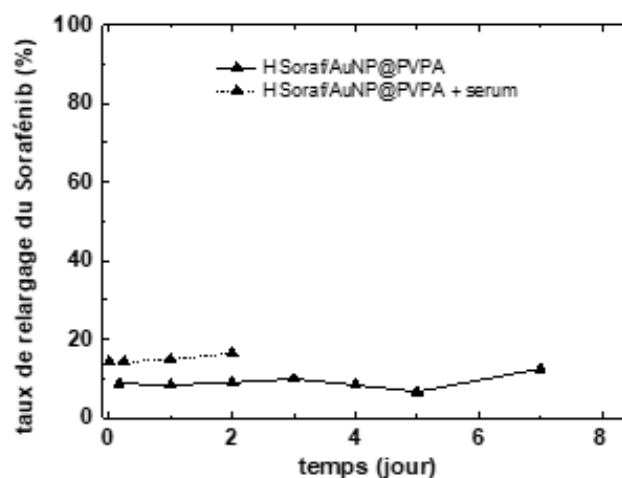


Figure 148 : Libération du sorafénib initialement encapsulé dans les H<sup>®</sup> AuNP@PVPA en fonction du temps et du milieu de suspension des capsules : (—) pour les H<sup>®</sup> en solution aqueuse et (· · ·) pour les H<sup>®</sup> mis en solution dans le milieu de culture cellulaire contenant le sérum de veau fœtal (FBS).

## II.2 Évaluation des effets chimioradiothérapeutiques des H<sup>®</sup>

Les tests cellulaires ont été élaborés et réalisés par Rémy Le Guével et Hélène Solhi (ImPACcell), et l'irradiation a été effectuée par Ulrich Jarry (Biotrial, plateforme Arche).

### II.2.a Évaluation de l'activité chimiothérapeutique des H<sup>®</sup> AuNP@PVPA avec/sans sorafénib.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier l'efficacité inhibitrice du sorafénib encapsulé dans les H<sup>®</sup> AuNP@PVPA sur l'activité des cellules en culture, sans irradiation.

Le sorafénib encapsulé dans les H<sup>®</sup> d'or s'est avéré approximativement 2 fois plus efficace ( $IC_{50} = 9 \mu M$  et 92 % de cellules inhibées, Figure 149.a) qu'encapsulé dans les capsules d'oxyde de fer ( $IC_{50} = 19 \mu M$  et 88 % de cellules inhibées). Par ailleurs, une chute du pourcentage de cellules viables (avec un facteur de pente de -3, voir V.3.b.ii du chapitre 5 Matériels et Méthodes) est observée dans le cas des H<sup>®</sup> sorafénib/AuNP@PVPA (Figure 149.b), montrant une activité chimique efficace dans le milieu cellulaire avec quasiment 100 % d'inhibition. Néanmoins, les capsules d'or « vides » (c'est-à-dire sans sorafénib, avec le BHT encapsulé) sembleraient assez toxiques pour les cellules HuH-7-Luc alors que les capsules d'oxyde de fer « vides » le sont uniquement à très forte dose. Ceci pourrait s'expliquer par la présence des ligands  $PPh_3$  qui sont hautement réactifs et connus pour leur toxicité dans d'autres lignées cellulaires.<sup>34</sup> Il est aussi possible que cette toxicité provienne de la taille des capsules légèrement supérieures à 100 nm (Figure 145).

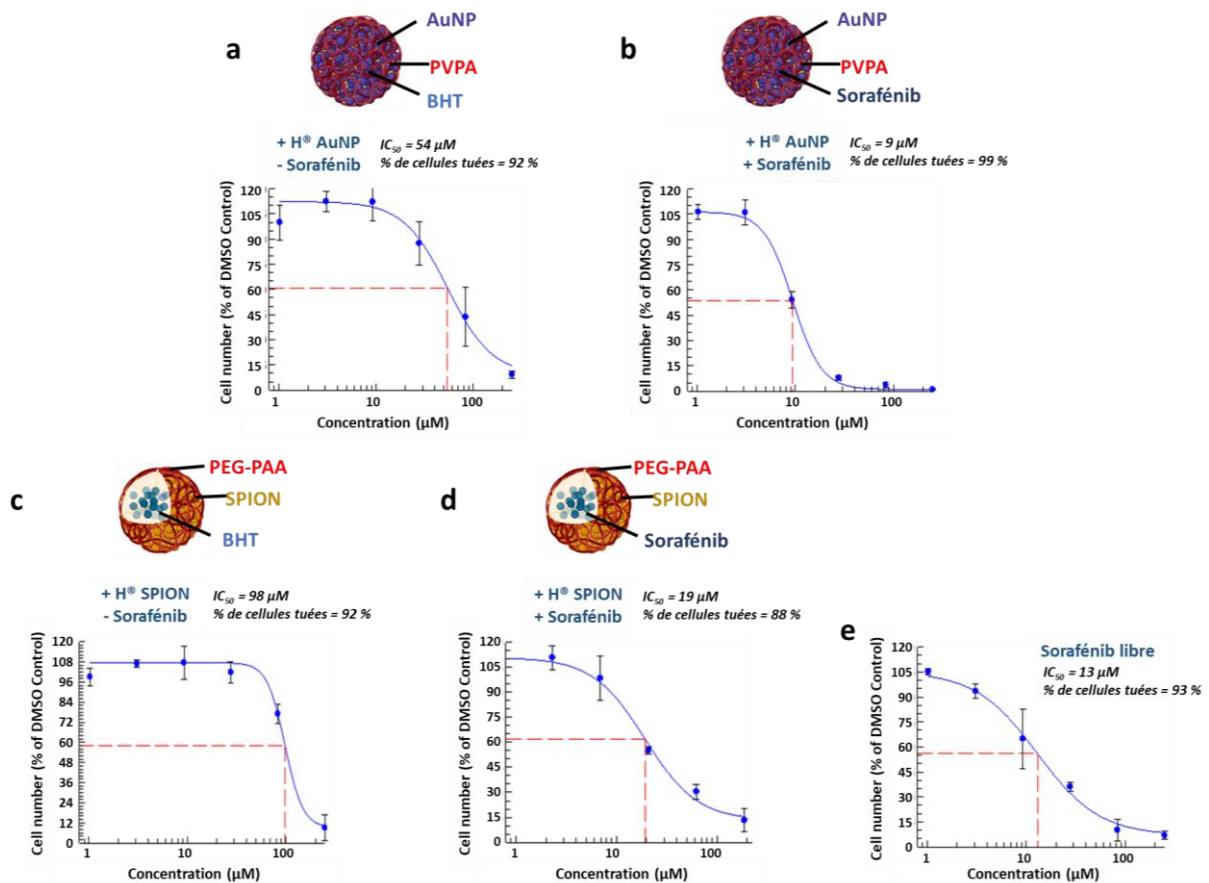


Figure 149 : Profil de viabilité des cellules HuH-7-Luc incubées 48h en présence des composés :  $H^{187}AuNP/PVPA$  (a) n'encapsulant pas le sorafénib, (b) contenant du sorafénib dans le cœur hydrophobe. (c-d-e) Rappel des profils d'inhibition des cellules HuH-7-Luc en présence des  $H^{60}SPION@PEG-PAA$  sans (c) ou avec sorafénib (d), et (e) en présence du sorafénib libre en solution (non formulé en  $H^{60}$ ).

## II.2.b Evaluation de l'activité chimioradiothérapeutique du sorafénib formulé en $H^{60}$

### II.2.b.i Détermination de la dose d'irradiation adéquate

Avant de réaliser des tests de radiothérapie avec nos capsules d'or, nous avons cherché à déterminer la dose d'irradiation adéquate pour inhiber l'activité des cellules (lignée HuH-7-Luc) en absence de nanoparticules.

Pour ce faire, les cellules ont été irradiées avec une dose allant de 2 Gy à 20 Gy (test réalisé en triplicata). Ensuite, nous avons observé les photos des cellules fixées colorées en bleu par une molécule se fixant à l'acide nucléique, le Hoechst 33342 (Figure 150). Il est alors plus facile de détecter les cellules en division, de quantifier l'ADN et le nombre de cellules, et de distinguer les cellules viables des cellules mourantes/mortes. La première photo « Doxo » correspond aux cellules mises en culture avec la doxorubicine sans irradiation, en tant que contrôle du milieu de culture. La doxorubicine, étant toxique pour le milieu de culture, semble faire grossir les noyaux des cellules (ADN coloré en bleu) par rapport à ceux des cellules témoins, (0 Gy, pas de chimiothérapie). Nous n'avons pas mis les photos de toutes les doses d'irradiation, car elles se ressemblaient beaucoup à partir de 8 Gy environ. Pour ce qui est des images des cellules colorées entre 0 Gy (témoin) et 2 Gy, celles-ci ne présentaient pas de

grandes différences. La taille des noyaux semblait petite avec encore quelques événements de division cellulaire (mitose) indiqué dans les photos par une petite flèche jaune. À partir d'un dépôt de dose de 4 Gy, l'irradiation semble avoir provoqué un blocage en phase G2 du cycle cellulaire (avant la mitose, Figure 151). En effet, les cellules semblent être plus grosses et également multinucléées, sans toutefois se séparer.

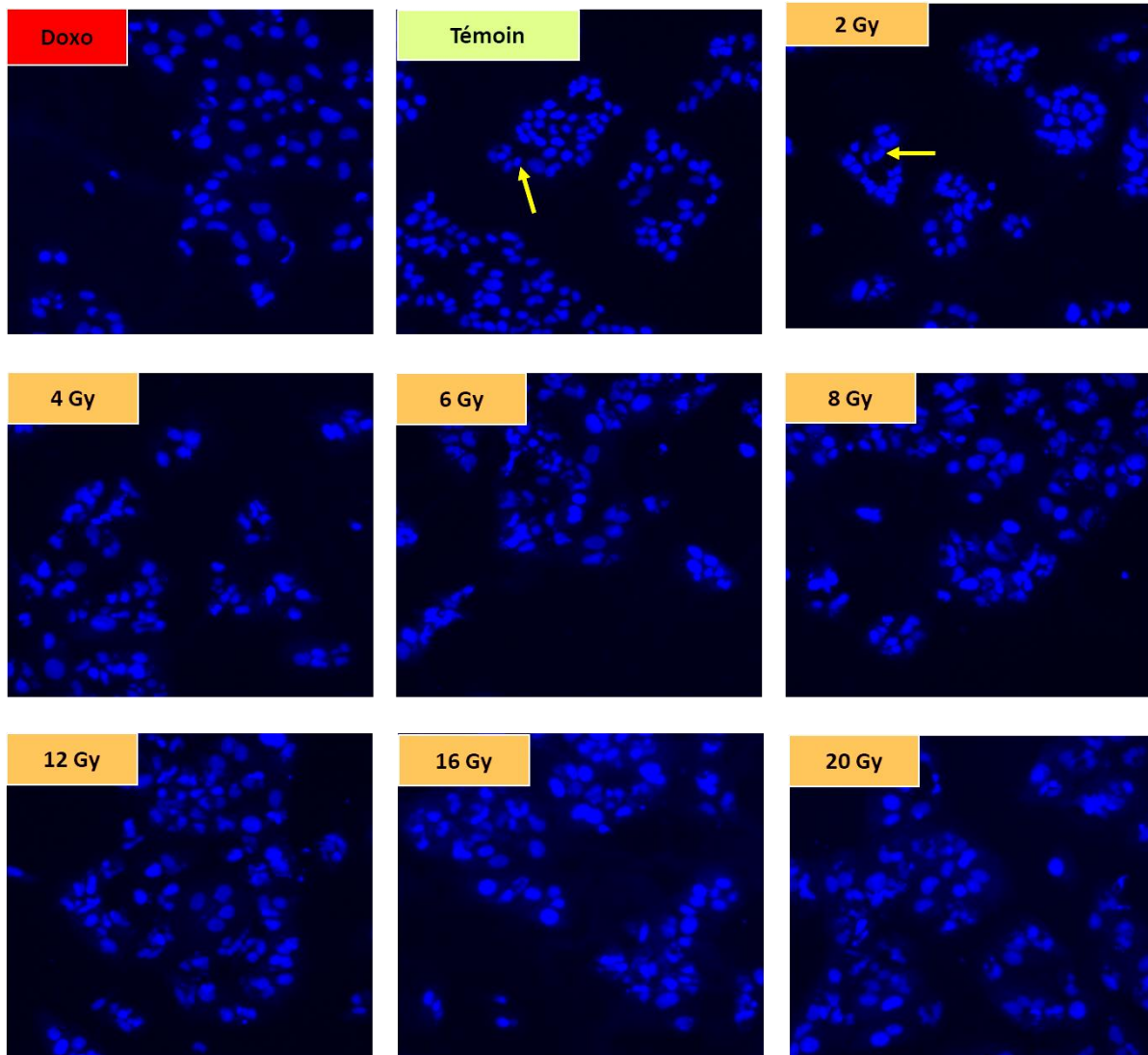


Figure 150 : Photos des cellules fixées et colorées en bleu par le colorant Hoechst 33342, marqueur fluorescent de l'ADN, pour une des expériences. Coloration de l'ADN pour différentes doses d'irradiation déposées sur les cellules HuH-7-Luc. Les flèches jaunes montrent les cellules en phase mitotique. Les images obtenues après irradiation sont identifiées par la valeur de la **dose en Gy** administrée.

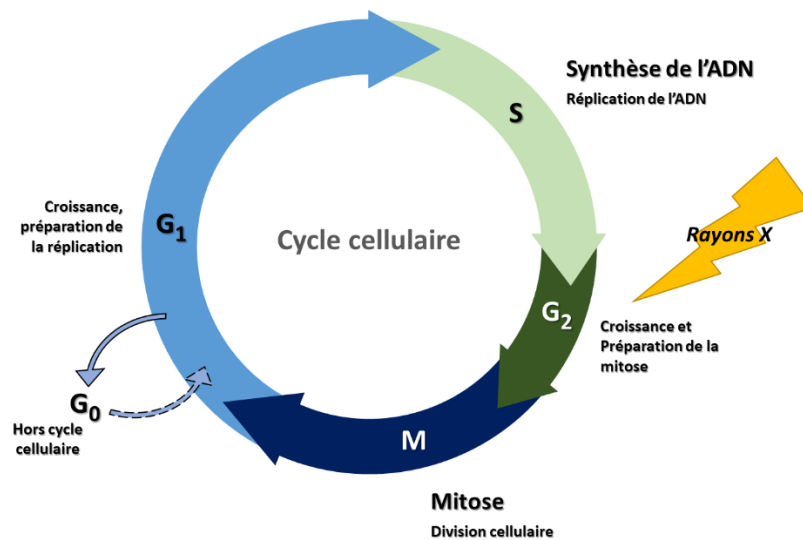


Figure 151 : Illustration schématique du cycle cellulaire représentant les différentes phases. La flèche jaune « Rayons X » indique l'endroit de blocage du cycle cellulaire, induits sur les cellules HuH-7-Luc dans nos tests *in vitro*.

Des tests de viabilité ont également été réalisés, afin de déterminer l'IC<sub>50</sub> des rayonnements appliqués (effet dose). Les résultats donnent IC<sub>50</sub> = 2,3 ± 0.4 Gy et environ 50 % d'inhibition des cellules (Figure 152). Ces valeurs sont en accord avec les observations de microscopie confocale. Pour résumer, avec une dose un peu plus élevée que 2 Gy, il est possible d'observer des effets sur l'activité cellulaire de la lignée HuH-7-Luc. Environ 50 % de cellules irradiées semblaient être bloquées dans leur cycle cellulaire, mais restant en vie (Figure 152). En fait, ces cellules sont probablement en apoptose, c'est-à-dire qu'elles sont vouées à mourir à plus long terme.

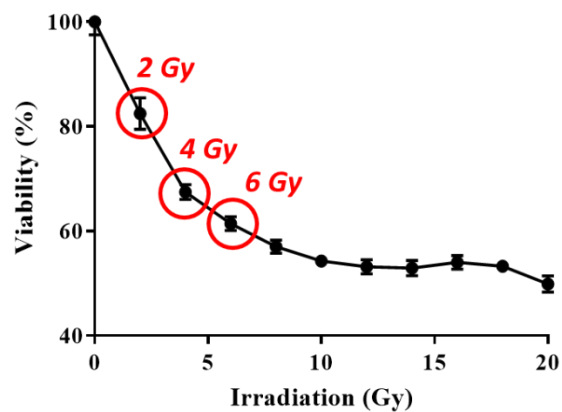


Figure 152 : Profil de viabilité des cellules HuH-7-Luc en fonction des différentes doses d'irradiation : moyenne des triplicatas en représentation linéaire.

La Figure 153 permet de quantifier les observations précédentes puisqu'elle représente la surface de noyaux colorés en bleu (implicitement la quantité relative d'ADN) à différentes doses d'irradiation appliquées. La surface totale des noyaux a commencé à augmenter à partir de 1 Gy et montre un point d'inflexion à 3,3 ± 0.4 Gy.

### Huh7 LUC Nucleus Area

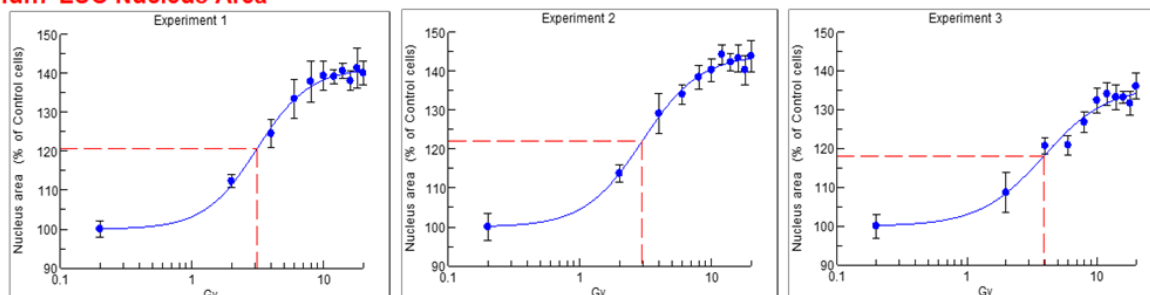


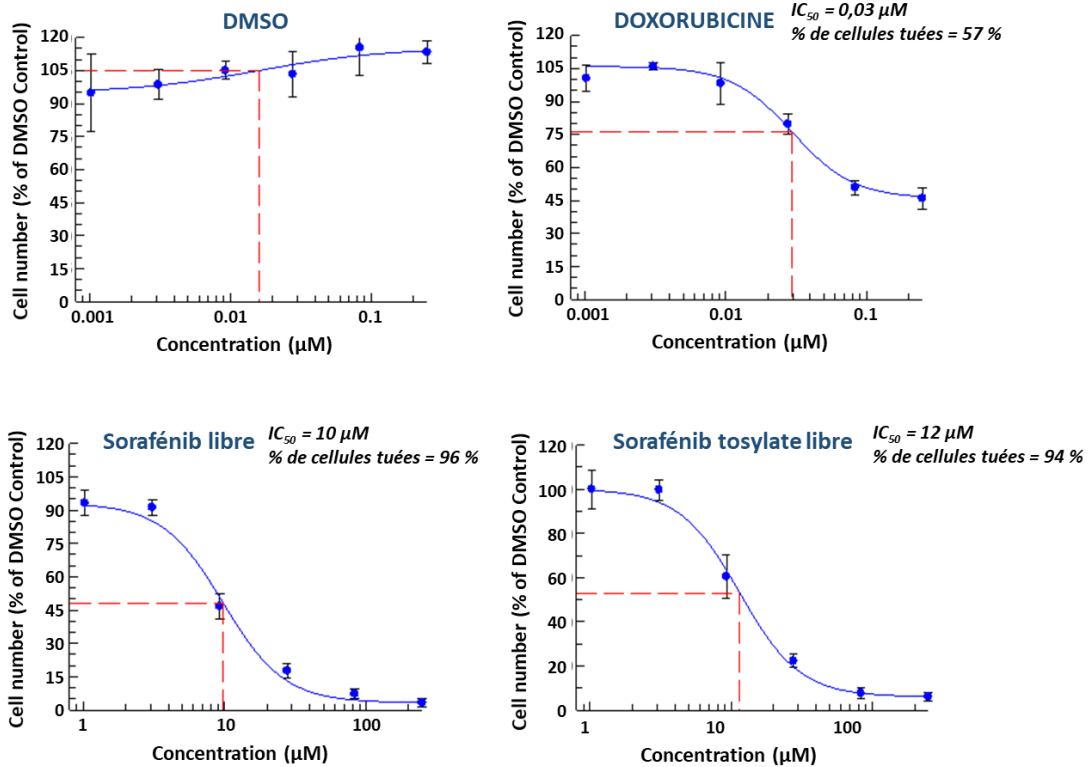
Figure 153 : Surface des noyaux des cellules HuH-7-Luc en fonction de la dose d'irradiation (en triplicata).

Pour la suite des expérimentations, nous souhaiterions tester différentes doses d'irradiation (0 Gy comme contrôle, 2 Gy, 4 Gy et 6 Gy) sur nos H<sup>®</sup> AuNP@PVPA afin d'observer une potentielle amélioration des résultats d'inhibition, avec probablement un plus haut pourcentage de cellules tuées.

#### II.2.b.ii Tests cellulaires de thérapie combinée

Dans cette partie du projet, nous avons en premier lieu irradié les molécules thérapeutiques avant de les placer en culture cellulaire afin de vérifier que leur activité n'est pas altérée par l'irradiation. Après irradiation par une dose de 2 Gy, la doxorubicine a perdu son activité inhibitrice avec environ deux fois moins de cellules tuées par rapport à l'essai sans irradiation, tandis que l'irradiation n'a pas eu d'effet sur le sorafénib, ni le sorafénib tosylate (Figure 154).

**a Irradiation à 0 Gy**



**b Irradiation à 2 Gy**

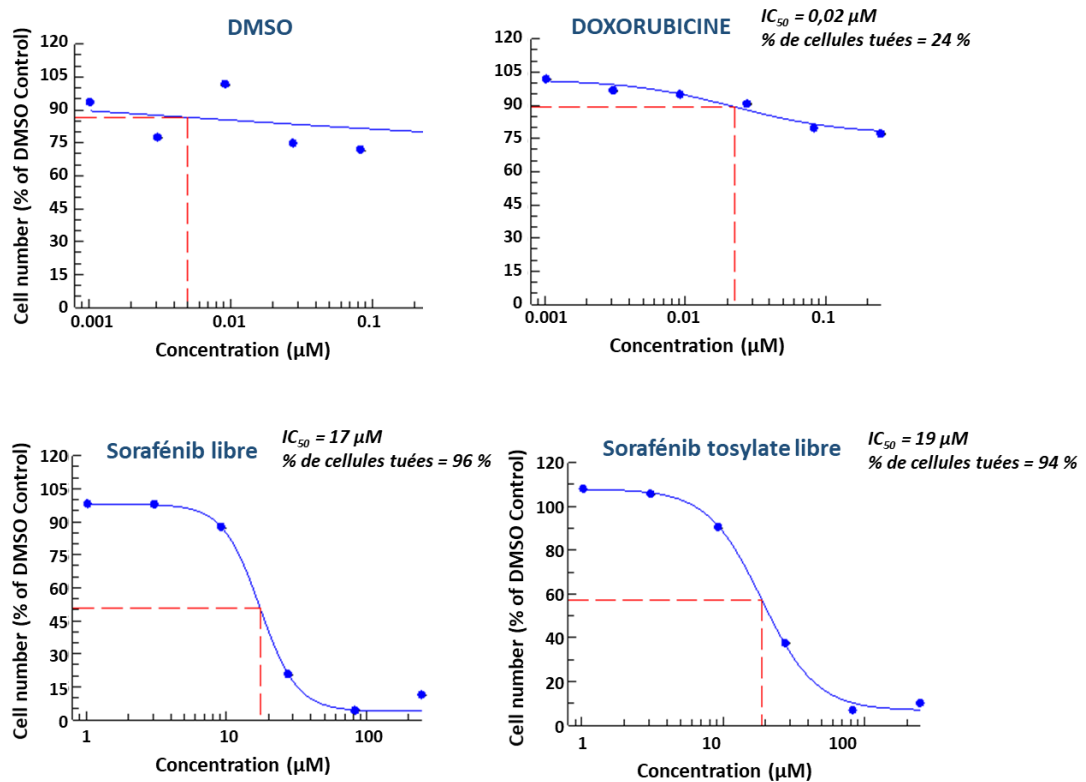


Figure 154 : Profil de viabilité des cellules de la lignée HuH-7-Luc incubées 48h en présence des composés chimiques (DMSO, doxorubicine, sorafénib avec/sans tosylate) (a) molécules non irradiées avant incubation (b) irradiées avec une dose de 2 Gy avant incubation.

Nous avons réalisé un premier test de thérapie combinée en comparant l'efficacité radiochimiothérapeutique de nos capsules d'or à 0 Gy et à 2 Gy d'irradiation. Nous savons qu'en termes d'irradiation, l'IC<sub>50</sub> est supérieure à 2 Gy (Figure 152). Cette dose standard nous permettra d'identifier plus clairement un potentiel effet synergique de la chimio- (sorafénib) et de la radiothérapie (AuNP). Les résultats sont regroupés dans la Figure 155 pour le profil d'inhibition sigmoïdal du test de viabilité. Sans irradiation, les H<sup>®</sup> d'or contenant du sorafénib ont encore démontré leur efficacité chimiothérapeutique sur les cellules (Figure 155.b1) avec un IC<sub>50</sub> de 12 μM, proche de celui du sorafénib témoin (non irradié et non formulé en H<sup>®</sup>). L'IC<sub>50</sub> des capsules d'or sans sorafénib a été évalué à 35 μM (en équivalent de sorafénib). Les capsules d'or formées avec du BHT montrent donc de nouveau une certaine toxicité pour nos cellules (Figure 155.a1). L'irradiation à 2 Gy de ces capsules avec ou sans sorafénib (les Figure 155.a2 et b2) donne les mêmes IC<sub>50</sub> et les mêmes courbes sigmoïdales qu'à 0 Gy. Une dose de 2 Gy n'est pas suffisante pour engendrer une efficacité d'inhibition de l'activité biologique, même en présence des H<sup>®</sup> sorafénib/AuNP@PVPA.

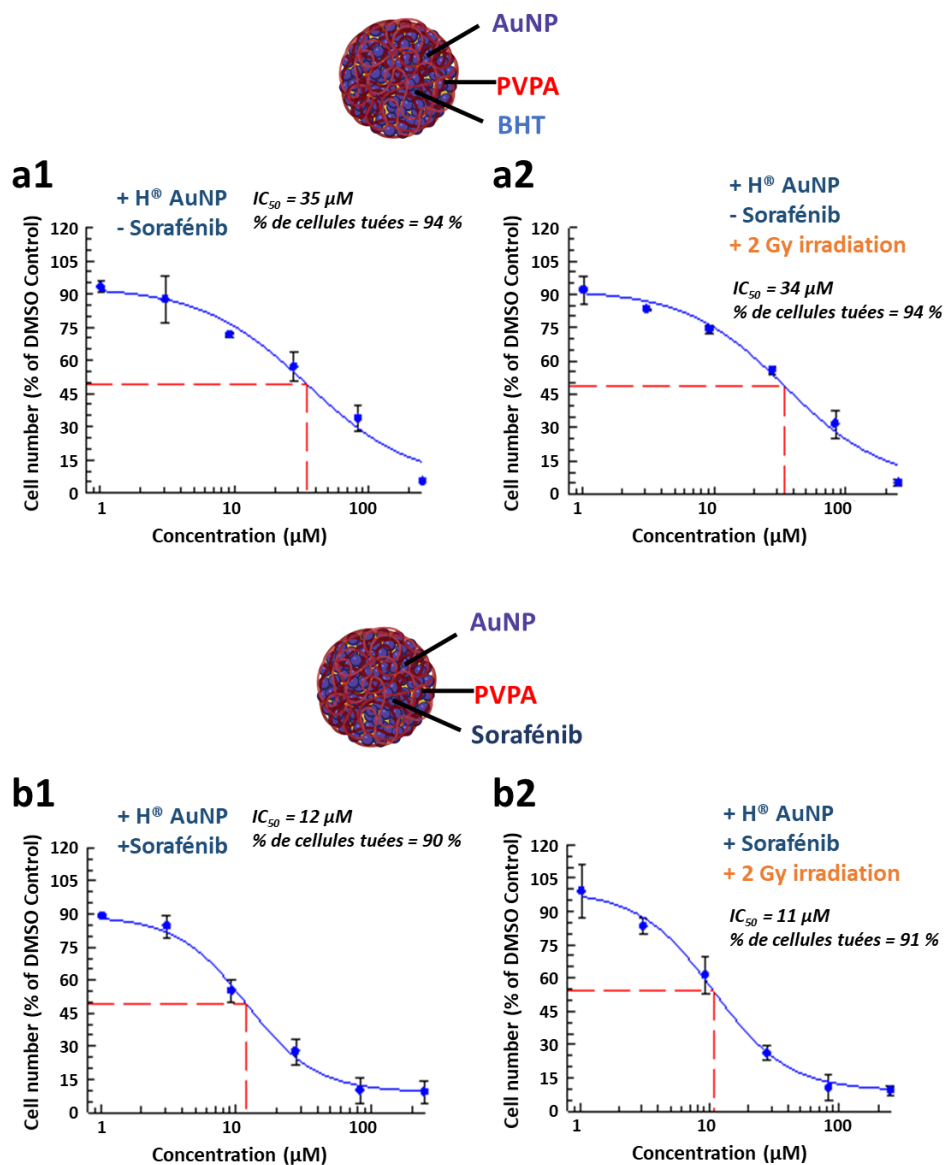


Figure 155 : Profil de viabilité des cellules HuH-7-Luc incubées 48h (a) en présence des H<sup>®</sup> BHT/AuNP@PVPA (sans sorafénib encapsulé) non irradiés (a1) et irradiés à 2 Gy (a2) ; et (b) en présence des H<sup>®</sup> sorafénib/AuNP@PVPA (avec sorafénib encapsulé) non irradiés (b1) et irradiés à 2 Gy (b2).

### III Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons pu évaluer et démontrer l'efficacité chimiothérapeutique du sorafénib encapsulé dans des Hybridosomes® composés de nanoparticules d'oxyde de fer (SPION) sur la lignée cellulaire HuH-7-Luc (carcinome hépatocellulaire).

Par la suite, nous avons réussi à élaborer des capsules uniformes (~ 120 nm de diamètre) entièrement recouvertes de nanoparticules d'or (AuNP, 2-3 nm de diamètre) chargée ou non en leur cœur en sorafénib. Le sorafénib, encapsulé à 88% au moins dans les Hybridosomes® d'or, a montré un effet chimiothérapeutique efficace sur les cellules HuH-7-Luc. Cependant, il sera nécessaire de tester la cytotoxicité de chaque composé (ligand, polymère PVPA, BHT) de nos capsules, afin de déterminer de quel composant provient la toxicité des H® ne contenant pas de sorafénib. Dans cette optique, nous avons songé à améliorer l'étape de purification en réalisant une dialyse de la suspension d'H®, une méthode beaucoup plus douce que la centrifugation.

Concernant la partie radiothérapie, nous avons pu déterminer les doses d'irradiation intéressantes (au-delà de 2 Gy) pour observer une efficacité inhibitrice sur l'activité biologique. Cependant, nous avons constaté que la dose d'irradiation testée en présence de nos capsules d'or (2 Gy) n'est pas suffisante pour engendrer un effet considérable sur la viabilité et la croissance cellulaire. Seul le sorafénib encapsulé a encore démontré sa performance thérapeutique sur les cellules cancéreuses.

L'ensemble de ces résultats s'avère réellement encourageant pour évaluer la combinaison de la chimio- et de la radiothérapie. Toutefois, il reste plusieurs expérimentations complémentaires pour conforter les résultats obtenus et mettre en évidence un potentiel effet synergique des nanoparticules d'or et du sorafénib encapsulé.

L'effet potentialisant des AuNP du fait de leur auto-assemblage mérite d'être évalué plus en profondeur à l'aide d'outils de modélisation (dépôt de dose en modélisant nos capsules synthétisées), par des expériences *in vitro* en essayant avec des doses plus élevées que 2 Gy, ainsi que des expériences *in vivo* pour comparer nos résultats avec ce qui a déjà été observé par Clément Goubault.<sup>9</sup> Pour la suite du projet (plan CANCER – INSERM), nous envisageons également de tester différentes concentrations et tailles (3 nm et 10 nm) de nanoparticules d'or pour voir l'effet de la quantité et de la taille sur l'effet potentialisant du rayonnement.

D'autres composés chimiothérapeutiques à encapsuler peuvent être envisagés pour la suite du projet afin d'agrandir le spectre des types de cancer. Nous nous concentrerons sur le traitement du glioblastome et du cancer du poumon. Par exemple, l'osimertinib pourrait être un très bon candidat encapsulé seul ou co-encapsulé avec le sorafénib. Nous pourrions probablement envisager aussi de tester l'élaboration de capsules hybrides à partir de nanoparticules radiosensibilisantes de bismuth, qui sont moins chères que celles d'or (et qui ont un Z similaire à l'or).

L'objectif de ce projet serait aussi de réussir à travailler dans un solvant plus répandu pour les applications biologiques, comme le DMSO, au lieu du THF utilisé pour formuler les émulsions Ouzo. Pour ce faire, il faudrait obtenir des nanoparticules qui soient dispersables dans le DMSO, ce que nous n'avons pas réussi à faire jusqu'à maintenant. Il serait possible qu'un échange de ligand à la surface des nanoparticules d'or puisse mener à une solubilité accrue dans le solvant d'intérêt.



Enfin, une dernière piste intéressante serait l'incorporation des Hybridosomes® dans un gel post-résection. En effet, certains traitements de cancers avancés nécessitent une résection de la tumeur. Le gel formulé pourrait alors être déposé dans la cavité formée à la suite de la chirurgie, et permettre l'amélioration du traitement chimioradiothérapeutique.<sup>35</sup>

## IV Références bibliographiques

- (1) Retif, P.; Pinel, S.; Toussaint, M.; Frochot, C.; Chouikrat, R.; Bastogne, T.; Barberi-Heyob, M. Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: The Key Parameters. *Theranostics* **2015**, *5* (9), 1030–1044. <https://doi.org/10.7150/thno.11642>.
- (2) Coulter, J. A.; Hyland, W. B.; Nicol, J.; Currell, F. J. Radiosensitising Nanoparticles as Novel Cancer Therapeutics — Pipe Dream or Realistic Prospect? *Clin. Oncol.* **2013**, *25* (10), 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.011>.
- (3) Cooper, D. R.; Bekah, D.; Nadeau, J. L. Gold Nanoparticles and Their Alternatives for Radiation Therapy Enhancement. *Front. Chem.* **2014**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00086>.
- (4) Butterworth, K. T.; McMahon, S. J.; Currell, F. J.; Prise, K. M. Physical Basis and Biological Mechanisms of Gold Nanoparticle Radiosensitization. *Nanoscale* **2012**, *4* (16), 4830. <https://doi.org/10.1039/c2nr31227a>.
- (5) Pinel, S.; Thomas, N.; Boura, C.; Barberi-Heyob, M. Approaches to Physical Stimulation of Metallic Nanoparticles for Glioblastoma Treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *138*, 344–357. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.013>.
- (6) Hainfeld, J. F.; Dilmanian, F. A.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M. Radiotherapy Enhancement with Gold Nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *60* (8), 977–985. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.8.0005>.
- (7) Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M. The Use of Gold Nanoparticles to Enhance Radiotherapy in Mice. *Phys. Med. Biol.* **2004**, *49* (18), N309–N315. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/18/N03>.
- (8) Bromma, K.; Chithrani, D. B. Advances in Gold Nanoparticle-Based Combined Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2020**, *10* (9), 1671. <https://doi.org/10.3390/nano10091671>.
- (9) Goubault, C.; Jarry, U.; Bostoën, M.; Éliat, P.-A.; Kahn, M. L.; Pedoux, R.; Guillaudeux, T.; Gauffre, F.; Chevance, S. Radiosensitizing Fe-Au Nanocapsules (Hybridosomes®) Increase Survival of GL261 Brain Tumor-Bearing Mice Treated by Radiotherapy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2022**, *40*, 102499. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102499>.
- (10) Rim, C. H.; Park, S.; Shin, I.-S.; Yoon, W. S. Is the Concurrent Use of Sorafenib and External Radiotherapy Feasible for Advanced Hepatocellular Carcinoma? A Meta-Analysis. *Cancers* **2021**, *13* (12), 2912. <https://doi.org/10.3390/cancers13122912>.
- (11) Beik, J.; Khateri, M.; Khosravi, Z.; Kamrava, S. K.; Kooranifar, S.; Ghaznavi, H.; Shakeri-Zadeh, A. Gold Nanoparticles in Combinatorial Cancer Therapy Strategies. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *387*, 299–324. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.025>.
- (12) Li, X.; Yu, L.; Zhang, C.; Niu, X.; Sun, M.; Yan, Z.; Wang, W.; Yuan, Z. Tumor Acid Microenvironment-Activated Self-Targeting & Splitting Gold Nanoassembly for Tumor Chemo-Radiotherapy. *Bioact. Mater.* **2022**, *7*, 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.050>.
- (13) Fathy, M. M.; Mohamed, F. S.; Elbially, N.; Elshemey, W. M. Multifunctional Chitosan-Capped Gold Nanoparticles for Enhanced Cancer Chemo-Radiotherapy: An In Vitro Study. *Phys. Med.* **2018**, *48*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2018.04.002>.
- (14) Yang, C.; Bromma, K.; Di Ciano-Oliveira, C.; Zafarana, G.; van Prooijen, M.; Chithrani, D. B. Gold Nanoparticle Mediated Combined Cancer Therapy. *Cancer Nanotechnol.* **2018**, *9* (1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12645-018-0039-3>.
- (15) VIDAL®, Monographie NEXAVAR® - BAYER Healthcare SAS, Mis à Jour 16/11/2022. <https://www.vidal.fr/Medicaments/Nexavar-200-Mg-Cp-Pellic-73977.html> (Consulté Le 14/12/2022).
- (16) Cassim, S.; Raymond, V.-A.; Lacoste, B.; Lapierre, P.; Bilodeau, M. Metabolite Profiling Identifies a Signature of Tumorigenicity in Hepatocellular Carcinoma. *Oncotarget* **2018**, *9* (42), 26868–26883. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25525>.

- (17) Rizvi, S. A. A.; Saleh, A. M. Applications of Nanoparticle Systems in Drug Delivery Technology. *Saudi Pharm. J.* **2018**, *26* (1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>.
- (18) Barreto, J. A.; O'Malley, W.; Kubeil, M.; Graham, B.; Stephan, H.; Spiccia, L. Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (12), H18–H40. <https://doi.org/10.1002/adma.201100140>.
- (19) Girard, N.; Mornex, F. Radiothérapie externe des carcinomes hépatocellulaires. *Cancer/Radiothérapie* **2011**, *15* (1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2010.11.011>.
- (20) Llovet, J. M.; Hilgard, P.; de Oliveira, A. C.; Forner, A.; Zeuzem, S.; Galle, P. R.; Häussinger, D.; Moscovici, M. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* **2008**, *13*.
- (21) Chu, S.-S.; Kuo, Y.-H.; Liu, W.-S.; Wang, S.-C.; Ho, C.-H.; Chen, Y.-C.; Yang, C.-C.; Wu, H.-C. Effect of Radiotherapy on Survival in Advanced Hepatocellular Carcinoma Patients Treated with Sorafenib: A Nationwide Cancer-Registry-Based Study. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 1614. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81176-w>.
- (22) Wada, Y.; Takami, Y.; Matsushima, H.; Tateishi, M.; Ryu, T.; Yoshitomi, M.; Matsumura, T.; Saitsu, H. The Safety and Efficacy of Combination Therapy of Sorafenib and Radiotherapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Retrospective Study. *Intern. Med.* **2018**, *57* (10), 1345–1353. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.9826-17>.
- (23) Yu, W.; Gu, K.; Yu, Z.; Yuan, D.; He, M.; Ma, N.; Lai, S.; Zhao, J.; Ren, Z.; Zhang, X.; Shao, C.; Jiang, G.-L. Sorafenib Potentiates Irradiation Effect in Hepatocellular Carcinoma in Vitro and in Vivo. *Cancer Lett.* **2013**, *329* (1), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.024>.
- (24) Aykul, S.; Martinez-Hackert, E. Determination of Half-Maximal Inhibitory Concentration Using Biosensor-Based Protein Interaction Analysis. *Anal. Biochem.* **2016**, *508*, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>.
- (25) Liu, J.; Liu, Y.; Meng, L.; Ji, B.; Yang, D. Synergistic Antitumor Effect of Sorafenib in Combination with ATM Inhibitor in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Int. J. Med. Sci.* **2017**, *14* (6), 523–529. <https://doi.org/10.7150/ijms.19033>.
- (26) Wu, M.; Tang, Y.; Liu, J.; Liang, R.; Luo, X. Global Transcriptomic Study of CircRNAs Expression Profile in Sorafenib Resistant Hepatocellular Carcinoma Cells. *J. Cancer* **2020**, *11* (10), 2993–3001. <https://doi.org/10.7150/jca.39854>.
- (27) Şirin, N.; Elmas, L.; Seçme, M.; Dodurga, Y. Investigation of Possible Effects of Apigenin, Sorafenib and Combined Applications on Apoptosis and Cell Cycle in Hepatocellular Cancer Cells. *Gene* **2020**, *737*, 144428. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144428>.
- (28) Nagel, C.; Armeanu-Ebinger, S.; Dewerth, A.; Warmann, S. W.; Fuchs, J. Anti-Tumor Activity of Sorafenib in a Model of a Pediatric Hepatocellular Carcinoma. *Exp. Cell Res.* **2015**, *331* (1), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.10.018>.
- (29) Morisaki, T.; Umebayashi, M.; Kiyota, A.; Koya, N.; Tanaka, H.; Onishi, H.; Katano, M. Combining Celecoxib with Sorafenib Synergistically Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro. *ANTICANCER Res.* **2013**, *9*.
- (30) Goubault, C.; Sciortino, F.; Mongin, O.; Jarry, U.; Bostoën, M.; Jakobczyk, H.; Burel, A.; Dutertre, S.; Troadec, M.-B.; Kahn, M. L.; Chevance, S.; Gauffre, F. The Ouzo Effect: A Tool to Elaborate High-Payload Nanocapsules. *J. Controlled Release* **2020**, *324*, 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.023>.
- (31) Roeske, J. C.; Nuñez, L.; Hoggarth, M.; Labay, E.; Weichselbaum, R. R. Characterization of the Theoretical Radiation Dose Enhancement from Nanoparticles. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2007**, *6* (5), 395–401. <https://doi.org/10.1177/153303460700600504>.
- (32) Gazil, O.; Virgilio, N.; Gauffre, F. Synthesis of Ultrasmall Metal Nanoparticles and Continuous Shells at the Liquid/Liquid Interface in Ouzo Emulsions. *Nanoscale* **2022**, *14* (37), 13514–13519. <https://doi.org/10.1039/D2NR04019K>.

- (33) Bingöl, B.; Meyer, W. H.; Wagner, M.; Wegner, G. Synthesis, Microstructure, and Acidity of Poly(Vinylphosphonic Acid). *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27* (20), 1719–1724. <https://doi.org/10.1002/marc.200600513>.
- (34) Pernar, M.; Kokan, Z.; Kralj, J.; Glasovac, Z.; Tumir, L.-M.; Piantanida, I.; Eljuga, D.; Turel, I.; Brozovic, A.; Kirin, S. I. Organometallic Ruthenium(II)-Arene Complexes with Triphenylphosphine Amino Acid Bioconjugates: Synthesis, Characterization and Biological Properties. *Bioorganic Chem.* **2019**, *87*, 432–446. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.048>.
- (35) Solano, A. G.; Dupuy, J.; Therriault, H.; Liberelle, B.; Faucheux, N.; Lauzon, M.-A.; Virgilio, N.; Paquette, B. An Alginate-Based Macroporous Hydrogel Matrix to Trap Cancer Cells. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *266*, 118115. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118115>.





**CHAPITRE 5**  
**Partie expérimentale**



# SOMMAIRE

---

<b>CHAPITRE 5 Partie expérimentale</b>	<b>193</b>
<b>I Produits utilisés</b>	<b>197</b>
I.1 Solvants organiques et aqueux	197
I.2 Solutés hydrophobes	197
<b>II Méthodes de caractérisation des échantillons</b>	<b>197</b>
II.1 NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)	197
II.2 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	198
II.3 SMLS (Static Multiple Light Scattering)	199
II.4 MET (Transmission Electron Microscopy)	200
II.5 Mobilité électrophorétique	200
<b>III Chapitre 2 – Mise en évidence de la formation et de la stabilité des mésostructures dans les mélanges ternaires Ouzo.</b>	<b>201</b>
III.1 Préparation des échantillons et élaboration d'un diagramme de phase	201
III.2 Détermination de la binodale	202
III.2.a Par observation visuelle	202
III.2.b Par COSMO-RS (COnductor-like Screening MOdel for Real Solvents)	202
III.3 Suivi cinétique de l'évolution de la taille des gouttelettes	203
III.3.a Par NTA	203
III.3.b Par DLS	203
III.4 Etude de la composition des gouttes	204
III.4.a Par RMN <sup>1</sup> H, NOESY <sup>1</sup> H 2D et DOSY 2D	204
III.4.b Par suivi de la fluorescence du BODIPY	204
<b>IV Chapitre 3 – Encapsulation des principes actifs par nanopréciipitation dans les Hybridosomes®</b>	<b>206</b>
IV.1 Les nanoparticules d'oxyde de Fer ou SPION	206
IV.2 Préparation et purification des H® - Procédé d'encapsulation des principes actifs	206
IV.3 Analyse de la taille des H® par NTA	207
IV.4 Détermination du taux d'encapsulation du sorafénib dans les H® SPION@PEG-PAA	207
IV.5 Etude du relargage du sorafénib hors des H® SPION@PEG-PAA au cours du temps	208
<b>V Chapitre 4 – Vers la thérapie combinée – chimioradiothérapie</b>	<b>209</b>
V.1 Synthèse des nanoparticules d'or (AuNP)	209
V.2 Préparation et purification des H®	210
V.2.a H® SPION@PEG-PAA (encapsulant soit sorafénib soit BHT)	210
V.2.b H® AuNP@PVPA (encapsulant soit sorafénib soit BHT)	210
V.3 Tests cellulaires	210
V.3.a Préparation des échantillons H® dans le sérum	210



V.3.b	Protocole d'incubation dans les milieux cellulaires	211
V.3.b.i	Cultures cellulaires	211
V.3.b.ii	Essai de cytotoxicité à effet de dose (détermination de IC <sub>50</sub> )	211
<b>V.4</b>	<b>Procédé d'irradiation des échantillons et des milieux cellulaires</b>	<b>211</b>
<b>VI</b>	<b>Références bibliographiques</b>	<b>213</b>

# CHAPITRE 5 : PARTIE EXPÉRIMENTALE

---

## I Produits utilisés

### I.1 Solvants organiques et aqueux

Le tétrahydrofurane (THF), sans inhibiteur et de qualité HPLC ( $\geq 99,9\%$ ), a été prélevé sur une rampe de solvants organiques et a été acheté auprès de Sigma-Aldrich. Le THF avec inhibiteur ( $C_{\text{BHT}} = 1,28 \text{ mM}$ ) a été acheté chez VWR chemicals (GPR Rectapur). Le diméthylsulfoxyde (DMSO, de qualité analytique,  $\geq 99,9\%$ ) et le méthanol (MeOH), qualité HPLC ( $\geq 99,8\%$ ), proviennent de Fisher Chemical.

Les échantillons ont été réalisés en utilisant de l'eau MilliQ ( $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ).

### I.2 Solutés hydrophobes

L'hydroxytoluène butylé (BHT, CAS : 128-37-0) a été acheté auprès de Janssen. Le (S)-4-Isopropényl-1-méthyl cyclohexène (S-(-)-limonène, 96 %, CAS : 5989-54-8) a été acheté auprès de Sigma-Aldrich. Le ( $\pm$ )- $\alpha$ -Tocophérol (Vitamine E ou Vit E, CAS : 10191-41-0) de BASF a été gracieusement fourni par AMI-ingredient. Le 4-Difluoro-8-(4-triméthylsilyléthynylphényl)-1,3,5,7-tétraméthyl-2,6-diéthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène (BODIPY) a été synthétisé par Olivier Mongin (ISCR, équipe COInt) selon une procédure publiée.<sup>1</sup>

La curcumine (95 %, CAS : 458-37-7) a été achetée auprès d'Alfa Aesar, le paclitaxel ( $> 98\%$ , CAS : 33069-62-4) auprès de TCI, le sorafénib ( $\geq 98\%$ , grade HPLC, CAS : 284461-73-0) et le sorafénib tosylate ( $\geq 98\%$ , grade HPLC, CAS : 475207-59-1) chez Sigma-Aldrich.

## II Méthodes de caractérisation des échantillons

### II.1 NTA (Nanoparticle Tracking Analysis)

Nous avons principalement utilisé le NTA pour mesurer et analyser la distribution des diamètres hydrodynamiques ( $D_H$ ) et la concentration en nano-objets (nano-gouttelettes ou  $H^{\circ}$ ). Le NTA est réalisé par un appareil Nanosight LM10 (Malvern Panalytical). Chaque échantillon est inséré dans la cellule de l'appareil et éclairé par un faisceau laser (40 mW,  $\lambda = 405 \text{ nm}$ ). La lumière diffusée par les gouttelettes apparaît comme des taches individuelles (Figure 156, à gauche) et est enregistrée par une caméra CCD, fonctionnant à 30 images par seconde, à travers un microscope. Chaque mesure est constituée de 3 acquisitions de 30 s.

Grâce au logiciel analytique NANOSIGHT NTA 2.0, les diamètres hydrodynamiques, sont ensuite déduits pour chaque objet de l'analyse de leur mouvement Brownien (Figure 156, en haut à droite). L'instrument permet également d'obtenir une mesure approximative de la concentration en particules. Les mesures sont effectuées à  $25^{\circ}\text{C}$  et les calculs des diamètres hydrodynamiques (équation de Stokes-Einstein Figure 156, en bas à droite) sont réalisés en prenant la viscosité du mélange THF/eau à cette température à partir des valeurs rapportées

par Das *et al* (Tableau 2).<sup>2</sup> La distribution des tailles mesurables au NTA se situe entre 10 et 1000 nm.

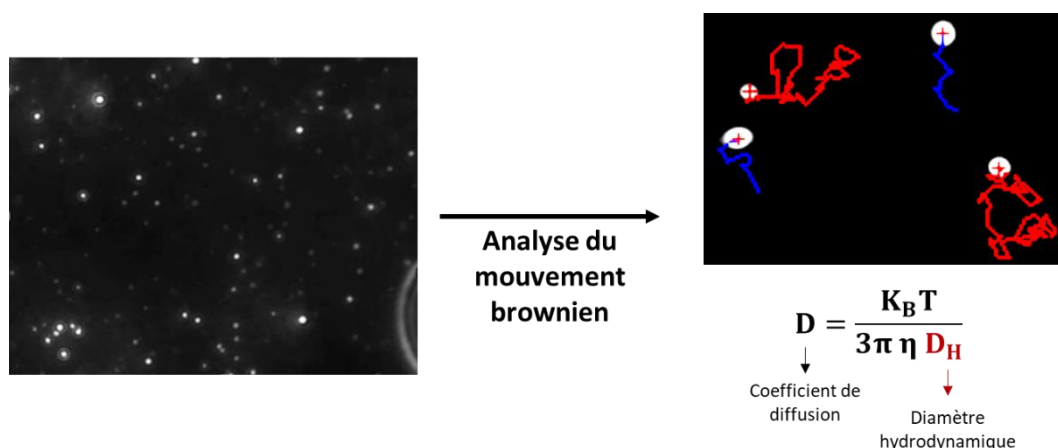


Figure 156 : Capture d'une image de la mesure NTA et observation des taches de diffusion des nano-objets, puis analyse du mouvement brownien de ces taches. Obtention du diamètre hydrodynamique par l'équation de Stokes-Einstein, en connaissant la température ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ) et la viscosité ( $\eta$ ) du mélange de l'échantillon.

Tableau 2 : Viscosité du mélange THF/H<sub>2</sub>O pour différentes proportions de THF dans l'eau à 25°C, exprimées en fraction molaire, massique ou volumique d'après (2).

Fraction molaire en THF	Fraction massique en THF	Fraction volumique en THF	Viscosité (cP)
0	0	0	0,890
0,0271	0,100	0,111	1,201
0,0587	0,200	0,218	1,490
0,0967	0,300	0,324	1,680
0,1427	0,400	0,427	1,732
0,1998	0,500	0,528	1,678
0,2726	0,600	0,627	1,490
0,3682	0,700	0,723	1,224
0,4998	0,800	0,817	0,924
0,6921	0,900	0,910	0,656
1,000	1,000	1,000	0,463

## II.2 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les mesures de DLS sont réalisées à l'aide d'un dispositif DLS VASCO-KIN™ de Cordouan (France) équipé d'une tête optique déportée sans contact (Figure 157.A) et d'une source laser (638 nm) mesurant l'intensité diffusée à un angle de 170°. Chaque échantillon est analysé directement dans le flacon de préparation qui est déposé dans le support de l'appareil. La viscosité des mélanges de solvants, ainsi que la température de la mesure (température ambiante) sont indiquées comme paramètres dans l'ajustement des cumulants. Les diamètres

hydrodynamiques (Z-average ou  $Z_{av}$ ) sont déterminés à partir des corrélogrammes par la méthode des cumulants (Figure 157.B).

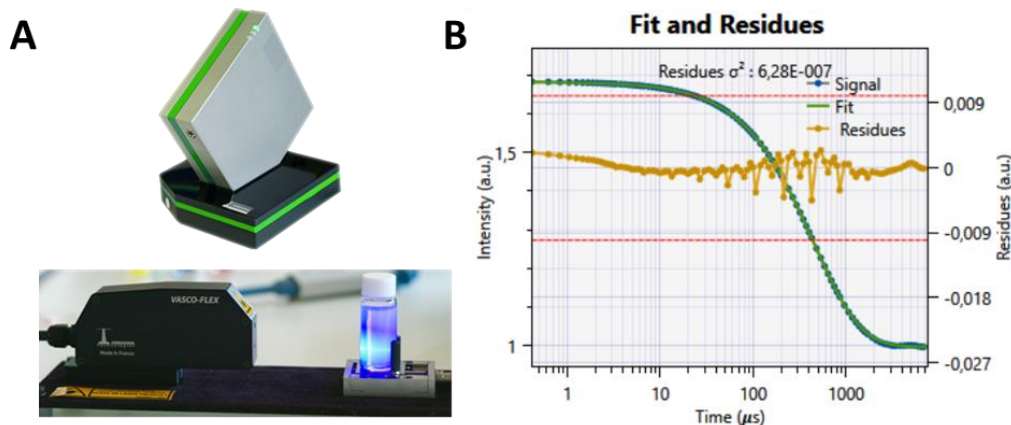


Figure 157 : (A) Dispositif DLS VASCO-KIN™ équipé d'une tête optique déportée. (B) Corrélogramme obtenu par la méthode des cumulants après mesure d'un échantillon pour obtenir le  $Z_{av}$  des nano-objets.

### II.3 SMLS (Static Multiple Light Scattering)

Un dispositif de diffusion multiple statique de la lumière (SMLS) (TurbiScan™ TOWER) de Formulation (France) a été utilisé pour contrôler la stabilité des émulsions. L'appareil mesure les intensités de transmission (T, à 180°) ou de rétrodiffusion (BS, à 45°) sur la hauteur de l'échantillon au cours du temps en utilisant une source de lumière proche infrarouge ( $\lambda = 880$  nm) et deux détecteurs synchrones qui se déplacent de haut en bas le long de l'échantillon (Figure 158.A et B).

Les échantillons ont été préparés dans des flacons en verre en ajoutant de l'eau en une seule fois à la solution organique. Pour le mélange, chaque échantillon a été lentement retourné 3 fois et suivi pendant 14 h avec la succession de séquences suivante :

- (1) une mesure toutes les 3 min pendant 45 min,
- (2) une mesure toutes les 15 min pendant 3 h,
- (3) une mesure toutes les 30 min pendant 2 h et 45 min,
- (4) une mesure toutes les 45 min pendant 2 h et 30 min,
- (5) et une mesure toutes les heures pendant 6 h.

Les résultats sont fournis sous forme de transmission relative au cours du temps.

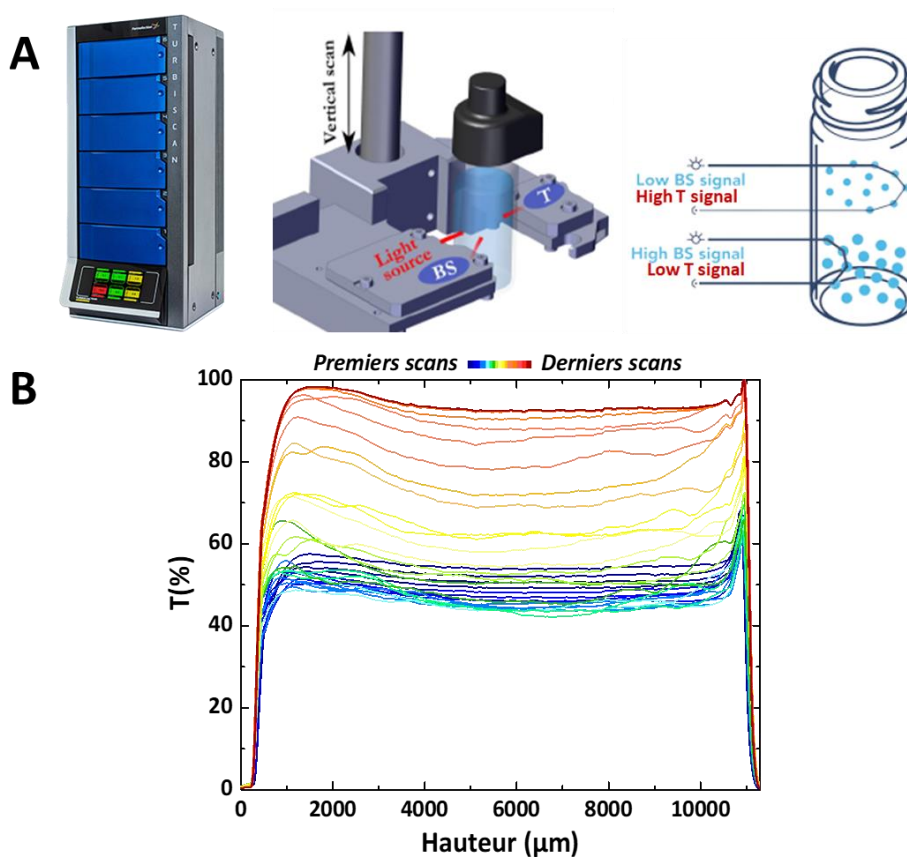


Figure 158 : (A) Dispositif TurbiScan™ TOWER avec des illustrations schématiques de la mesure des intensités de transmission (T) et de rétrodiffusion (BS). (B) Exemple d'un résultat d'intensité de transmission mesurée en fonction de la hauteur du tube (des premiers scans en bleu aux derniers scans en rouge).

## II.4 MET (Transmission Electron Microscopy)

Dans un premier temps, une goutte de dispersion (10  $\mu\text{L}$ ) est déposée sur la grille de MET. Ensuite, la goutte est évaporée à température ambiante pendant quelques heures. Les grilles MET utilisées sont des grilles de 200 mesh en cuivre recouvertes d'un film carbone/formvar (ref S162, Agar Scientific).

Deux appareils de microscopie électronique ont été utilisés pour l'imagerie au cours de la thèse :

- Un microscope électronique JEOL 1400 MET opérant à 120 kV et équipé d'une caméra GATAN Orius 1000 (MRic-TEM, Biosit)
- Un microscope électronique JEOL 2100 LaBG équipé d'une caméra GATAN Orius 200D (THEMIS, Scanmat).

## II.5 Mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique a été mesurée à l'aide d'un Malvern Zetasizer Nano ZS équipé d'une cellule d'immersion ZEN1002 (Figure 159) pour les solutions contenant différentes fractions de solvant organique des systèmes BHT/THF/H<sub>2</sub>O (chapitre 2), BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O (chapitre 2), sorafénib/THF/H<sub>2</sub>O (chapitre 3) et sorafénib tosylate/THF/H<sub>2</sub>O

(chapitre 3). Dans les cas des solutions aqueuses contenant seulement les H<sup>®</sup> (chapitre 3), la cuve utilisée est une cellule zêta à capillaire replié DTS1070 (Figure 159).

La technique utilisée pour mesurer la mobilité électrophorétique des particules en dispersion est l'électrophorèse laser Doppler (ELS). Le principe de l'électrophorèse est d'appliquer un champ électrique aux bornes des deux électrodes. Ainsi, les particules possédant une charge électrique migrent vers l'électrode portant une charge opposée avec une certaine vitesse qui est la mobilité électrophorétique.

Les valeurs indiquées représentent la moyenne et l'écart-type de trois séries indépendantes de 100 mesures.

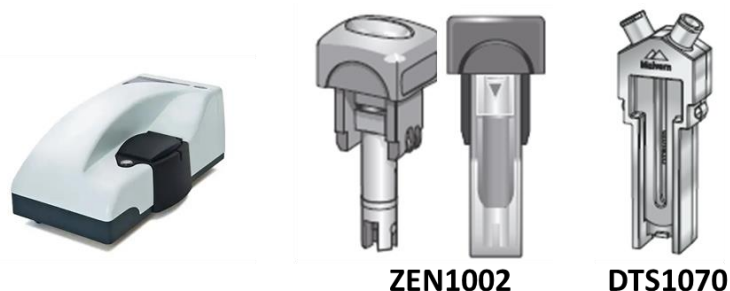


Figure 159 : Dispositif Malvern Zetasizer Nano ZS (gauche), représentation schématique d'une cellule d'immersion ZEN1002 (milieu) et d'une cellule zêta à capillaire replié DTS1070 (droite).

La viscosité de la phase dispersante est le paramètre à prendre en compte pour l'analyse de la mobilité (Tableau 3) :

Tableau 3 : Paramètres (indice de réfraction de la phase dispersée et de la phase dispersante, viscosité du mélange) à indiquer pour les mesures de la mobilité électrophorétique des différents systèmes de la thèse.

Systèmes	Viscosité du mélange (cP ou mPa.s)
BHT/THF/H <sub>2</sub> O (chap 2)	1,2010
	1,3455
	1,4900
	1,6800
BODIPY/THF/H <sub>2</sub> O (chap 2)	1,4900
Sorafénib/THF/H <sub>2</sub> O (chap 3)	1,5130
Sorafénib tosylate/THF/H <sub>2</sub> O (chap 3)	1,5130

### III Chapitre 2 – Mise en évidence de la formation et de la stabilité des mésostructures dans les mélanges ternaires Ouzo.

#### III.1 Préparation des échantillons et élaboration d'un diagramme de phase

Dans le chapitre 2, nous avons étudié les mélanges ternaires suivants : BHT/THF/H<sub>2</sub>O, limonène/DMSO/H<sub>2</sub>O, α-Tocophérol/THF/H<sub>2</sub>O et BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O. Dans tous les cas, les échantillons ont été préparés en ajoutant, rapidement et en une seule fois, de l'eau à un

solvant (THF ou DMSO) contenant le soluté hydrophobe (BHT, limonène,  $\alpha$ -Tocophérol ou BODIPY). Ensuite, l'échantillon est rapidement mélangé au vortex pendant environ 10 s.

Pour l'élaboration des diagrammes de phase, les échantillons ont été immédiatement inspectés visuellement à la lumière, particulièrement nécessaire pour les échantillons proches de la binodale. Les solutions limpides et homogènes ont été classées dans la phase monophasique. Si nous avons observé une diffusion de la lumière et un trouble à l'intérieur des échantillons homogènes, nous les avons attribués au domaine Ouzo. Si nous avons vu des précipités dans les échantillons, ou des gouttelettes d'huile surnagées, nous les avons placés dans le domaine diphasique (avec démixtion visible).

Concernant l'élaboration du diagramme de phase du BODIPY dans le THF et l'eau, les échantillons ont été réalisés comme expliqué précédemment et ils ont été observés sous illumination UV à  $\lambda_{\text{excitation}} = 365 \text{ nm}$ . Puis, nous avons pris une photographie de chaque série aux différentes fractions de solvant (Figure 160). Et nous avons placé un spot de la même couleur que l'échantillon de ces photos extraits de l'image dans le diagramme de phase aux coordonnées correspondant aux différentes fractions massiques de BODIPY et de solvant utilisées.

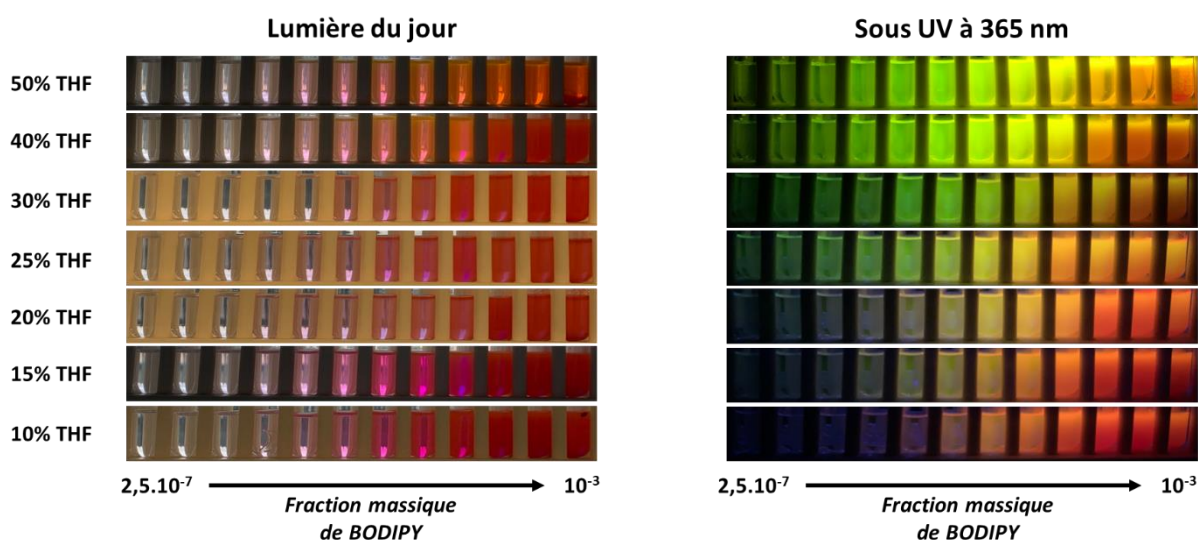


Figure 160 : Elaboration du diagramme de phase du BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O en prenant les photos des échantillons aux différentes fractions de BODIPY, THF et H<sub>2</sub>O à la lumière du jour (gauche) puis sous illumination UV à 365 nm de longueur d'onde d'excitation (droite).

## III.2 Détermination de la binodale

### III.2.a Par observation visuelle

Après attribution des échantillons de chaque système à leurs domaines respectifs, la binodale (visuelle et théorique) et la spinodale ont pu être tracées sur le diagramme de phase.

### III.2.b Par COSMO-RS (CONductor-like Screening MOdel for Real Solvents)

Les calculs COSMO-RS sont réalisés par le logiciel COSMOthermX et permettent de prédire des propriétés thermodynamiques de solutions sur la base de données de mécanique quantique (solubilités de molécules en solution, les coefficients de partage comme le LogP, les valeurs de pKa, les diagrammes de phases vapeur-liquide (VLE), solide-liquide (SLE) ou liquide-

liquide (LLE) de mélanges binaires et ternaires, etc.). Le logiciel possède une base de données stockant plus de 2500 composés (solvants, molécules, liquides ioniques). Il est aussi possible grâce au SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) d'ajouter d'autres molécules comme le BHT qui ne faisait pas partie de la base de données. La densité de charge de surface est déterminée à partir des calculs quantiques.

Dans notre cas, nous avons étudié particulièrement l'estimation du diagramme de phase solide-liquide du système ternaire BHT/THF/H<sub>2</sub>O. Pour ces calculs, nous avons dû indiquer la température de fusion ( $T_{\text{fusion}} = 71^{\circ}\text{C}$ ) et l'enthalpie de fusion ( $\Delta H_{\text{fusion}} = 17,14 \text{ kJ/mol}$ ) mesurées par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Les paramètres de calcul à fournir sont les suivants :  $T = 25^{\circ}\text{C}$  ;  $\Delta G_{\text{fusion}}$  estimée par le logiciel. Les résultats des calculs de COSMO-RS pour chaque fraction massique THF/H<sub>2</sub>O donnant la limite d'équilibre solide-liquide (ou binodale) sont répertoriés dans le Tableau 4 ci-dessous :

*Tableau 4 : Valeurs des fractions de BHT de la limite d'équilibre solide-liquide (SLE, ou binodale) en fonction de différentes fraction THF/H<sub>2</sub>O calculées par COSMO-RS.*

Fraction massique en THF	Fraction massique en BHT
0,0	$6,4536 \cdot 10^{-7}$
0,1	$8,2269 \cdot 10^{-6}$
0,2	$7,8392 \cdot 10^{-5}$
0,3	$5,6839 \cdot 10^{-4}$
0,4	$3,35 \cdot 10^{-3}$
0,5	$1,725 \cdot 10^{-2}$
0,6	$8,785 \cdot 10^{-2}$
0,7	$5,3867 \cdot 10^{-1}$
0,8	$7,6446 \cdot 10^{-1}$
0,9	$8,1353 \cdot 10^{-1}$
1,0	$8,3664 \cdot 10^{-1}$

### III.3 Suivi cinétique de l'évolution de la taille des gouttelettes

#### III.3.a Par NTA

Pour chaque échantillon, les mesures ont été réalisées quelques minutes après le mélange (pour une mesure à  $t = 0$ ) et après 3 h. L'échantillon ne peut pas être dilué pour les mesures NTA sous risque de modifier la composition du système dans le diagramme de phase. L'intensité du laser (« camera Level ») est ajustée pour visualiser le plus de particules.

#### III.3.b Par DLS

Le signal diffusé a été acquis en continu pendant le temps souhaité (1 à 3 h). Ensuite, de courtes séquences (généralement de 1,5 à 3 min) ont été utilisées aux points de temps sélectionnés pour l'analyse.



### III.4 Etude de la composition des gouttes

#### III.4.a Par RMN $^1\text{H}$ , NOESY $^1\text{H}$ 2D et DOSY 2D

Tous les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AVANCE NEO 500 MHz équipé d'une cryosonde TCI  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  de 5 mm sur la plateforme PRISM.

Différentes compositions de BHT/THF-*d8*/D<sub>2</sub>O ont été analysées par RMN  $^1\text{H}$ . En bref, une solution mère de BHT a été préparée dans le THF-*d8*, puis elle a été diluée dans du THF-*d8* selon la concentration de BHT souhaitée. Ensuite, l'eau deutérée (D<sub>2</sub>O) a été rapidement ajoutée dans les proportions THF-*d8*/D<sub>2</sub>O visées et la solution a été mélangée pendant 30 s au vortex. Ensuite, la solution a été immédiatement placée dans un tube RMN de 5 mm dans lequel un tube coaxial était parfois inséré mais pas systématiquement. Ce tube coaxial contenant 200  $\mu\text{M}$  de TSP (sel de sodium de l'acide triméthylsilyl) propionique-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub>) a été utilisé comme référence externe pour la calibration des spectres et l'intégration relative des signaux de BHT. Les spectres  $^1\text{H}$  ont été enregistrés à 298 K en utilisant les séquences standards de Bruker.

Les expériences NOESY  $^1\text{H}$  2D ont été réalisées en utilisant la séquence standard **noesygp** de Bruker et les paramètres d'acquisition suivants : temps de mélange de 500 ms, TD 4k x 128 points, 8 scans. Le temps de mélange était suffisamment long pour détecter les échanges chimiques. Nous avons utilisé le logiciel gratuit EXSYcalc (Mestrelab Research, <https://mestrelab.com/software/freeware/>) pour estimer les constantes cinétiques  $k_1$  et  $k_{-1}$  après intégration des pics croisés hors diagonale.

Les mesures d'autodiffusion (expériences DOSY)<sup>2</sup> ont été réalisées à l'aide d'une expérience d'Echo stimulé 2D utilisant une séquence d'impulsions de gradients bipolaires (**stebpp1s**), avec un délai de diffusion (d20) de 350 ms et une durée de gradient (p30) de 3 s. L'analyse de la diffusion a été traitée avec le logiciel de traitement DOSY 2D Topspin (échelle logarithmique).

#### III.4.b Par suivi de la fluorescence du BODIPY

Pour analyser la composition des gouttes du domaine Ouzo et du domaine SFME, nous avons utilisé le système BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O. A partir d'une étude antérieure portant sur la fluorescence du BODIPY en fonction de son environnement (bon ou mauvais solvant)<sup>3</sup>, nous avons cherché à séparer la phase dispersée (culot) de la phase dispersante (surnageant) par centrifugation de 3 échantillons se situant à  $2,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-5}$  et  $2,5 \cdot 10^{-4}$  en fraction massique de BODIPY et à 20 % en fraction massique de THF (Figure 161). La vitesse choisie pour la centrifugation est de 18000 RPM (tours par minute) pendant 30 min.

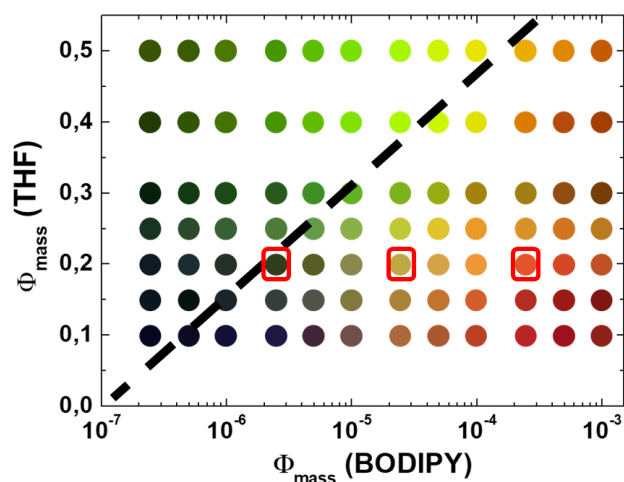


Figure 161 : Diagramme de phase du BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O. Les 3 échantillons choisis pour être observés après centrifugation sont entourés en rouge.

Après centrifugation, les trois échantillons ont été observés sous illumination UV à  $\lambda_{excitation} = 365 \text{ nm}$ , avec observation ou non d'un culot (Figure 162).








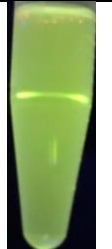




Fraction massique de BODIPY :	2.5 10 <sup>-6</sup>		2.5 10 <sup>-5</sup>		2.5 10 <sup>-4</sup>	
	Lumière du jour	Sous UV 365 nm	Lumière du jour	Sous UV 365 nm	Lumière du jour	Sous UV 365 nm
Avant centrifugation						
Après centrifugation						
	Pas de culot		Culot (vert fluo)		Culot (rouge)	

Figure 162 : Tableau récapitulatif des observations à la lumière du jour ou sous illumination UV à  $\lambda_{excitation} = 365 \text{ nm}$  des échantillons se situant à  $2,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-5}$  et  $2,5 \cdot 10^{-4}$  de fraction massique de BODIPY et à 20 % de fraction massique de THF, avant et après centrifugation.

## IV Chapitre 3 – Encapsulation des principes actifs par nanopréciipitation dans les Hybridosomes®

### IV.1 Les nanoparticules d'oxyde de Fer ou SPION

Les SPION utilisés au cours de cette thèse sont des NP de maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Ils ont été synthétisés et fournis par Myrtil Kahn (LCC, Toulouse).<sup>4</sup> La synthèse est réalisée par étapes successives en débutant par une hydrolyse contrôlée d'un précurseur organométallique de Fe(II), le  $(\text{Fe}\{\text{N}(\text{SiMe}_3)_2\}_2)_2$ , en présence de ligands (2 équivalents octylamine, 1 équivalent acide oléique). Ensuite, ce précurseur hydrolysé subit une oxydation à l'air pour donner les SPION. Ces NP peuvent être dispersées dans le THF.

Au cours de la thèse de Clément Goubault, la taille moyenne des SPION a été déterminée par MET (Figure 163.A). Elle est de l'ordre de  $4,2 \pm 1,7$  nm (Figure 163.B).

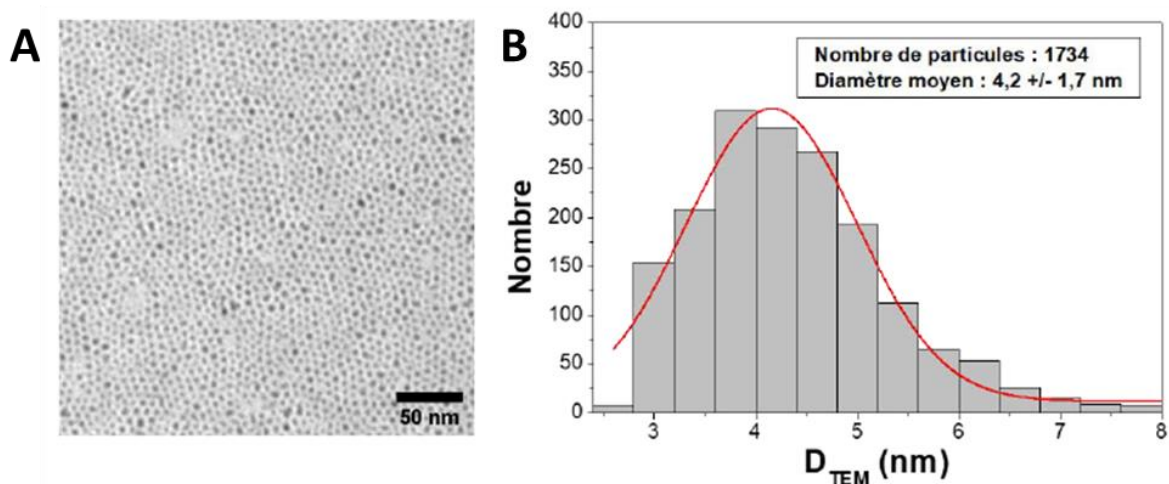


Figure 163 : Analyse MET des nanoparticules de maghémite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , SPION@octylamine/acide oléique). (A) image MET et (B) leur distribution de taille.

### IV.2 Préparation et purification des H® - Procédé d'encapsulation des principes actifs

Dans un premier temps, nous avons élaboré une ligne du diagramme de phase de chaque système étudié (principe actif/THF/H<sub>2</sub>O) à 0,22 en fraction massique de THF. La binodale a pu être déterminée visuellement, comme vu dans la partie III de ce chapitre.

Dans un second temps, la préparation des H® au cours de cette thèse a suivi la procédure classique (cf. chapitre 1) en utilisant comme soluté hydrophobe les principes actifs étudiés.

1. La solution de THF sans BHT et contenant les NP hydrophobes (SPION) est mélangée à la solution mère (1 à 1,65 mM) contenant le principe actif d'intérêt. Selon la concentration de soluté hydrophobe visée, la solution est complétée par du THF. La phase aqueuse

- (milliQ) est ajoutée rapidement et en une fois à la solution organique afin d'atteindre des proportions volumiques eau/THF de 75/25.
2. Ensuite, un mélange de quelques secondes au vortex est effectué. Typiquement, la quantité de NP utilisée est de 20 µg Fe/mL (ICP-OES).
  3. L'échantillon de NP-shell est laissé environ 6 h à température ambiante. Puis, le polymère (PEG7k-PAA2k) est ajouté, avec une concentration en fonctions acides carboxyliques de l'ordre de 2,4 mmol.L<sup>-1</sup>.
  4. Le solvant THF est ensuite éliminé par évaporation dans un bain de sable à 40°C pendant environ 17 à 20 h.
  5. A la sortie du bain sec, les échantillons sont complétés en phase aqueuse (milliQ) pour une masse totale de 1 g. Puis, la purification est effectuée par deux aimantations successives de 24 h sur un aimant permanent (aimant NdFeB, 10x10x8 mm, Supermagnete), suivie chacune d'un remplacement du surnageant par de l'eau milliQ. Enfin, l'ajout de phase aqueuse (milliQ) permet de redisperser le culot final et d'obtenir une solution homogène et trouble.

### IV.3 Analyse de la taille des H<sup>®</sup> par NTA

Les échantillons d'H<sup>®</sup> sont préalablement dilués (par 50 ou par 20) pour la mesure NTA afin d'avoir idéalement entre 50 et 100 nanoparticules par image. Dans ce cas de figure, il est possible de diluer l'échantillon sans modifier la composition du système puisque les H<sup>®</sup> sont « figés » par le polymère ajouté dans le procédé décrit ci-dessus. Les conditions d'acquisition sont comparables à celles décrites dans la partie précédente (ajustement du « camera level » pour éviter les grosses taches de diffusion qui peuvent masquer les plus petites, 3 acquisitions de 30 s et indication de la viscosité de l'eau, étant la phase dispersante ici).

### IV.4 Détermination du taux d'encapsulation du sorafénib dans les H<sup>®</sup> SPION@PEG-PAA

Le taux d'encapsulation du sorafénib dans les H<sup>®</sup> a été déterminé par dosage HPLC (High performance liquid chromatography), avec un détecteur d'absorbance UV. Dans un premier temps, un abaque de la concentration du sorafénib dans le méthanol (MeOH) en fonction de l'aire sous la courbe du dosage HPLC a été réalisée (Figure 164). Pour cela, des solutions de sorafénib dissout dans du MeOH ont été élaborées à différentes concentrations. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne C18 (4,6 mm × 150 mm, pores de 5 µm ; AGILENT ZORBAX ECLIPSE XDB-C18 ANALYTICAL) en utilisant de l'acétonitrile (A) et de l'eau contenant 0,2 %v d'acide acétique (B) comme phase mobile, à un débit de 1,0 mL/min et contrôlée à 254 nm. Un gradient d'élution a été appliqué à 25°C comme indiqué ci-dessous :

0-30 min : 40 % A / 60 % B à 75 % A / 25 % B

30-35 min : 75 % A / 25 % B à 40 % A / 60 % B

35-40 min : 40 % A / 60 % B

Le temps de rétention du sorafénib a été observé vers 18,5 min.

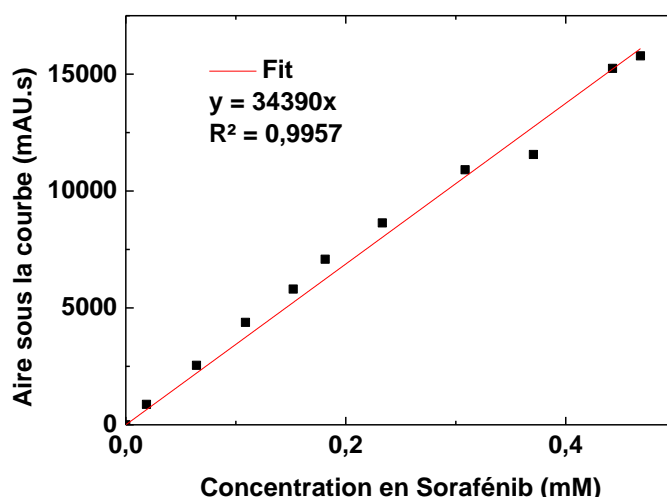


Figure 164 : Abaque de la concentration en sorafénib dans THF en fonction de l'aire sous la courbe issue du dosage HPLC.

Le taux d'encapsulation est déterminé à partir des surnageants récupérés à chaque étape de purification par aimantation de la suspension d'H<sup>®</sup> contenant le principe actif (sorafénib) nanodispersé. Un volume de 200 µL de chaque surnageant est mélangé avec 800 µL de MeOH pour resolubiliser le sorafénib non encapsulé dans les H<sup>®</sup> et nanoprecipité dans le surnageant. Puis, ce mélange est dosé par HPLC. L'obtention de l'équation de la courbe de l'abaque a alors permis de recalculer les concentrations de sorafénib dosées dans les surnageants. Le taux d'encapsulation dans les H<sup>®</sup> est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux d'encapsulation (\%)} = \frac{[\text{Sorafénib}]_{\text{encaps}}}{[\text{Sorafénib}]_{\text{initiale}}} \times 100$$

Avec  $[\text{sorafénib}]_{\text{encaps}}$ , la concentration réelle de sorafénib encapsulée dans les H<sup>®</sup> et  $[\text{sorafénib}]_{\text{initiale}}$ , la concentration de sorafénib initialement introduite au début du procédé. La  $[\text{sorafénib}]_{\text{réelle}}$  correspond à la concentration initiale après soustraction de la somme des concentrations de sorafénib dosées dans les surnageants ( $[\text{sorafénib}]_{\text{surn}}$ ).

$$\text{Taux d'encapsulation (\%)} = \frac{[\text{Sorafénib}]_{\text{initiale}} - (\sum [\text{sorafénib}]_{\text{surn}})}{[\text{Sorafénib}]_{\text{initiale}}} \times 100$$

#### IV.5 Etude du relargage du sorafénib hors des H<sup>®</sup> SPION@PEG-PAA au cours du temps

À l'issue de l'étape de la purification par aimantation de la suspension d'H<sup>®</sup> contenant du sorafénib, 50 µL de surnageant est récupéré chaque jour pendant 8 jours. Chacun de ces prélèvements est ensuite mélangé à 200 µL de MeOH pour être dosés par HPLC comme dans le paragraphe précédent. À partir de l'équation de droite de l'abaque (Figure 164), il est possible de remonter à la concentration de sorafénib dosé dans chaque surnageant pendant 8 jours et de tracer la courbe de relargage du sorafénib hors des H<sup>®</sup>.

## V Chapitre 4 – Vers la thérapie combinée – chimioradiothérapie

### V.1 Synthèse des nanoparticules d'or (AuNP)

Dans le chapitre 4, nous avons utilisé des nanoparticules d'or en plus des SPION du chapitre 3. La synthèse des AuNP a été développée par Olivier Gazil, doctorant de l'Université Polytechnique de Montréal, avec qui notre équipe a collaboré pour développer une méthode de synthèse de nanoparticules à partir d'émulsions Ouzo.<sup>5</sup>

En bref, la synthèse ex situ des AuNP consiste à mélanger 50 %v d'une solution de chlorure de triphénylphosphine d'or (I) (1,5 mM d'AuPPh<sub>3</sub>Cl) dans le THF dépourvu de BHT, avec 50 %v d'une solution de borohydrure de sodium préparée fraîchement (10 mM NaBH<sub>4</sub> dans du THF sans BHT). La solution finale présente une couleur marron homogène et les nanoparticules obtenues possèdent une taille autour de  $2,9 \pm 0,6$  nm d'après les clichés MET (Figure 165).

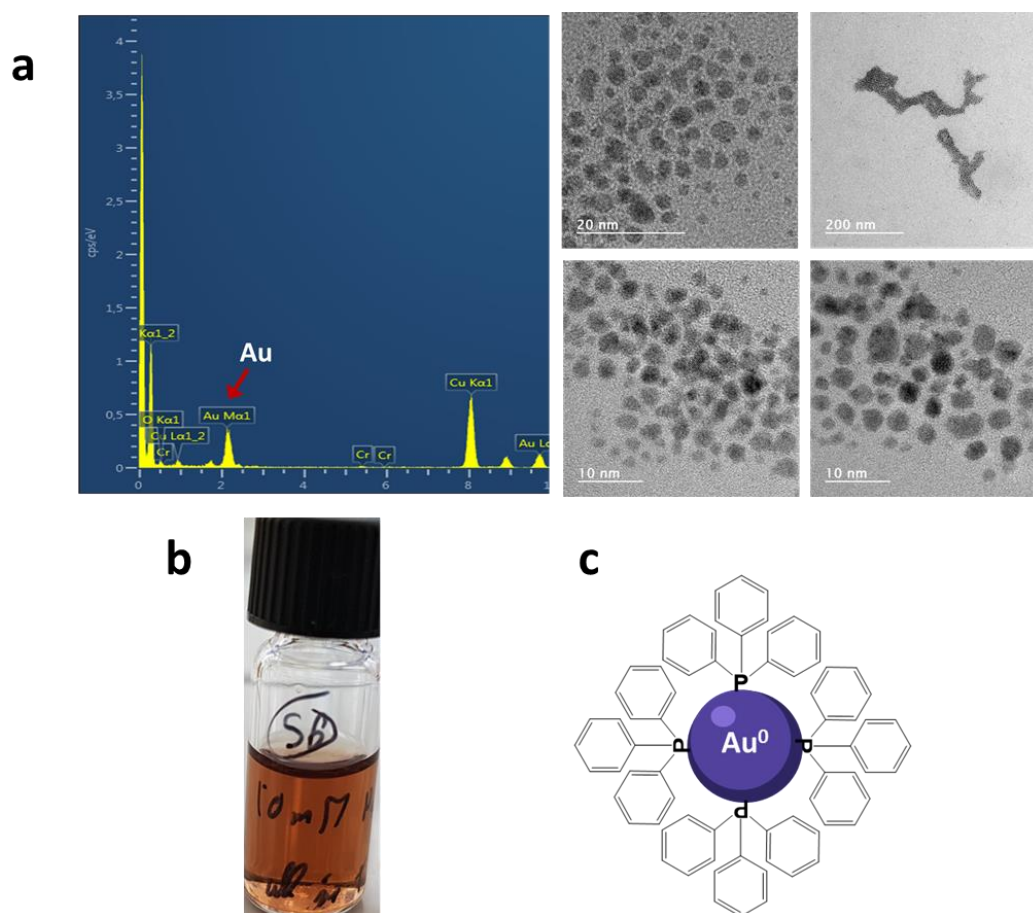


Figure 165 : Obtention d'AuNP suspendues dans du THF après synthèse ex situ. (a) images MET des AuNP obtenues accompagnées du résultat d'analyse par EDX. (b) la photo du flacon contenant la solution d'AuNP suspendues dans du THF. (c) schéma des AuNP entourés des ligands PPh<sub>3</sub>.

## V.2 Préparation et purification des H<sup>®</sup>

### V.2.a H<sup>®</sup> SPION@PEG-PAA (encapsulant soit sorafénib soit BHT)

Pour la préparation et purification des H<sup>®</sup> SPION@PEG-PAA, le procédé décrit dans la partie IV.2 est identique au procédé utilisé dans cette partie.

Pour l'encapsulation du sorafénib, nous nous sommes concentrés sur une seule concentration (0,24 mM) pour la suite de l'étude. Cette concentration est la même que celle utilisée pour l'encapsulation du sorafénib dans les H<sup>®</sup> AuNP@PVPA (discutée dans le paragraphe suivant).

Concernant l'élaboration des H<sup>®</sup> SPION@PEG-PAA contenant du BHT encapsulé, une solution commerciale de THF a été utilisée. Cette solution contient initialement 1,28 mM de BHT (dosage UV réalisé au cours de la thèse de Clément Goubault). Le THF commercial contenant le BHT et les SPION a donc été directement mélangé à l'eau milliQ pour former les NP-shell, suivi du procédé habituel pour fabriquer les H<sup>®</sup>.

### V.2.b H<sup>®</sup> AuNP@PVPA (encapsulant soit sorafénib soit BHT)

Après avoir synthétisé les AuNP@PPH<sub>3</sub>, nous avons constaté que le meilleur polymère pour former les H<sup>®</sup> était le poly(acide vinylphosphonique) (PVPA, 50 µL à 4,4 mg/mL).

Le principe d'élaboration des H<sup>®</sup> AuNP@PVPA reste le même que celui des H<sup>®</sup> SPION@PEG-PAA, seules les matières premières et la méthode de purification ont changé : utilisation des AuNP au lieu des SPION, utilisation du PVPA au lieu du PEG-PAA et purification par deux étapes de centrifugation successives au lieu de purifier par aimantation. Pour l'encapsulation du BHT, le THF commercial a été utilisé comme précédemment pour élaborer les H<sup>®</sup> AuNP@PVPA.

Il est aussi important de remarquer que le ligand (PPH<sub>3</sub>) semblait pouvoir former une émulsion instantanée et aurait possiblement un effet sur la formation des objets (comme dans le cas des ligands des SPION discuté dans la partie II.3.a du chapitre 1).

## V.3 Tests cellulaires

Les tests cellulaires ont été réalisés sur la plateforme ImPACcell de Biosit par Rémy Le Guével et Hélène Solhi. L'irradiation préalable des échantillons a été effectuée sur la plateforme Arche de Biosit par Ulrich Jarry (Chargé de Recherche chez Biotrial), notre collaborateur au sein du laboratoire commun Oncotrial (Biosit-Biotrial).

### V.3.a Préparation des échantillons H<sup>®</sup> dans le sérum

A l'issue de la purification des H<sup>®</sup> (AuNP@PPH<sub>3</sub> ou SPION@PEG-PAA), le culot est récupéré et resuspendu dans un plus petit volume (215 µL) de milieu DMEM pour atteindre une concentration finale de 1 mM de sorafénib. Les échantillons ont été concentrés afin qu'ils puissent subir des dilutions successives et donc balayer un large éventail de concentration pour la détermination des concentrations inhibitrices médianes (IC<sub>50</sub>).

## V.3.b Protocole d'incubation dans les milieux cellulaires

### V.3.b.i Cultures cellulaires

Les lignées cellulaires cancéreuses HuH-7 (carcinome hépatocellulaire) proviennent de la collection ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Porton Down, Royaume-Uni). Elles ont été modifiées au sein d'Oncotrial pour l'expression de la luciférase (HuH-7-Luc). Les cellules ont été cultivées à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> dans le DMEM, le milieu recommandé par l'ECACC pour HuH7 et les fibroblastes. Tous les milieux de culture ont été complétés par 10 % de sérum de vœu fœtal (FBS), 1 % de pénicilline-streptomycine et 2 mM de glutamine.

### V.3.b.ii Essai de cytotoxicité à effet de dose (détermination de IC<sub>50</sub>)

Les essais de détermination des IC<sub>50</sub> ont été réalisés en utilisant les molécules de doxorubicine, sorafénib et sorafénib tosylate et cela grâce à une gamme de concentrations de chaque produit chimique (concentrations finales : 0,1 µM – 0,3 µM – 0,9 µM – 3 µM – 9 µM – 25 µM). Le DMSO, utilisé comme solvant, est utilisé comme traitement témoin.

Les cellules ont été placées dans des plaques de 96 puits (4000 cellules/puits). 24 heures après, les cellules sont exposées aux produits chimiques aux concentrations indiquées. Après 48h de traitement, les cellules sont lavées dans du PBS et fixées dans 90 % d'éthanol / 5 % d'acide acétique glacial pendant 20 min.

Ensuite, les noyaux ont été colorés avec du Hoechst 33342 (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride, ≥ 98 % grade HPLC et TLC, référence B2261 chez Sigma). L'acquisition et l'analyse des images pour compter les cellules viables sont réalisées à l'aide d'un lecteur Cellomics ArrayScan VTI/HCS (ThermoScientific). Les pourcentages de survie sont calculés comme le pourcentage du nombre de cellules après traitement par le composé par rapport au nombre de cellules après traitement par le DMSO (fixé à 100 %). Les IC<sub>50</sub> **relatives** sont calculées à l'aide de l'ajustement de courbe XLfit 5.5.0.5 (idbs) intégré à Microsoft Excel en tant qu'add-on. Le modèle logistique à 4 paramètres ou modèle dose-réponse sigmoïdal est utilisé selon l'équation<sup>6</sup> suivante :

$$Fit = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} + D$$

Où Fit est la réponse, X est la concentration, A est l'asymptote inférieure (le bas de la courbe ou le plateau inférieur), D est l'asymptote supérieure (le haut de la courbe ou le plateau supérieur), B est le facteur de pente décrivant la pente de la partie linéaire de la courbe, et C est la concentration correspondant à la réponse située à mi-chemin entre A et D.

## V.4 Procédé d'irradiation des échantillons et des milieux cellulaires

Les irradiations des cellules ont été réalisées avec un irradiateur Faxitron (CellRad) de 130 kV / 5 mA.



Concernant l'étude de la dose d'irradiation pour observer un effet de l'irradiation sur les cellules, 3 séries d'essais ont été réalisées. A la suite des 48 h d'incubation, les cellules de la première colonne de puits ont subi une première irradiation avec une dose de 2 Gy, tandis que les cellules des autres colonnes étaient protégées par un cache de plomb, stoppant les rayonnements. Ce cache recule d'une colonne pour infliger la même dose à la seconde colonne, et une deuxième dose de 2 Gy à la première colonne, tout en protégeant toujours le reste des colonnes et ainsi de suite pour le reste de la plaque de puits (10 colonnes au total). Ainsi, la première colonne a subi 10 x 2 Gy (soit une dose totale de 20 Gy) alors que la dernière colonne a reçu une unique dose de 2 Gy. A partir de ces tests, il a alors été possible de tracer la viabilité des cellules en fonction de la dose d'irradiation afin de connaître la meilleure dose pour les tests de cytotoxicité.

Afin de vérifier l'intégrité thérapeutique des Hybridosomes® après irradiation, nous avons réalisé une série de test sur nos composés chimiques (sorafénib avec/sans tosylate) préalablement irradiés avant d'être incubés avec les cellules. Cela nous a permis de vérifier l'activité thérapeutique des principes actifs irradiés. Pour vérifier l'efficacité de la radiothérapie de nos H® constituant d'or, nous avons irradiés directement les cellules contenant les H®, avec ou sans principe actif encapsulé.

## VI Références bibliographiques

- (1) Ulrich, G.; Ziesel, R. Convenient and Efficient Synthesis of Functionalized Oligopyridine Ligands Bearing Accessory Pyrromethene-BF<sub>2</sub> Fluorophores. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (6), 2070–2083. <https://doi.org/10.1021/jo035825g>.
- (2) Das B.; Roy, M. N.; Hazra, D. Densities and Viscosities of the Binary Aqueous mixtures of Tetrahydrofuran and 1,2-Dimethoxyethane at 298, 308 and 318 K. *INDIAN J CHEM TECHNOL* **1994**, *5*.
- (3) Goubault, C.; Sciortino, F.; Mongin, O.; Jarry, U.; Bostoën, M.; Jakobczyk, H.; Burel, A.; Dutertre, S.; Troadec, M.-B.; Kahn, M. L.; Chevance, S.; Gauffre, F. The Ouzo Effect: A Tool to Elaborate High-Payload Nanocapsules. *J. Controlled Release* **2020**, *324*, 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.023>.
- (4) Casterou, G.; Collière, V.; Lecante, P.; Coppel, Y.; Eliat, P.-A.; Gauffre, F.; Kahn, M. L. Improved Transversal Relaxivity for Highly Crystalline Nanoparticles of Pure  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Phase. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21* (51), 18855–18861. <https://doi.org/10.1002/chem.201502905>.
- (5) Gazil, O.; Virgilio, N.; Gauffre, F. Synthesis of Ultrasmall Metal Nanoparticles and Continuous Shells at the Liquid/Liquid Interface in Ouzo Emulsions. *Nanoscale* **2022**, *14* (37), 13514–13519. <https://doi.org/10.1039/D2NR04019K>.
- (6) Sebaugh, J. L. Guidelines for Accurate EC50/IC50 Estimation. *Pharm. Stat.* **2011**, *10* (2), 128–134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>.





**CHAPITRE 6**  
**Conclusion générale**

---



## CHAPITRE 6 : CONCLUSION GÉNÉRALE

---

Les travaux de cette thèse se sont basés sur la méthode de nanoprécipitation par déplacement de solvant en utilisant l'effet Ouzo, une méthode simple à mettre en œuvre et peu coûteuse en énergie. Nous avons cherché à comprendre les phénomènes se déroulant entre le domaine SFME, où se produit une microémulsion thermodynamiquement stable à faible concentration de soluté, et le domaine Ouzo, où le système s'émulsifie spontanément à des concentrations plus élevées pour produire des gouttelettes métastables. Pour cela, nous avons étudié différents systèmes : BHT/THF/H<sub>2</sub>O, Limonène/DMSO/H<sub>2</sub>O, alpha-tocophérol/THF/H<sub>2</sub>O, BODIPY/THF/H<sub>2</sub>O. Par ailleurs, nous avons formulé des nanocapsules hybrides (Hybridosomes<sup>®</sup>) dont la coque se constitue à la fois de nanoparticules inorganiques et de polymère, et ce dans le but d'encapsuler divers principes actifs hydrophobes (liquide ou solide) dans le cœur. Enfin, nous avons formulé des H<sup>®</sup> combinant à la fois les propriétés pharmacologiques d'un principe actif chimiothérapeutique encapsulé, et les propriétés radiothérapeutiques de nanoparticules radiosensibilisantes formant la coque.

Le chapitre 2 nous a permis d'élaborer une démarche rationnelle pour construire les diagrammes de phase et identifier les différents domaines (SFME, Ouzo, etc.). En effet, nous avons compris que l'observation visuelle des échantillons (limpide, trouble, diphasique) ne suffit pas. En particulier, nous avons observé qu'une zone Ouzo pouvait apparaître visuellement limpide aux faibles concentrations de soluté, ce qui n'avait pas été constaté auparavant dans la littérature. Différentes méthodes de caractérisation combinées nous ont permis d'arriver à cette observation et de comprendre les différentes caractéristiques propres à chaque domaine. Grâce à la méthode optique SMLS, nous avons réussi à tracer de manière convaincante la courbe binodale qui caractérise la limite entre le domaine dit thermodynamiquement stable (SFME) et le domaine métastable (Ouzo). Par ailleurs, les mesures NTA nous ont apporté des informations supplémentaires quant à l'évolution continue de la taille du domaine SFME au domaine Ouzo. Pour les différents systèmes étudiés (liquide ou solide), nous avons constaté avec certitude une augmentation considérable de la polydispersité en passant du domaine limpide au domaine trouble. La formation de grandes gouttelettes expliquerait l'aspect turbide des échantillons. Également, la mesure du potentiel zêta a confirmé la présence de charges négatives à la surface des gouttelettes, expliquant la métastabilité du domaine Ouzo. Enfin, la caractérisation par RMN <sup>1</sup>H et l'étude de la fluorescence d'un fluorochrome ont mis en lumière une évolution continue de la composition des gouttes : les gouttes sont initialement gonflées de solvant aux plus faibles concentrations de soluté dans le domaine SFME, puis il y a de moins en moins de solvant dans les gouttes à mesure qu'il y a de plus en plus de soluté introduit dans le système. La Figure 166 permet de résumer l'ensemble de ces observations intéressantes.

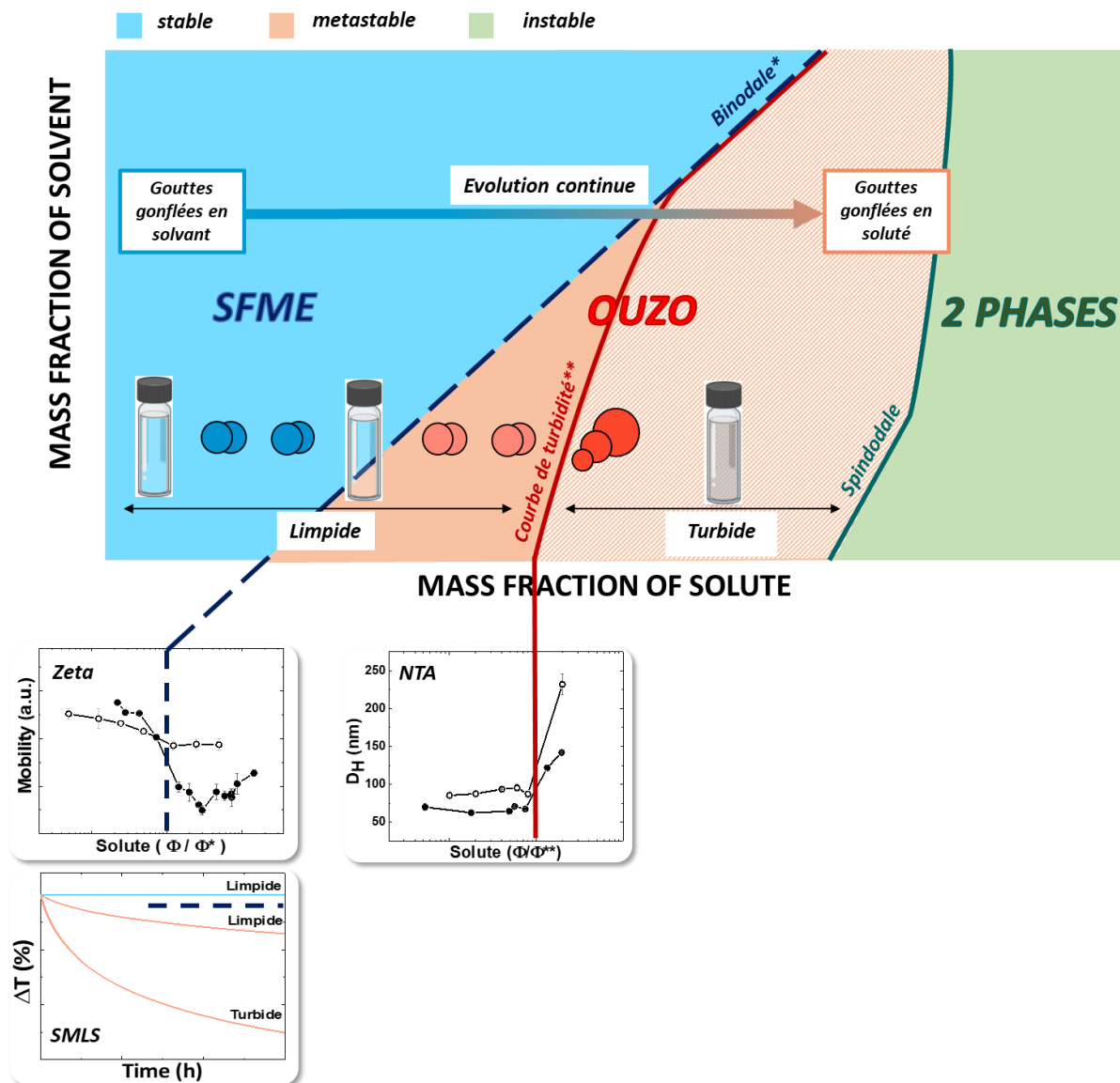


Figure 166 : Résumé des caractéristiques physico-chimiques entre le domaine SFME et le domaine Ouzo issues des différentes méthodes de caractérisation utilisées pour les travaux de thèse (chapitre 2).

Concernant le chapitre 3, nous avons réussi à formuler des nanocapsules ayant un cœur composé uniquement de médicaments hydrophobes et une coque hybride polymère/nanoparticules inorganiques (SPION). En fait, nous avons utilisé la méthode de nanopréciipitation par déplacement de solvant pour former des gouttelettes de principes actifs, au lieu de le solubiliser dans une huile comme majoritairement observé dans la littérature. Notre procédé de fabrication est simple (« one-pot ») et applicable pour des solutés thérapeutiques qui diffèrent par leur état physique (solide ou liquide) ou leur structure chimique (forme moléculaire ou ionique). En se basant sur l'étude des diagrammes de phase, des H<sup>®</sup> de morphologies différentes se sont formés : pour des compositions du domaine SFME, les capsules présentaient contre-intuitivement de très grandes tailles pouvant dépasser les 1  $\mu\text{m}$ , alors que les compositions du domaine Ouzo forment des H<sup>®</sup> de taille homogène autour des 100 nm (Figure 167). Nous avons aussi pu constater à travers cette étude que certains médicaments pouvaient ne pas former de domaine Ouzo (cas du paclitaxel) et qu'il était alors

intéressant de pouvoir utiliser les compositions dans le domaine SFME pour encapsuler ce type de médicament.

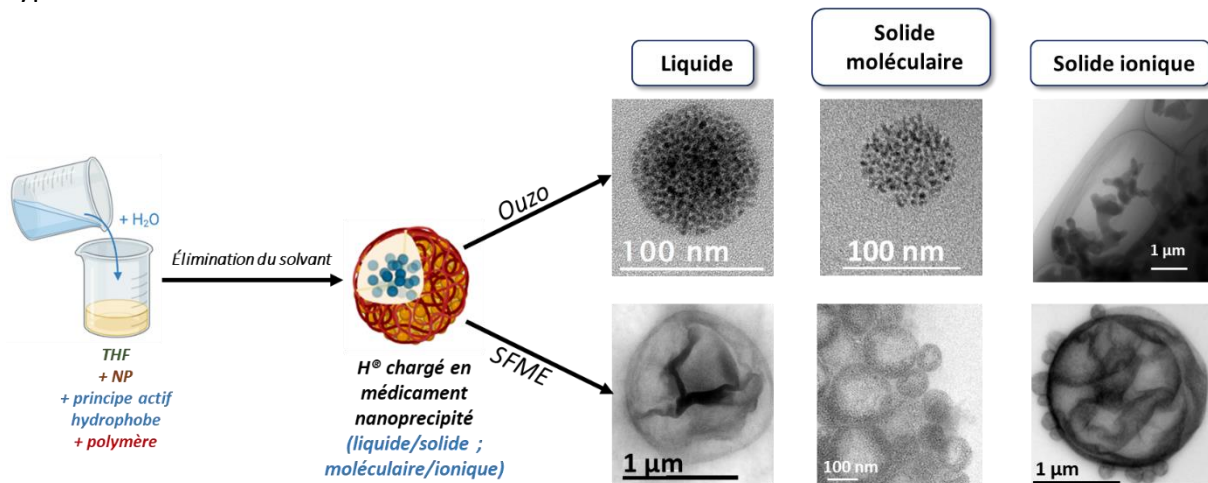


Figure 167 : Résumé du procédé d'élaboration des H<sup>®</sup> et des résultats concernant l'encapsulation de différents principes actifs (liquide/solide ; moléculaire/ionique) pour des compositions se situant soit dans le domaine SFME (MET du bas) soit dans le domaine Ouzo (MET du haut). (Chapitre 3).

Le chapitre 4 est une ouverture vers la thérapie combinée en utilisant à la fois les propriétés chimiothérapeutiques des médicaments encapsulés (chapitre 3) et les propriétés radiosensibilisantes des nanoparticules inorganiques composant la coque des H<sup>®</sup>. Dans cette étude, l'agent chimiothérapeutique encapsulé (sorafénib, prescrit contre le carcinome hépatocellulaire) dans les H<sup>®</sup> qui sont entièrement constitués de nanoparticules d'oxyde de fer (SPION), ou d'or (AuNP), a bien démontré un effet thérapeutique *in vitro*, tuant presque la totalité des cellules de la lignée HuH-7-Luc. Pour la thérapie combinée, plusieurs tests devront être réalisés avec des doses d'irradiation supérieures à 2 Gy afin de confirmer la potentialisation des H<sup>®</sup> entièrement constitués d'or et l'effet synergique médicament/AuNP de notre système contre les cellules cancéreuses. Cependant, d'autres facteurs sont à prendre en compte pour étudier la potentialisation des rayons X par l'utilisation des H<sup>®</sup> formulés. En effet, il paraît difficile de prédire avec précision les effets biologiques en se basant seulement sur la concentration en nanoparticules d'or dans la coque et sur l'énergie du faisceau de rayons X, puisque les espèces réactives de l'oxygène jouent également un rôle majeur dans le mécanisme de radiosensibilisation. C'est pourquoi, nous envisageons d'étudier plus profondément l'effet potentialisateur des H<sup>®</sup> entièrement constitués de nanoparticules d'or ou en partie (SPION/AuNP) dans le cadre d'un financement Plan Cancer INSERM (PCSI). Il s'agira notamment de comprendre le lien entre l'organisation des nanoparticules (en capsules, en « bulk », ou en agrégat) et la potentialisation des rayonnements. Également, il sera question d'analyser les effets de la taille des nanoparticules d'or (~ 3-5 ou 10 nm). Pour relier ces paramètres avec l'effet accentué des rayons X, il est nécessaire d'utiliser des outils de modélisation et des calculs théoriques pour modéliser le dépôt de dose pour ces différents types de capsules. *In fine*, les H<sup>®</sup> combinant ces différentes caractéristiques pourront être testés *in vivo* en combinaison avec divers principes actifs (osimertinib, sorafénib, paclitaxel) selon différents modèles de cancer (poumon, foie, glioblastome). Par ailleurs, une co-encapsulation de deux médicaments, par exemple l'osimertinib et le sorafénib, pourra être envisagée pour évaluer leur efficacité et un effet potentiellement synergique.



Pour la suite du projet portant sur la compréhension des domaines SFME-Ouzo, nous cherchons à étudier plus en profondeur la composition des gouttes de différents systèmes, ainsi que leur structure, dans le domaine SFME et Ouzo. Nous souhaitons aussi comprendre quels sont les phénomènes régissant la nucléation des gouttes afin de mieux contrôler cette étape, et ce, en utilisant un dispositif « stopped-flow » (expériences cinétiques de quelques millisecondes à quelques secondes). En effet, une meilleure compréhension de cette étape de nucléation pourrait nous permettre de mieux contrôler la taille et l'homogénéité des gouttes/nanoparticules produites, ce qui est souhaitable dans une majorité d'applications et serait un plus pour la conception de métamatériaux par exemple. En effet, la formulation de nanorésonateurs plasmoniques par émulsion Ouzo nécessite un assemblage précis de nanoparticule d'or (diamètre compris entre 10 et 15 nm) en NP-shell (gouttelettes recouvertes de nanoparticules à la surface). Effectivement, une certaine distance entre les AuNP permet de conférer un couplage plasmonique aux particules – ce couplage amplifie les propriétés plasmoniques des particules individuelles. Il est possible de contrôler la distance entre ces dernières en modulant le ligand utilisé et, conséquemment, sa longueur (thèse en cours de Mouktar Nour, Figure 168).

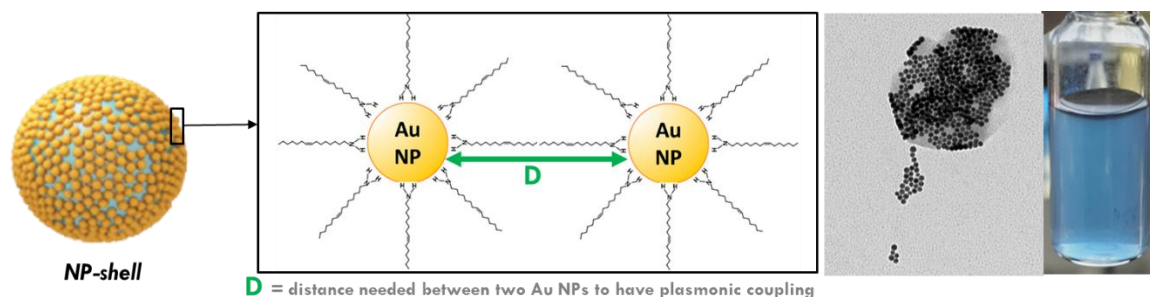


Figure 168 : Formulation de nanorésonateur plasmonique par émulsion Ouzo en élaborant des NP-shell à partir d'AuNP. Illustration schématique à gauche et au milieu, images MET et de l'échantillon à droite obtenues dans les travaux de thèse de Mouktar Nour à droite. Une certaine distance entre les AuNP permet d'obtenir un couplage plasmonique (image à droite, solution bleue).

Par ailleurs, la nanoprécipitation de composés hydrophobes dans les émulsions Ouzo a été utilisée pour précipiter un précurseur organométallique sous forme de gouttelettes. Cela est suivi par une synthèse de nanoparticules à l'interface, induite par l'ajout d'un agent réducteur dans la phase continue. Une nouvelle synthèse *in situ* dans les émulsions Ouzo a ainsi été proposée, en opposition aux nanoparticules synthétisées *ex situ* en question dans cette thèse. Ces travaux (thèse en cours d'Olivier Gazil) devraient permettre une meilleure compréhension de la synthèse de nanoparticules/coques métalliques (Au, Pd, bimétalliques, etc.) via une réaction à l'interface liquide-liquide dans une émulsion Ouzo du système BHT/THF/H<sub>2</sub>O. Cela permettra ainsi d'élargir les possibilités de formation d'Hybridosomes® en introduisant un meilleur contrôle et plus de possibilité sur leur synthèse.

En conclusion, suite à la lecture de cette thèse, vous avez pu apercevoir que les émulsions Ouzo sont encore loin d'être pleinement caractérisées et les phénomènes sous-jacents font toujours place à débat. Toutefois, nous arrivons à mieux caractériser le domaine Ouzo dans les diagrammes de phase, à utiliser convenablement cet effet pour l'encapsulation de composés actifs pour les traitements de type chimiothérapeutique et, enfin, même à utiliser l'effet Ouzo pour de nouveaux types de synthèses.



**Titre : De l'effet Ouzo à la chimioradiothérapie : Formulation de nanocapsules hybrides nanoparticules/polymères pour l'encapsulation de principes actifs par déplacement de solvant**

**Mots clés :** effet Ouzo, nanoparticules, nanocapsules, nanopréciptation, thérapie combinée, médicaments

**Résumé :** L'effet Ouzo est une émulsification spontanée générant des nano-gouttelettes métastables, sans tensioactif ni apport d'énergie. Ce phénomène se produit dans des mélanges ternaires d'une huile hydrophobe, d'un solvant miscible à l'eau et d'eau. Ainsi, l'huile sursaturée s'agrège en petites gouttelettes en suspension dans la phase continue. Un domaine limpide appelé Surfactant-Free MicroEmulsion (SFME) existe dans la région monophasique et est décrit comme une microémulsion stable. Jusqu'à présent, la transition entre les domaines SFME et Ouzo a généralement été caractérisée de manière subjective par l'observation visuelle de la solution (limpide/turbide). Ce travail se concentre sur une compréhension plus objective de cette transition dans différents systèmes, en utilisant plusieurs techniques de caractérisation (potentiel Zêta, Nanoparticle Tracking Analysis - NTA, Static Multiple Light Scattering - SMLS, Résonance Magnétique Nucléaire RMN). Nous avons utilisé l'effet Ouzo en présence de nanoparticules pour produire des nano-

capsules (~ 100 nm de diamètre), appelées Hybridosomes®. Celles-ci sont composées d'une enveloppe de nanoparticules inorganiques (oxyde de fer, Au) stabilisée par un polymère (PEG-PAA, PVPA). Grâce à une bonne connaissance des diagrammes de phase, nous avons réussi à développer un protocole pour encapsuler différents médicaments hydrophobes (liquides ou solides) ayant des caractéristiques différentes (moléculaires, sels, cristallins) dans ces capsules hybrides. La combinaison des propriétés des nanoparticules inorganiques dans la coque et des principes actifs dans le coeur des nanocapsules présentent un réel potentiel pour des applications biomédicales telles que la thérapie (radiothérapie, chimiothérapie). Ainsi, nous avons débuté l'étude *in vitro* de l'efficacité de tels nano-objets dans le traitement du carcinome hépatocellulaire en étudiant les effets chimiothérapeutiques d'un médicament hydrophobe (sorafénib) combinés à la radiothérapie (nanoparticules d'or radiosensibilisantes).

**Title: From the Ouzo effect to chemoradiotherapy: Formulation of hybrid nanoparticle/polymer nanocapsules for the encapsulation of drug substances by solvent displacement**

**Keywords :** Ouzo effect, nanoparticles, nanocapsules, nanoprecipitation, combined therapy, drugs,

**Abstract:** The Ouzo effect is a spontaneous emulsification generating metastable nanodroplets, without using surfactant or energy input. This phenomenon occurs in ternary mixtures of a hydrophobic oil, a water-miscible solvent and water. Thus, the supersaturated oil aggregates into small droplets suspended in the continuous phase. A lipid domain called Surfactant-Free MicroEmulsion (SFME) exists in the monophasic region and is described as a stable microemulsions. Until now, the transition between the SFME and Ouzo domains has generally been characterized in a subjective way by visual observation of the solution (limpid/turbid). Our work focuses on a more objective understanding of this transition in different systems, using several characterization techniques (Zeta potential, Nanoparticle Tracking Analysis – NTA, Static Multiple Light Scattering – SMLS, Nuclear Magnetic Resonance – RMN). We used the Ouzo effect in the presence of

nanoparticles to produce nanocapsules (diameter ~ 100 nm), called Hybridosomes®. These are composed of an inorganic nanoparticle shell (Iron Oxide, Au) stabilized by a polymer (PEG-PAA, PVPA). Thanks to a good knowledge of the phase diagrams, we have successfully developed a protocol to encapsulate different hydrophobic drugs (liquid or solid) that have different characteristics (molecular, salt, crystalline) in these hybrid capsules. The combined properties of the inorganic nanoparticles in the shell and the drugs in the core of the nanocapsules present a real potential for biomedical applications such as therapy (radiotherapy, chemotherapy). We therefore investigated *in vitro* the effectiveness of such nano-objects in the treatment of hepatocellular carcinoma with studying chemotherapeutic effects of a hydrophobic drug (sorafenib) combined with the radiotherapy enhancement (radiosensitizer gold nanoparticles).