

THESE

présentée à
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR ès SCIENCES PHYSIQUES

par
Michel MORCELLET

**ETUDE DE L'ACIDE POLY-L-GLUTAMIQUE
EN SOLUTION DANS DES MELANGES
EAU-SOLVANT ORGANIQUE**



Soutenu le 26 Février 1977, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury :	MM. C. LOUCHEUX	Président
	M. DAUNE	} Rapporteurs
	C. QUIVORON	
	C. STRAZIELLE	
	Mme M.H. LOUCHEUX	} Examineurs
	M. M. LUCQUIN	

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DEHEUVELS,
DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET,
KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE,
MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN,
ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie

M. CARREZ Christian
 M. CORDONNIER Vincent
 M. COQUERY Jean-Marie
 M^{lle} DACHARRY Monique
 M. DEBENEST Jean
 M. DEBRABANT Pierre
 M. DE PARIS Jean-Claude
 M. DHAINAUT André
 M. DELAUNAY Jean-Claude
 M. DERIEUX Jean-Claude
 M. DOUKHAN Jean-Claude
 M. DUBOIS Henri
 M. DYMENT Arthur
 M. ESCAIG Bertrand
 M^{lle} EVRARD Micheline
 M. FONTAINE Jacques-Marie
 M. FOURNET Bernard
 M. FORELICH Daniel
 M. GAMBLIN André
 M. GOBLOT Rémi
 M. GOSSELIN Gabriel
 M. GRANELLE Jean-Jacques
 M. GUILLAUME Henri
 M. HECTOR Joseph
 M. HERMAN Maurice
 M. JOURNEL Gérard
 M^{lle} KOSMAN Yvette
 M. KREMBEL Jean
 M. LAURENT François
 M^{lle} LEGRAND Denise
 M^{lle} LEGRAND Solange
 M. LEROY Jean-Marie
 M. LEROY Yves
 M. LHENAFF René
 M. LOCQUENEUX Robert
 M. LOUCHET Pierre
 M. MACKE Bruno
 M. MAHIEU Jean-Marie
 M^{lle} N'GUYEN VAN CHI Régine
 M. MAIZIERES Christian
 M. MALAUSSENA Jean-Louis
 M. MESSELYN Jean
 M. MONTUELLE Bernard
 M. NICOLE Jacques
 M. PAQUET Jacques
 M. PARSY Fernand
 M. PECQUE Marcel
 M. PERROT Pierre
 M. PERTUZON Emile
 M. PONSOLLE Louis
 M. POVY Lucien
 M. RICHARD Alain
 M. ROGALSKI Marc
 M. ROY Jean-Claude
 M. SIMON Michel
 M. SOMME Jean
 M^{lle} SPIK Geneviève
 M. STANKIEWICZ François
 M. STEEN Jean-Pierre

Informatique
 Informatique
 Psycho-Physiologie
 Géographie
 Sciences Economiques
 Géologie Appliquée
 Mathématiques
 Biologie Animale
 Sciences Economiques
 Microbiologie
 Physique du Solide
 Physique
 Mécanique
 Physique du Solide
 Chimie Appliquée
 Electronique
 Biochimie
 Chimie Physique
 Géographie
 Algèbre
 Sociologie
 Sciences Economiques
 Sciences Economiques
 Géométrie
 Physique Spatiale
 Physique Atomique et Moléculaire
 Géométrie
 Biochimie
 Automatique
 Algèbre
 Algèbre
 Chimie Appliquée
 Electronique
 Géographie
 Physique Théorique
 Sciences de l'Education
 Physique
 Physique Atomique et Moléculaire
 Géographie
 Automatique
 Sciences Economiques
 Physique Atomique et Moléculaire
 Biologie Appliquée
 Chimie Appliquée
 Géologie Générale
 Mécanique
 Chimie Physique
 Chimie Appliquée
 Physiologie Animale
 Chimie Physique
 Automatique
 Biologie
 Analyse
 Psycho-Physiologie
 Sociologie
 Géographie
 Biochimie
 Sciences Economiques
 Informatique

Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LOUAGE Francis	Electronique
Mle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	PANET Marius	Electrotechnique
M.	RACZY Ladislav	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algebre
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BOSCO Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie

M. THERY Pierre
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. WALLART Francis
M. WERNIER Georges
M. WATERLOT Michel
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Electronique
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Chimie
Informatique
Géologie Générale
Algèbre

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MON FILS

A MES AMIS

En témoignage de mon affection

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie macromoléculaire de l'Université des Sciences et Techniques de Lille sous la direction de Monsieur le Professeur Claude LOUCHEUX. Je tiens à le remercier très vivement pour la confiance qu'il m'a témoignée, ainsi que pour les nombreuses et fructueuses discussions que nous avons eues ensemble.

Monsieur Michel DAUNE, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg m'a fait l'honneur d'examiner cette thèse. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance.

Je suis également heureux de remercier Monsieur Claude QUIVORON, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) ainsi que Monsieur Claude STRAZIELLE, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui ont accepté d'examiner ce travail et ont bien voulu faire partie de ce jury.

Mes remerciements vont également à Madame Marie-H. LOUCHEUX qui a toujours témoigné un intérêt bienveillant pour mon travail et qui m'a fait l'honneur de participer au jury.

Je tiens enfin à exprimer ma gratitude à Monsieur Michel LUCQUIN, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille pour avoir bien voulu examiner ce travail et prendre part au jury.

Je suis reconnaissant de l'aide que m'ont apportée Madame Marie-Paule HILDEBRAND et Monsieur Jacky ESTEVEZ qui ont participé pour une large part à la préparation des échantillons d'acide polyglutamique utilisés.

Je remercie également Madame Marie-H. LOUCHEUX qui a mis à ma disposition le dichrographe Roussel-Jouan III, à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

J'associe en une même pensée tous mes camarades de laboratoire qui ont su créer et maintenir une ambiance de travail chaleureuse et décontractée. En particulier les membres du groupe "polypeptides" avec lesquels j'ai eu davantage l'occasion de discuter.

Je remercie tout particulièrement Mademoiselle OLIVIER qui a réalisé avec soin et patience la dactylographie de ce travail, ainsi que Mesdames SAINLEGER et THOMAS qui se sont chargées de son impression.

G L O S S A I R E

PLGA	Acide poly L glutamique
PLGB	Poly L glutamate de benzyle
PHPG	Poly [N 5 (3 hydroxypropyl) L glutamine]

Lorsque la conformation n'est pas précisée, cela sous entend que le composé est sous la forme L.

ETUDE VISCOSIMETRIQUE

η_{sp}	viscosité spécifique
$[\eta]$	viscosité intrinsèque
I	force ionique
C	concentration
a	exposant de la relation de Mark-Houwink
\bar{v}	volume spécifique partiel
F_H	fraction de polymère sous forme hélicoïdale.
ϕ_s	constante universelle de Flory
λ^{-1}	longueur du segment statistique de Kuhn
q	longueur de persistance
L	longueur du contour de la molécule
l	projection d'une unité monomère sur l'axe de l'hélice α
d	diamètre hydrodynamique
S	nombre d'unités monomères par segment statistique
τ_w	temps de relaxation
b_p	longueur d'une liaison non perturbée
a	coefficient d'expansion
M_0	masse moléculaire d'une unité monomère

ETUDE OPTIQUE

$[\alpha]_{334}$	rotation molaire corrigée à 334 nm
$[\theta]$	ellipticité molaire
a_0 b_0	paramètres de l'équation de Moffitt et Yang
F_H	
ϵ	constante diélectrique du solvant
I	force ionique

ETUDE POTENTIOMETRIQUE

K_0	constante de dissociation
α	coefficient de dissociation
$\alpha^{1/2}$	coefficient de dissociation à la demi transition
F_H	fraction de polymère sous forme hélicoïdale
R	constante des gaz parfaits
ΔG_0	énergie libre de transition
ΔH_0	enthalpie libre de transition
ΔS_0	entropie de transition
ϵ	constante diélectrique du solvant
ΔH	enthalpie d'ionisation.

ETUDE DE LA SOLVATATION

$\left(\frac{\partial n}{\partial C_2}\right)_{m_3}$	incrément d'indice à molalité constante du solvant organique
$\left(\frac{\partial n}{\partial C_2}\right)_{\mu_3}$	incrément d'indice à potentiel chimique constant du solvant organique
$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_\mu$	coefficient de solvatisation préférentielle exprimé en g/g

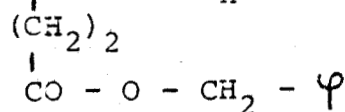
- n indice de réfraction du polymère
- n_0 indice de réfraction du solvant ou du mélange de solvants
- A_1 quantité absolue d'eau adsorbée en g par g du polymère
- A_3 quantité absolue de solvant organique en g par g de polymère.

Depuis la synthèse et les premières études physico-chimiques du poly(L glutamate de Benzyle) (PLGB) et de l'acide poly(L glutamique) (PLGA) ⁽¹⁻⁵⁾ de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude en solution des poly α amino acides synthétiques. En effet, ces homopolypeptides sont considérés comme des modèles simplifiés des protéines naturelles et leur étude physico chimique permet une approche intéressante des facteurs responsables de la stabilité conformationnelle des protéines.

Les protéines et les polypeptides synthétiques peuvent adopter des conformations organisées dont la structure est bien connue : en particulier l'hélice α de PAULING et COREY ou les structures β en feuillets plissés parallèles et antiparallèles. On rencontre aussi des conformations désordonnées appelées également pelote ou chaîne statistique.

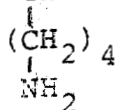
La synthèse de polypeptides de haute masse moléculaire a permis de mettre en évidence par de nombreuses méthodes une transition conformationnelle entre l'hélice α et une conformation désordonnée. Cette transition est provoquée de manière différente selon que l'on a affaire à un polypeptide à chaîne latérale ionisable ou non ionisable :

Si la chaîne latérale n'est pas ionisable (c'est le cas du polyglutamate de benzyle : $(-\text{NH} - \text{CH} - \text{CO}-)_n$



la transition est provoquée par un changement de la composition du solvant ⁽⁶⁾. On utilise dans ce cas un mélange de deux solvants dont l'un stabilise et l'autre déstabilise la conformation hélicoïdale. A composition constante du solvant, la variation de la température peut également induire la transition.

Dans le cas où la chaîne latérale est ionisable (cas de la poly L Lysine : $(-\text{NH} - \text{CH} - \text{CO}-)_n$ ou de l'acide



poly L glutamique $(-\text{NH} - \underset{\substack{| \\ (\text{CH}_2)_2 \\ | \\ \text{COOH}}}{\text{CH}} - \text{CO}-)_n$ c'est l'ionisation des fonc-

tions portées par la chaîne latérale, c'est-à-dire la variation du pH de la solution qui amène une répulsion électrostatique importante conduisant à la destruction de la structure organisée⁽⁷⁾. Dans le cas du PLGA on aura une hélice α aux bas pH et une conformation désordonnée aux pH élevés.

L'étude de ces composés est d'un grand intérêt car la chaîne latérale hydrophile permet la solubilisation de ces polypeptides en milieu purement aqueux. Ceci explique qu'un grand nombre de travaux aient été consacrés au cours de ces vingt dernières années à l'étude de ces systèmes.

Au contraire le nombre de travaux concernant l'étude des polypeptides dans des solvants organiques ou des mélanges eau - solvant organique est beaucoup plus restreint. De plus, dans de nombreux cas, le choix d'un mélange eau - solvant organique n'a été dicté que par des considérations pratiques. Ainsi l'utilisation d'un mélange eau - dioxanne (DOTY et coll.⁽⁴⁾) ou eau - 2 chloroéthanol (GOLDSTEIN et KATCHALSKY⁽⁸⁾) permet d'éviter les phénomènes de précipitation et d'agrégation qui se manifestent dans les solutions aqueuses d'acide polyglutamique aux bas pH.

Parmi les polypeptides étudiés, l'acide poly L glutamique est celui dont les propriétés physico chimiques en solution purement aqueuse sont les mieux connues.

C'est la raison pour laquelle nous l'avons choisi pour une étude en mélange eau/solvant organique, étude dont les résultats peuvent être comparés à ceux fournis par la littérature pour les solutions purement aqueuses.

Dans ce travail nous avons choisi d'utiliser plus particulièrement les mélanges de l'eau avec le dioxanne et le 2 chloroéthanol.

Le dioxanne est connu depuis longtemps comme étant un stabilisant de la conformation hélicoïdale. Il présente l'intérêt de modifier très peu le pH des solutions aqueuses auxquelles il est ajouté. De plus, parmi les solvants organiques miscibles à l'eau, le dioxanne est celui dont la constante diélectrique est la plus faible ($\epsilon = 2,2$ à 25°C contre $78,5$ pour l'eau). Le mélange eau - dioxanne permet donc de faire varier dans de larges proportions la constante diélectrique du solvant ce qui doit se traduire par certaines modifications des propriétés du polymère en solution. Le 2 chloroéthanol est un agent de dénaturation restructurante des protéines. C'est un solvant acide qui, contrairement au dioxanne, amène un abaissement du pH de la solution.

L'étude de l'influence de ces deux solvants sur les différentes conformations et sur la transition conformationnelle sera axée sur trois aspects :

- l'influence de la nature et de la quantité de solvant organique sur la transition induite par le pH.

- à pH constant l'influence de la nature du solvant sur les différentes conformations et leur stabilité.

- la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le changement de la composition du solvant.

Plusieurs méthodes d'étude physico chimiques ont été utilisées :

- la mesure de la viscosité des solutions donne un aspect du comportement hydrodynamique global du polymère et permet dans certaines conditions de mettre en évidence la transition hélice \rightleftharpoons chaîne. Cette méthode a été utilisée pour suivre la transition chaîne hélice dans un mélange NaCl $0,2$ M - dioxanne en fonction du pH. Elle a également été employée pour comparer la coopérativité de la transition dans NaCl $0,2$ M et dans des mélanges NaCl $0,2$ M - dioxanne ⁽⁹⁾. Nous avons cherché à compléter ces résultats en déterminant les paramètres de MARK-HOUWINK dans différentes conditions du pH et de solvant.

- les méthodes optiques telles que la dispersion du pouvoir optique rotatoire (D.O.R.) le dichroïsme circulaire (D.C.) et la spectroscopie infra-rouge (I.R.) donnent une image de la conformation locale du polymère et permettent de caractériser les différentes conformations rencontrées. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le solvant qui a été peu étudiée jusqu'à présent⁽¹⁰⁾. L'influence de divers paramètres sur cette transition chaîne hélice a été examinée.

- l'étude potentiométrique de la transition permet de comparer la stabilité de la conformation hélicoïdale dans les différentes conditions de solvant. Elle fournit en particulier les paramètres thermodynamiques (enthalpie et entropie) de la transition conformationnelle.

- la mesure de la solvation préférentielle du polymère dans le mélange de solvant permet de préciser les interactions entre le polymère et chacun des solvants. Cette solvation préférentielle est due à une différence d'affinité entre le polypeptide sous ses différentes conformations et chacun des solvants constituant le mélange. Cela se traduit par une différence de composition entre la couche de solvation et le reste du solvant qui rend possible la détermination de la solvation préférentielle par différentes méthodes telles que la mesure des incréments d'indice de réfraction.

Moyennant certaines hypothèses sur l'hydratation du polypeptide, il est possible de calculer la solvation absolue par le solvant organique et de suivre son évolution au cours de la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le solvant.

De nombreuses études ont été consacrées à la solvation préférentielle des polymères vinyliques en mélanges de solvants⁽¹¹⁾. D'autre part la solvation préférentielle et absolue de certaines protéines a été étudiée en mélange eau - solvant organique⁽¹²⁻¹⁵⁾. Ce travail, consacré à l'étude de la solvation d'un polypeptide apte à subir une transition conformationnelle en mélange de solvants, est en quelque sorte le lien entre ces deux ensembles de travaux.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

La plupart des travaux consacrés à l'acide poly L glutamique (PLGA) en mélanges de solvants concernent les mélanges eau - méthanol (17-20) eau - éthanol (21-24) eau - chloroéthanol (8,9,25,26) eau - éthylène glycol (25) eau - glycérol (27) et eau - tertiobutanol (28).

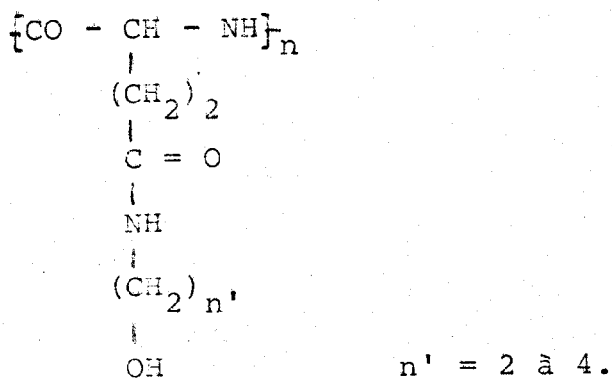
Une grande part de ces travaux est consacrée à la détermination des paramètres thermodynamiques de la transition hélice \rightleftharpoons chaîne au moyen des titrages potentiométriques.

Parmi les autres mélanges de solvants utilisés citons encore le mélange eau - pyridine (29) et, bien sûr, le mélange eau - dioxanne (4,9,10,17,25,27,30-32). Il n'existe cependant pas d'étude complète consacrée au PLGA dans les mélanges eau - dioxanne. Enfin, on peut signaler une étude systématique de CASSIM et TAYLOR (33) portant sur l'influence des solvants organiques sur le paramètre b_0 de la dispersion optique rotatoire.

Parmi les travaux mentionnés ci-dessus un nombre assez restreint d'entre eux a permis de mettre en évidence une transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le changement de composition du solvant. C'est le cas des mélanges eau - méthanol (18) eau - dioxanne (10) et eau - pyridine (29).

D'autres polymères hydrosolubles peuvent subir une transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le solvant. C'est le cas par exemple de la poly L lysine en mélanges eau - méthanol (34,35) ou eau - dioxanne (36).

Au cours de ces dernières années d'autres polypeptides à chaîne latérale hydrophile ont été synthétisés. Il s'agit des poly [N⁵(-hydroxyalkyl)-L glutamines] préparés par action d'un amino alcool sur le poly (L glutamate de benzyle):



Ces polymères qui ne s'ionisent qu'à pH très acide ou très basique peuvent subir eux aussi une transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par l'addition de solvant organique (37,38).

Une étude de l'adsorption préférentielle de la poly (N⁵ (3 hydroxypropyl) L-glutamine) dans les mélanges eau - dioxanne a été publiée très récemment par INOUE et IZUMI (16). Les résultats de ce travail seront comparés à nos propres résultats expérimentaux concernant le PLGA dans le même mélange de solvants.

CHAPITRE I

PREPARATION ET CARACTERISATION

DES ECHANTILLONS

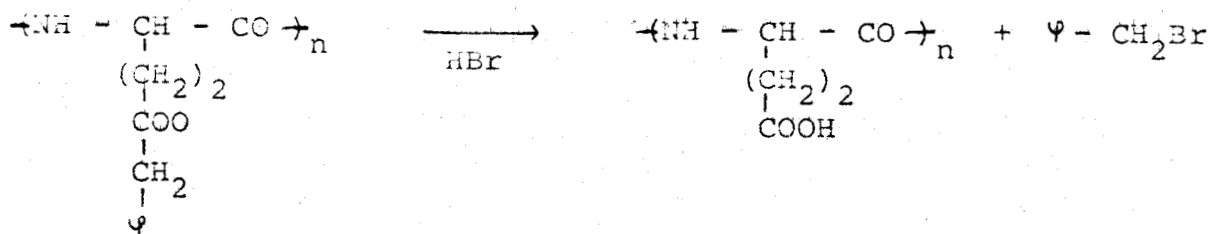
D'ACIDE POLYGLUTAMIQUE.

PREPARATION ET CARACTERISATION DES ECHANTILLONS
D'ACIDE POLY L GLUTAMIQUE (PLGA)

A - PREPARATION

L'acide poly L glutamique est généralement préparé par débenzylation du poly L glutamate de benzyle selon la méthode d'IDELSON et BLOUT⁽¹⁾. Le poly L glutamate de benzyle est lui-même obtenu par polymérisation de l'anhydride de Leuchs (NCA) du glutamate de benzyle effectuée dans le dioxanne anhydre (BLOUT et KARLSON⁽²⁾). L'amorceur utilisé peut être le méthano-late de sodium ou la triéthylamine.

La débenzylation se fait dans un mélange chloroforme/benzène en utilisant l'acide bromhydrique gazeux sec:



Le PLGA insoluble dans le mélange chloroforme-benzène précipite. Il est filtré et lavé à l'acétone.

L'échantillon est ensuite dissous dans la soude 0,1 N, filtré, puis mis à dialyser contre de l'eau renouvelée, pour enlever les impuretés de petite masse moléculaire.

Enfin, on dialyse contre HCl 0,1 N. Le polyglutamate de sodium repasse sous forme acide et précipite. Le PLGA ainsi purifié est lyophilisé.

B - CONTROLE DE LA DEBENZYLATION

La débenzylation est contrôlée par spectrophotométrie U.V. En effet le chromophore benzylique présente une bande d'absorption à 260 nm ($\epsilon = 200 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Le spectre U.V. d'une solution de PLGA (C = 5 g/l) permet, à partir de la densité optique à 260 nm, de calculer la teneur en groupement benzyle. Dans le cas de tous les échantillons utilisés, celle-ci est inférieure à 0,25 %. Dans ces conditions, les quelques groupes benzyle résiduels ont un effet négligeable sur les propriétés du PLGA, comme l'ont montré RAO et MILLER (3) par des mesures de viscosité et de dichroïsme circulaire.

C - MESURE DES MASSES MOLECULAIRES. POLYDISPERSITE.

La débenzylation de la chaîne latérale du PLGB s'accompagne de coupures dans la chaîne principale du polymère. Ceci entraîne une diminution du degré de polymérisation moyen comme le montrent les résultats du tableau I.1.

PLGB		PLGA		Taux de coupure par chaîne
\overline{M}_w	\overline{DP}_w	\overline{M}_w	\overline{DP}_w	
300.000	1370	61.000	473	2,90
100.000	457	33.000	256	1,80

Tableau I.1

Variation du degré de polymérisation au cours de la débenzylation

Il y a donc en moyenne deux coupures par chaîne dans le premier cas et une dans le second, et ceci dans des conditions opératoires identiques. Ceci paraît logique si l'on considère que la probabilité de coupure dans une même chaîne augmente avec la longueur de celle-ci. A priori, on doit s'attendre à ce que les coupures dans la chaîne principale du polymère entraînent une augmentation de la polydispersité de l'échantillon.

La littérature présente peu de données expérimentales concernant la polydispersité des polypeptides polymérisés à partir d'anhydrides de Leuchs. En 1965, BRANT et FLORY (4) ont publié

quelques données expérimentales relatives au polyaspartate de benzyle, au polyglutamate de benzyle, à la polylysine et à l'acide polyglutamique. Dans ce dernier cas, la masse moyenne en nombre \bar{M}_n mesurée est de 68.500 tandis que la masse en poids \bar{M}_w est estimée à 136 000 ce qui donne une polydispersité pratiquement égale à 2. Cependant il faut remarquer que cette valeur de \bar{M}_w est celle indiquée par le fournisseur (Pilot Chemical Co) et de nombreux exemples de la littérature montrent que celle-ci est souvent largement surestimée (5). La polydispersité réelle est donc probablement inférieure à 2. Dans le cas du PLGB, les mêmes auteurs supposent que la distribution est suffisamment étroite pour que l'on puisse assimiler \bar{M}_n à \bar{M}_w . Nous avons tenté d'évaluer la polydispersité de l'un de nos échantillons. Pour cela sa masse moléculaire moyenne en poids \bar{M}_w a été mesurée par deux méthodes :

a) nous avons utilisé l'étalonnage de WADA (6) établi à partir d'échantillons non fractionnés dont la masse en poids \bar{M}_w avait été mesurée de manière absolue par diffusion de lumière.

Cet étalonnage relie \bar{M}_w à la viscosité mesurée dans NaCl 0,2 M à pH 7,3 par la relation :

$$[\eta] = 4,1 \cdot 10^{-5} \bar{M}_w^{0,94}$$

Cette relation donne pour une viscosité de 0,73 dl/g une masse $\bar{M}_w = 33.000$.

b) nous avons mesuré \bar{M}_w par équilibre de sédimentation. Cette méthode absolue donne $\bar{M}_w = 33.600$ en très bon accord avec le résultat précédent.

La masse moléculaire moyenne en nombre \bar{M}_n a été déterminée par osmométrie à l'aide d'un osmomètre à dépression Knauer. La membrane utilisée a une limite évaluée à $M \sim 1500$. Les données expérimentales ont été tracées en tant que $(\frac{\Pi}{C})^{1/2}$ en fonction de C (4). L'extrapolation à $C = 0$ fournit $(\frac{\Pi}{C})_{C \rightarrow 0}$ reliée à \bar{M}_n par la relation :

$$\left(\frac{\Pi}{C}\right)_{C \rightarrow 0} = \frac{RT}{\bar{M}_n}$$

Cette mesure, faite dans les mêmes conditions que la viscosité et l'équilibre de sédimentation, c'est-à-dire dans NaCl 0,2 M à pH 7,3, donne $\overline{M}_n = 23.500 \pm 5000$. La polydispersité est donc dans ce cas égale à environ 1,4.

Cette valeur est assez faible. Cela peut être attribué à une sorte de fractionnement qui a lieu lors de la débenzylation du PLGB. Lorsque le PLGA précipite, les plus petites masses restent en solution. Le PLGA est ensuite dissous dans une solution aqueuse basique, dialysé contre HCl pour obtenir la forme acide et enfin dialysé contre l'eau pour enlever les impuretés de petites masses.

Ces dialyses sont effectuées avec des membranes dont le diamètre de pore correspond à des masses d'environ 300. La polydispersité doit donc être peu affectée par la dialyse.

D - DIFFERENTS ECHANTILLONS UTILISES

Le tableau I.2 présente les différents échantillons d'acide polyglutamique synthétisés, avec leur masse moléculaire en poids. Celles-ci ont été évaluées grâce à la relation de WADA ⁽⁶⁾ donnée plus haut.

Polymère	Masse moléculaire en poids
PGA 10	9 800
PGA 12	12 200
PGA 27	27 000
PGA 33	33 000
PGA 58*	58 000
PGA 61	61 000

Tableau I.2 : Masses moléculaires en poids des différents échantillons utilisés.

* L'échantillon PGA 58 provient de la Société Pilot Chemical Inc. Dans tous les cas la teneur en groupements benzyle résiduels est inférieure à 0,25 %.

CHAPITRE II

ETUDE VISCOSIMETRIQUE

ETUDE VISCOSIMETRIQUE

Nous étudierons dans ce chapitre le comportement viscosimétrique de l'acide polyglutamique en solution aqueuse et dans un mélange de solvant (NaCl 0,2 M/Dioxanne) à différentes valeurs du pH. Nous établirons en particulier les lois de viscosités (relations de MARK-HOUWINK) correspondant à ces conditions expérimentales.

RAPPELS SUR LE COMPORTEMENT VISCOSIMETRIQUE DES POLYMERES CHARGES EN SOLUTION AQUEUSE.

A - L'EFFET POLYELECTROLYTE

En solution aqueuse basique toutes les fonctions carboxyliques portées par les chaînes latérales de l'acide poly L glutamique sont ionisées. Lorsque la force ionique est nulle, c'est-à-dire lorsqu'aucun sel n'a été ajouté à la solution, les seuls ions présents dans la solution en dehors du polyion négatif, sont les contre ions positifs (ex : Na^+) provenant de la salification des fonctions acides. Lorsque l'on dilue une telle solution les ions compensateurs se répartissent dans un plus grand volume autour du polyion tandis que la concentration locale en charges négatives (groupes COO^-) varie peu puisque ces charges sont liées à la chaîne macromoléculaire. L'effet d'écran dû à la présence des contre ions positifs va donc s'atténuer au fur et à mesure de la dilution. Les répulsions électrostatiques entre les groupes chargés portés par la chaîne latérale augmentent alors et l'expansion de la chaîne macromoléculaire s'accroît.

On observe donc une viscosité de plus en plus importante de la solution à mesure que la concentration en polymère diminue. On définit ainsi l'effet polyélectrolyte qui est d'autant plus marqué que le taux de neutralisation du polyacide est grand. Dans le cas des polymères non chargés on caractérise le comportement hydrodynamique par la viscosité intrinsèque $[\eta]$ qui est

l'extrapolation à concentration nulle de la viscosité réduite

$$\frac{\eta_{sp}}{C} :$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)$$

Dans le cas de polymères portant des charges, l'effet polyélectrolyte observé en absence de sel interdit une telle détermination de $[\eta]$. On peut néanmoins exprimer la variation de viscosité en utilisant une relation empirique, celle proposée par FUOSS⁽¹⁾ par exemple :

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = \frac{A}{1 + B\sqrt{C}} \quad (\text{II-1})$$

L'addition de sel à une solution de polymère chargé réduit l'importance de l'effet polyélectrolyte et permet de retrouver, pour une force ionique suffisante, une variation linéaire de $\frac{\eta_{sp}}{C}$ avec la concentration.

B - INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE

L'addition à la solution de polyélectrolyte d'un électrolyte fort permet d'atténuer l'effet polyélectrolyte de telle sorte que la courbe $\frac{\eta_{sp}}{C} = f(C)$ soit une droite. On peut ainsi déterminer $[\eta]$ de manière classique par l'extrapolation à concentration nulle. C'est ainsi qu'on peut évaluer la masse moléculaire d'un échantillon d'acide polyglutamique par une mesure de $[\eta]$ dans NaCl 0,2 M à pH 7,3⁽²⁾.

Si on augmente encore la force ionique, l'effet d'écran s'intensifie et on observe une diminution importante de la viscosité intrinsèque. PALS et HERMANS⁽³⁾ ainsi que FUOSS et STRAUSS⁽⁴⁾ ont montré que la viscosité intrinsèque varie linéairement avec la racine carrée de la force ionique I.

$$[\eta] = \frac{A}{1 + B\sqrt{I}} \quad \text{ou} \quad [\eta] = a + bI^{-1/2} \quad (\text{II-2})$$

COMPORTEMENT VISCOSIMETRIQUE DU PLGA EN MELANGES DE SOLVANTS
RESULTATS EXPERIMENTAUX

A - LA TRANSITION HELICE \rightleftharpoons CHAINE INDUITE PAR LE pH

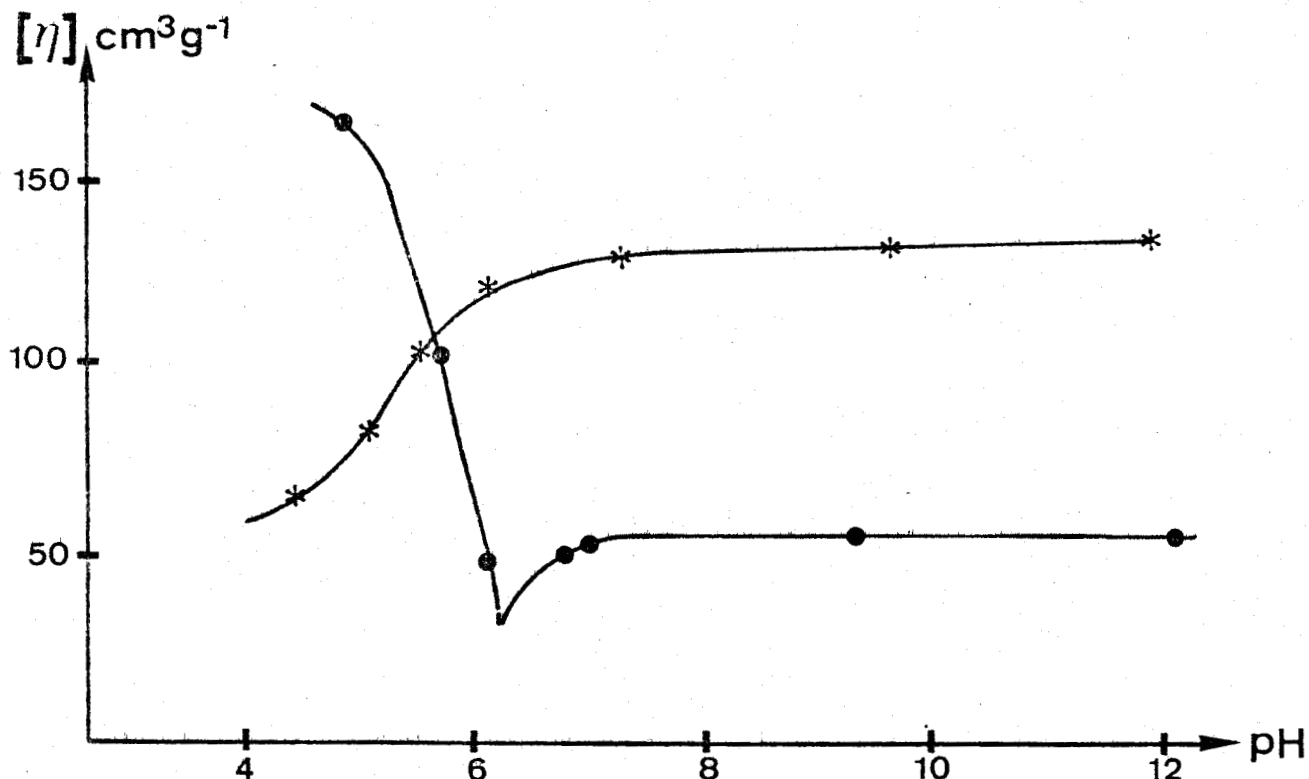


Figure II-1 : Transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le pH pour l'échantillon PGA 58 :

* dans NaCl 0,2 M

● dans NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1 en volume)

La figure II-1 montre la variation de la viscosité intrinsèque du PLGA en fonction du pH dans une solution de NaCl 0,2 M et dans un mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1 en volume par volume) pour l'échantillon de masse moléculaire moyenne en poids $\overline{M}_w = 58\ 000$. Ces deux courbes sont similaires à celles publiées par DOTY et coll. (5) et par PTITSYN (6). Elles permettent de mettre en évidence la transition entre l'hélice α stable aux bas pH et une forme désordonnée stable aux pH élevés.

La comparaison des deux courbes montre que l'addition de dioxanne déplace le pH de la transition de 5,5 dans NaCl 0,2 M à 5,9 dans NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1 ; v/v).

Dans NaCl 0,2 M la viscosité de la forme hélicoïdale est inférieure à celle obtenue aux pH plus élevés. On peut trouver à cela deux explications :

- tout d'abord la force ionique 0,2 M n'est pas suffisante pour supprimer entièrement toute interaction électrostatique entre les charges portées par les chaînes latérales. On est donc en présence d'une structure désordonnée assez étendue dont le comportement hydrodynamique est très différent de celui d'une véritable pelote statistique. Ceci est confirmé par le fait que si on augmente la force ionique de 0,2 M à 5 M la viscosité intrinsèque passe de 130 à 86 cm³/g.

- En milieu acide la viscosité de l'hélice α est beaucoup plus faible que celle qu'on peut attendre d'un bâtonnet rigide d'une masse égale à 58 000. On peut donc supposer qu'en solution purement aqueuse, l'hélice de PLGA n'est pas parfaitement rigide mais présente un certain nombre de cassures le long du bâtonnet. L'addition de dioxanne en milieu acide amène une augmentation importante de la viscosité intrinsèque de l'hélice α .

Au contraire, en milieu basique le dioxanne provoque une diminution importante de la viscosité.

Aux deux pH extrêmes (pH 4,8 et 11,7) la variation de viscosité se fait très progressivement lorsqu'on fait varier la composition en dioxanne de 0 à 33 % (figure II-2). Pour un pourcentage plus élevé de dioxanne le polymère précipite lorsque l'on est en présence de sel.

Afin de décrire d'une manière plus complète les caractéristiques hydrodynamiques des conformations rencontrées dans les différentes conditions de solvant et de pH, il est plus intéressant de déterminer les paramètres K et a de la relation de MARK-HOUWINK

$$[\eta] = K M^a \quad (\text{II-3})$$

dans laquelle les paramètres K et a dépendent de la nature du couple polymère-solvant. La valeur de a en particulier peut être utilisée comme une évaluation de la rigidité de la macromolécule.

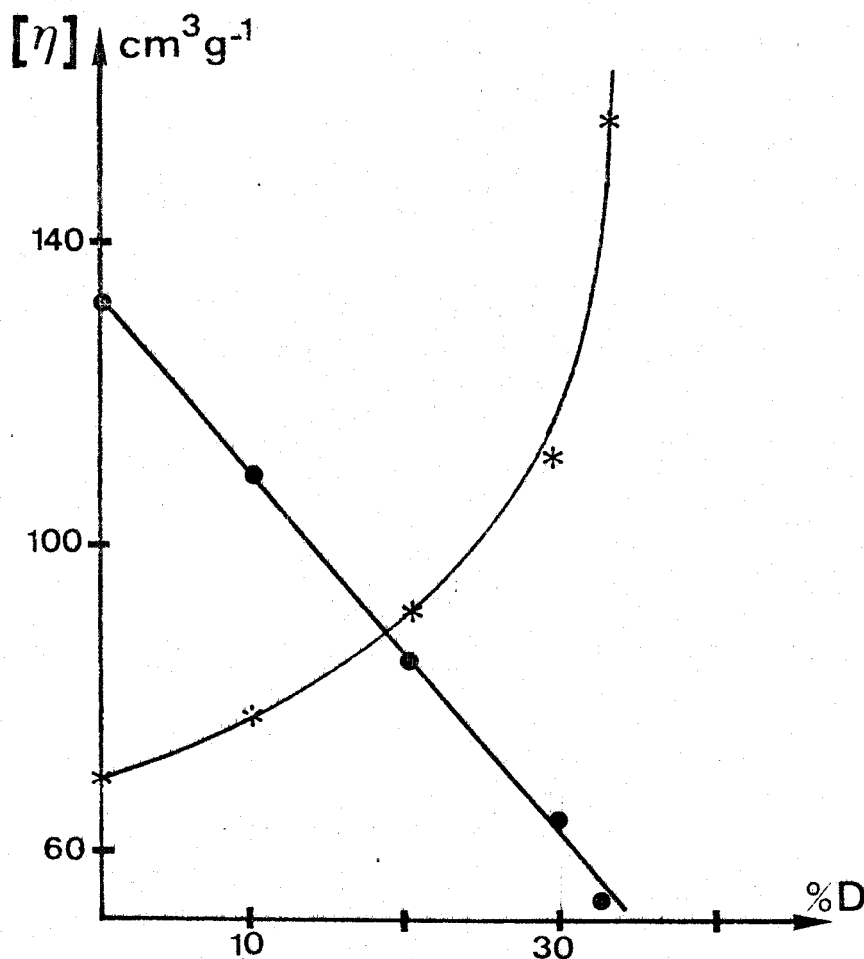


Figure II-2 : Variation de la viscosité de l'échantillon PGA 58 en fonction de la composition en dioxanne :

* pH 4,8 ; ● pH 11,7

3 - DETERMINATION DES PARAMETRES DE LA RELATION DE MARK-HOUWINK

La relation de MARK-HOUWINK $[\eta] = K M^a$ peut être établie en mesurant la viscosité intrinsèque d'échantillons de PLGA de masses moléculaires différentes.

1 - Masses moléculaires des échantillons utilisés :

Cinq échantillons différents ont été utilisés. Leurs masses moléculaires en poids \overline{M}_w ont été déterminées par mesures de viscosité dans NaCl 0,2 M à pH 7,3 en utilisant l'étalonnage de WADA (2). Cet étalonnage est basé sur des mesures absolues de \overline{M}_w par diffusion de la lumière pour des échantillons non fractionnés de masse comprise entre 22 000 et 56 000.

Le tableau II-1 regroupe les caractéristiques des échantillons que nous avons utilisés.

Polymère	[η] à pH 7,3 dans NaCl 0,2 M	\overline{M}_w (viscosité)	\overline{M}_w (ultracentrifugation)
PGA ₁₀	24,0 cm ³ /g	9 800	9 400
PGA ₁₂	29,0 cm ³ /g	12 200	
PGA ₃₃	73,0 cm ³ /g	33 000	33 600
PGA ₅₈	127,0 cm ³ /g	58 000	
PGA ₆₁	130,6 cm ³ /g	61 000	

Tableau II-1 : Viscosité et masse moléculaire moyenne en poids des échantillons de PLGA utilisés.

Il est important de noter que l'utilisation d'un tel étalonnage peut entraîner une erreur dans la détermination des masses si les caractéristiques de l'échantillon, et en particulier sa polydispersité, sont différentes de celles des échantillons utilisés pour l'établissement de la loi de viscosité. C'est pourquoi nous avons effectué sur deux de nos échantillons une mesure absolue de la masse moléculaire en poids \overline{M}_w par équilibre de sédimentation. Ces mesures ont été effectuées dans NaCl 0,2 M à pH 7,3 pour les polymères PGA₁₀ et PGA₃₃. La valeur de \overline{M}_w est obtenue à partir de la relation :

$$\overline{M}_w = \frac{2 RT}{(1 - \bar{v}\rho)\omega^2} \frac{\ln \frac{c_2}{c_1}}{(r_1^2 - r_2^2)} \quad (\text{II-4})$$

- où \overline{M}_w est la masse moléculaire
 R est la constante des gaz parfaits égale à $8,313 \cdot 10^7$
 T est la température absolue
 \bar{v} est le volume spécifique partiel du polymère
 ρ est le volume spécifique du solvant

C_1 et C_2 sont les concentrations en soluté aux distances r_1 et r_2 de l'axe du rotor

ω est la vitesse angulaire de rotation

Le choix de la valeur de \bar{v} est important car il conditionne la précision sur la valeur de \bar{M}_w .

On trouve dans la littérature différentes valeurs de \bar{v} pour le PLGA :

$$\bar{v} = 0,675 \text{ cm}^3/\text{g} \text{ dans le diméthylformamide (7)}$$

$$\bar{v} = 0,66 \text{ cm}^3/\text{g} \text{ en solution aqueuse (8)}$$

La valeur $\bar{v} = 0,66 \text{ cm}^3/\text{g}$ semble la plus convenable car elle a été déterminée en solution aqueuse et correspond aux conditions de mesures viscosimétriques. Cependant la différence obtenue en utilisant la valeur $\bar{v} = 0,675 \text{ cm}^3/\text{g}$ est faible ; en effet selon la valeur de \bar{v} , on obtient pour PGA_{10} :

$$9100 < \bar{M}_w < 9600$$

et pour PGA_{33} :

$$32800 < \bar{M}_w < 34400$$

La valeur moyenne de \bar{M}_w pour ces échantillons est donnée dans le tableau II-1.

On constate un très bon accord entre les valeurs déterminées par viscosité et équilibre de sédimentation ce qui justifie l'utilisation de l'étalonnage de WADA (2).

La détermination de \bar{M}_w par une méthode absolue est particulièrement importante dans le cas de l'échantillon PGA_{10} . En effet, dans le cas des polymères de faible masse moléculaire l'utilisation d'un étalonnage viscosimétrique et de la loi

$[\eta] = K M^a$ conduit généralement à des masses surestimées. L'erreur peut être d'autant plus importante que l'on utilise dans

ce cas précis une extrapolation et non une interpolation de la loi de WADA. Une telle surestimation de \overline{M}_w conduirait à une sous-estimation du paramètre a , déterminé dans d'autres conditions de solvant.

2 - Mesures de viscosité dans différentes conditions de solvant.

a) Mesures en mélange eau - dioxanne :

Les mesures de viscosité ont été effectuées dans des conditions telles que la fraction F_H de polymère sous forme d'hélice α soit égale à 1,0 ; 0,5 ou zéro quelle que soit la proportion de dioxanne dans le solvant. (La valeur de F_H est déterminée par dichroïsme circulaire en utilisant la relation :

$$F_H = \frac{[\theta] - [\theta]_c}{[\theta]_h - [\theta]_c}$$

dans laquelle $[\theta]$ est l'ellipticité du polymère. $[\theta]_h$ et $[\theta]_c$ sont les ellipticités des formes entièrement hélicoïdale et entièrement désordonnée).

Le polymère est alors entièrement hélicoïdal, à la demi-transition ou entièrement sous forme désordonnée.

Les conditions expérimentales sont :

NaCl 0,2 M :

$$F_H = 0 \quad \text{à pH } 7,3$$

$$F_H = 0,5 \quad \text{à pH } 5,0$$

$$F_H = 1,0 \quad \text{à pH } 4,3$$

NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1 ; v/v)

$$F_H = 0 \quad \text{à pH } 7,3$$

$$F_H = 0,5 \quad \text{à pH } 5,9$$

$$F_H = 1,0 \quad \text{à pH } 5,0$$

Les viscosités intrinsèques (exprimées en cm^3/g) obtenues dans ces conditions sont reportées dans le tableau II-2.

Polymère	PGA ₁₀	PGA ₁₂	PGA ₃₃	PGA ₅₈	PGA ₆₁
NaCl 0,2 M pH 7,3 F _H = 0	24,0	29,0	73,0	127,0	130,6
NaCl 0,2 M pH 5,0 F _H = 0,5		13,6	44,1	74,4	80,0
NaCl 0,2 M pH 4,3 F _H = 1		15,6	48,1	98,1	100,2
NaCl 0,2 M/Diox. pH 7,3 F _H = 0		16,2	34,4	54,0	47,2
NaCl 0,2 M/Diox. pH 5,9 F _H = 0,5	13,0		45,0	87,0	
NaCl 0,2 M/Diox. pH 5,0 F _H = 1		19,3	76,6	156,0	194,0

Tableau II-2 : Viscosités intrinsèques des échantillons de PLGA dans différentes conditions de solvant et de pH.

Les résultats expérimentaux ont été traités par la méthode des moindres carrés linéaires de manière à déterminer les paramètres K et a de la relation de MARK-HOUWINK.

Ces valeurs sont données dans le tableau II-3.

	pH	F _H	a	10 ⁶ K
PLGA dans NaCl 0,2 M	4,3	1	1,09	4,6
	5,0	0,5	1,09	5,4
	7,3	0	0,94	41
PLGA dans NaCl 0,2 M/ Dioxanne (2/1 ; v/v)	5,0	1	1,40	0,40
	5,9	0,5	1,07	6,5
	7,3	0	0,72	200

Tableau II-3 : Paramètres de l'équation de MARK-HOUWINK pour le PLGA dans NaCl 0,2 M et le mélange NaCl 0,2 M-Dioxanne (2/1 en volume).

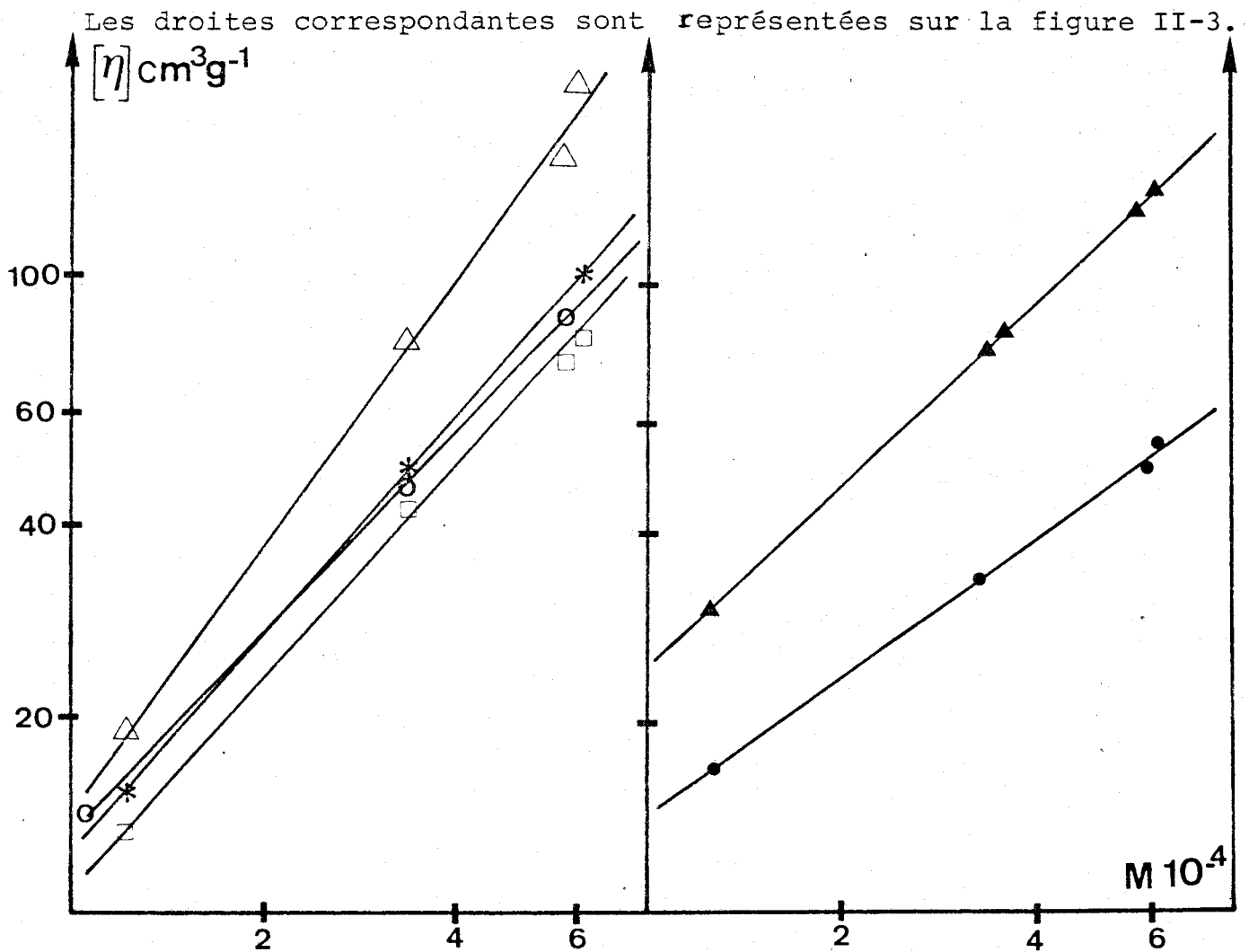


Figure II-3 : Lois de viscosité pour le PLGA :

- * NaCl 0,2 M $F_H = 1$; Δ NaCl 0,2 M/Dioxanne $F_H = 1$
- \square NaCl 0,2 M $F_H = 0,5$; \circ NaCl 0,2 M/Dioxanne $F_H = 0,5$
- \blacktriangle NaCl 0,2 M $F_H = 0$; \bullet NaCl 0,2 M/Dioxanne $F_H = 0$

b) Mesures en mélange eau - 2 chloroethanol.

Nous avons également effectué quelques mesures de viscosité sur les échantillons PGA_{10} PGA_{33} et PGA_{61} dans un mélange NaCl 0,2 M/2 chloroethanol (2/1 ; v/v) à pH 5,0 conditions dans lesquelles la molécule est entièrement sous forme hélicoïdale. (Tableau II-4) (Figure II-4).



Echantillon	\overline{M}_w	$[\eta]$ cm ³ /g	KK	ca
PGA ₁₀	9800	9,0		
PGA ₃₃	33000	62,0	33,11 10 ⁻¹⁸	11,60
PGA ₆₁	61000	166,0		

Tableau II-4 : Paramètres de l'équation de MARK-KOUWINK pour le PLGA dans NaCl 0,2 M/chloroethanol pH 5,0

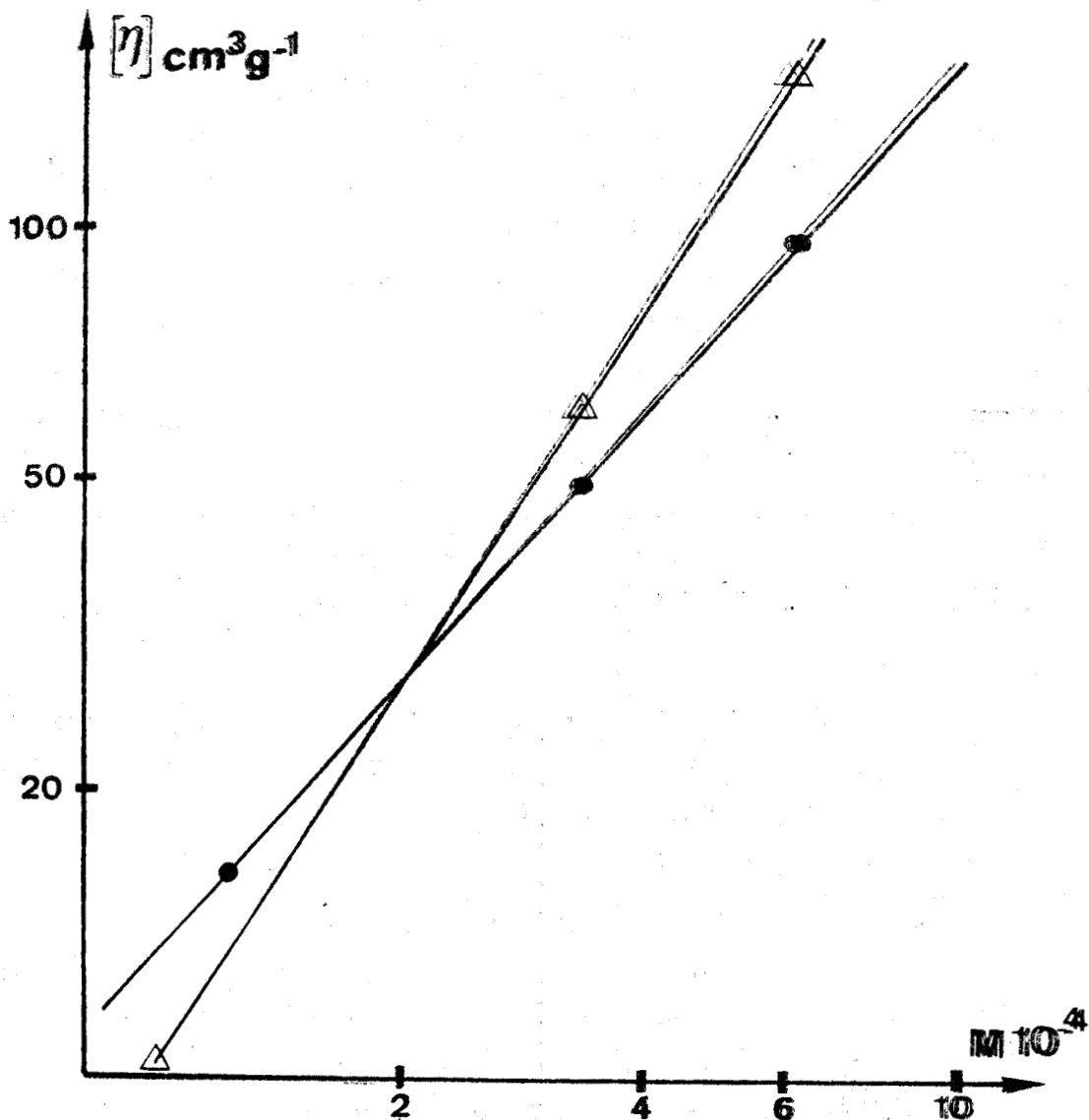


Figure II-4 : Lois de viscosité pour le PLGA:

● NaCl 0,2 M pH 4,3 ; △ NaCl 0,2 M/2-chloroethanol (2/1) pH 5,0

C. - DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS

1 - Milieu acide ; modèles proposés

En milieu acide la molécule est une hélice plus ou moins rigide selon la nature du solvant ou du mélange de solvants (l'hélicité est toujours de 100 % mais le coefficient a de MARK-HOUWINK varie de 1,09 à 1,60). La comparaison des résultats obtenus en milieu acide pour $F_H = 1$ montre que l'addition de dioxanne augmente la rigidité de l'hélice α puisque le coefficient a prend une valeur plus proche de la valeur théorique de 2. La valeur $a = 1,40$ pour une solution contenant 33 % de dioxanne peut être comparée à d'autres valeurs trouvées dans la littérature. En particulier SCHIFFER et HOLTZER ⁽⁹⁾ ont trouvé $a = 1,61$ pour le PLGA en solution dans le N méthylacétamide pur. Ce solvant est connu comme un puissant agent stabilisant de la conformation hélicoïdale du PLGA. L'énergie de transition nécessaire pour passer de l'hélice α à une configuration désordonnée est en effet dix fois plus grande dans le N méthylacétamide que dans l'eau ⁽¹⁰⁾. Malheureusement le PLGA n'est pas soluble dans le dioxanne pur. On observe néanmoins une augmentation de la rigidité de l'hélice par addition de dioxanne à une solution aqueuse.

Nos résultats sont également comparables à ceux de LOTAN et coll. ⁽¹¹⁾ qui ont étudié la poly hydroxypropyl glutamine (PHPG) dans le méthanol. Ce polypeptide est alors sous forme d'hélice α et $a = 1,5$.

Les résultats obtenus en mélange eau - chloroethanol (figure II-4 et Tableau II-4) montrent que, comme dans le cas du dioxanne l'addition de chloroéthanol augmente la rigidité de l'hélice α . Nous verrons plus loin que parallèlement l'addition de chloroethanol augmente l'énergie de stabilisation de l'hélice α d'une manière plus importante que ne le fait le dioxanne. Pour expliquer la faible viscosité de l'hélice de PLGA en milieu purement aqueux nous envisagerons successivement plusieurs hypothèses :

- des cassures d'origine chimique dues à des réactions parasites au niveau de quelques résidus lors de la débenzylation du polyglutamate de benzyle.

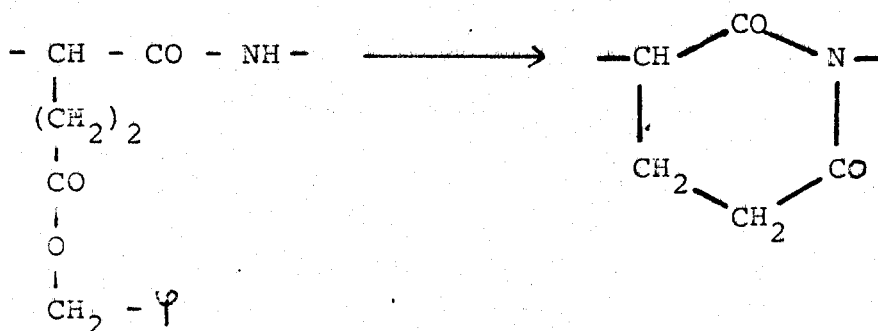
- des cassures d'origine physique dues à la rupture de liaisons hydrogène intramoléculaires le long de l'axe de l'hélice. Le modèle correspondant est le modèle d'"hélice brisée"

- des cassures d'origine physique mettant en jeu des structures particulières telles que " β turns" ou " γ turns".

- il est également possible d'envisager un modèle de bâtonnet ne présentant pas de cassure nette mais ayant une souplesse suffisante pour que l'écart quadratique moyen et donc la viscosité soient inférieurs à l'écart quadratique moyen et la viscosité d'un bâtonnet parfaitement rigide. Un tel bâtonnet souple peut être représenté par le modèle de cylindre courbe continu proposé par YAMAKAWA et FUJII. La rigidité de la molécule est alors caractérisée par sa longueur de persistance.

a) Cassures d'origine chimique :

ADLER, FASMAN et BLOUT (12) ont montré que dans certaines conditions la débenzylation du polyaspartate de benzyle conduit à des réactions de cyclisation (formation de polysuccinide) et que la débenzylation du polyglutamate de benzyle conduit à une dépolymérisation. Dans le cas du polyglutamate de benzyle une éventuelle réaction de cyclisation serait :



Dans cette hypothèse les liaisons hydrogène intramoléculaires NHCO le long de l'axe de l'hélice du PLGA seraient

interrompues au niveau des résidus ayant subi la cyclisation, ce qui expliquerait l'existence de cassures.

Il faut cependant remarquer que :

- la réaction de cyclisation n'a été mise en évidence que dans le cas du polyaspartate de benzyle. Dans le cas du polyglutamate de benzyle c'est une dépolymérisation qui est observée dans les mêmes conditions opératoires.

- ces réactions n'ont lieu que lorsqu'elles sont catalysées par le méthanolate de sodium dans des solvants tels que le diméthylformamide, diméthylsulfoxyde et N méthylacétamide. Dans les conditions que nous avons utilisées pour débénzyler nos échantillons de PLGB (débénylation par HBr dans un mélange chloroforme-benzène) la débénylation se déroule sans réaction secondaire (12).

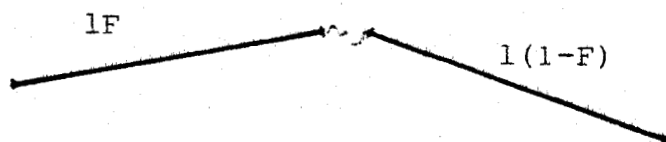
L'hypothèse de réactions de cyclisation semble donc devoir être exclue. De plus, on conçoit mal comment l'addition de dioxanne à la solution pourrait augmenter la rigidité de l'hélice si les cassures sont dues à une modification chimique de la molécule.

b) Cassures d'origine physique

Nous envisagerons maintenant l'existence de cassures dues à la rupture de certaines liaisons hydrogène le long de l'axe de l'hélice en l'absence de toute modification chimique de la molécule. Dans un premier temps nous supposons les cassures telles que l'on puisse considérer la molécule comme étant formée de deux ou plusieurs bâtonnets rigides reliés entre eux par un ou plusieurs joints flexibles (modèle de l'"hélice brisée"). Dans un second temps nous envisagerons des cassures à structures bien définies telles que des " β turns" ou des " γ turns".

α) modèle de YU et STOCKMAYER et de TAKI et FUJITA :

Le modèle de calcul proposé par YU et STOCKMAYER⁽¹³⁾ est constitué de deux bâtonnets rigides reliés par un joint flexible autour duquel la molécule possède une certaine souplesse.



Soient l la longueur de la molécule et F la fraction de cette molécule qui constitue l'un des bâtonnets.

Les calculs de YU et STOCKMAYER aboutissent à l'équation :

$$\frac{[\eta]_B}{[\eta]_R} = 1 - 0,6 F (1 - F) \quad (\text{II-5})$$

dans laquelle $[\eta]_R$ et $[\eta]_B$ sont les viscosités du modèle parfaitement rigide et du modèle présentant une cassure. Selon la position du joint flexible, c'est-à-dire selon la valeur de F on obtient les valeurs représentées sur la figure II-5.

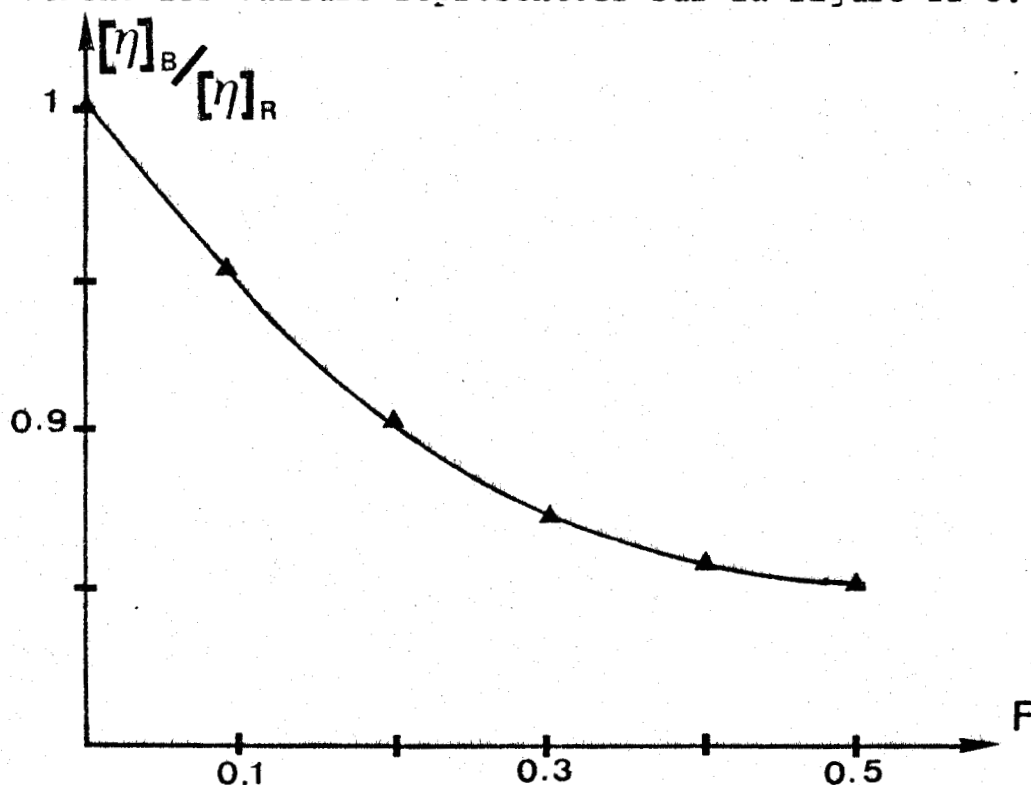


Figure II-5 : Variation de viscosité du modèle de YU et STOCKMAYER ⁽¹³⁾ selon la position du joint flexible.

On constate que, selon la théorie de YU et STOCKMAYER, la variation de viscosité serait au maximum de 15 % ce qui ne peut rendre compte de nos résultats.

Les résultats de YU et STOCKMAYER ont été récemment remis en cause par TAKI et FUJITA ⁽¹⁴⁾. Observant que la diminution de 15 % de viscosité calculée par YU et STOCKMAYER paraît faible si on considère que le carré moyen du rayon de giration diminue de 37 %, ces auteurs ont repris ces calculs en utilisant une solution asymptotique de l'équation intégrale proposée par YAMAKAWA et FUJII ⁽¹⁵⁾. Leurs calculs aboutissent à un rapport $\frac{[\eta]_B}{[\eta]_R} = \frac{5}{8}$ ce qui signifie que l'introduction d'un joint flexible au centre de la molécule diminuerait la viscosité de 38 %, résultat très différent de celui de YU et STOCKMAYER.

En utilisant une méthode de calcul différente, HASSAGER ^(16a) aboutit au même résultat que TAKI et FUJITA.

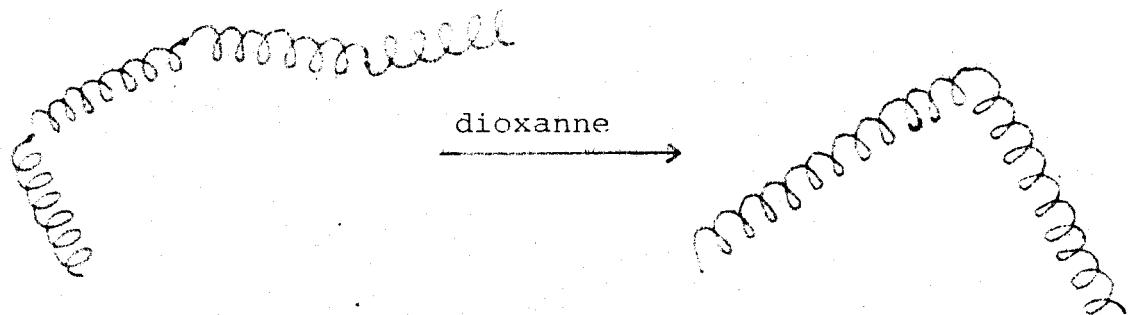
Dans notre cas la diminution de viscosité est d'environ 40 % pour les échantillons de masse comprise entre 33 000 et 61 000 lorsqu'on passe du mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1) à NaCl 0,2 M. Nos résultats semblent donc pouvoir être interprétés par la théorie de TAKI et FUJITA. Cependant il faut remarquer que même en présence de dioxanne la molécule n'est pas un bâtonnet parfaitement rigide. La diminution de viscosité de l'hélice dans l'eau par rapport à un bâtonnet idéal est donc supérieure à 40%. De plus la valeur de 38 % calculée par TAKI et FUJITA est un maximum puisqu'elle s'applique à un bâtonnet présentant une cassure au centre de la molécule. Si l'on veut faire appel à un modèle, il est donc nécessaire de faire intervenir au moins deux cassures (modèle de l'hélice brisée).

8) Modèle de "l'hélice brisée".

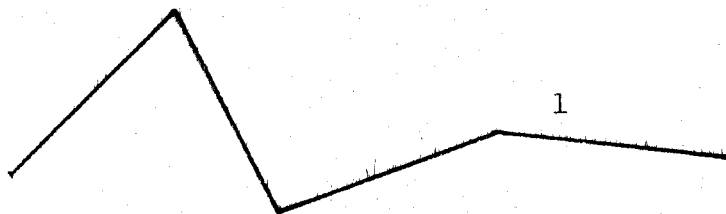
Nous envisageons maintenant comme modèle pour la molécule de PLGA en solution aqueuse un bâtonnet qui présenterait un certain nombre de cassures telles que la molécule puisse prendre une conformation relativement compacte correspondant à

la valeur $a = 1,09$. L'addition de dioxanne supprimerait certaines de ces cassures rendant ainsi la molécule plus rigide ($a = 1,40$).

On peut interpréter cela en termes de liaisons hydrogène. En effet le dioxanne forme moins facilement que l'eau des liaisons hydrogène intermoléculaires avec le soluté (5). Si on enrichit le solvant en dioxanne, on doit donc favoriser les liaisons hydrogène intramoléculaires qui sont responsables de la stabilité de l'hélice α . Cette interprétation peut être rapprochée de la notion de dénaturation restructurante selon JIRGENSONS (16b). Le schéma ci-dessous représente le modèle proposé:



On peut chercher à évaluer le nombre moyen de segments hélicoïdaux du modèle proposé. Pour cela nous avons assimilé cette molécule modèle à une chaîne de Gauss dont le chaînon est représenté par la portion d'hélice située entre deux points de cassure :



On envisage donc un ensemble de n chaînons hélicoïdaux de longueur l . Si on suppose que les chaînons ont la même longueur, chacun d'eux contient $\frac{DP}{n}$ unités de répétition (DP est le degré de polymérisation). Comme chaque monomère contribue pour $1,5 \text{ \AA}$ à la longueur du chaînon (projection d'une unité monomère sur l'axe d'une hélice α) la longueur de chaque chaînon est :

$$l = 1,5 \frac{DP}{n} \text{ \AA} = 1,5 \cdot 10^{-8} \frac{DP}{n} \text{ cm} \quad (\text{II-6})$$

L'écart quadratique moyen $(\bar{r}^2)^{1/2}$ est exprimé par :

$$\bar{r}^2 = n l^2 \quad (\text{II-7})$$

D'après la théorie de KIRKWOOD-RISEMAN ⁽¹⁷⁾ la viscosité intrinsèque $[\eta]$ d'une telle molécule est donnée par la relation :

$$[\eta] M = \phi (\bar{r}^2)^{3/2} \quad (\text{II-8})$$

dans laquelle M est la masse moléculaire du polymère et ϕ est la constante de FLORY égale à $2,86 \cdot 10^{21}$.

M est reliée à la masse M_0 d'une unité monomère par la relation :

$$M = DP \times M_0$$

La longueur totale du bâtonnet est égale à :

$$nl = 1,5 \cdot 10^{-8} DP \quad (\text{exprimée en cm})$$

D'où $n^2 l^2 = (1,5)^2 \cdot 10^{-16} DP^2$

Comme $\bar{r}^2 = nl^2$, on obtient :

$$n\bar{r}^2 = (1,5)^2 \cdot 10^{-16} DP^2$$

ou
$$\frac{DP}{n} = \frac{\bar{r}^2}{(1,5)^2 \cdot 10^{-16} DP} \quad (\text{II-9})$$

En remplaçant \bar{r}^2 par son expression en fonction de $[\eta]$, M et ϕ , on obtient finalement :

$$\frac{DP}{n} = \frac{1}{(1,5)^2 \cdot 10^{-16} \cdot DP} \left[\frac{[\eta] \cdot M}{\phi} \right]^{2/3} = 22,07 \frac{[\eta]^{2/3} \cdot M^{2/3}}{DP} \quad (\text{II-10})$$

expression dans laquelle $[\eta]$ doit être exprimée en dl/g.

$\frac{DP}{n}$ représente le nombre moyen de résidus par chaînon hélicoïdal rigide.

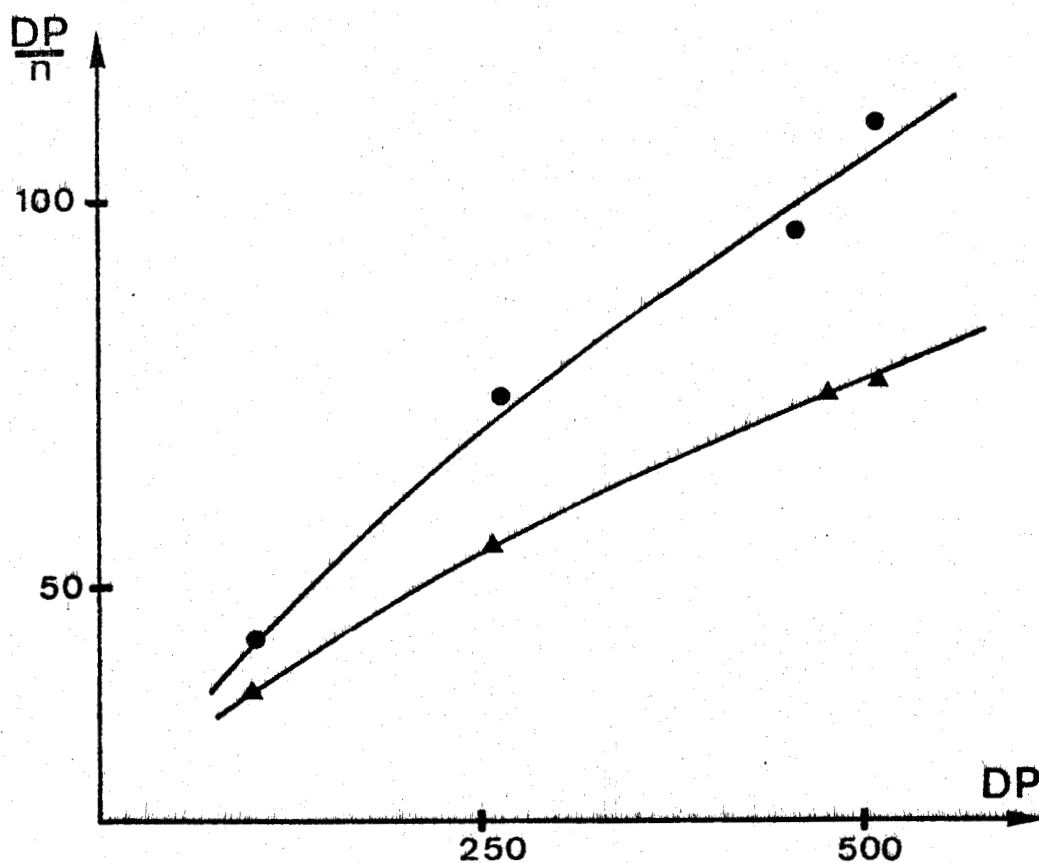


Figure II-6 : Variation du nombre moyen de résidus par chaînon hélicoïdal :

▲ NaCl 0,2 M pH 4,3

● NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1 en volume) pH 5,0

La figure II-6 présente les résultats obtenus pour les différents échantillons de PLGA dans l'eau et le mélange eau-dioxanne (2/1 ; v/v).

Les valeurs de $\frac{DP}{n}$ sont toujours supérieures dans le mélange eau - dioxanne. Le nombre de bâtonnets n est d'environ 4 dans le mélange eau - dioxanne et d'environ 6 dans l'eau pure pour l'échantillon de masse 61 000. Ce type de calcul ne donne qu'un ordre de grandeur du nombre de chaînons car il repose sur l'hypothèse d'une chaîne gaussienne dans NaCl 0,2 M et les divers mélanges de solvants utilisés. Or deux raisons nous montrent que cette hypothèse est en fait très hardie. En effet d'une part le nombre n de chaînons hélicoïdaux constituant la chaîne est très petit, et d'autre part les conditions expérimentales sont loin d'être celles d'un solvant thêta comme le prouve l'étude viscosimétrique. Dans ces conditions tous les résultats concernant ce type de calcul doivent être considérés avec prudence. Cependant leur ordre de grandeur reste très plausible et il n'y a pas incompatibilité entre le modèle d'une macromolécule qui se rigidifie par disparition d'un certain nombre de repliements, et les résultats de l'étude hydrodynamique. Néanmoins, on comprend mal pourquoi l'addition de dioxanne ne supprimerait qu'une partie des cassures et non leur totalité.

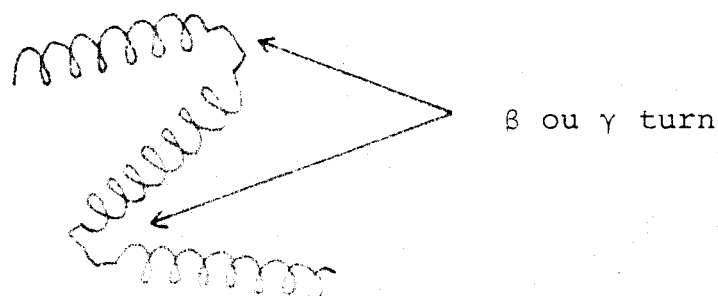
Les modèles proposés ci-dessus sont basés sur l'existence de segments hélicoïdaux rigides reliés entre eux par des joints flexibles. Il y a donc liberté de rotation autour des points de cassure de la molécule. Ces modèles ne tiennent aucun compte de la nature polypeptidique du PLGA. Il est donc nécessaire de considérer différents modèles de "cassure" spécifiques des chaînes polypeptidiques.

γ) Structures en " β turn" et " γ turn".

Des structures spécifiques des chaînes polypeptidiques ont été proposées pour expliquer le repliement des chaînes observé par exemple dans le cas des protéines globulaires. Ce sont les structures dites en " β turn" et " γ turn".

Dans cette hypothèse, la molécule de PLGA serait constituée de segments rigides reliés entre eux par des " β turns" ou des " γ turns". Contrairement au joint flexible envisagé dans

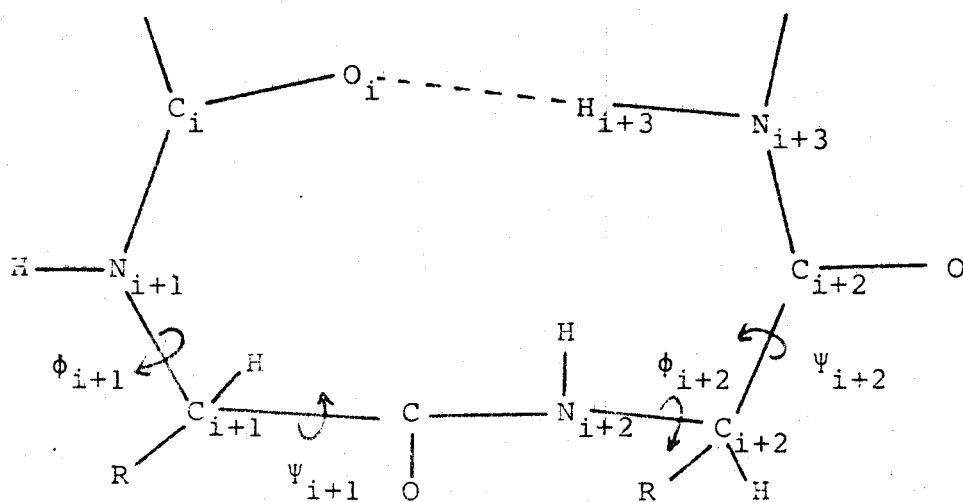
les modèles précédents, ces structures ont des caractéristiques spatiales bien définies présentant des restrictions à la rotation.



Structure en " β turn"

Cette structure a été proposée sur des bases théoriques par VENKATACHALAM (18) puis mise en évidence par cristallographie.

Le schéma ci-dessous proposé par URRY et OHNISHI (19) représente une telle structure :



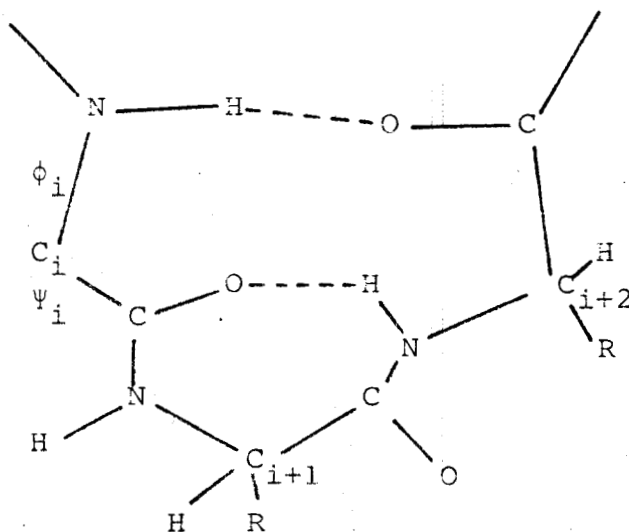
La structure en " β turn" répond aux critères suivants : (20)

- 1 La distance $C_i^\alpha - C_{i+3}^\alpha$ est inférieure ou égale à 5,7 Å
- 2 Les angles diédraux ϕ_{i+1} , ψ_{i+1} , ϕ_{i+2} et ψ_{i+2} sont dans un domaine de 15° autour des valeurs données par VENKATACHALAM⁽¹⁸⁾ sauf pour l'un d'eux qui peut être dans un domaine de 30° .
- 3 Il y a une liaison hydrogène entre O_i et H_{i+3} . La distance $O_i - N_{i+3}$ est alors inférieure à 3,2 Å et l'angle $O_i - N_{i+3} - H_{i+3}$ est inférieur à 30° .

On définit plusieurs types de β turns selon que la structure répond à un, deux, ou trois de ces critères. Remarquons en particulier que l'existence de la liaison hydrogène n'est pas nécessaire (critère 3).

Structure en " γ turn"

Cette structure représentée sur le schéma ci-dessous⁽²¹⁾ a été proposée par NEMETHY et coll.⁽²²⁻²³⁾ et mise en évidence par diffraction des rayons X⁽²⁴⁾.



Alors que dans la structure en " β turn" il existe une liaison hydrogène de 4 vers 1. (NH du 4^e résidu vers CO du 1^{er} résidu), il y a dans la structure en " γ turn" une liaison hydrogène de 1 vers 3 (NH du 1^{er} résidu vers le CO du 3^e résidu). Il peut en exister une autre du NH du 3^e résidu vers le CO du 1^{er} résidu (3 \rightarrow 1). Les modèles en " β turn" et " γ turn" sont concilia- bles avec le modèle en bâtonnet brisé. En effet, si certaines liaisons hydrogène parallèles à l'axe de l'hélice sont rompues, les groupes CO et NH ainsi libérés peuvent participer à la for- mation de structures telles que les " β turns" et " γ turns".

Remarquons que l'existence d'un seul " β turn" ou " γ turn" dans la molécule doit amener une diminution importante de la viscosité. En particulier cette diminution de viscosité doit être plus grande que celle observée en utilisant le modèle de YU et STOCKMAYER ou celui de TAKI et FUJITA. Dans ce dernier cas, en effet, les deux bâtonnets hélicoïdaux peuvent tourner librement autour du joint flexible alors que dans le cas des β et γ turns, même s'il n'y a pas formation de liaisons hydro- gène, il reste des contraintes en ce qui concerne les valeurs des angles diédraux.

Lorsque les β turns sont présents en quantité non né- gligeable leur existence peut être mise en évidence par dichroïs- me circulaire^(25-26b). Dans notre cas la différence entre les spectres dichroïques obtenus en présence et en absence de dioxanne est faible (Figure II-7). Si on suppose une hélice par- faite en présence de dioxanne ($[\theta]_{222} = - 40\ 000\ \text{d}^\circ\ \text{cm}^2\ \text{décimole}^{-1}$) et une "hélice brisée" dans l'eau ($[\theta]_{222} = - 36\ 000\ \text{d}^\circ\ \text{cm}^2\ \text{décimole}^{-1}$) on peut évaluer très approximativement la quantité de " β turn" en utilisant pour 100 % de " β turn" la valeur moyenne ($[\theta]_{222} = - 5\ 600\ \text{d}^\circ\ \text{cm}^2\ \text{décimole}^{-1}$ proposée par FREYSSINET⁽²⁶⁾). Par ce calcul on obtiendrait environ 10 % de " β turn" pour le PLGA dans l'eau.

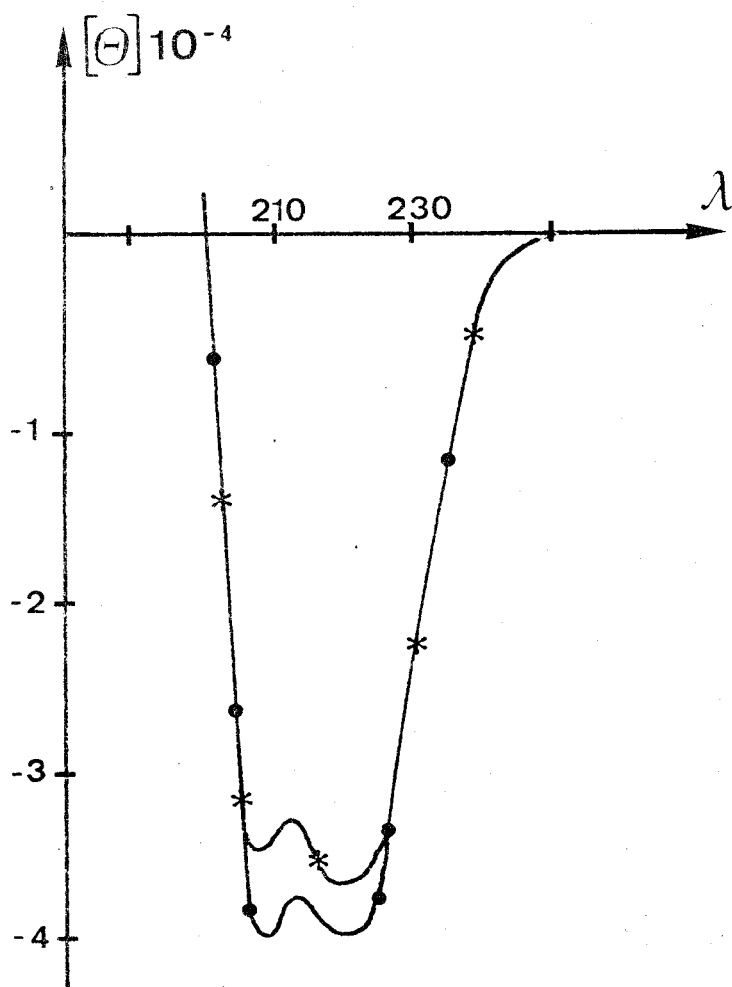


Figure II-7 : Spectres dichroïques du PLGA dans NaCl 0,2 M à pH 4,3 (*) et dans NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1 en volume) à pH 5,0 (•).

Il faut remarquer que :

. la différence entre les valeurs de $[\theta]_{222}$ mesurées en présence ou en absence de dioxanne peut être due au moins en partie à des erreurs expérimentales.

. on suppose dans ce calcul que les cassures du bâtonnet sont dues à l'existence de "β turns". On peut aussi envisager des "γ turns" ou d'autres structures. Cependant les spectres dichroïques correspondants ne sont pas connus.

. la valeur de $[\theta]_{222}$ pour 100 % de "β turns" que nous avons utilisée est tirée d'un spectre moyen sur de nombreux types différents de "β turns". Ce n'est donc pas nécessairement la valeur qui convient à notre cas particulier.

. Pour une molécule de DP 450, 10 % de "β turn" signifie que 45 résidus seraient inclus dans cette structure. Comme un "β turn" est formé de 4 résidus il y aurait environ 10 à 12 "β turns" ce qui paraît beaucoup si on considère les propriétés hydrodynamiques d'une telle molécule.

. Nous avons supposé une hélice parfaite en présence de dioxanne ce qui n'est pas le cas.

La probabilité pour qu'un ensemble de quatre résidus forme un β turn peut être calculée ⁽²⁶⁾. Cette probabilité P est exprimée par la relation :

$$P = F_i \times F_{i+1} \times F_{i+2} \times F_{i+3} \quad (\text{II-11})$$

dans laquelle F est la fréquence d'apparition d'un résidu dans une structure en β turn selon sa position en i, i+1, i+2 ou i+3 dans le tétrapeptide.

Dans le cas du résidu glutamique :

$$F_i = 0,011 ; F_{i+1} = 0,032 ; F_{i+2} = 0,053 ; F_{i+3} = 0,021$$

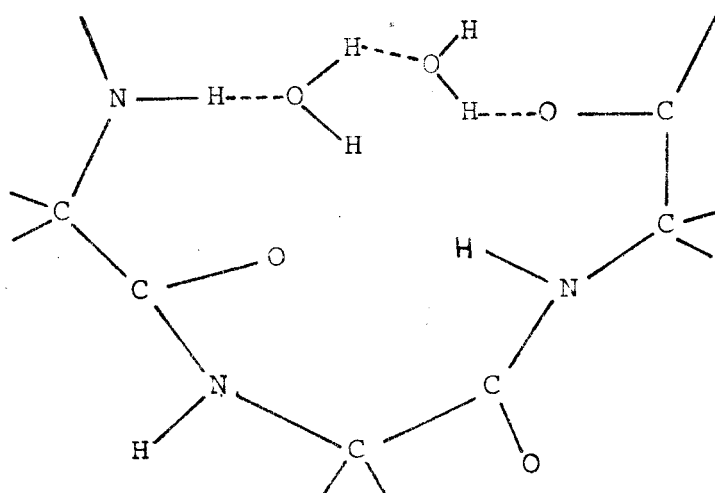
ce qui donne : $P = 3,9 \cdot 10^{-7}$.

Or ⁽²⁶⁾, la valeur limite pour qu'un tétrapeptide adopte une structure en "β turn" est $P = 0,5 \cdot 10^{-4}$.

On voit donc que la probabilité pour que quatre résidus glutamiques soient inclus dans une structure "β turn" est très faible. Nos résultats expérimentaux peuvent donc difficilement être attribués à l'existence de "β turns" dans la molécule de PLGA. L'étude d'oligomères de l'acide glutamique ^(26c) montre également que l'hypothèse de β turns est fort peu probable.

Modèles modifiés

Les structures "β et γ turn" font apparaître des liaisons hydrogène entre les groupes CO et NH. On peut imaginer des structures différentes dans lesquelles les groupes CO et NH seraient liés entre eux par l'intermédiaire de molécules d'eau, les aminoacides formant la cassure de la macromolécule n'ayant alors plus de conformation particulière en "β" ou "γ turn".



De telles structures devraient présenter moins de contraintes et en particulier moins de contraintes angulaires que les structures " β et γ turns".

Rôle du dioxanne

Nous avons vu que le dioxanne augmente la rigidité du bâtonnet. Cela peut être dû à un double effet :

- l'addition de dioxanne diminue l'activité de l'eau dans le solvant. L'eau est donc moins disponible pour la formation de liaisons hydrogène telles que nous les avons représentées ci-dessus.

- le dioxanne forme avec l'eau des complexes 1-3 de formule : $C_4H_8O_2, 3 H_2O$ ⁽²⁷⁾. Les molécules d'eau incluses dans ces complexes ne peuvent participer à des liaisons hydrogène avec le soluté. L'addition de dioxanne doit donc défavoriser les structures proposées ci-dessus et rigidifier le bâtonnet.

Dans le cas des mélanges eau méthanol, il existe également un complexe 1-2 de formule $CH_3OH, 2 H_2O$ ⁽²⁷⁾ et on observe comme dans notre cas une augmentation de rigidité de l'hélice α du PLGA lorsqu'on ajoute du méthanol au milieu ⁽²⁸⁾.

c) Modèle de bâtonnet souple (chaîne à longueur de persistance).

Les modèles envisagés ci-dessus supposent l'existence de "cassures" le long du bâtonnet. Nous avons d'abord examiné le cas où il y a libre rotation au niveau de ces cassures (modèle de YU et STOCKMAYER et de TAKI et FUJITA), puis nous avons supposé l'existence de structures à géométrie définie telle que les " β turns" et " γ turns". On peut également imaginer un bâtonnet dont la souplesse augmenterait en même temps que la longueur.

Ce modèle présente, par rapport aux précédents, l'avantage de ne pas supposer l'existence de cassures nettes dans la molécule, cassures dont l'existence peut difficilement être attribuée à des modifications chimiques ou à la présence de "turns".

Un tel modèle également appelé modèle de cylindre courbe continu a été proposé par YAMAKAWA et FUJII^(15,29) en s'inspirant des travaux de POROD et KRATKY⁽³⁰⁾. Les équations établies par ces auteurs permettent de définir la viscosité intrinsèque d'une chaîne à longueur de persistance avec une bonne précision dans tout le domaine de masses moléculaires. La longueur de persistance, notée q , caractérise la rigidité de la molécule⁽³⁰⁾. Plus la molécule est rigide, plus q est grand. Dans le cas d'une chaîne gaussienne, la longueur de persistance est reliée à la longueur du segment statistique de KUHN λ^{-1} par la relation :

$$\lambda = \frac{1}{2q}$$

La longueur de persistance est donc dans ce cas la moitié du segment statistique de KUHN⁽³¹⁾.

Deux relations analytiques semi empiriques ont été proposées par YAMAKAWA et FUJII⁽¹⁵⁾. Selon la longueur L de la molécule, l'une ou l'autre de ces relations doit être employée.

$$[\eta] = \frac{\phi_{\infty} L^{3/2}}{M} \frac{1}{1 - \sum_{i=1}^{i=4} C_i L^{-i/2}} \text{ pour } L \gg 2,28 \quad (\text{II-12})$$

et :

$$[\eta] = \frac{\pi N_A L^3}{24 M \ln(\frac{L}{d})} \frac{F(L)}{1 + \sum_{i=1}^{i=4} A_i \left[\ln(\frac{d}{L}) \right]^{-i}} \text{ pour } L < 2,28 \quad (\text{II-13})$$

Dans la première de ces relations :

$$\phi_{\infty} = 2,87 \cdot 10^{23}$$

L est la longueur de contour de la molécule (longueur normée)

M est la masse moléculaire

Les coefficients C_i sont indépendants de L mais dépendent du diamètre hydrodynamique d de la chaîne ⁽¹⁵⁾ (diamètre normé)

Dans la seconde relation :

N_A est le nombre d'Avogadro

F(L) est une fonction de la longueur de contour L

$$F(L) = \left(\frac{3}{2L^4} \right) (e^{-2L} - 1 + 2L - 2L^2 + \frac{4}{3}L^3) \quad (\text{II-14})$$

Les valeurs de A_i sont indépendantes de L et d :

$$A_1 = 1,8395 \quad A_2 = 8,2406 \quad A_3 = 32,8628 \quad A_4 = 41,1045$$

(pour $d < 0,1$).

Toutes les longueurs qui apparaissent dans ces relations ont comme unité la longueur du segment statistique de KUHN λ^{-1} .

(Seules les valeurs de L utilisées dans le premier terme de chacune des équations (II-12) et (II-13) (termes en $L^{3/2}$ et L^3) doivent être exprimées en cm pour obtenir la viscosité en cm^3/g .)

La longueur de contour L, normée dans ce système, dépend donc de la masse moléculaire, mais aussi de la longueur de persistance ρ . Elle dépend également de la projection l de l'unité monomère sur le contour de la chaîne. Dans le cas d'une hélice α , la projection de l'unité monomère est égale à $1,5 \text{ \AA}$. La longueur, exprimée en \AA , de la molécule est alors égale à $1,5 \text{ DP}$.

Les relations ci-dessus dépendent donc des trois paramètres l , q et d . Pour rendre compte des résultats expérimentaux et déterminer la longueur de persistance de la molécule il faut d'abord se fixer la valeur de l et de d puis tracer un faisceau de courbes $\text{Log } [\eta] = f(\text{Log } M)$ correspondant aux différentes valeurs de q . La longueur de persistance de la molécule est alors la valeur q pour laquelle il y a le meilleur accord entre la courbe expérimentale et la courbe calculée. On peut également faire varier le diamètre hydrodynamique d pour améliorer l'accord entre les deux courbes.

Pour tous nos échantillons, la masse moléculaire est suffisamment faible pour que la condition : $L < 2,28$ soit remplie dans tous les cas. La seconde relation donnée plus haut sera donc seule utilisée.

La projection de l'unité monomère d'un polypeptide sur l'axe d'une hélice α est de $1,5 \text{ \AA}$. Ce sera la valeur de l que nous utiliserons pour calculer la longueur de contour. Le diamètre d d'une hélice α est de $10,5 \text{ \AA}$ à l'état solide. En solution, la valeur $d = 15 \text{ \AA}$ a été proposée dans le cas du PLGA dans le N méthylacétamide (9).

La figure II-8 montre les courbes obtenues pour différentes valeurs de q en se fixant $l = 1,5 \text{ \AA}$ et $d = 15 \text{ \AA}$, dans le cas du PLGA dans NaCl 0,2 M à pH 4,3. On constate que l'accord entre courbe expérimentale et courbe calculée est satisfaisant pour $q = 220 \pm 20 \text{ \AA}$. Cependant le point correspondant à $M = 12\ 200$ est toujours hors de la droite. L'hélice α de PLGA dans NaCl 0,2 M peut donc être représentée par les valeurs suivantes :

$$l = 1,5 \text{ \AA} \quad d = 15 \text{ \AA} \quad \text{et} \quad q = 220 \pm 20 \text{ \AA}$$

Dans le cas du PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1 en volume) nous avons d'abord tenté de représenter la courbe expérimentale en nous fixant $l = 1,5 \text{ \AA}$ et $d = 15 \text{ \AA}$ comme précédemment et en faisant varier q . On constate alors qu'aucune valeur de q entre 100 et 2000 \AA ne peut rendre compte de nos résultats

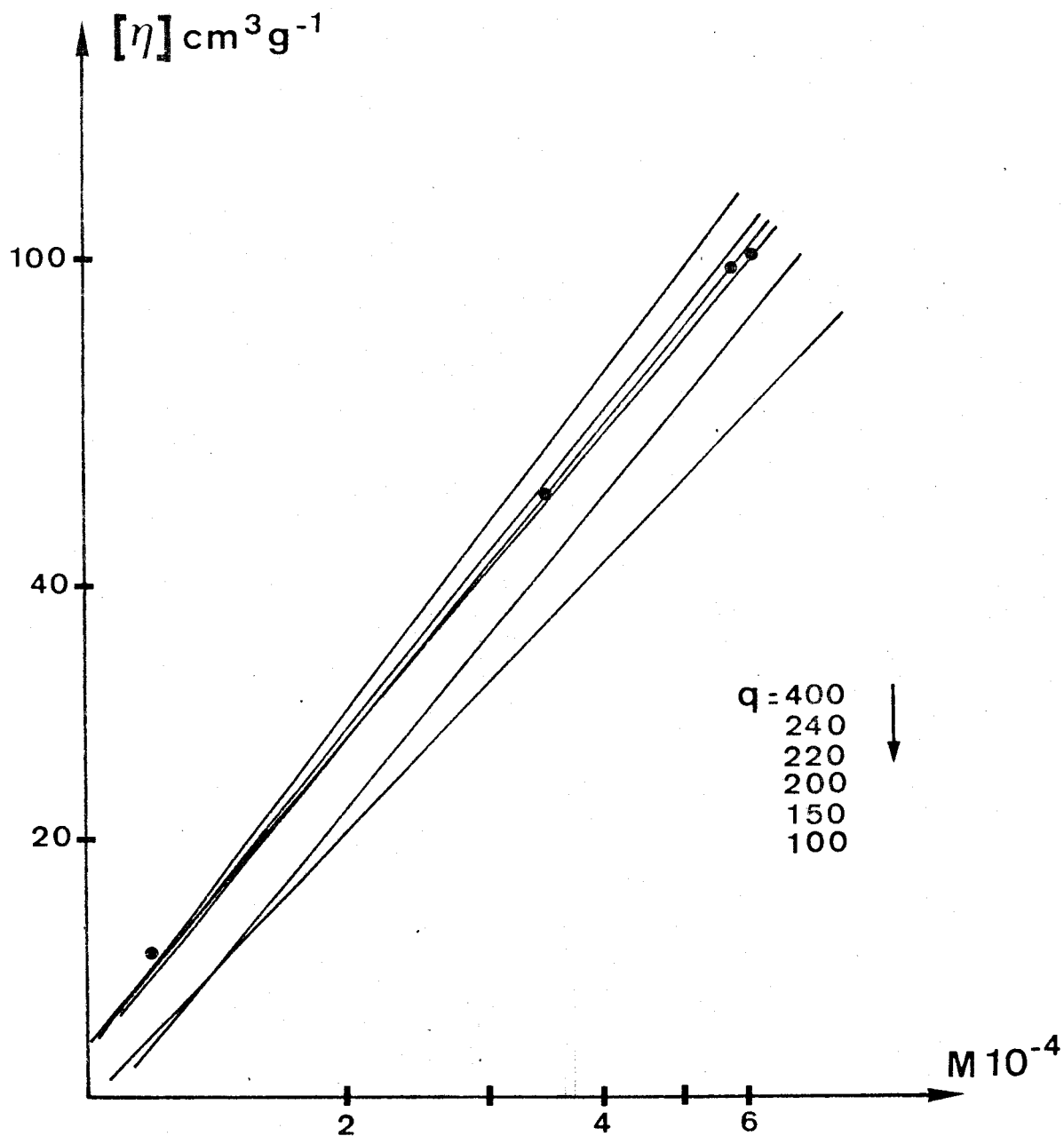


Figure II-8 . Comparaison entre la loi de viscosité expérimentale et les lois de viscosités calculées à partir des relations de YAMAKAWA et FUJII dans le cas du PLGA dans NaCl 0,2 M.

$l = 1,5 \text{ \AA}$; $d = 15 \text{ \AA}$; q varie de 100 à 400 \AA .



expérimentaux. Nous avons alors tracé d'autres faisceaux de courbes en faisant varier également le diamètre de l'hélice solvatée entre $d = 10 \text{ \AA}$ et $d = 25 \text{ \AA}$ (Figure II-9). Le meilleur accord entre la courbe expérimentale et la courbe calculée est alors obtenu pour les valeurs :

$$l = 1,5 \text{ \AA} \quad d = 25 \text{ \AA} \quad \text{et} \quad q = 500 \text{ \AA}$$

Ceci confirme la plus grande rigidité du PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne, puisque la longueur de persistance est plus élevée. Cependant la valeur de $d = 25 \text{ \AA}$ qui permet de rendre compte des résultats expérimentaux semble difficilement acceptable car elle serait comparable au diamètre de la double hélice du DNA (15,29).

Dans le but de contrôler et préciser à la fois les valeurs de d et q obtenues ci-dessus, nous avons traité nos résultats expérimentaux selon une modification mathématique proposée par VITOVSKAYA et TSVETKOV (32). L'équation proposée par YAMAKAWA et FUJII (équation II-13) est modifiée pour obtenir une fonction y définie par (32) :

$$y = \frac{[\eta]}{M^2} \frac{24}{\pi N_A} M_0^3 \left[\text{Ln} \frac{L}{d} - 1,839 + \frac{8,24}{\text{Ln} \frac{L}{d}} - \frac{32,86}{\text{Ln}^2 \frac{L}{d}} + \frac{41,10}{\text{Ln}^3 \frac{L}{d}} \right] \quad (\text{II-15})$$

La fonction y est également représentée par la relation :

$$y = l^3 \left(1 - \frac{2}{5} \frac{l}{M_0 S} M + \frac{2}{15} \cdot \frac{l}{M_0^2 S^2} M^2 - \dots \right) \quad (\text{II-16})$$

Dans la relation (II-16) l est la projection de la longueur de l'unité monomère sur l'axe de la molécule, S est le nombre d'unités monomères par segment statistique.

La méthode consiste à calculer la quantité y par la relation (II-15) et à tracer ensuite y en fonction de la masse moléculaire M . La relation (II-16) montre que l'ordonnée à l'origine fournit la valeur de l et que la pente initiale de la courbe est proportionnelle à $\frac{l}{S}$.

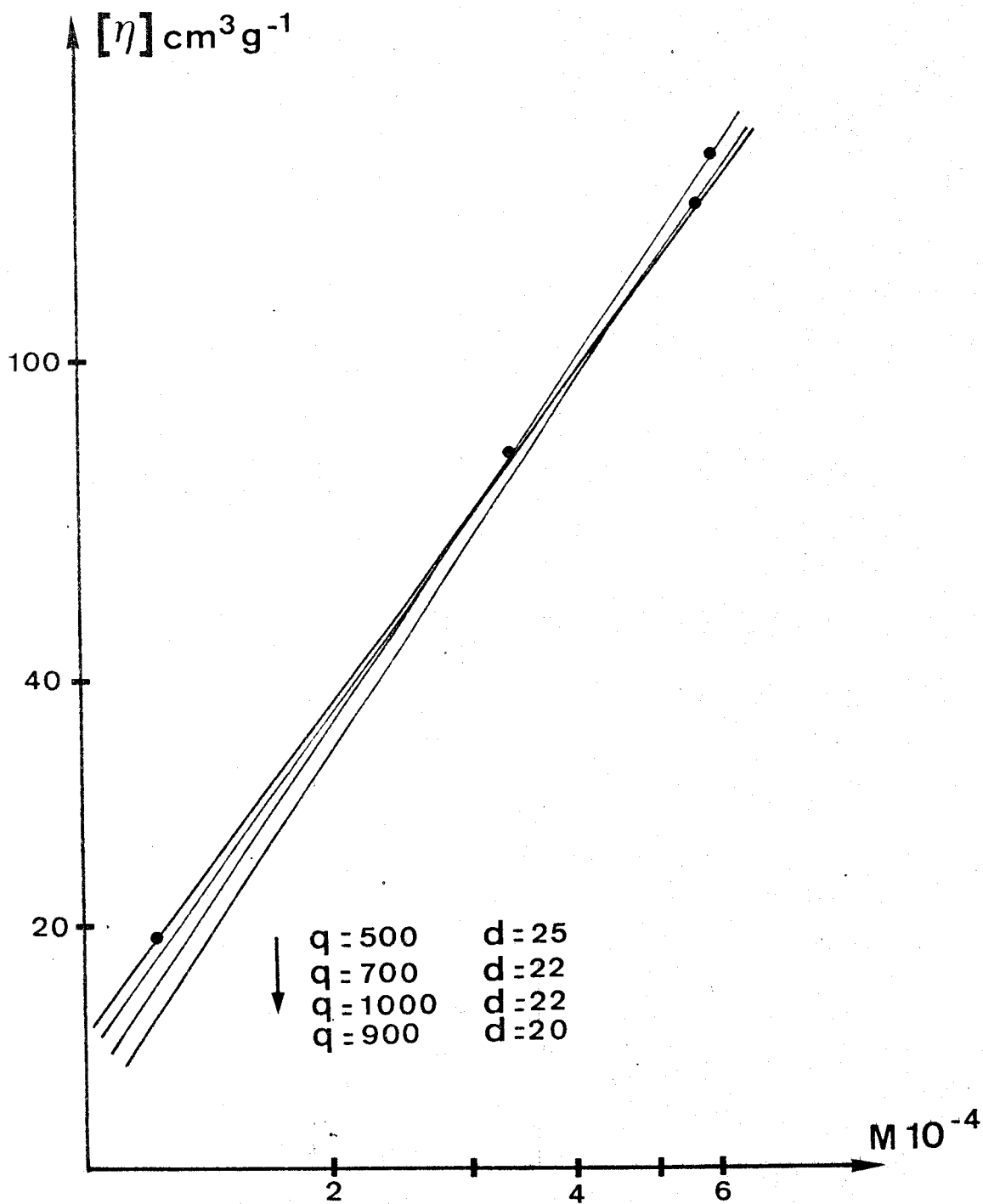


Figure II-9 . Comparaison entre la loi de viscosité expérimentale et les lois calculées à partir des relations de YAMAKAWA et FUJII dans le cas du PLGA dans NaCl 0,2 M/Dioxanne.

$l = 1,5 \text{ \AA}$; d varie de 10 à 25 \AA ; q varie de 500 à 1000 \AA



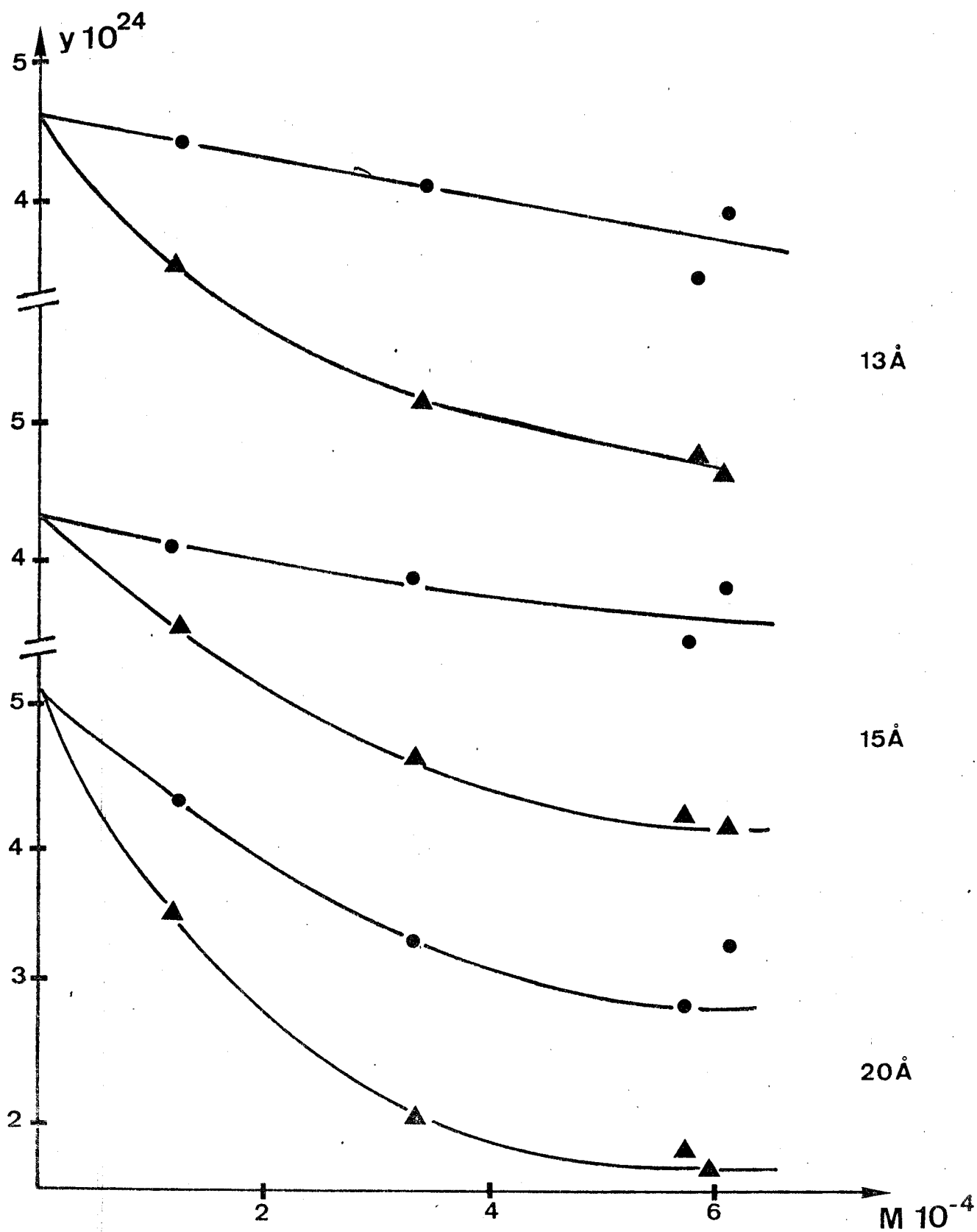


Figure II-10. Tracé de la fonction $y = f(M)$ pour $d = 13 \text{ \AA}$,
 15 \AA et 20 \AA

▲ NaCl 0,2 M

● NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1 en volume)



Par conséquent nous avons tracé les courbes $y = f(M)$ en supposant $d = 13 \text{ \AA}$, $d = 15 \text{ \AA}$ et $d = 20 \text{ \AA}$.

Dans le calcul de y intervient la valeur de L c'est-à-dire la valeur de l puisque $L = lDP$. L'ordonnée à l'origine de la courbe $y = f(M)$ permet de retrouver cette valeur. La meilleure courbe $y = f(M)$ doit donc être celle qui donne le meilleur accord entre la valeur de l utilisée pour le calcul de L et la valeur de l déterminée graphiquement. La figure II-10 montre les résultats obtenus pour $d = 13 \text{ \AA}$, 15 \AA et 20 \AA avec $l = 1,5 \text{ \AA}$.

L'ordonnée à l'origine de ces courbes fournit respectivement : $l = 1,67 \text{ \AA}$; $1,63 \text{ \AA}$ et $1,73 \text{ \AA}$.

Le meilleur accord est donc obtenu pour $d = 15 \text{ \AA}$. Nous constatons de plus qu'une seule valeur de d permet de rendre compte des résultats obtenus dans NaCl 0,2 M et dans le mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne, ce qui n'était pas le cas lorsque la méthode de YAMAKAWA et FUJII était utilisée. De plus cette valeur $d = 15 \text{ \AA}$ est beaucoup plus plausible que la valeur $d = 25 \text{ \AA}$ obtenue précédemment pour le PLGA en mélange NaCl 0,2 M Dioxanne. Nous avons vu que la pente initiale des courbes $y = f(M)$ est inversement proportionnelle à S , le nombre d'unités par segment statistique. Dans l'hypothèse $d = 15 \text{ \AA}$ on obtient $S = 150 \pm 20$ pour le PLGA dans NaCl 0,2 M et $S = 750 \pm 30$ pour le PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne.

En multipliant S par la projection de l'unité monomère sur l'axe de l'hélice on obtient la longueur du segment statistique égale à $225 \pm 30 \text{ \AA}$ et $1125 \pm 45 \text{ \AA}$.

Ces résultats confirment la plus grande rigidité de l'hélice de PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne puisque le nombre d'unités par segment statistique y est plus grand.

La valeur trouvée pour l ($l = 1,63 \text{ \AA}$) est supérieure à la valeur théorique de $1,50 \text{ \AA}$. Cependant elle nous semble satisfaisante. Par exemple, dans le cas du polyglutamate de benzyle, VITOVSKAYA et TSVETKOV ⁽³¹⁾ ont obtenu $l = 2,0 \text{ \AA}$, valeur encore plus différente de la valeur théorique.

La figure II-11 présente la courbe $y = f(M)$ pour le PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M/2 chloroéthanol (2/1 en volume).

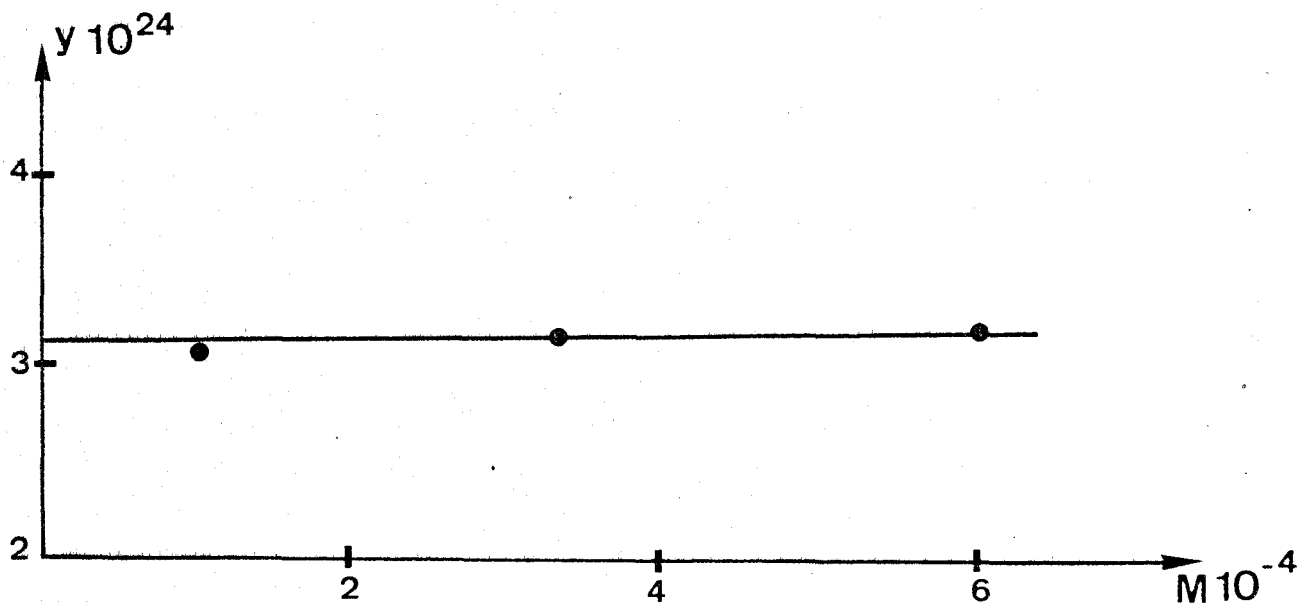


Figure II-11. Tracé de la fonction $y = f(M)$ pour $d = 15 \text{ \AA}$ pour le PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M/chloroéthanol (2/1 en volume)

Pour $d = 15 \text{ \AA}$, on obtient $l = 1,45 \text{ \AA}$. La pente de la courbe est pratiquement nulle, ce qui indique que S est très grand. Ceci est en bon accord avec la valeur du coefficient de l'équation de MARK-HOUWINK qui est de 1,60 (voir Tableau II-4) et confirme la rigidité accrue de la molécule en présence de chloroéthanol.

La molécule de PLGA sous forme hélicoïdale peut donc être représentée par un bâtonnet souple caractérisé par sa longueur de persistance q ou par le nombre S d'unités monomères par segment statistique.

La méthode de détermination de S proposée par VITOVSKAYA et TSVETKOV présente deux inconvénients pratiques :

- . elle nécessite une extrapolation curviligne
- . la valeur de S est déterminée à partir de la pente à l'origine de cette courbe, ce qui est peu précis.

La modification suivante permet une détermination plus précise de S . La fonction y est de la forme :

$$y = A + \frac{B}{S} M + \frac{C}{S^2} M^2 + \dots$$

Si on trace $\frac{y - l^3}{M}$ en fonction de M on doit obtenir une droite dont l'ordonnée à l'origine fournit $\frac{1}{S}$ et la pente $\frac{1}{S^2}$.

$$\frac{y - l^3}{M} = -\frac{2}{5} \frac{1}{M_0 S} + \frac{2}{15} \frac{1}{M_0^2 S^2} M + \dots \quad (\text{II-16'})$$

ordonnée à l'origine = $-\frac{2}{5} \frac{1}{M_0 S} l^3$

pente = $\frac{2}{15} \frac{1}{M_0^2 S^2} l^3$

Remarquons que dans le cas où S est grand, le terme en $\frac{1}{S^2}$ est négligeable. Dans ces conditions la fonction y est représentée par une droite et le tracé de la fonction $\frac{y - l^3}{M}$ n'a pas d'intérêt.

Nous avons repris les hypothèses $d = 13, 15$ et 20 \AA et nous avons fait varier l entre $1,5$ et $1,75 \text{ \AA}$

La figure II-11' montre, dans le cas où $d = 15 \text{ \AA}$, un exemple des résultats obtenus.

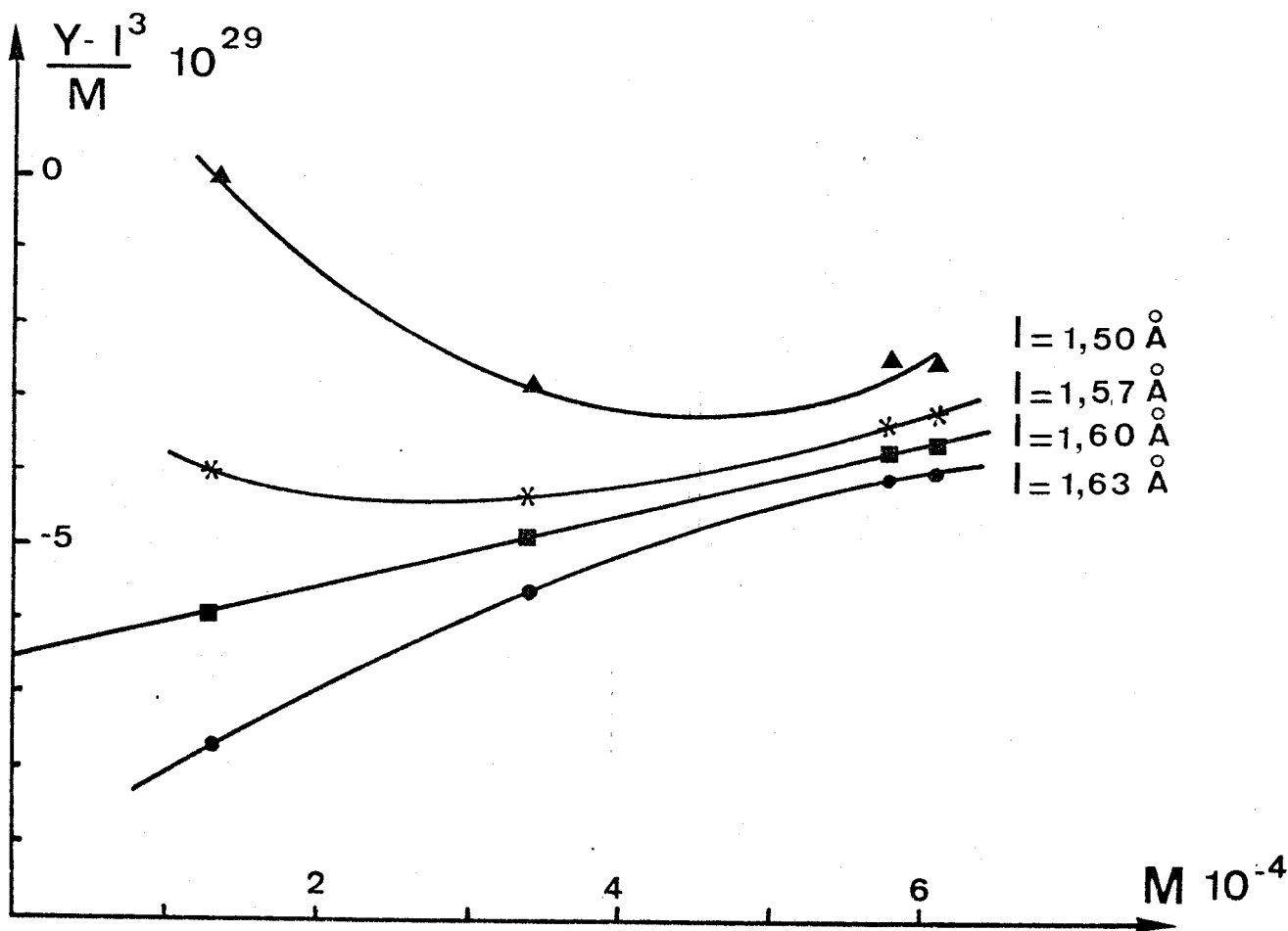


Figure II-11'. Tracé de la fonction $\frac{y - l^3}{M} = f(M)$ pour différentes valeurs de l .

On constate que la représentation la plus linéaire est obtenue pour $l = 1,60 \text{ \AA}$. On obtient alors $S = 200$ par l'ordonnée à l'origine et $S = 250$ par la pente, c'est-à-dire $S = 225 \pm 25$. Ceci est en assez bon accord avec les valeurs obtenues ci-dessus.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus selon les différentes méthodes.

	tracé de $y = f(M)$		tracé de $\frac{y - l^3}{M} = f(M)$	
NaCl 0,2 M				
$d = 13 \text{ \AA}$	$l = 1,67 \text{ \AA}$	$S = 120$	$l = 1,64 \text{ \AA}$	$S = 210 \pm 30$
$d = 15 \text{ \AA}$	$l = 1,63 \text{ \AA}$	$S = 150$	$l = 1,60 \text{ \AA}$	$S = 225 \pm 30$
$d = 20 \text{ \AA}$	$l = 1,73 \text{ \AA}$	$S = 100$	$l = 1,70 \text{ \AA}$	$S = 145 \pm 30$
NaCl 0,2 M/ dioxanne				
$d = 13 \text{ \AA}$	$l = 1,67 \text{ \AA}$	$S = 1000$		
$d = 15 \text{ \AA}$	$l = 1,63 \text{ \AA}$	$S = 750$		
$d = 20 \text{ \AA}$	$l = 1,73 \text{ \AA}$	$S = 200$	$l = 1,73 \text{ \AA}$	$S = 220 \pm 20$
			$l = 1,75 \text{ \AA}$	$S = 190 \pm 20$

Tableau II-4'. Valeurs calculées des paramètres l et S .

Quelle que soit la méthode utilisée, les résultats obtenus indiquent dans tous les cas une augmentation de q ou de S c'est-à-dire une augmentation de la rigidité de la molécule.

Dans le cas des solutions de PLGA dans NaCl 0,2 M, l'hypothèse $d = 15 \text{ \AA}$ semble plausible car elle conduit à une valeur de l égale à $1,60$ à $1,63 \text{ \AA}$ ce qui est proche de la valeur théorique.

Dans le cas du mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne, le traitement selon YAMAKAWA et FUJII et celui de VITOVSKAYA et TSVETKOV qui sont deux aspects mathématiques de la même théorie conduisent à des valeurs de d égales à 25 \AA et 15 \AA .

Bien que dans le second cas, la valeur $d = 15 \text{ \AA}$ conduise à une valeur de λ plus proche de la valeur théorique, on ne peut rejeter complètement l'hypothèse $d = 25 \text{ \AA}$. En effet, le diamètre hydrodynamique dépend de la solvatation de la molécule. Nous verrons au chapitre V que, dans ces conditions de solvant, la molécule est fortement solvatée.

2 - Discussion des autres résultats.

Le tableau II-3 montre que le coefficient a varie peu en solution dans NaCl 0,2 M au cours de la transition hélice \rightleftharpoons chaîne ($a = 1,09$ quand $F_H = 1$ et $a = 0,94$ quand $F_H = 0$). Ceci n'est pas surprenant si on considère le modèle d'"hélice brisée". En effet le comportement hydrodynamique doit être peu sensible à l'augmentation du nombre de cassures dans un bâtonnet qui en comporte déjà un certain nombre. Dans NaCl 0,2 M, si on s'intéresse plus spécialement à ce qui se passe entre $F_H = 1$ et $F_H = 0,5$ le tableau II-3 montre que le coefficient a est constant et égal à 1,09. Ce résultat confirme une observation de RAO et MILLER (33) qui ont constaté que a est pratiquement indépendant du pH jusqu'au milieu de la transition, en solution aqueuse. Dans ce cas la variation de viscosité observée au cours de la transition hélice \rightleftharpoons chaîne est due pour la plus grande part à la variation du coefficient K . ANUFRIEVA et coll. (34) ont étudié la variation du temps de relaxation τ_w de la molécule de PLGA au cours de la transition induite par le pH. Figure (II-12).

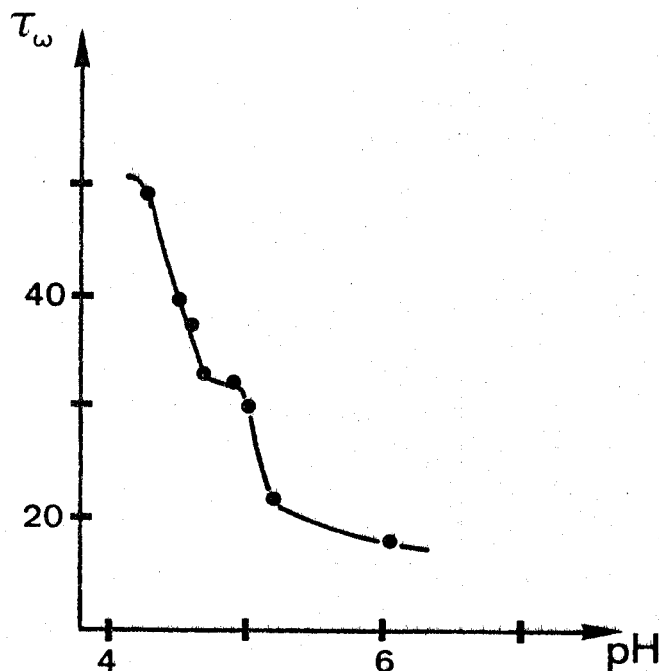


Figure II-12. Variation du temps de relaxation du PLGA dans NaCl 0,2 M en fonction du pH (34).

Ces auteurs constatent qu'entre pH 5,0 et pH 4,65 (c'est-à-dire entre $F_H = 0,54$ et $F_H = 0,80$) la valeur de τ_ω est pratiquement constante ce qui signifie que la rigidité de la molécule ne change pas. Ceci est en bon accord avec nos valeurs du coefficient a dans le même domaine de la transition. Entre pH 4,65 et pH 4,3 (c'est-à-dire entre $F_H = 0,8$ et $F_H \sim 1,0$) ANUFRIEVA et coll. observent une nouvelle augmentation de τ_ω qu'ils attribuent à une agrégation intermoléculaire. Dans notre cas on n'observe aucune augmentation de a entre ces deux valeurs de pH et les spectres dichroïques ne montrent aucune agrégation en solution. Cette différence peut être attribuée à la présence de sucrose dans les solutions utilisées par ANUFRIEVA et coll. pour les mesures de temps de relaxation.

En présence de dioxanne, le coefficient a varie de 1,40 à 0,72 au cours de la transition hélice \rightleftharpoons chaîne.

La figure II-13 montre que pour des masses moléculaires supérieures à 10 000 la viscosité de l'hélice est supérieure à celle de la chaîne ce qui justifie l'allure de la courbe de transition (figure II-1) pour l'échantillon de masse 58 000. Cette valeur limite de $M = 10\ 000$ est en accord avec les prévisions théoriques de MILLER et FLORY (35).

La comparaison des paramètres a et K pour $F_H = 0,5$ dans NaCl 0,2 M et dans NaCl 0,2 M/Dioxanne montre que au milieu de la transition, ces paramètres sont insensibles à la nature du solvant.

La valeur $a = 0,94$ trouvée dans NaCl 0,2 M à pH 7,3 c'est-à-dire dans les conditions de l'étalonnage de WADA est en bon accord avec les valeurs trouvées pour des forces ioniques voisines par HAWKINS et HOLTZER (36) ($a = 1,115$ pour $I = 0,11$ M et $a = 0,92$ pour $I = 0,41$ M) Dans ce dernier cas, les masses moléculaires des échantillons utilisés ont été déterminées par diffusion de la lumière et le domaine d'étalonnage s'étend de 44 300 à 152 000. On peut donc penser que le domaine d'étalonnage de WADA est valable entre 10 000 et 150 000 environ.

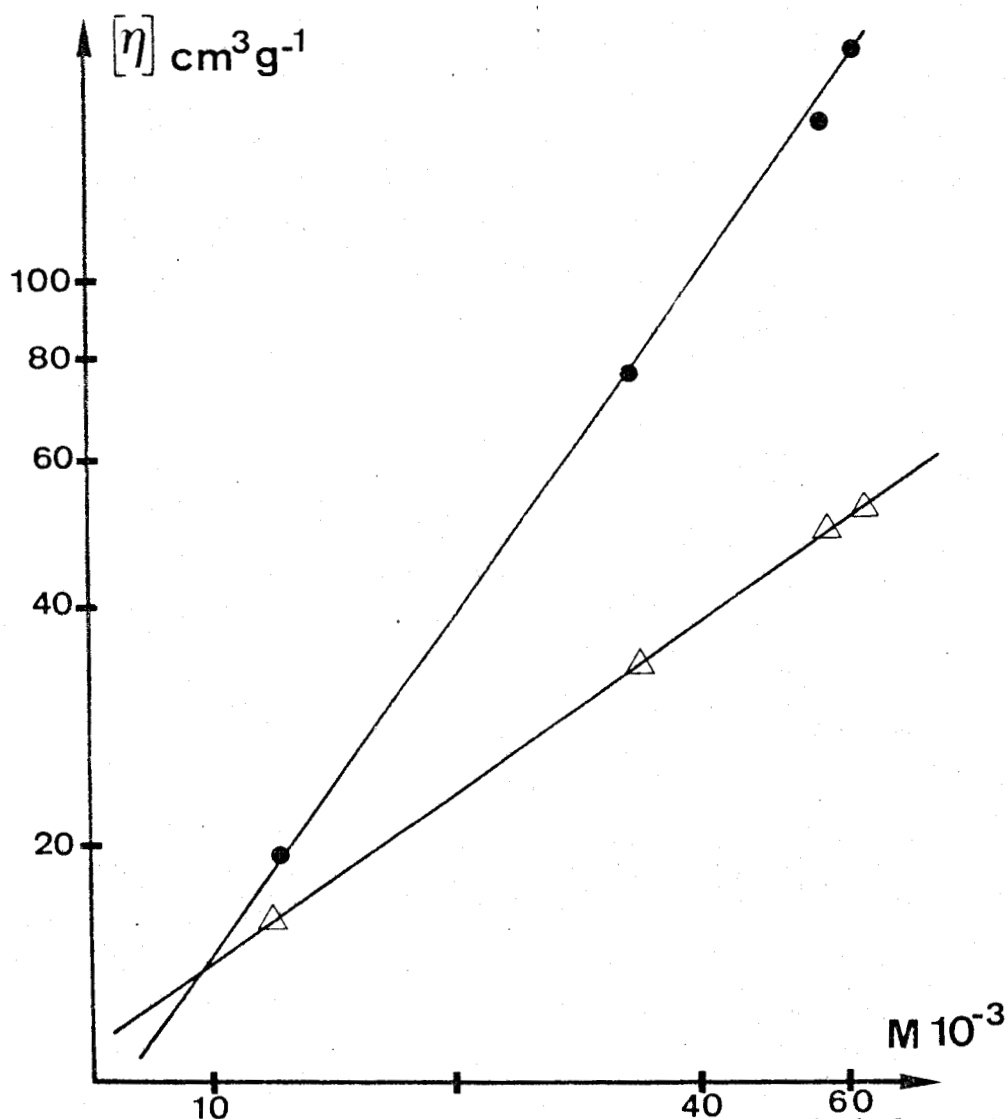


Figure II-13 : Comparaison des lois de viscosité du PLGA dans NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1)
● pH 5,0 ; △ pH 7,3.

En milieu basique (pH 7,3) la valeur de a en présence de dioxanne est égale à 0,72. Cette valeur est égale à celle obtenue par HAWKINS et HOLTZER ⁽³⁶⁾ pour le PLGA à force ionique infinie (par extrapolation de mesures à différentes forces ioniques). L'addition de dioxanne a donc le même effet sur le comportement hydrodynamique du PLGA qu'une force ionique infinie. Cependant le phénomène mis en jeu est différent. Dans le second cas les répulsions électrostatiques qui sont à l'origine de l'expansion du polymère sont supprimées par l'effet d'écran très important. Dans ces conditions, on peut estimer que la viscosité est celle qu'aurait le polymère en absence de charges. Dans notre

cas l'addition de dioxanne entraîne une diminution de la constante diélectrique de la solution ce qui a deux conséquences importantes :

- une augmentation des répulsions électrostatiques entre les groupes chargés de même signe portés par la chaîne latérale ce qui devrait conduire à une expansion plus importante du polymère.

- une augmentation des interactions entre les groupes COO^- et les contre ions positifs qui diminue la charge apparente du polymère et réduit ainsi les répulsions électrostatiques. Cet effet est prépondérant puisqu'on observe une diminution de la viscosité.

On observe le même phénomène dans le cas de l'acide polyacrylique. L'addition de 15 % de dioxanne à une solution de polyacrylate de sodium ($\bar{M}_n = 48\ 000$) dans NaCl 0,2 M provoque une diminution de la viscosité de 640 à 290 cm^3/g . (37).

3 - Dimensions non perturbées en mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne à pH 7,3.

Les dimensions non perturbées du polymère peuvent être déterminées en utilisant la méthode de STOCKMAYER et FIXMAN (38)
La relation fondamentale utilisée est :

$$\frac{[\eta]}{M^{1/2}} = K_{\theta} + 0,15 \phi B M^{1/2} \quad (\text{II-17})$$

où B est une constante dépendant du couple polymère solvant
 ϕ est la constante universelle de FLORY égale à $2,86 \cdot 10^{21}$
 K_{θ} est défini par la relation :

$$[\eta]_{\theta} = K_{\theta} M^{1/2} \quad (\text{II-18})$$

dans laquelle $[\eta]_{\theta}$ est la viscosité qu'aurait le polymère s'il était en solution dans un solvant theta.

De plus :

$$K_{\theta} = \phi \left[\frac{b_{\theta}}{M_0^{1/2}} \right]^3 \quad (\text{II-19})$$

où M_0 est la masse d'un résidu monomère,
et b_{θ} la longueur d'une liaison non perturbée.

Le tracé de $[\eta]/M^{1/2}$ en fonction de $M^{1/2}$ (Figure II-14)
permet par extrapolation à $M^{1/2} = 0$ de déterminer K_{θ} et donc
 b_{θ} .

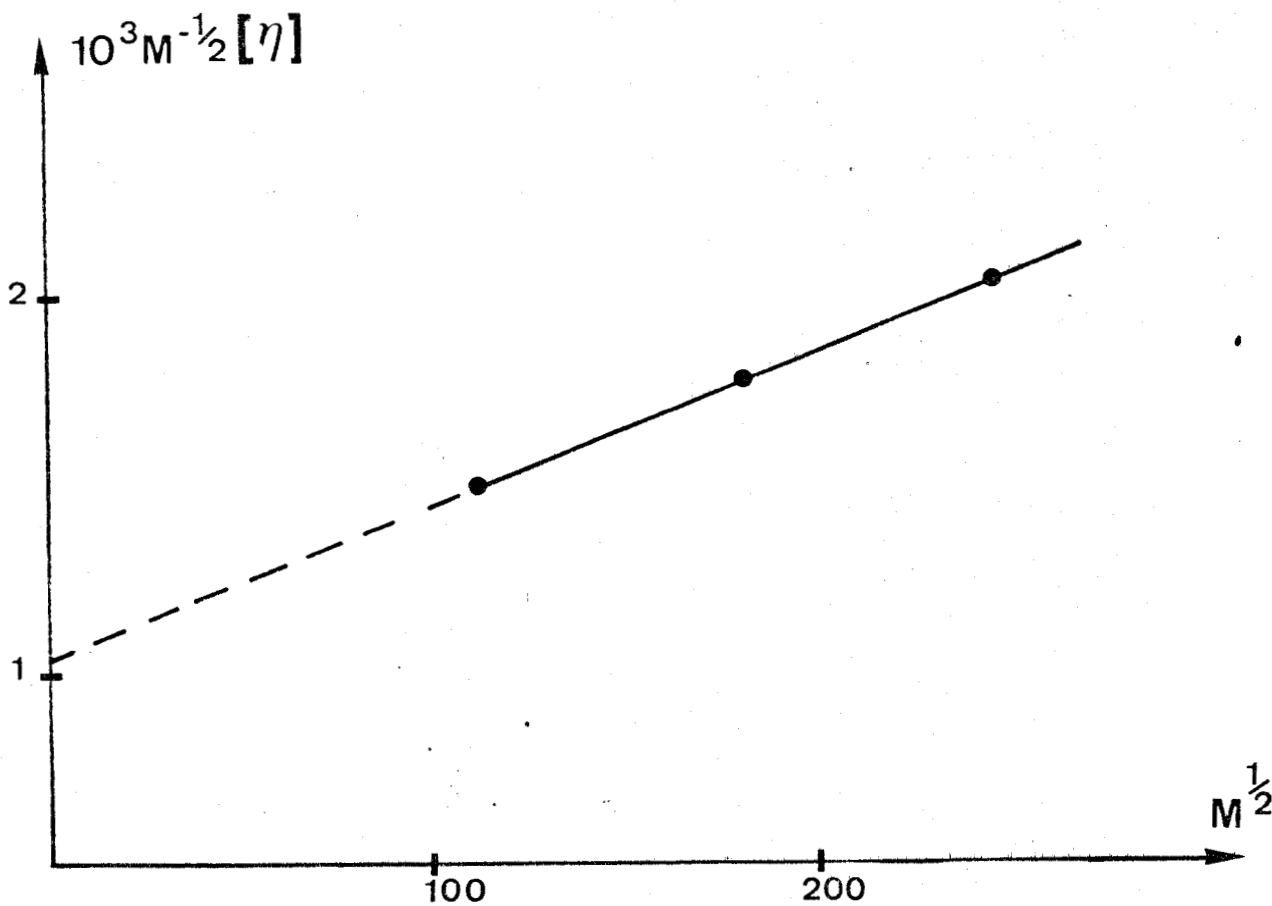


Figure II-14. Tracé de STOCKMAYER - FIXMAN pour le PLGA dans
NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1) à pH 7,3.

L'extrapolation à masse moléculaire nulle de nos valeurs expérimentales obtenues à pH 7,3 en présence de dioxanne donne le résultat suivant :

$$\frac{[\eta]}{M^{1/2}} = 1,03 \cdot 10^{-3} + 0,428 \cdot 10^{-5} M^{1/2}$$

Ceci conduit à la valeur $b_{\theta} = 8,15 \text{ \AA}$ en utilisant l'équation (II-19). La valeur de b_{θ} trouvée pour le PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1) est voisine de celles obtenues par HAWKINS et HOLTZER⁽³⁶⁾ pour le PLGA à force ionique infinie ($b_{\theta} = 8 \text{ \AA}$) et pour le polyglutamate de benzyle dans l'acide dichloroacétique. ($b_{\theta} = 7,9 \text{ \AA}$).

La validité de l'équation de STOCKMAYER - FIXMAN est d'autant meilleure que les conditions de mesure sont proches des conditions de solvant θ c'est-à-dire que a est proche de 0,5.

Cependant le tracé de la courbe de STOCKMAYER-FIXMAN pour les valeurs déterminées dans NaCl 0,2 M (conditions dans lesquelles $a = 0,94$) permet de constater que la pente de la droite est plus grande dans ce cas (pente = $1,7 \cdot 10^{-5}$ contre $0,43 \cdot 10^{-5}$).

Le mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne est donc un moins bon solvant pour le polyglutamate de sodium que NaCl 0,2 M de qui est compatible avec le phénomène de précipitation observé au-delà de 33 % en dioxanne.

Ceci est confirmé par la variation du coefficient d'expansion du polymère avec la teneur en dioxanne.

4 - Le coefficient d'expansion α :

La détermination de K_{θ} permet de calculer pour chaque échantillon $[\eta]_{\theta}$ et le facteur d'expansion α défini par :

$$\alpha^3 = \frac{[\eta]}{[\eta]_{\theta}} \quad (\text{II-20})$$

Le tableau II-5 donne la valeur de α dans NaCl 0,2 M et dans NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1).

M_w	$[\eta]_0$	$[\eta]$ NaCl 0,2 M	α NaCl 0,2 M	$[\eta]$ NaCl 0,2 M/ Dioxanne	α NaCl 0,2 M/ Dioxanne
12 200	11,4	29,0	1,365	16,2	1,124
33 000	18,7	73,0	1,575	34,4	1,225
58 000	24,8	127,0	1,724	54,0	1,296

Tableau II-5 : Coefficients d'expansion α

On constate que la valeur de α croît en même temps que la masse moléculaire du polymère. Il semblerait donc que, qualitativement le mélange de solvants se comporte comme un solvant unique pour lequel l'équation classique de FLORY ⁽³⁹⁾ :

$$(\alpha^5 - \alpha^3) = 2 c (0,5 - \chi) M^{1/2} \quad (\text{II-21})$$

pourrait s'appliquer.

De plus pour un échantillon de masse moléculaire donnée le facteur d'expansion est plus faible lorsque le milieu contient du dioxanne ce qui confirme une diminution de la qualité du solvant.

La mesure de la viscosité intrinsèque de l'échantillon de masse 58 000 en fonction de la teneur en dioxanne en milieu basique précise cette diminution de α lorsque la teneur en dioxanne croît. (Tableau II-6).

% Dioxanne	α
0	1,724
10	1,638
20	1,502
30	1,372
33	1,296

Tableau II-6. Coefficient d'expansion en fonction de la composition du mélange NaCl 0,2 M + Dioxanne.

D - LA TRANSITION CHAÎNE \rightleftharpoons HÉLICE INDUITE PAR LE CHANGEMENT DE COMPOSITION DU SOLVANT.

a - mélange eau - dioxanne :

Comme nous l'avons vu plus haut le domaine de composition en dioxanne dans lequel on peut étudier les solutions de PLGA est limité à 33 % en dioxanne en présence de sel (NaCl 0,2 M). Au-delà de ce pourcentage le polymère n'est plus soluble.

La solubilité est différente si on considère une solution dans laquelle la force ionique est faible ou nulle. Dans ce cas le domaine de solubilité du polymère s'étend au-delà de 50 % en dioxanne. De plus, si la proportion de dioxanne devient suffisamment importante, on peut mettre en évidence une transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le solvant à pH constant (pH apparent : 7,3). Cette transition est caractérisée par des changements importants des propriétés optiques des solutions.

Elle devrait se manifester par une augmentation importante de la viscosité comme c'est le cas lors de la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le pH en présence de sel. En effet la viscosité d'un bâtonnet est en général plus importante que celle d'une chaîne statistique de même masse moléculaire.

Cependant comme cette transition a lieu en absence de sel l'effet polyélectrolyte joue un rôle prépondérant surtout dans le domaine des faibles pourcentages en dioxanne et masque le phénomène de transition conformationnelle.

La figure II-15 montre la variation de la viscosité relative d'une solution de PLGA en absence de sel en fonction du pourcentage en volume de dioxanne à concentration constante en polymère (40).

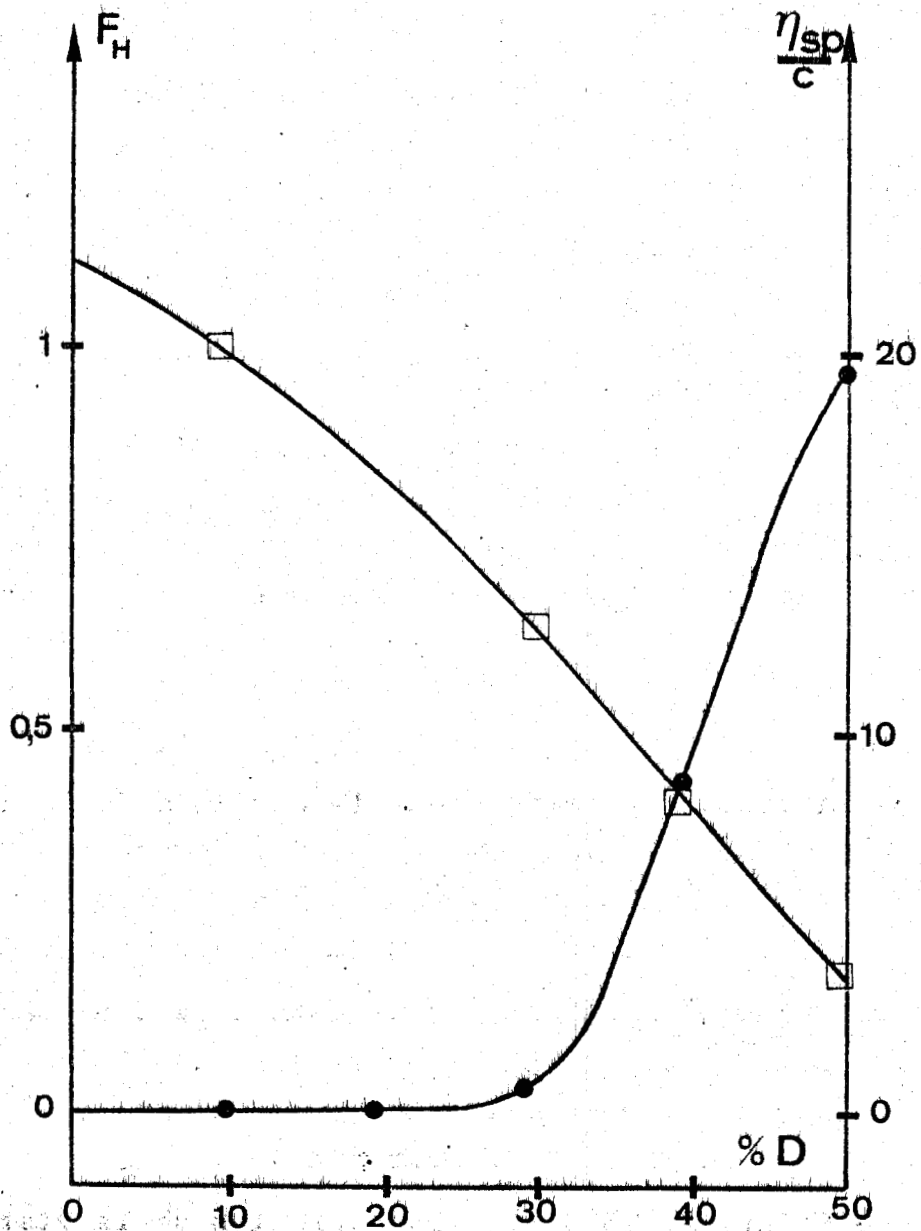


Figure II-15. La transition chaîne hélice induite par le dioxanne. Variation de $\frac{\eta_{sp}}{c}$ (□) et de la fraction d'hélice F_H (●).



Nous avons également représenté sur cette figure la variation de l'hélicité déterminée par dispersion du pouvoir rotatoire ou par dichroïsme circulaire. On constate qu'il n'y a aucune corrélation entre le comportement viscosimétrique et la transition conformationnelle. Pour les faibles taux en dioxanne l'effet polyélectrolyte est important et la viscosité est élevée. Lorsque le taux de dioxanne augmente la viscosité diminue. Ceci peut être interprété, comme nous l'avons fait précédemment dans le cas des solutions dans NaCl 0,2 M, par la formation d'une paire d'ions entre le groupe carboxylique chargé et son contre ion positif, favorisée par la diminution de la constante diélectrique. On diminue ainsi la charge apparente du polymère et on diminue les interactions électrostatiques, donc la viscosité.

b - mélange eau - chloroéthanol

Le 2 chloroéthanol est un solvant acide qui provoque un abaissement du pH de la solution. On ne pourra donc parler de transition induite par le solvant à pH constant comme c'est le cas avec le dioxanne. On peut s'attendre à observer la transition chaîne \rightleftharpoons hélice dans le mélange eau - chloroéthanol même en présence d'une force ionique importante.

La figure II-16 montre les résultats obtenus dans différentes conditions de force ionique et de masse moléculaire. Nous avons représenté la variation de $\frac{\eta_{sp}}{C}$ à concentration constante en fonction de la composition du solvant ainsi que la variation de l'hélicité déterminée par dichroïsme circulaire.

Dans le premier cas (figure II-16 a) la force ionique est nulle et la masse moléculaire est de 33 000. Comme dans le cas des mélanges eau - dioxanne la transition est masquée par l'importance de l'effet polyélectrolyte surtout pour les faibles taux en chloroéthanol.

Dans le second cas (figure II-16 b) l'effet polyélectrolyte est totalement supprimé par la force ionique importante ($I = 1 M$). Pour l'échantillon de masse 61 000 on observe une nette transition pour une composition de 35 % environ en chloroéthanol.

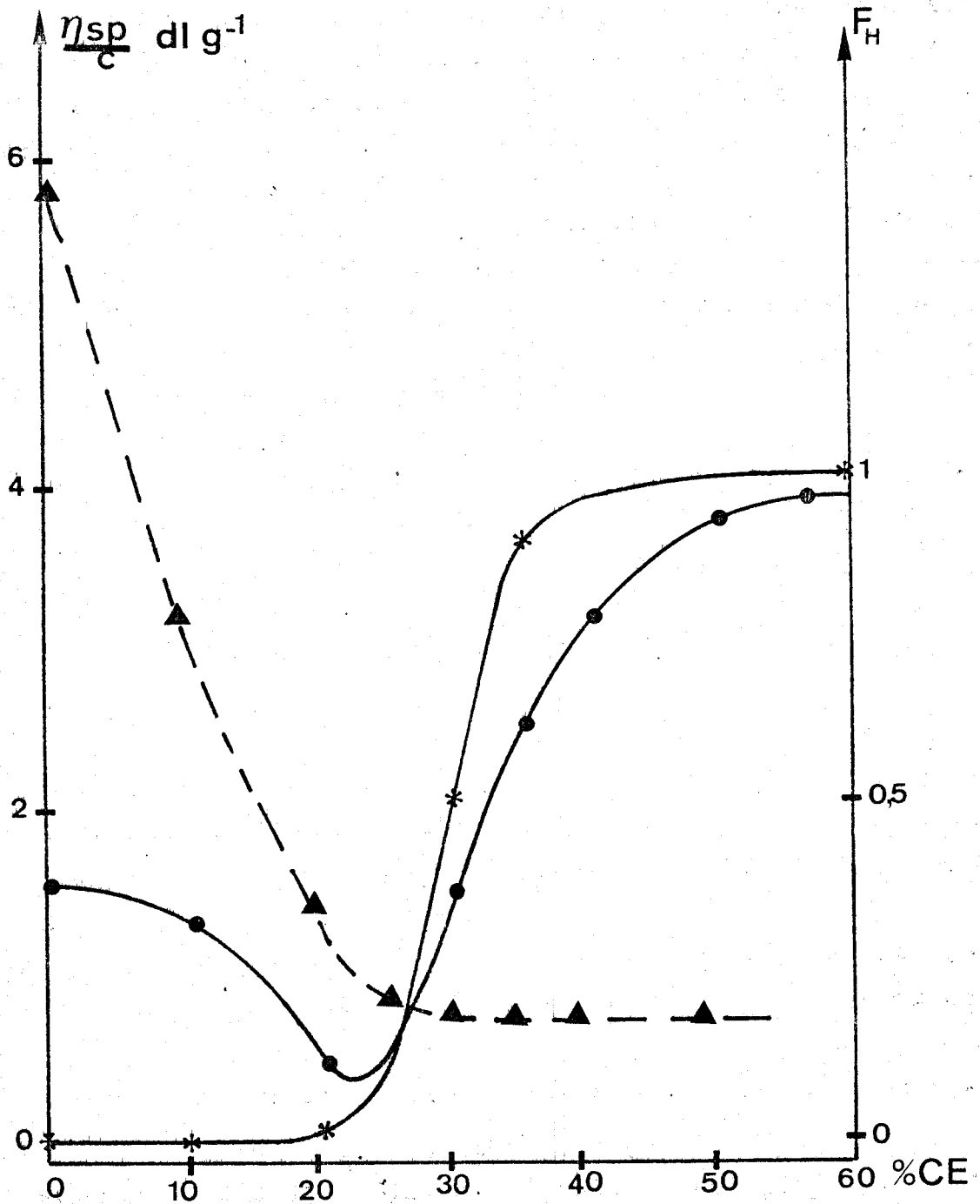


Figure II-16. La transition chaîne hélice induite par le chloroethanol :

- a) ▲ variation de $\frac{\eta_{sp}}{c}$ (mélanges H₂O/CE)
- b) ● variation de $\frac{\eta_{sp}}{c}$ (mélanges NaCl 1 M/CE)
- c) * variation de F_H

On observe un minimum de viscosité juste avant la transition, qui rappelle celui observé lors de la transition induite par le pH dans le mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne (2/1) (figure II-1).

E - CONCLUSION

L'étude viscosimétrique du PLGA en solution dans des mélanges de solvants a montré que l'addition de solvant organique à une solution aqueuse du polymère déplace le pH de la transition chaîne \rightleftharpoons hélice vers les pH basiques. On observe donc une stabilisation de la structure hélicoïdale qui existe aux bas pH. Ceci est confirmé par l'augmentation de la valeur du coefficient de MARK-HOUWINK qui tend vers la valeur observée dans un solvant fortement hélicogène tel que le N méthyl acétamide.

Pour expliquer la faible viscosité de l'hélice α du PLGA en milieu purement aqueux nous avons émis un certain nombre d'hypothèses :

- nous avons d'abord supposé une modification chimique de la molécule lors de la débenzylation du PLGB conduisant à une cyclisation de certains résidus. Cependant les données de la littérature ⁽¹²⁾ excluent l'existence d'une telle réaction dans les conditions opératoires que nous avons utilisées. De plus, cette réaction est pratiquement irréversible et le nombre de cycles formés doit être insensible à la présence de dioxanne.

Nous pouvons cependant remarquer que SCHIFFER et HOLTZER ⁽⁹⁾ ont également envisagé l'existence d'une modification chimique, mais d'une manière très vague, sans émettre d'hypothèse sur la nature de la réaction en cause. Il semble qu'ils aient ensuite abandonné cette hypothèse.

- le modèle d'"hélice brisée" est également peu satisfaisant. Dans le cas où on suppose un seul point de cassure (modèle de YU et STOCKMAYER et de TAKI et FUJITA) la diminution de viscosité calculée est inférieure à la diminution observée

expérimentalement. Il faut donc introduire au moins deux points de cassure ("hélice brisée"). Dans ce cas nous avons assimilé l'hélice brisée à une chaîne de Gauss mais le calcul du nombre de chaînons montre a posteriori que cette hypothèse de travail n'est pas correcte.

De plus rien ne justifie l'existence de cassures et on conçoit mal pourquoi une partie seulement des cassures serait supprimée par l'addition de dioxanne.

- l'hypothèse de l'existence de " β turns" ou " γ turns" est séduisante. Elle se heurte cependant à un certain nombre d'arguments tant théoriques qu'expérimentaux. Nous avons vu que la probabilité d'existence d'un " β turn" dans un homopolypeptide constitué de résidus glutamiques est très faible.

De plus, ces structures sont caractérisées par des contraintes angulaires importantes. L'existence de liaisons hydrogène y est possible mais non nécessaire. Or l'addition de dioxanne à la solution peut modifier les liaisons hydrogène mais non les angles diédraux. Les "turns" ne peuvent donc être supprimés par l'addition de dioxanne au milieu.

Seuls les modèles modifiés de "turns" faisant intervenir les molécules d'eau sont compatibles avec l'influence du dioxanne, à condition de supposer que ces modèles modifiés de "turns" présentent des contraintes angulaires beaucoup moins strictes.

- le modèle de bâtonnet souple (chaîne à longueur de persistance) que nous avons envisagé en dernier lieu nous paraît être celui qui convient le mieux. Il ne présuppose pas la rupture de certaines liaisons hydrogène le long de la molécule. Alors que le modèle d'"hélice brisée" suppose que l'addition de dioxanne reconstitue certaines liaisons hydrogène rompues, le modèle en bâtonnet souple ne nécessite qu'un renforcement de chacune des liaisons hydrogène déjà présentes dans la molécule.

Il permet enfin de caractériser la rigidité de la molécule par la longueur de persistance q ou par le nombre S d'unités monomères par segment statistique.

Lorsque le polymère est sous forme ionisée, l'addition de dioxanne diminue l'expansion du polyélectrolyte qui adopte un comportement hydrodynamique plus proche de celui d'une chaîne de Gauss. Nos résultats expérimentaux justifient a posteriori le choix du mélange eau dioxanne (2/1) comme solvant par DOTY et coll. ⁽⁵⁾. En effet dans ces conditions de solvant, la molécule sous forme désordonnée a un comportement assez voisin de celui d'une chaîne de Gauss ($a = 0,72$) (tandis que sous forme hélicoïdale la molécule adopte un comportement plus proche de celui d'un bâtonnet idéal ($a = 1,40$)).

La diminution de l'expansion du polymère en milieu eau dioxanne a été interprétée comme étant due à la formation de paires d'ions qui diminuent la charge apparente du polyélectrolyte. C'est la diminution de la constante diélectrique du milieu qui favorise la formation de ces paires d'ions. En l'absence de sel, le polymère subit une transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le solvant lorsqu'on augmente la quantité de dioxanne. Malheureusement les mesures de viscosité conviennent mal pour l'étude de ce phénomène en raison de l'effet polyélectrolyte.

Les méthodes optiques (D.O.R. et D.C.) sont mieux adaptées à une telle étude et permettent d'examiner l'influence de différents paramètres sur cette transition induite par le solvant.

CHAPITRE III

ETUDE OPTIQUE

ETUDE OPTIQUE

L'étude viscosimétrique nous a permis d'étudier l'influence du dioxanne sur les différentes conformations du PLGA en solution. Elle permet également la mise en évidence de la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le pH. Cependant, cette méthode de mesure convient mal pour l'étude de la transition induite par le changement de composition du solvant, transition qui ne peut avoir lieu qu'en absence de sel dans la solution. Nous nous sommes donc tournés vers les méthodes optiques qui conviennent mieux pour cette étude. Elles permettent également de considérer l'effet de paramètres tels que la force ionique, la concentration, la masse moléculaire ou la présence de groupes protecteurs résiduels.

RAPPELS

A - DEFINITIONS

Le pouvoir rotatoire d'une solution d'un composé optiquement actif est généralement exprimé par la rotation molaire corrigée du facteur de LORENTZ :

$$[\alpha] = \frac{3}{n^2 + 2} \frac{\alpha}{l \cdot C} \frac{M_0}{100} \quad (\text{III-1})$$

Dans cette relation n est l'indice de réfraction du solvant ou du mélange de solvant, α est l'angle de rotation exprimé en degrés, l est le trajet optique en dm, C est la concentration en g/ml et M_0 est la masse moléculaire d'un résidu.

Le dichroïsme circulaire est exprimé par l'ellipticité molaire $[\theta]$ exprimée par la relation :

$$[\theta] = \frac{\pi}{\lambda} (K_G - K_D) \frac{1}{C} \frac{M_0}{100} \quad (\text{III-2})$$

dans laquelle K_G et K_D sont les indices d'absorption des lumières polarisées gauche et droite, λ la longueur d'onde, C la concentration en g/ml et M_0 la masse d'un résidu.

K_G et K_D sont reliés aux coefficients d'extinction molaire ϵ_G et ϵ_D et on peut montrer que :

$$[\theta] = 3300 \Delta\epsilon \quad (\text{III-3})$$

avec

$$\Delta\epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D \quad (\text{III-4})$$

Expérimentalement on mesure la différence d'absorption ($A_G - A_D$)

$$\Delta\epsilon = \frac{M_0}{C l} (A_G - A_D) s \quad (\text{III-5})$$

relation dans laquelle s est la sensibilité en mm^{-1} .

B - DETERMINATION DE L'HELICITE A PARTIR DES MESURES DE DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE ET DE DICHROISME CIRCULAIRE.

1 - Dispersion optique rotatoire.

La courbe de dispersion optique rotatoire d'un polypeptide en solution dépend de la conformation de celui-ci.

MOFFITT ⁽¹⁾ en a proposé une représentation mathématique sous la forme d'une équation de DRUDE à deux termes :

$$[m'] = a_0 \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + b_0 \frac{\lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} \quad (\text{III-6})$$

a_0 , λ_0 et b_0 sont des constantes.

a_0 dépend de la nature du polymère et du solvant, λ_0 est égal à 212 nm. b_0 dépend de la conformation du polypeptide. En traçant

$[m'] \frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda_0^2}$ en fonction de $\frac{\lambda^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$ on obtient les valeurs de

a_0 et b_0 (MOFFITT et YANG⁽²⁾).

Le paramètre b_0 est d'environ - 630 pour un polypeptide adoptant entièrement une conformation en hélice α droite et de zéro pour un polypeptide sous forme désordonnée. Le taux d'hélice α droite F_H peut donc être exprimé par :

$$F_H = \frac{b_0}{-630} \quad (\text{III-7})$$

Si la courbe de dispersion optique rotatoire contient la contribution d'autres conformations, le taux d'hélice α déterminé comme ci-dessus sera faux. Pour résoudre ce problème, SHECHTER et BLOUT⁽³⁾ ont proposé d'autres équations qui permettent de détecter la présence d'autres conformations organisées que l'hélice (par exemple les structures β).

Au lieu de déterminer le taux d'hélice à partir de b_0 , en traçant la courbe de dispersion optique rotatoire, on peut simplement mesurer la valeur de $[m']$ à une longueur d'onde donnée. Comme $[m']$ dépend de la conformation du polypeptide, on peut ainsi évaluer l'hélicité.

Par exemple à 234 nm $[m'] = -14\ 000$ pour l'hélice α

et $[m'] \neq 0$ pour une conformation désordonnée

$$\text{On a alors : } F_H = \frac{[m']_{234}}{-14\ 000}$$

La mesure de b_0 ou de $[m']$ permet de suivre la transition hélice \rightleftharpoons conformation désordonnée.

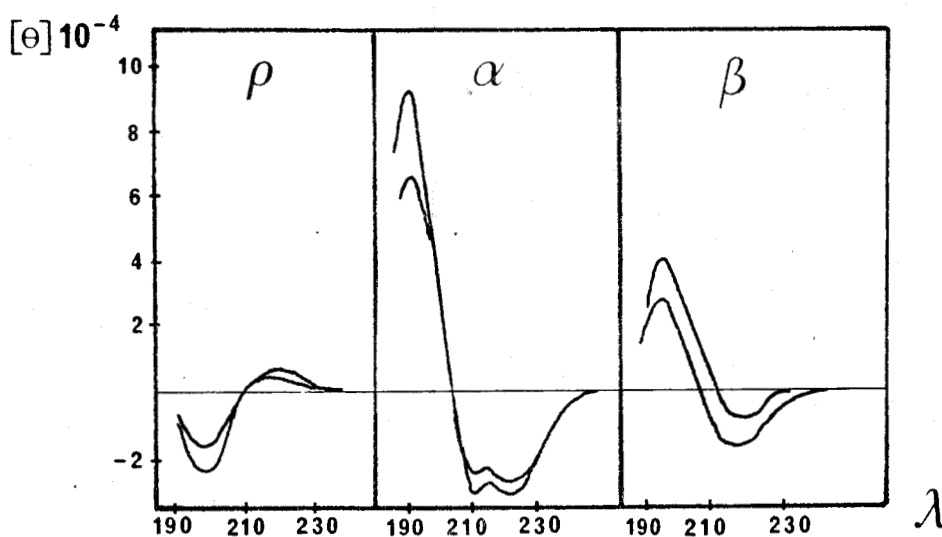
2 - Dichroïsme circulaire.

Le chromophore peptidique présente deux bandes d'absorption :

- . la bande $n \rightarrow \pi^*$ située à 220 nm.
- . la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ située à 190 nm.

Dans le cas où le polypeptide adopte la conformation α hélicoïdale, la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ est dédoublée en deux bandes attribuées à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ polarisée parallèlement et perpendiculairement à l'axe de l'hélice. Ces bandes sont situées à 209 et 190 nm.

Les figures III-1 à III-3 présentent les spectres dichroïques de l'hélice α , de la structure β , et de la conformation désordonnée, tels qu'ils ont été proposés par GRATZER et COWBURN⁽⁴⁾.



Figures III-1 à III-3. Spectres dichroïques de la conformation désordonnée, de l'hélice α , et de la structure β ⁽⁴⁾.

La structure β est caractérisée par une bande négative située vers 220 nm et une bande positive située vers 195 nm.

Le spectre dichroïque d'une structure en hélice α droite présente deux bandes négatives situées à 209 et 222 nm et une bande positive située à 190 nm.

Enfin la conformation désordonnée présente une faible bande positive à 218 nm et une bande négative à 198 nm.

A 222 nm les ellipticités de l'hélice α et de la conformation désordonnée sont très différentes. Si la solution étudiée ne contient que ces deux conformations, on peut calculer la teneur en hélice par la relation :

$$F_H = \frac{4\ 000 - [\theta]_{222}}{40\ 000} \quad (\text{III-8})$$

si l'on adopte les valeurs :

$[\theta]_{222} = + 4\ 000 \text{ d}^\circ \text{ cm}^2/\text{décimole}$ pour la conformation entièrement désordonnée,

$[\theta]_{222} = - 36\ 000 \text{ d}^\circ \text{ cm}^2/\text{décimole}$ pour la conformation entièrement α hélicoïdale.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

A - TRANSITION INDUITE PAR LE pH.

Les figures III-4 à III-6 montrent les spectres dichroïques correspondant à la transition induite par le pH dans l'eau et dans différents mélanges de solvants en absence de sel. Tous les spectres présentent un point isodichroïque situé à 202 nm pour une ellipticité de $- 17\ 000 \text{ d}^\circ \text{ cm}^2/\text{décimole}$. Cela signifie que seules l'hélice α et une conformation désordonnée sont présentes dans la solution.

Le tracé de $[\theta]_{222}$ en fonction du pH (pH apparent en milieu eau/solvant organique) permet de mieux mettre en évidence la transition. (figure III-7).

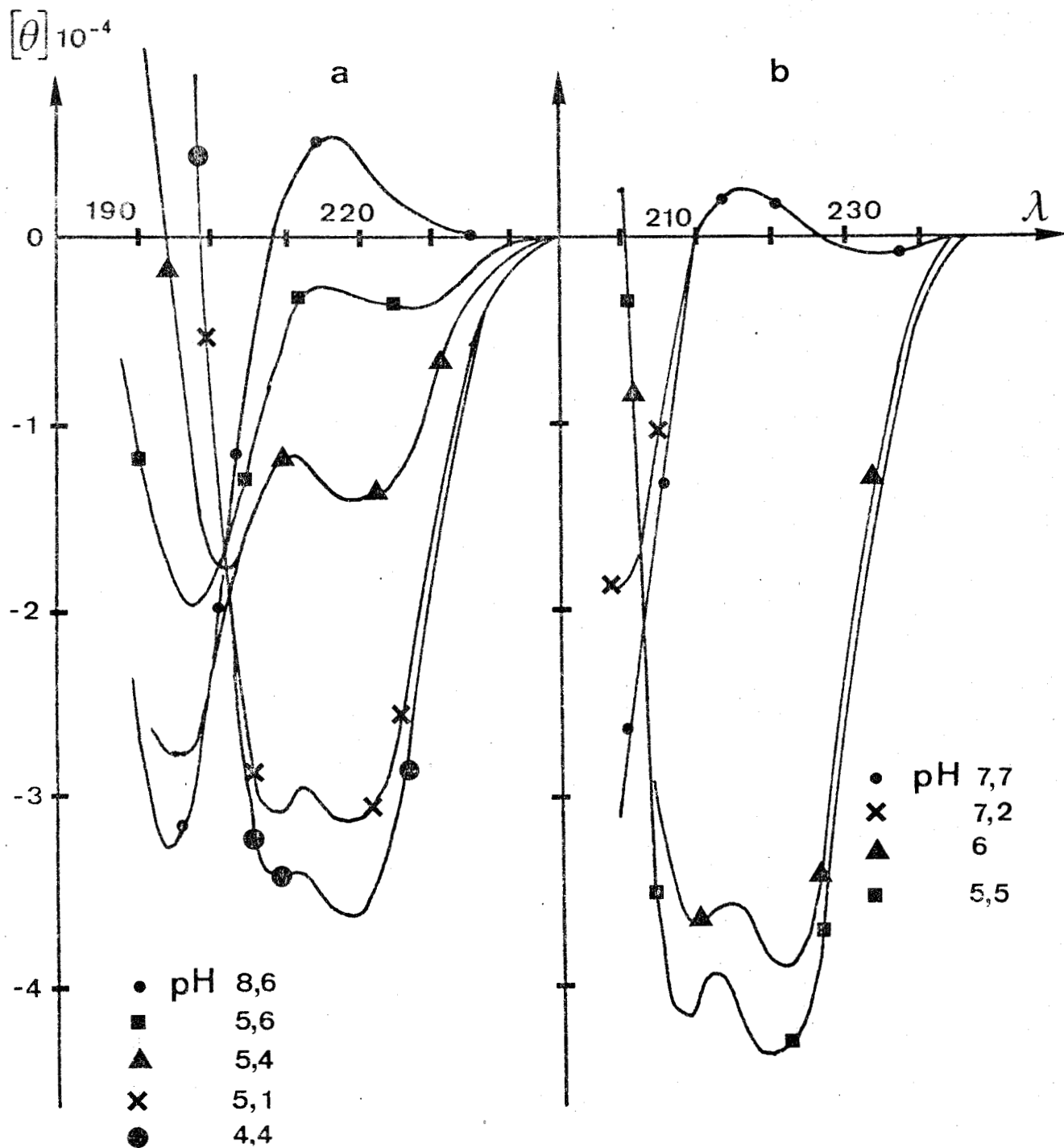


Figure III-4. Spectres dichroïques obtenus au cours de la transition chaîne hélice induite par le pH :

a) dans l'eau

b) dans le mélange H₂O/Dioxanne (2/1).



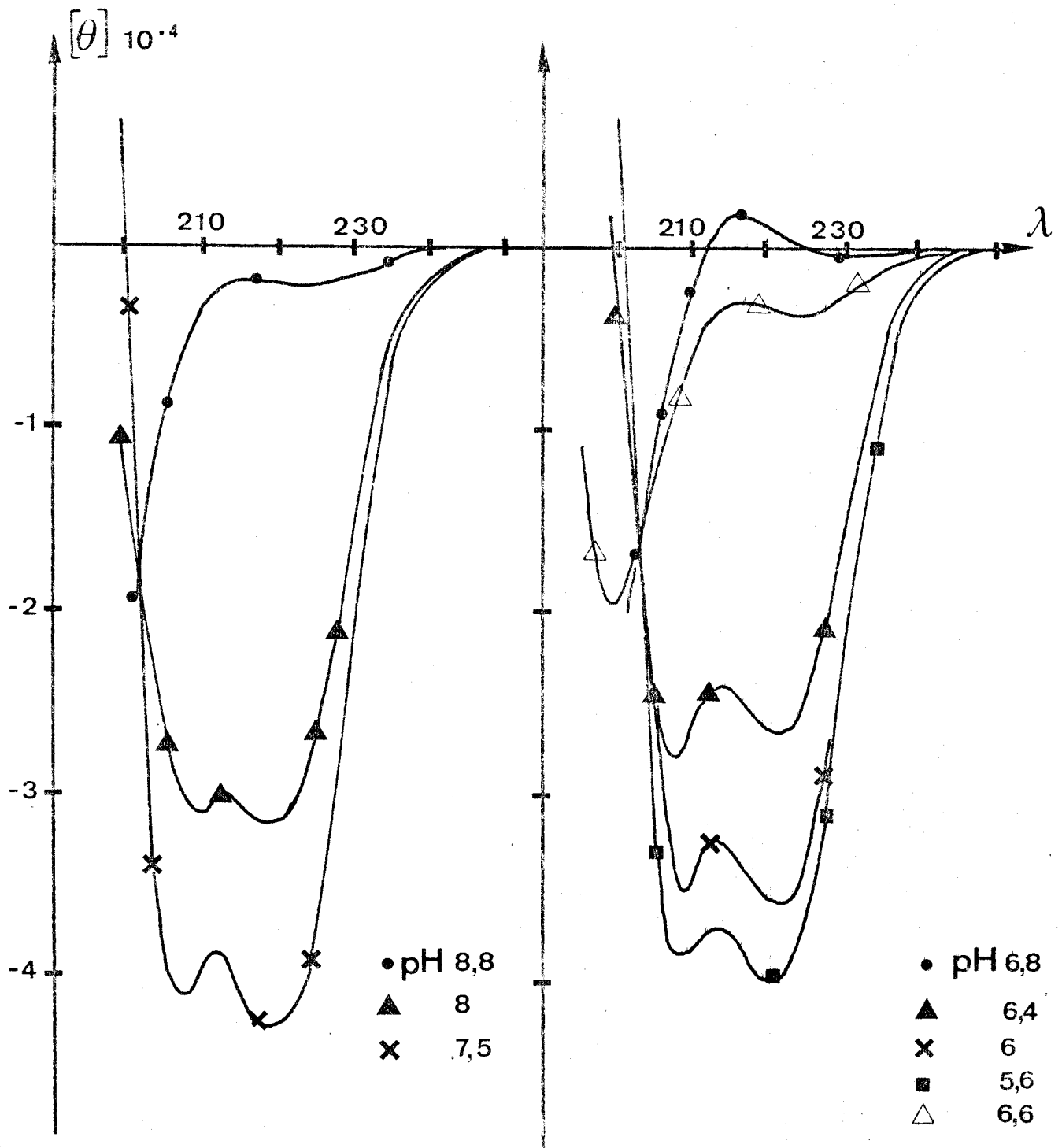


Figure III-5 et III-6..

Spectres dichroïques obtenus au cours de la transition chaîne hélice induite par le pH :

dans le mélange H_2O /Dioxanne (58 % en dioxanne)

dans le mélange H_2O /chloroéthanol (20 % en chloroéthanol)



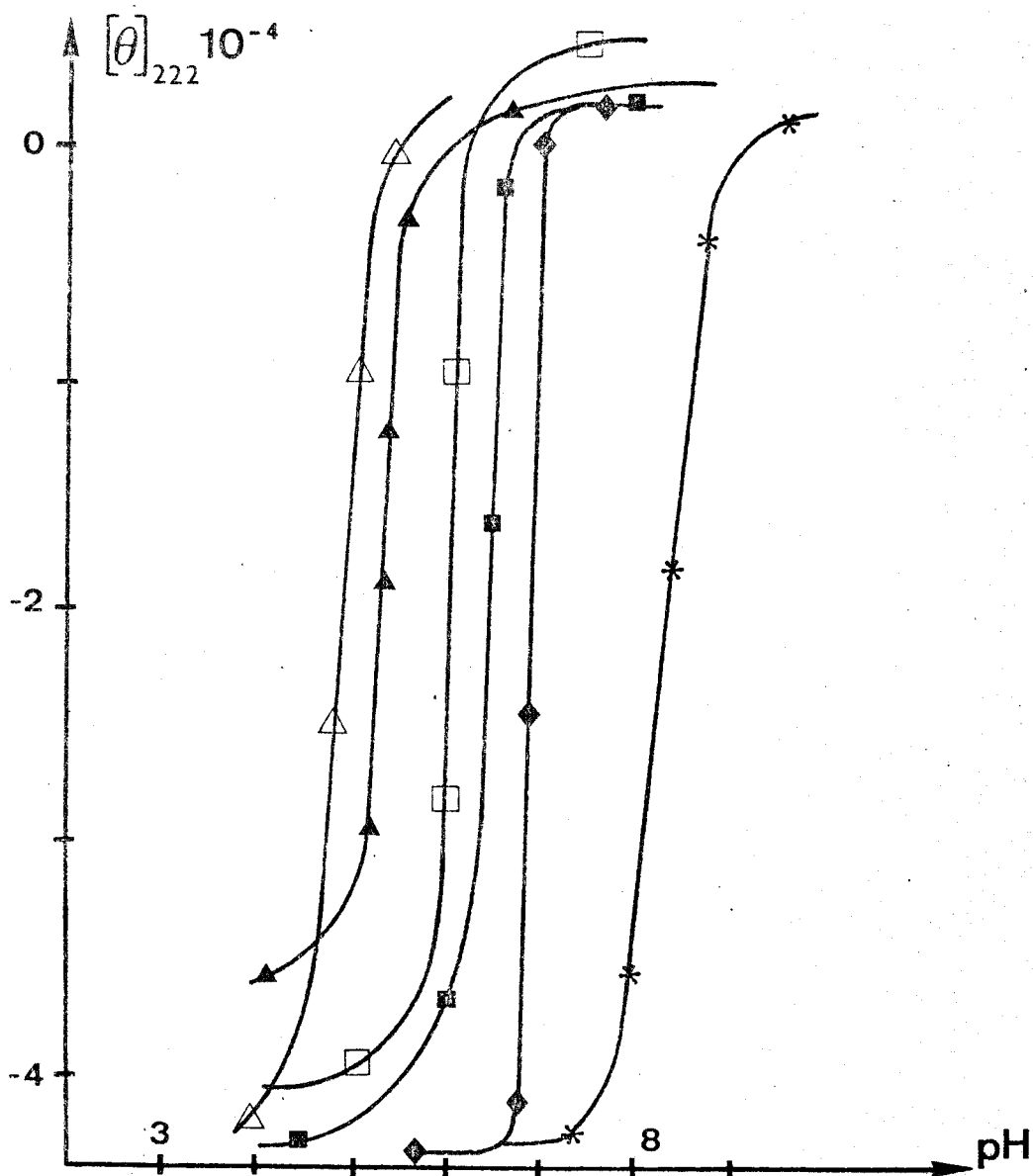


Figure III-7. Variation de $[\theta]_{222}$ en fonction du pH dans différents mélanges de solvants :

- ▲ H₂O ; △ NaCl 0,2 M ; ◆ H₂O/Dioxanne (33 % en dioxanne) ; □ NaCl 0,2 M/Dioxanne (33 % en dioxanne) ; * H₂O/Dioxanne (58 % en dioxanne) ; ■ H₂O/chloroethanol (20 % en CE)

Cette figure montre également la transition dans NaCl 0,2 M et dans un mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne (67 %/33 % en volume). On constate que le pH apparent de la transition augmente lorsque la proportion de solvant organique augmente. L'addition de sel diminue au contraire le pH de la transition.

En réalité, le paramètre dont dépend le plus directement la conformation du polymère n'est pas le pH mais α , le

coefficient de dissociation des groupes carboxyliques (Les valeurs de α sont calculées à partir des données potentiométriques du chapitre IV). α dépend du pH mais aussi de la constante de dissociation K_o qui diminue à mesure que la quantité de solvant organique croît.

Il est donc plus correct de tracer $[\theta]_{222}$ en fonction de α plutôt qu'en fonction du pH. (figure III-8)

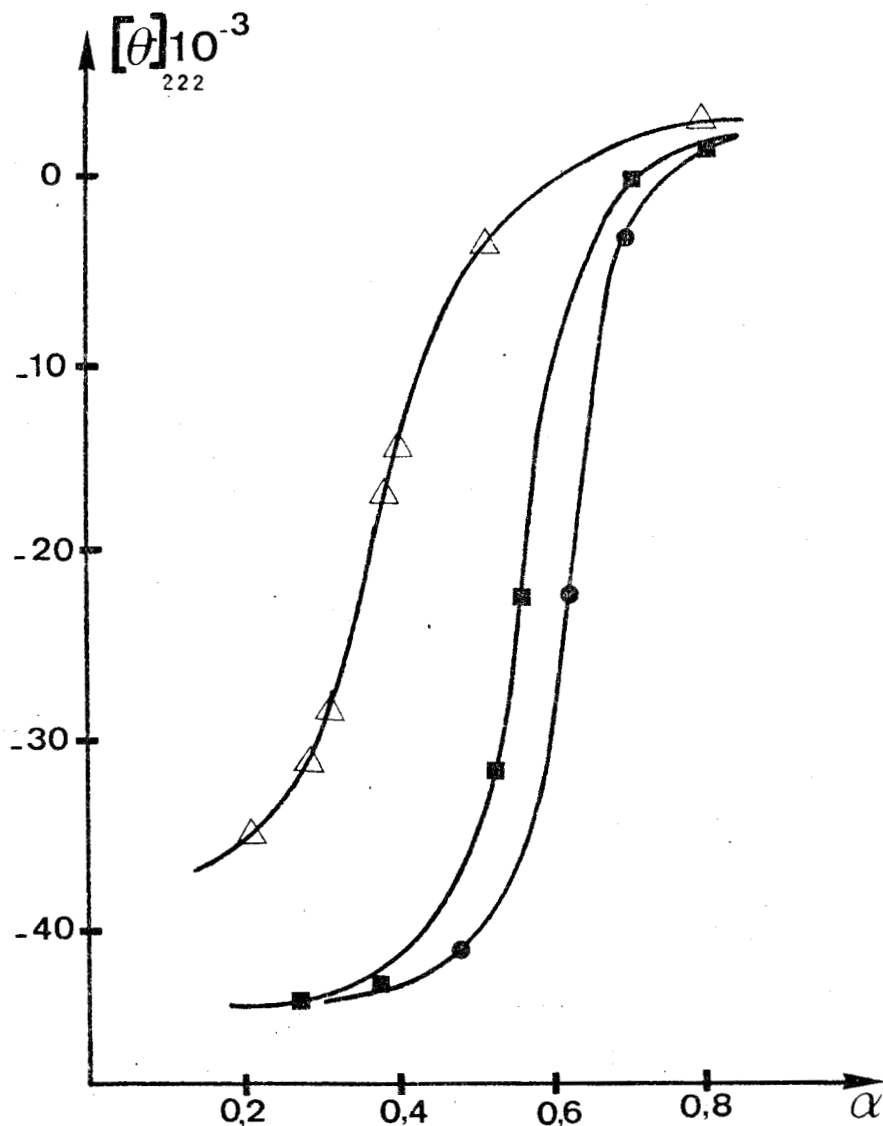


Figure III-8. Variation de $[\theta]_{222}$ avec le coefficient de dissociation α :

\triangle H₂O ; \blacksquare H₂O/Dioxanne (33 % en dioxanne) ;
 \bullet H₂O/Dioxanne (58 % en dioxanne).

Le coefficient de dissociation à la demi-transition $\alpha_{1/2}$ augmente avec la quantité de solvant organique. Cela signifie que la stabilité de l'hélice est alors augmentée.

La figure III-7 montre également que l'ellipticité maximale atteinte aux pH les plus acides augmente en milieu organique: $[\theta]_{222} = - 36\ 000$ dans l'eau et $[\theta]_{222} = - 43\ 000$ en présence de dioxanne ou de chloroéthanol. Ceci est en accord avec les résultats de FASMAN et collaborateurs ⁽⁵⁾ qui ont observé une augmentation de b_0 dans les mélanges eau-solvant organique. Nous avons vu au chapitre II que l'addition de solvant organique augmente la longueur de persistance de la molécule. On peut penser que l'augmentation observée de $[\theta]_{222}$ est due à l'augmentation de la longueur de la séquence hélicoïdale. Les incertitudes sur la mesure de $[\theta]_{222}$ sont cependant trop grandes pour proposer une relation quantitative entre ces deux phénomènes. De plus, la modification du milieu environnant le centre actif (changement de polarité du solvant) doit également entraîner une variation de $[\theta]_{222}$.

Dans le cas du mélange à 58,5 % de dioxanne le spectre obtenu à pH 3,8 est différent de celui obtenu pour d'autres compositions. Nous verrons que cela est dû au début de la transition induite par le solvant.

B - TRANSITION INDUITE PAR LE SOLVANT.

Comme nous le verrons par la suite, la présence d'électrolyte dans la solution contenant le polymère chargé modifie considérablement les conditions dans lesquelles s'effectue la transition. Il est donc nécessaire d'éliminer toute trace de ces composés. Pour cela le PLGA est dissous dans un léger excès de soude. On obtient alors le sel de sodium du PLGA. La solution est ensuite dialysée cinq à six fois contre un excès d'eau parfaitement exempt de sel. On obtient ainsi une solution ne contenant que le polyélectrolyte et ses contre-ions associés. Le pH de cette solution est d'environ 7.

1 - Transition induite par le solvant en absence de sel.

La figure III-9 montre l'évolution des spectres dichroïques lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de dioxanne à une solution aqueuse de PLGA chargé.

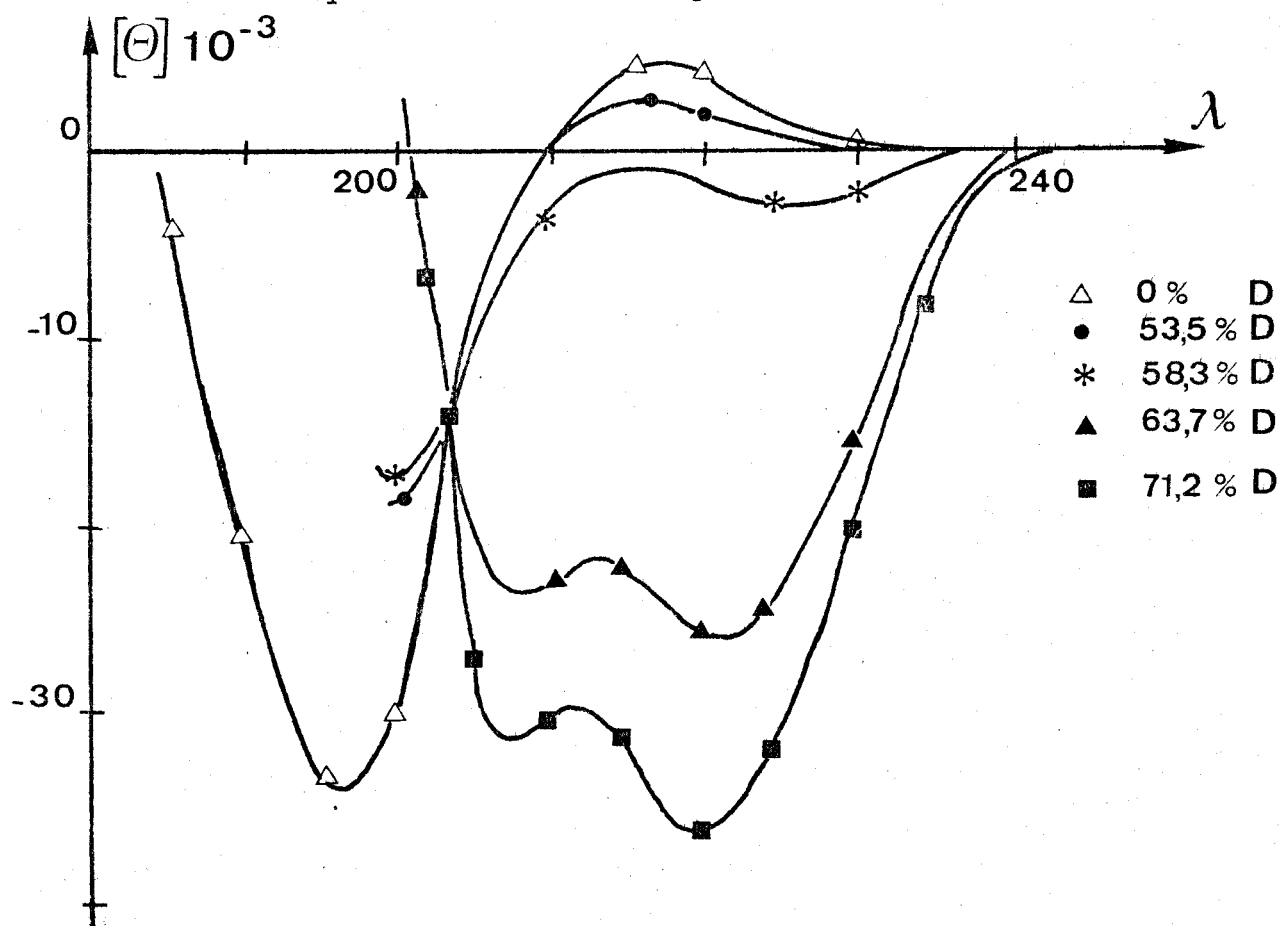
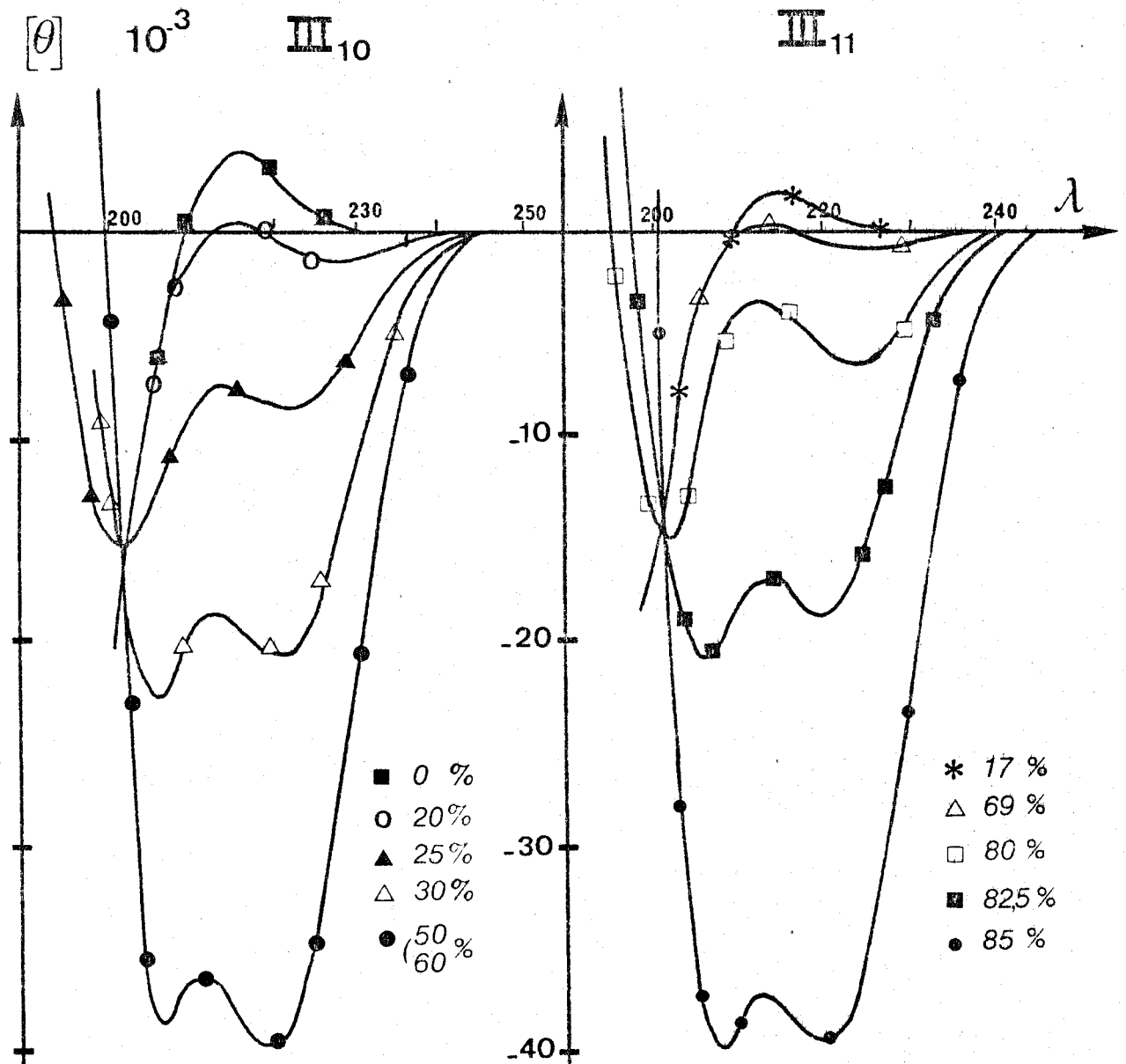


Figure III-9. Spectres dichroïques au cours de la transition induite par le dioxanne.

Les premiers spectres sont caractéristiques d'une conformation désordonnée et on obtient ensuite le spectre d'une hélice α . Tous les spectres présentent un point isodichroïque pour $\lambda = 203 \text{ nm}$ et $[\theta] = -15\,000 \text{ d}^\circ \text{ cm}^2/\text{décimole}$.

Le même type de transition est obtenu avec le 2 chloroéthanol (dans ce cas la transition est en fait une transition induite par le pH) (figure III-10), et avec le tertio-butanol (fig. III-11).



Figures III-10 et III-11. Spectres dichroïques au cours de la transition induite par le chloroéthanol et par le t-Butanol.

Si la nature du solvant n'a pas d'influence sur l'aspect des spectres, elle modifie par contre la composition du solvant correspondant au point de demi-transition.

La figure III-12 regroupe les résultats obtenus pour les différents solvants en donnant $[\theta]_{222}$ en fonction du pourcentage de solvant organique.

Le tableau III-1 donne pour le PLGA les pourcentages de solvant organique à la demi-transition ainsi que la constante diélectrique correspondante.

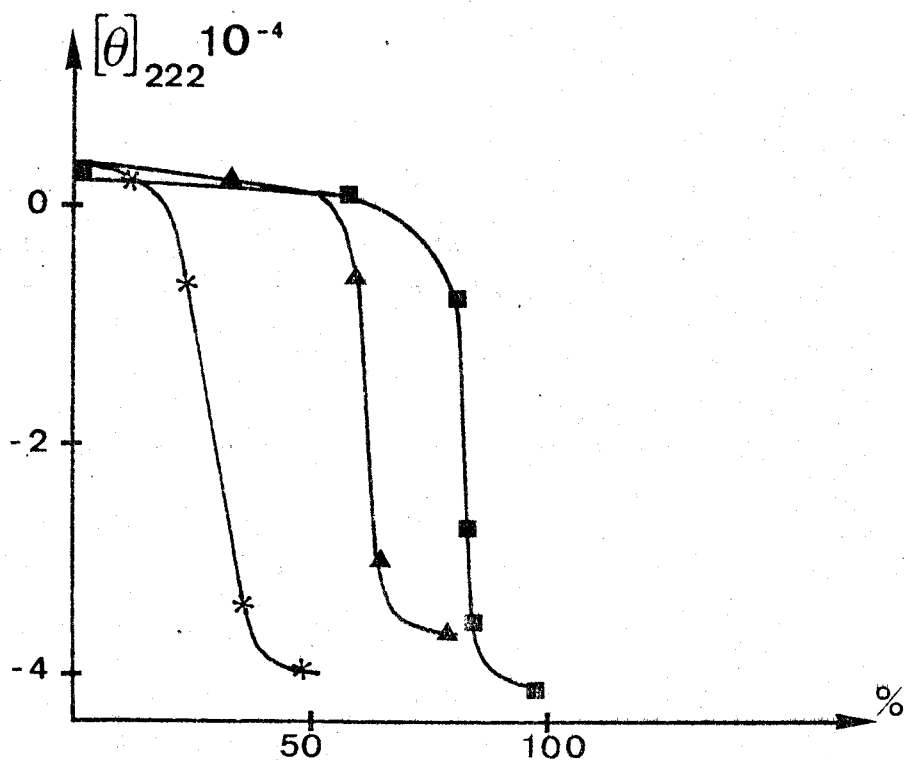


Figure III-12. Variation de $[\theta]_{222}$ au cours de la transition induite par le solvant :

▲ dioxanne ; * chloroethanol ; ■ t Butanol

Solvant	% en volume	ϵ c)
Dioxanne	60 %	32,7
t. Butanol	82 %	22,3
Méthanol a)	88 %	37,1
2 chloroéthanol	27 %	64,3
Pyridine b)	48 %	46,6

Tableau III-1. Constante diélectrique du mélange de solvants à la demi-transition : cas du PLGA.

a) TIFFANY et KRIMM (6)

b) GIANCOTTI, QUADRIFOGLIO, CRESCENZI (7)

c) calculée en supposant que la constante diélectrique d'un mélange de solvants varie linéairement avec la composition.

Le 2 chloroéthanol et la pyridine sont des cas particuliers où la transition n'a pas lieu à pH constant. Le 2 chloroéthanol est un solvant acide. La pyridine est une base qui forme un complexe en solution avec le PLGA. Même si l'on exclut ces deux cas particuliers il ne semble pas y avoir de corrélation étroite entre l'apparition de la transition et la valeur de la constante diélectrique du milieu.

Il faut cependant remarquer que la constante diélectrique envisagée ici est la constante diélectrique moyenne du milieu ϵ_m . En réalité le paramètre important est la valeur de la constante diélectrique au voisinage immédiat du polymère ϵ_p c'est-à-dire la constante diélectrique de la couche de solvation du polyélectrolyte. Cette valeur de ϵ_p peut être différente de ϵ_m si la composition de la couche de solvation est différente de celle du milieu. Ce sera le cas si on est en présence d'un phénomène de solvation préférentielle d'un des constituants du mélange de solvants. Il n'est donc pas exclu que la constante diélectrique au voisinage immédiat du polymère au moment de la transition soit indépendante de la nature du solvant.

Le tableau III-2 donne les valeurs du pourcentage de solvant organique et de la constante diélectrique à la transition pour d'autres polypeptides.

A l'examen des tableaux III-1 et III-2 on constate qu'en ce qui concerne les polypeptides ionisables (acide Polyglutamique Poly L Lysine et Poly arginine) la transition a lieu pour des valeurs de ϵ comprises entre 22 et 37. Or lorsqu'on diminue la constante diélectrique d'une solution, c'est entre $\epsilon = 20$ et $\epsilon = 40$ qu'on observe la formation de paires d'ions. En dessous de $\epsilon = 15$ environ il n'y a pratiquement pas de dissociation et au dessus de $\epsilon = 40$ les ions libres prédominent⁽¹²⁾

On peut donc penser que pour un polypeptide ionisé, la transition chaîne \rightleftharpoons hélice a lieu lorsque le nombre de paires d'ions formées est suffisamment important pour diminuer la charge nette et permettre la formation d'une structure hélicoïdale.

Polymère	Solvant		% en volume	ϵ
Poly L Lysine	Méthanol	a)	88 %	37,1
Poly L Lysine	i Propanol	b)	77 %	32,1
Poly L Lysine	Dioxanne	c)	71 %	24,3
Poly arginine	Dioxanne	c)	71 %	24,3
Poly hydroxypropyl glutamine	Dioxanne	d)	40 %	47,8

- a) EPAND et SCHERAGA (8)
- b) BARTERI et PISPISA (9)
- c) RIFKIND (10)
- d) INOUE et IZUMI (11)

Tableau III-2. Constante diélectrique du solvant à la demi-transition : autres polypeptides.

2 - Influence de la force ionique sur la transition induite par le solvant.

En absence de sel, la transition induite par le dioxanne ou le 2 chloroéthanol est complète c'est-à-dire qu'il est possible d'obtenir 100 % d'hélicité sans observer aucun phénomène de précipitation en solution. Nous allons examiner maintenant l'influence de la force ionique sur la transition. Les figures III-13 a à III-13 c montrent l'effet de l'addition de dioxanne à des solutions de PLGA contenant des quantités croissantes de sel de 10^{-3} à 10^{-1} M.

Pour 10^{-3} M en NaCl, la transition a lieu vers 60 % en dioxanne. Le spectre correspondant semble être celui d'un mélange hélice - chaîne. Cependant l'intensité relative des bandes situées vers 208 et 222 nm est différente (voir figures III-10 et III-11) et il est probable que la bande à 208 nm est déjà atténuée par le début de la précipitation. Au delà de 60 % les spectres sont déformés la bande située à 208 nm disparaît. Simultanément la solution devient opalescente puis un précipité apparaît

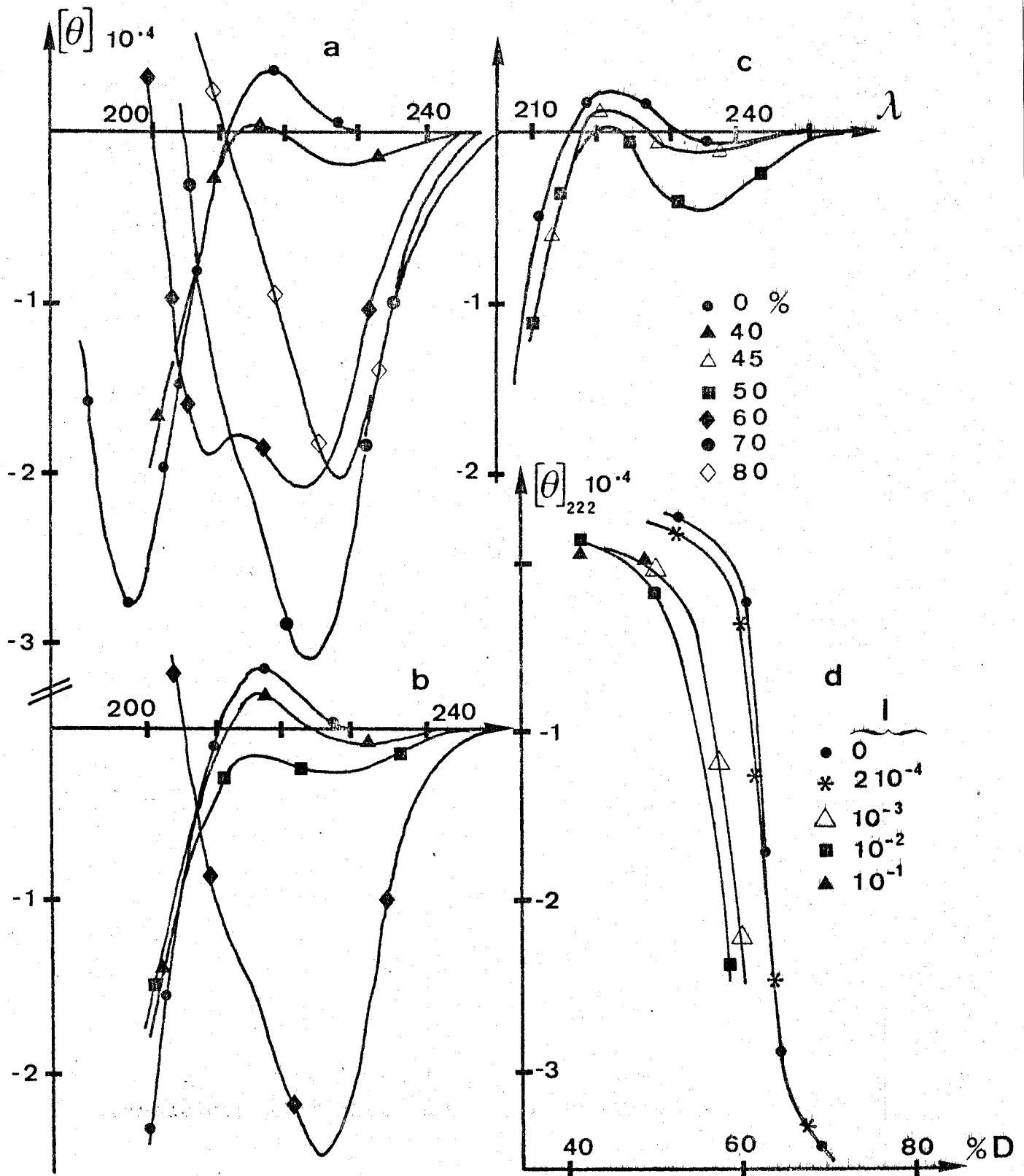


Figure III-13. Transition induite par le dioxanne, à différentes forces ioniques.
 a) $10^{-3} M$; b) $10^{-2} M$; c) $10^{-1} M$;
 d) variation de $[\theta]_{222}$ en fonction du pourcentage de dioxanne



si on continue l'addition de dioxanne. En l'absence de sel, la solution reste limpide au moins jusqu'à 80 % en dioxanne.

En présence de 10^{-3} M NaCl le spectre obtenu à 80 % de dioxanne ne présente qu'une bande située à 228 nm d'intensité assez faible. Si l'on augmente la force ionique de la solution de départ, le phénomène s'accroît. Pour 10^{-2} M la transition n'est que partiellement réalisée avant la précipitation. Pour 10^{-1} M la transition n'a pas lieu et le précipité apparaît dès 50 % de dioxanne. La limite de solubilité est donc 60 % pour 10^{-3} M, 50 % pour 10^{-2} M et 40 % pour 10^{-1} M.

La figure III-13 d (voir plus haut) montre que le pourcentage de dioxanne à la demi-transition tend à diminuer lorsque la force ionique augmente. Le passage à l'hélice est donc favorisé par la présence de sel, du moins dans la limite de concentration où la transition est encore possible. Si on compare ce résultat à ceux obtenus dans le cas de la transition conformation désordonnée \rightleftharpoons hélice induite par abaissement du pH (voir figure III-7), on constate que dans le cas d'un mélange à 33 % en dioxanne la transition vers l'hélice a lieu à pH 6,9 en mélange eau - dioxanne et à pH 6,0 en mélange NaCl 0,2 M - dioxanne. Dans ces mélanges le passage à l'hélice est donc retardé par la présence de sel. Ceci est donc contraire aux résultats obtenus lors de la transition induite par le solvant.

Dans le cas du 2 chloroéthanol, le phénomène est très différent. Comme le montre la figure III-14 la transition est complète pour toutes les valeurs de la force ionique comprises entre 10^{-3} et 1 M. Aucun phénomène de précipitation n'apparaît dans le milieu. La composition du solvant à la demi-transition dépend de la force ionique. En effet le pourcentage de 2 chloroéthanol à la demi-transition passe de 32 à 23 % lorsque la force ionique varie de 0 à 1 M. Simultanément le pH de la solution à la demi-transition passe de 6,7 à 5,3. Si on considère cette transition comme une transition induite par le pH, l'hélice est stable si le pH est inférieur à 6,7, lorsque $I = 0$ et pour des pH inférieurs à 5,3 lorsque $I = 1$ M. L'augmentation

de la force ionique diminue donc le domaine de stabilité de l'hélice ce qui est en accord avec les résultats de IIZUKA et YANG (13) et ceux de la figure III-7 pour ce qui est de la transition induite par le pH.

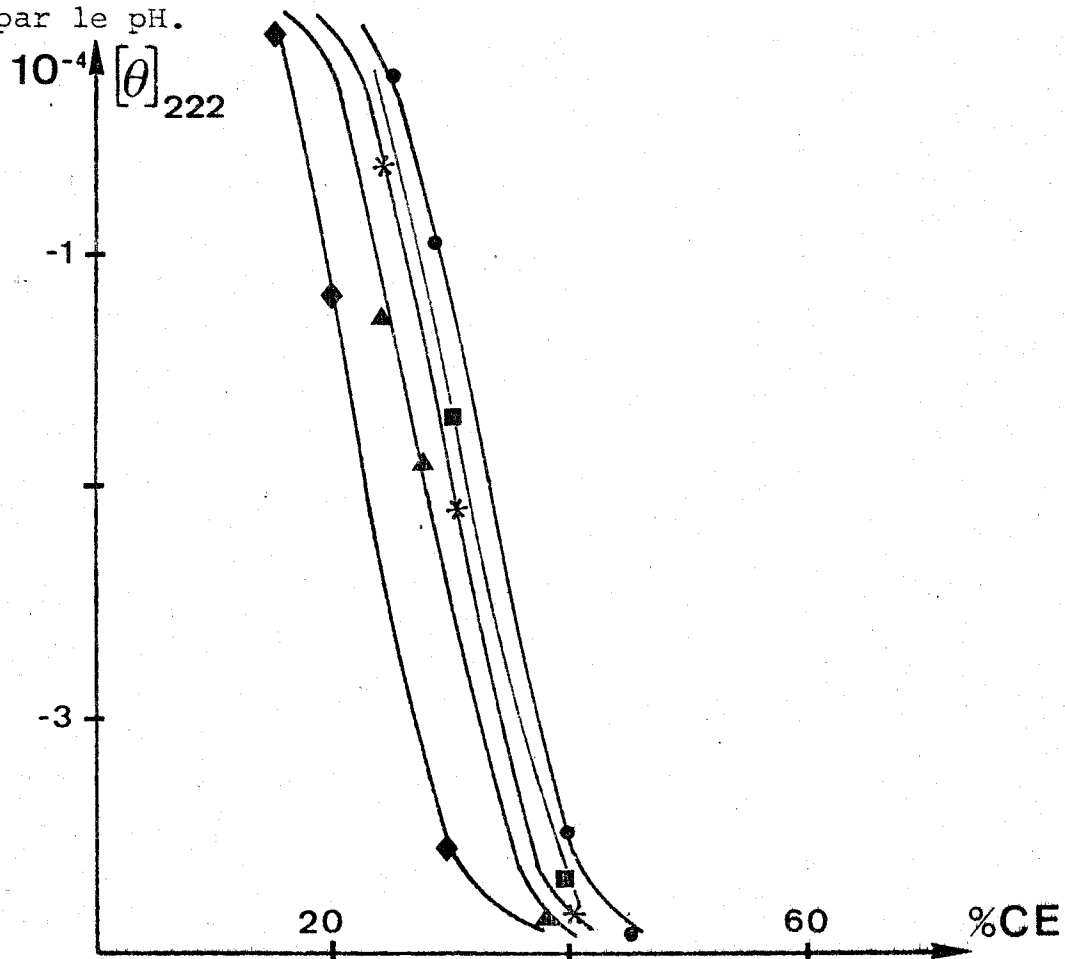


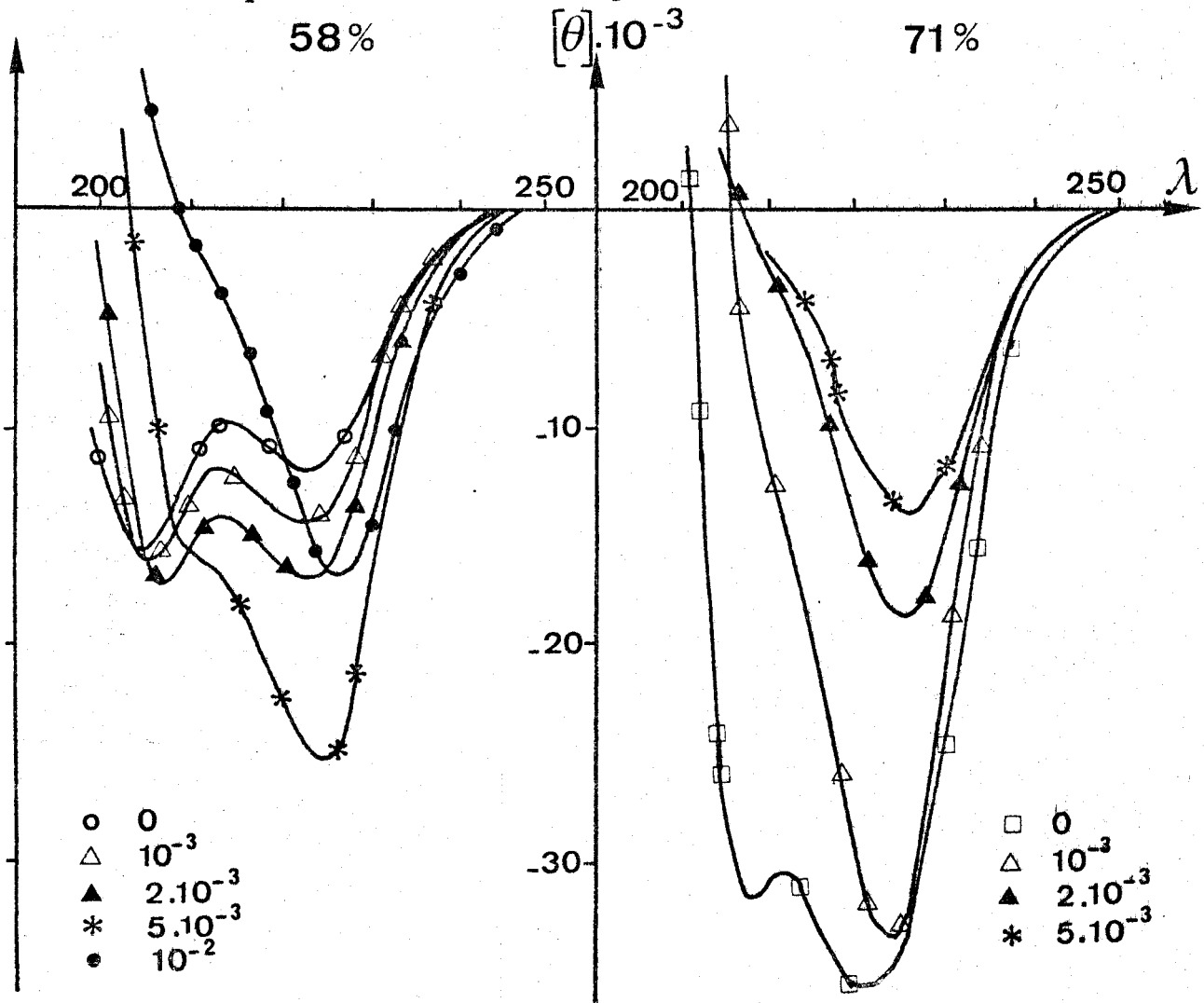
Figure III-14. Transition induite par le chloroéthanol à différentes forces ioniques :

* $I = 0$; ● $I = 10^{-3} M$; ■ $I = 10^{-2} M$;
 ▲ $I = 10^{-1} M$: ◆ $I = 1 M$.

Dans le cas du dioxanne, le sel de sodium de l'acide polyglutamique devient insoluble dans le milieu, précipite, et la transition ne peut pas avoir lieu. Par contre lorsque le milieu contient du 2 chloroethanol, le polymère peut passer sous forme acide. La forme hélicoïdale est donc favorisée, d'autant plus qu'elle est stabilisée par la présence de solvant organique. Aucun précipité n'est alors observé.

Pour étudier d'une manière plus complète l'influence du sel sur la transition nous avons choisi deux solutions contenant respectivement 58,3 et 71,2 % de dioxanne c'est-à-dire situées au début et à la fin de la transition induite par ce solvant, en absence de sel (voir figure III-12).

Des quantités croissantes de sel variant entre 10^{-3} et 10^{-2} M NaCl ont été ajoutées à ces solutions. Les spectres obtenus sont présentés sur les figures III-15 et III-16.



Figures III-15 et III-16. Influence de la force ionique sur une solution de PLGA dans un mélange eau dioxanne à 58 % en dioxanne et à 71 % en dioxanne.

A 58,3 % de dioxanne le spectre est caractéristique d'un mélange hélice/chaîne. Lorsque la force ionique augmente,

on observe une évolution du spectre vers une hélicité plus grande correspondant à une augmentation de $[\theta]_{222}$.

Jusqu'à une force ionique de $2 \cdot 10^{-3}$ M la solution est limpide. Les spectres obtenus présentent un point isodichroïque.

Si l'on augmente encore la force ionique, on augmente la valeur de $[\theta]_{222}$. Simultanément la solution se trouble, les spectres sont déformés et le point isodichroïque disparaît. On peut donc dire que l'addition de sel favorise dans une certaine mesure la formation d'hélice mais le polymère précipite bien avant d'avoir une hélicité de 100 %.

Si l'on part d'une solution contenant 71,2 % de dioxanne (fig. III-16) l'hélicité est déjà importante. Une augmentation faible de la force ionique provoque immédiatement un trouble dans la solution et les spectres sont déformés. L'augmentation de la force ionique ne fait qu'accentuer le phénomène.

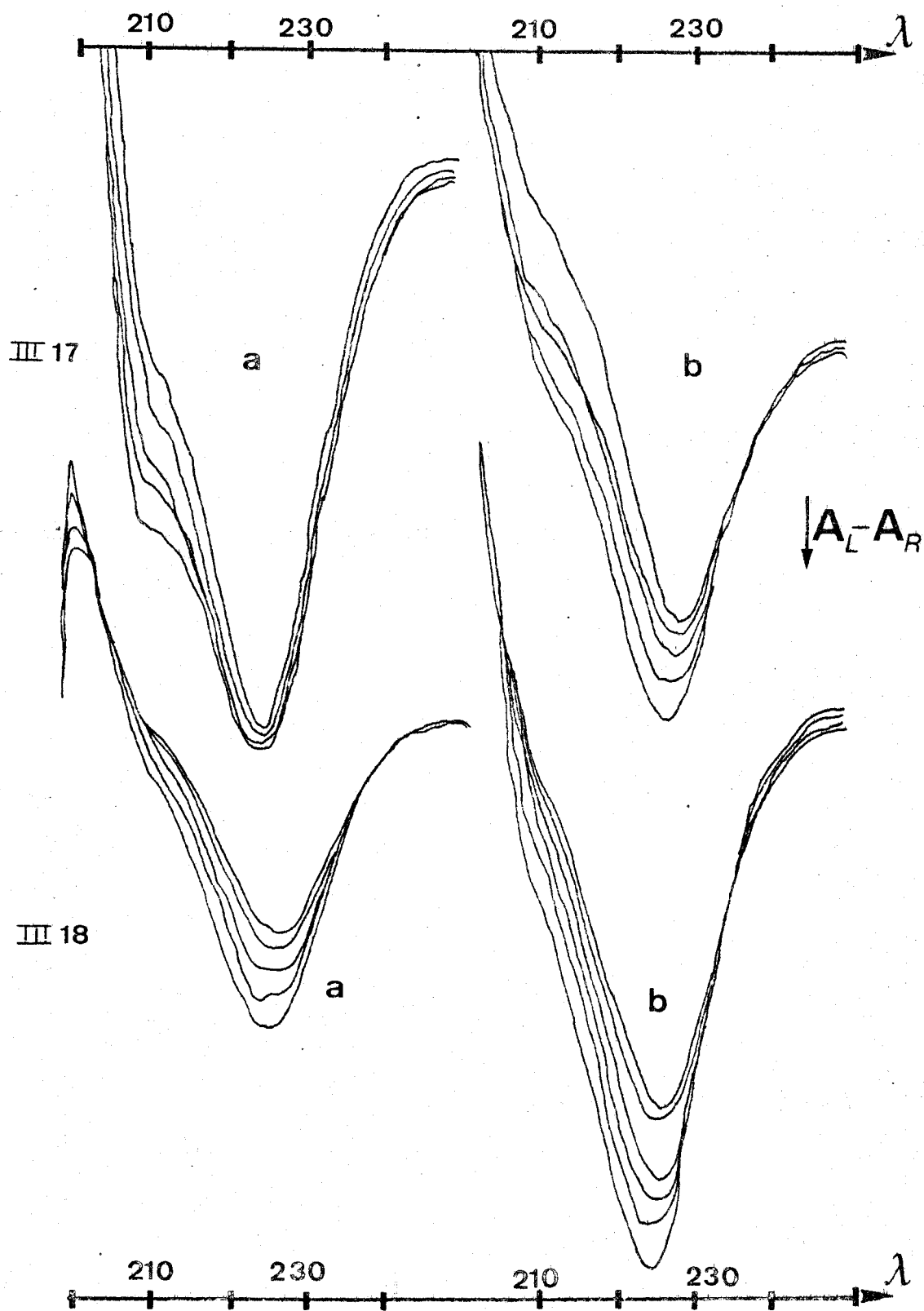
La première étape de l'évolution observée dans la solution à 58,3 % de dioxanne, c'est-à-dire l'augmentation de l'hélicité, n'existe évidemment pas et on obtient immédiatement la précipitation du polymère. Les figures III-17 et III-18 montrent l'évolution dans le temps des spectres ainsi obtenus. Pour les solutions à 58,3 % de dioxanne et de forces ioniques $5 \cdot 10^{-3}$ et 10^{-2} M en NaCl (fig. III-17 a et fig III.17 b) on observe une forte diminution de l'intensité de la bande à 209 nm. La bande située à 225 nm diminue légèrement en intensité et subit un effet bathochrome.

On observe les mêmes effets sur les solutions à 71,2 % en dioxanne et 10^{-3} et $2 \cdot 10^{-3}$ M en sel (fig. III-18 a et III-18 b)

3 - Influence du pH de départ de la solution.

a - Dioxanne

Si l'on ajoute du dioxanne à une solution de PLGA dissous dans NaOH 0,1 N aucune transition n'est observée. Très rapidement un précipité apparaît dans la solution, de manière analogue à ce qu'on obtient en présence de NaCl 0,1 M.



Figures III-17 et III-18. Evolution des spectres dichroïques du PLGA dans les mélanges eau/dioxanne à 58 % (figure III-17) et 71 % (Figure III-18) en dioxanne à différentes forces ioniques.

BIS
LILLE

b - 2 chloroéthanol

La figure III-19 montre les résultats obtenus lorsqu'on ajoute du 2 chloroéthanol à une solution de PLGA dans NaOH 0,1 N

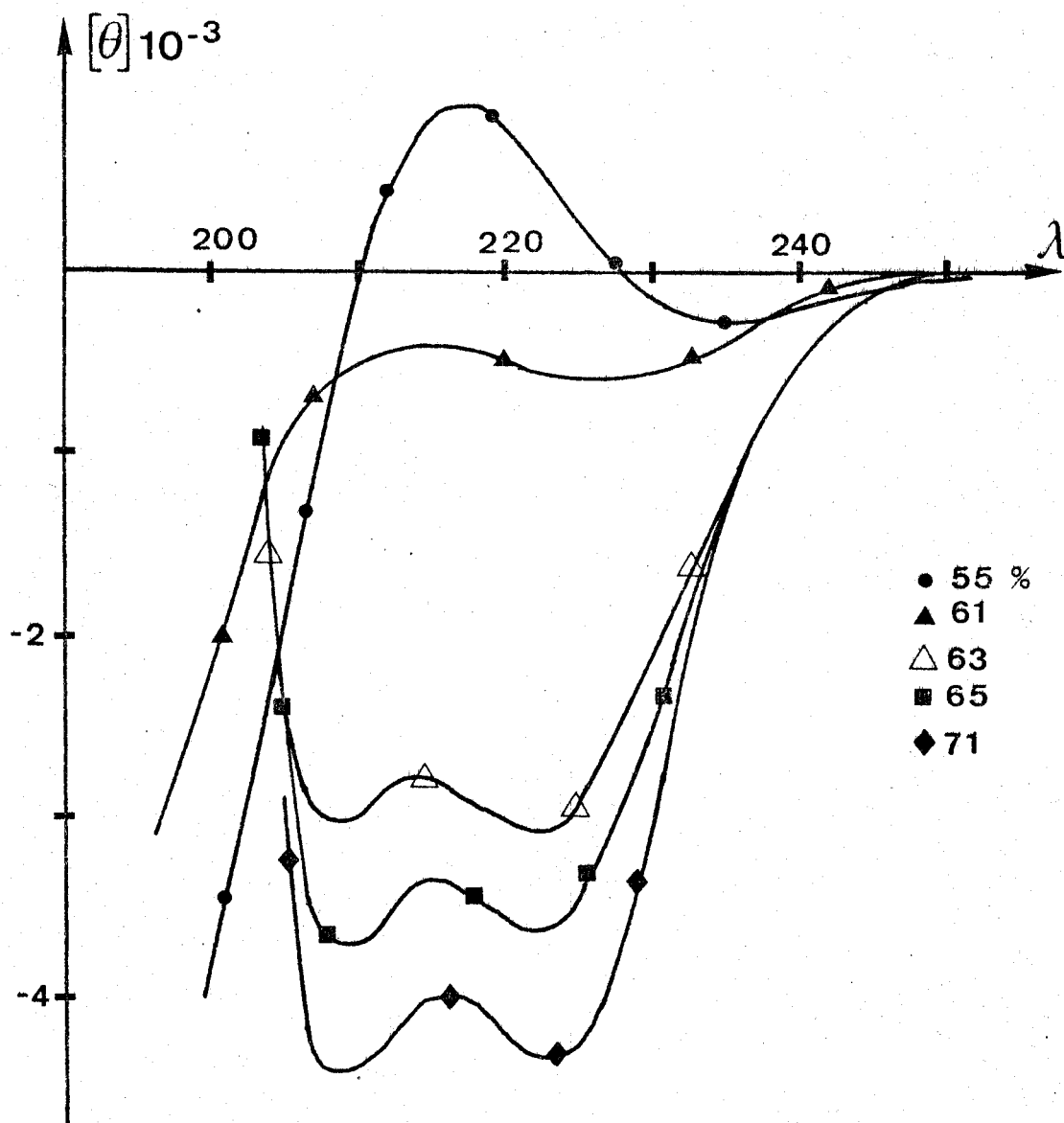


Figure III-19. Spectres dichroïques obtenus par addition de chloroéthanol à une solution de PLGA dans NaOH 0,1 M.

Jusqu'à 59 % en 2 chloroéthanol le polymère a une conformation désordonnée. Vers 61 % la transition commence. Simultanément un

trouble apparaît dans la solution et une partie du polymère précipite. Si l'on poursuit l'addition de 2 chloroéthanol, les spectres dichroïques enregistrés à partir de la solution surnageante montrent une augmentation de l'hélicité. L'ellipticité maximale atteinte dans ces conditions est de $-4\ 000\ \text{d}^\circ\ \text{cm}^2/\text{décimole}$. Si le polymère était entièrement en solution l'ellipticité serait de $-40\ 000\ \text{d}^\circ\ \text{cm}^2/\text{décimole}$ ce qui signifie que seuls 10 % environ du polymère sont restés en solution. La figure III-20 montre la variation de $[\theta]_{222}$, b_0 et $[m']_{334}$ en fonction de la proportion de 2 chloroéthanol.

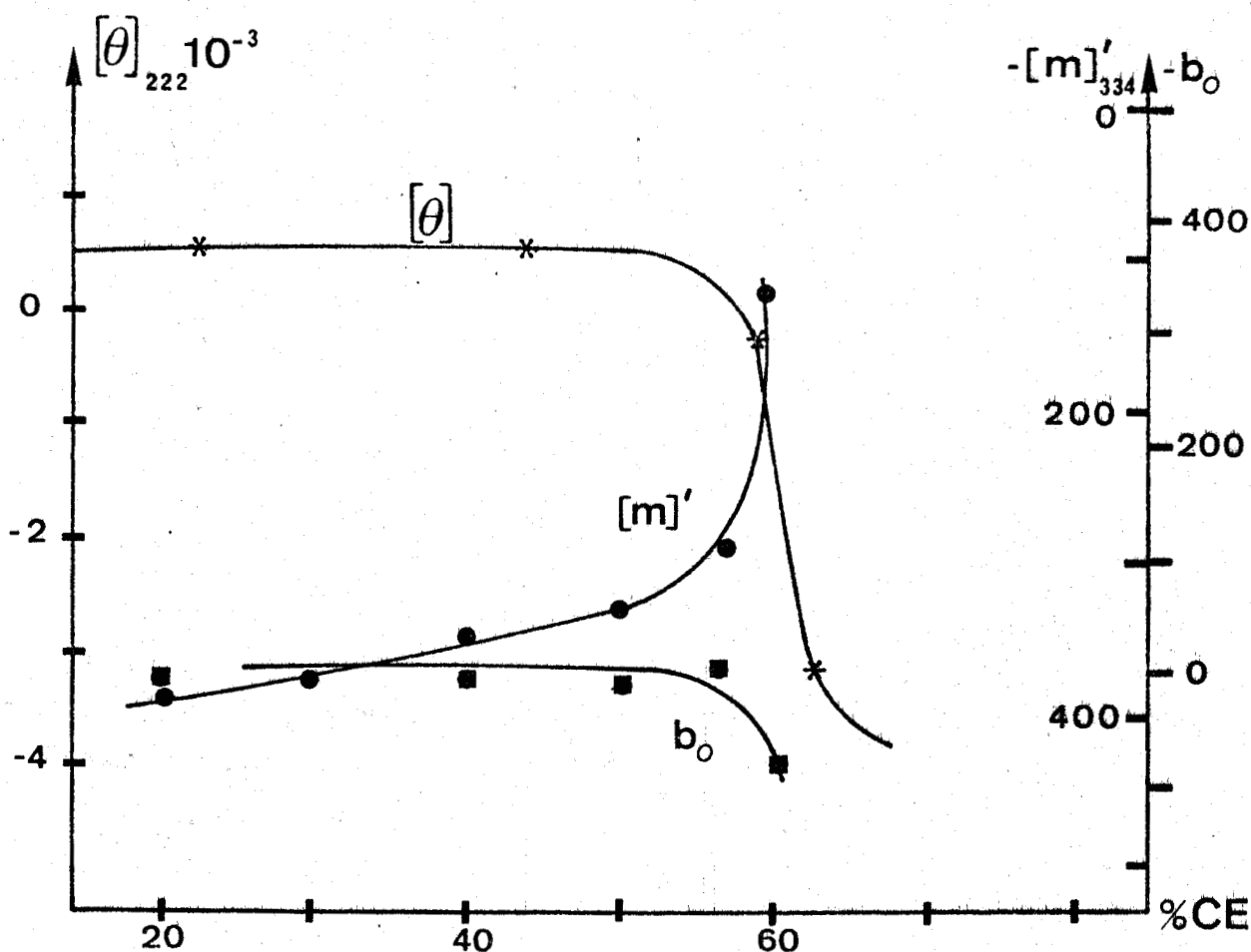


Figure III-20. Variation de b_0 , $[m']_{334}$ et $[\theta]_{222}$ au cours de l'addition de chloroéthanol à une solution de PLGA dans NaOH 0,1 M.

Le précipité obtenu dans les conditions ci-dessus a été récupéré puis lyophilisé. Sa masse moléculaire déterminée dans les conditions décrites par WADA (NaCl 0,2 M ; pH 7,3) est d'environ 15 000 tandis que la masse du composé de départ est de 33 000.

La transition serait donc accompagnée d'un fractionnement, les molécules de plus grandes masses moléculaires restant en solution et passant sous forme hélicoïdale tandis que les molécules de masses plus faibles précipitent. Ceci rappelle le phénomène de fractionnement observé par SPACH et collaborateurs (14,15) sur les solutions acides de PLGA dans l'eau. Si l'on abaisse fortement le pH d'une solution de PLGA dans l'eau, on observe à la fois un phénomène de précipitation et d'agrégation. SPACH et collaborateurs ont montré qu'il se produit un fractionnement, les fortes masses restant en solution sous forme d'agrégats d'hélices tandis que les faibles masses précipitent. Dans notre cas, on n'observe aucune agrégation en solution en raison de la présence de solvant organique. Une interprétation approfondie de ce phénomène nécessiterait une étude expérimentale plus poussée que nous ne l'avons fait. Même lorsque la solution ne contient aucun sel ou aucune base en excès, la transition dépend du pH de départ de la solution. Ainsi nous avons provoqué la transition par le 2 chloroéthanol dans des solutions dont le pH de départ était 7,25 et 6,45. La figure III-21 montre la variation de b_0 et $[\theta]_{222}$ pour ces solutions.

Lorsque le pH de départ est de 7,25 le pourcentage de 2 chloroéthanol à la demi-transition est de 30 %. Ce pourcentage passe à 10 % lorsque le pH de départ est de 6,45. Si l'on trace $[\theta]_{222}$ et b_0 en fonction du pH de la solution, les deux courbes obtenues sont extrêmement voisines, ce qui montre une nouvelle fois que la transition provoquée par l'addition de 2 chloroéthanol est en fait une transition induite par le pH.

4 - Evolution des spectres au cours du temps.

Dans ce qui précède tous les spectres ont été enregistrés immédiatement après la préparation des solutions. Cependant nous avons observé que dans tous les cas où l'on a affaire à une solution de PLGA dans un mélange de solvants, les spectres obtenus présentent une évolution au cours du temps et indiquent

tous une augmentation de l'hélicité. Ce phénomène a déjà été observé pour le PLGA dans le mélange eau - méthanol (TIFFANY et KRIMM ⁽⁶⁾), pour la poly L ornithine dans les mélanges eau - éthanol et eau - isopropanol et pour la poly L Lysine dans le mélange eau - isopropanol (BARTERI et PISPISA ⁽⁹⁾).

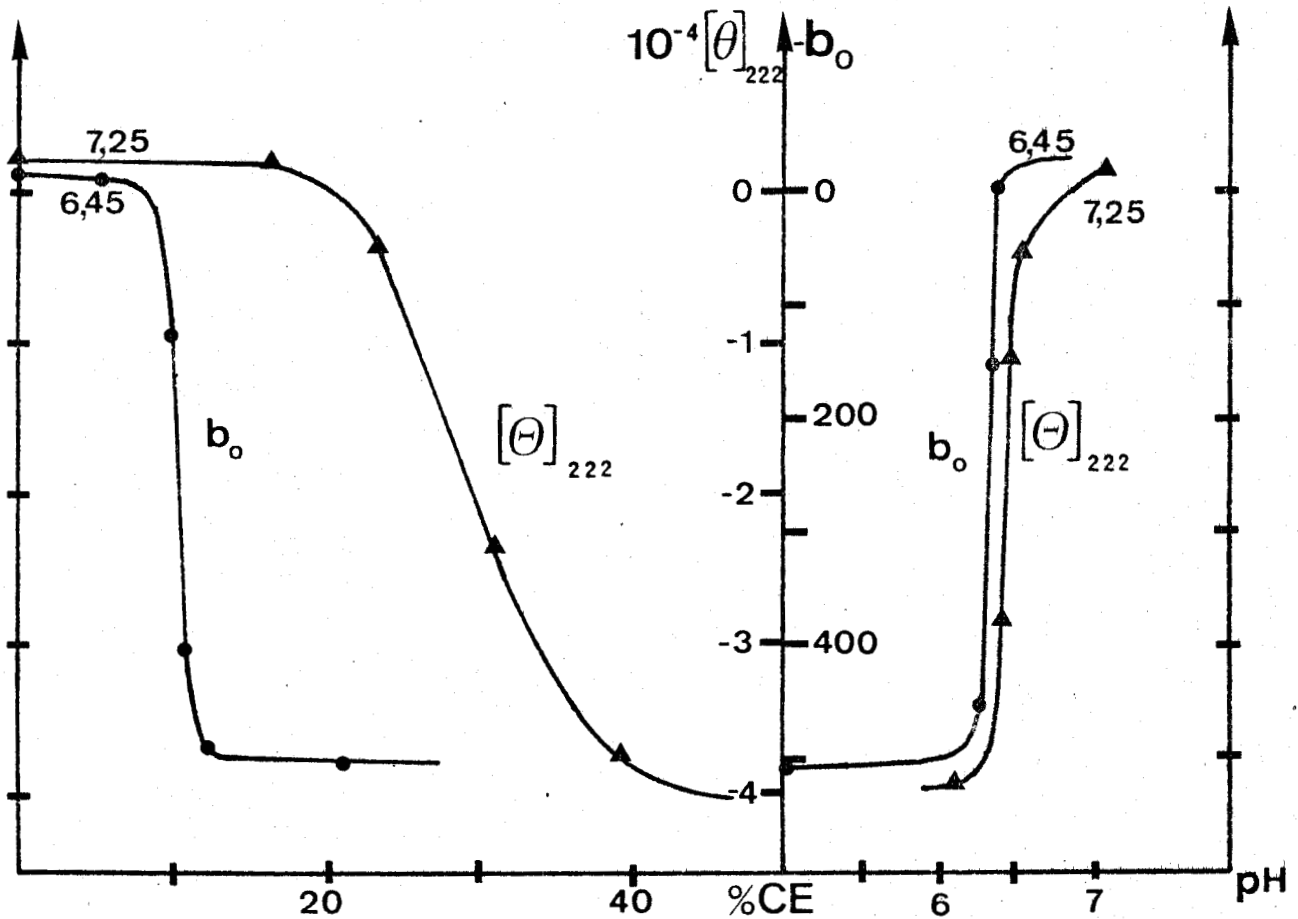


Figure III-21. Variation de $[\theta]_{222}$ et b_0 en fonction du pH ou du pourcentage en chloroéthanol. pH de départ 6,45 ou 7,25.

Il semble donc que ce phénomène soit caractéristique des poly α aminoacides dans des mélanges de solvants. Cependant aucune étude approfondie n'en a été faite jusqu'à ce jour.

Les figures III-22 et III-23 montrent quelques exemples de l'évolution des spectres pour des solutions de PLGA dans des mélanges eau - dioxanne, eau - 2 chloroéthanol, et eau - tertiobutanol, en l'absence de sel. Il est important de

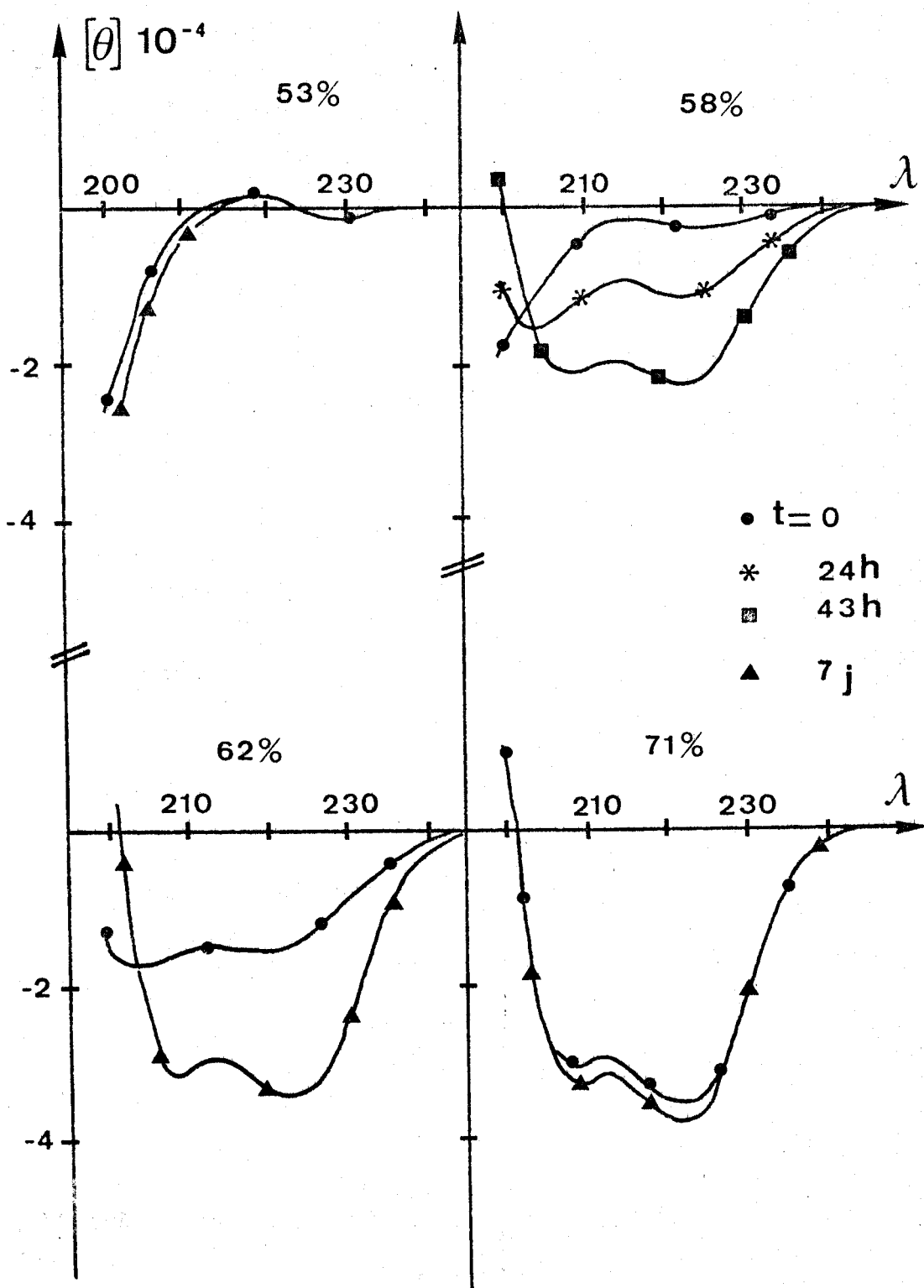


Figure III-22. Evolution au cours du temps des spectres dichroïques du PLGA obtenus dans des mélanges eau - dioxanne.



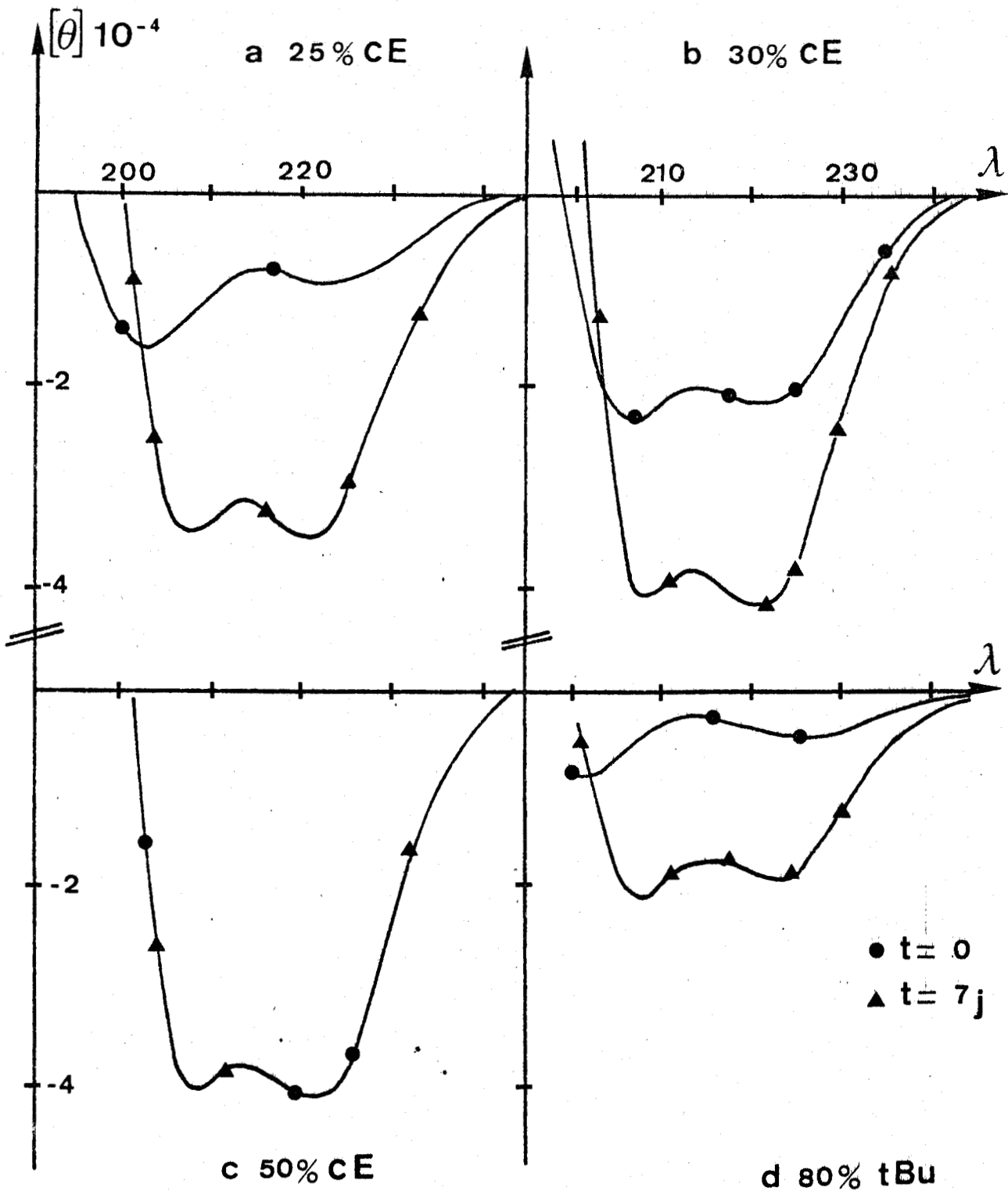


Figure III-23. Evolution au cours du temps des spectres dichroïques du PLGA obtenus dans des mélanges eau chloroéthanol (a,b et c) et eau - t butanol (d).



noter qu'aucun changement de pH n'a lieu en solution pendant la période envisagée. La variété des mélanges utilisés montre bien que le phénomène n'est pas le fait d'un solvant particulier. De plus la comparaison des fig. III-22 b, c et d montre que les possibilités d'évolution vers une hélicité totale sont d'autant plus grandes que la solution de départ a une plus faible hélicité à condition de se trouver dans la zone de transition. La conséquence en est que si l'on trace les courbes de transition, non plus à partir des valeurs instantanées de $[\theta]_{222}$, mais à partir des valeurs mesurées 72^h après, on observe :

- que la transition a lieu pour un pourcentage en solvant organique plus faible.

- que cette transition est plus coopérative c'est-à-dire qu'elle s'effectue totalement dans un domaine plus étroit de composition.

La figure III-24 met en évidence ces résultats. La composition correspondant à la demi-transition est déplacée de 62 à 58 % dans le cas du dioxanne et de 30 à 25 % dans le cas du 2 chloroéthanol.

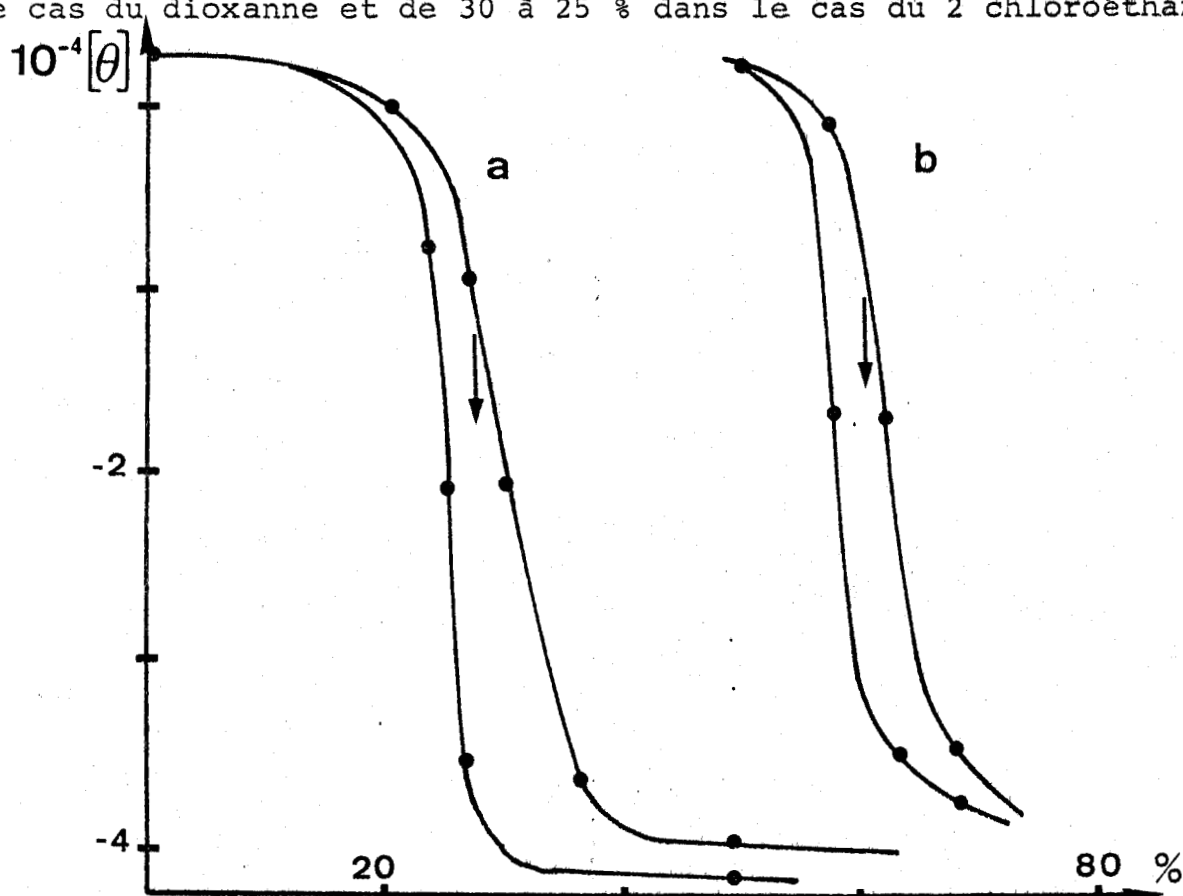


Figure III-24. Influence de l'évolution au cours du temps sur la courbe de transition. a) mélange eau-chloroéthanol
b) mélange eau-dioxanne.

Nous avons vu que la force ionique a un effet important sur la transition induite par le solvant. Il faut donc s'attendre à ce que l'évolution des spectres au cours du temps dépende fortement de la force ionique de la solution. La figure III-25 montre un exemple de l'influence de la force ionique sur l'évolution cinétique des spectres.

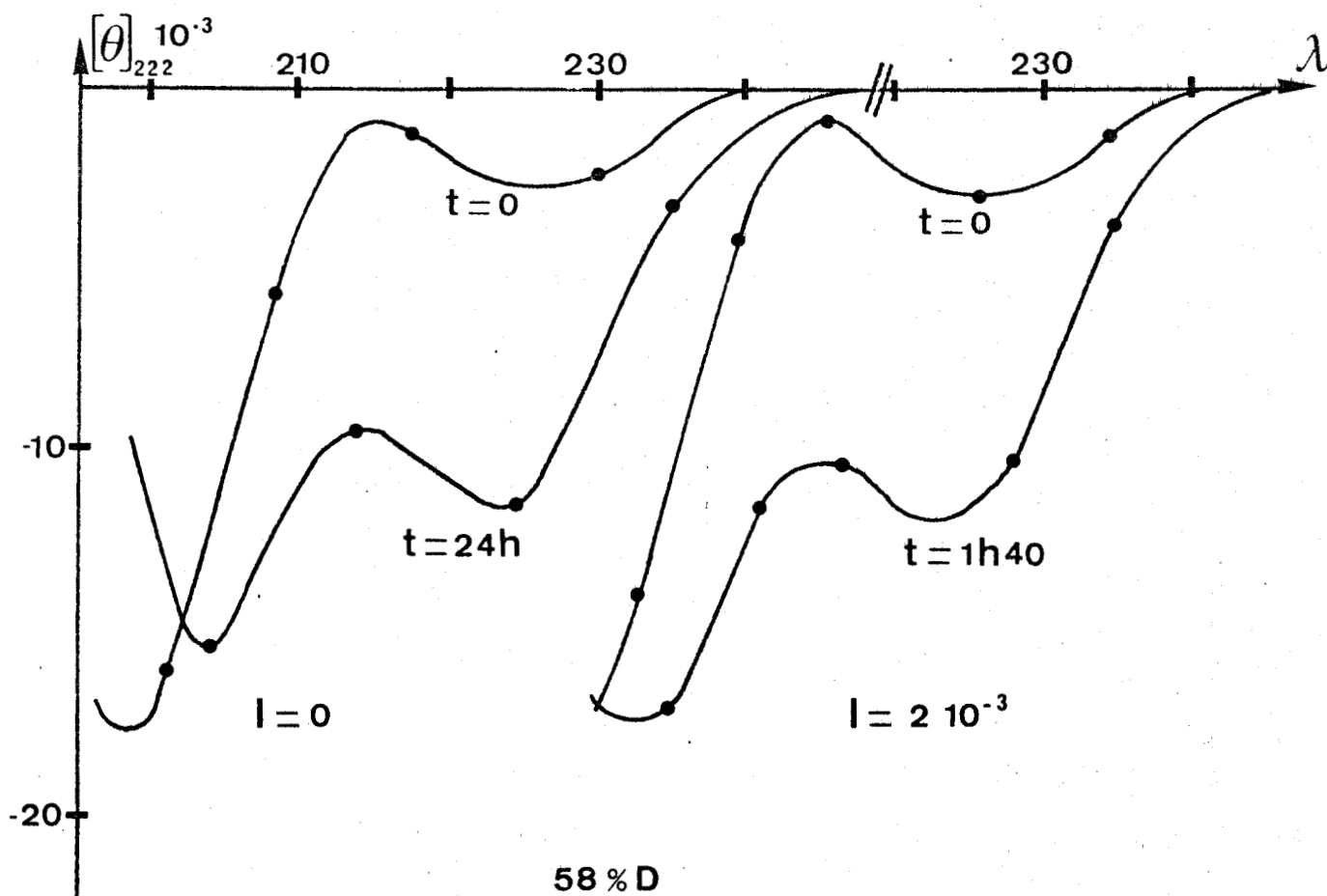


Figure III-25. Influence de la force ionique sur l'évolution des spectres au cours du temps.

On constate que l'évolution est beaucoup plus rapide dans le cas où la solution contient du sel. On obtient la même ellipticité en 1^h40 lorsque $I = 2 \cdot 10^{-3}$ qu'en 24^h lorsque $I = 0$.

Ceci est en bon accord avec l'observation que nous avons faite précédemment : l'addition de sel augmente l'hélicité dans les limites de solubilité du polymère. Cet effet est mis en évidence sur la figure III-26 où nous avons tracé en unités arbitraires l'évolution de l'ellipticité à 222 nm au cours du temps pour différentes forces ioniques entre 0 et $4 \cdot 10^{-3}$ M dans le cas du mélange contenant 58,3 % de dioxanne en volume. L'augmentation de l'hélicité est d'autant plus rapide que la force ionique est grande.

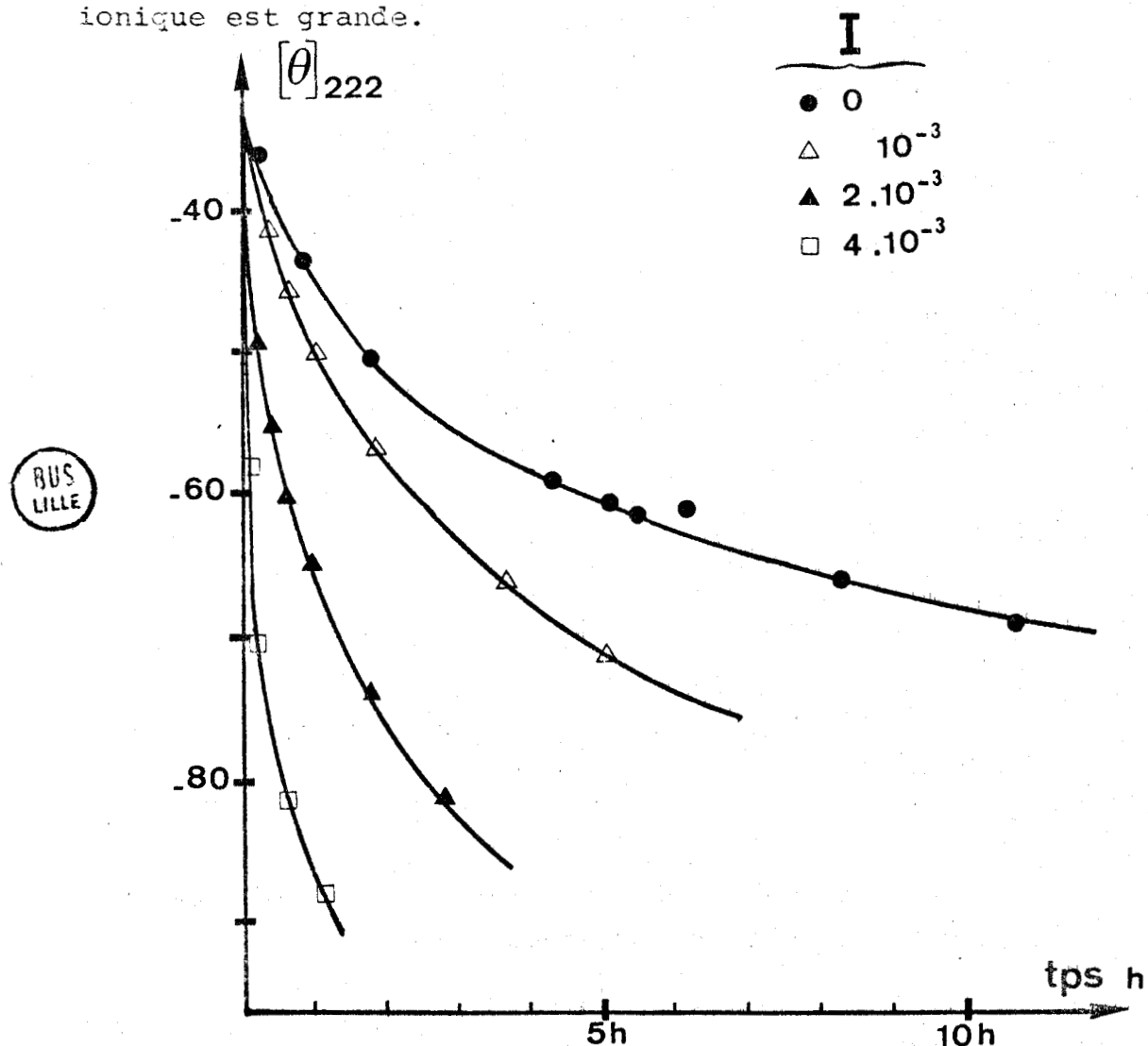


Figure III-26. Variation de $[\theta]_{222}$ au cours du temps pour différentes forces ioniques. PLGA dans un mélange eau dioxanne à 58 % en dioxanne.

La figure III-27 montre que pour le système eau/dioxane l'ellipticité à 222 nm varie linéairement avec la racine carrée du temps.

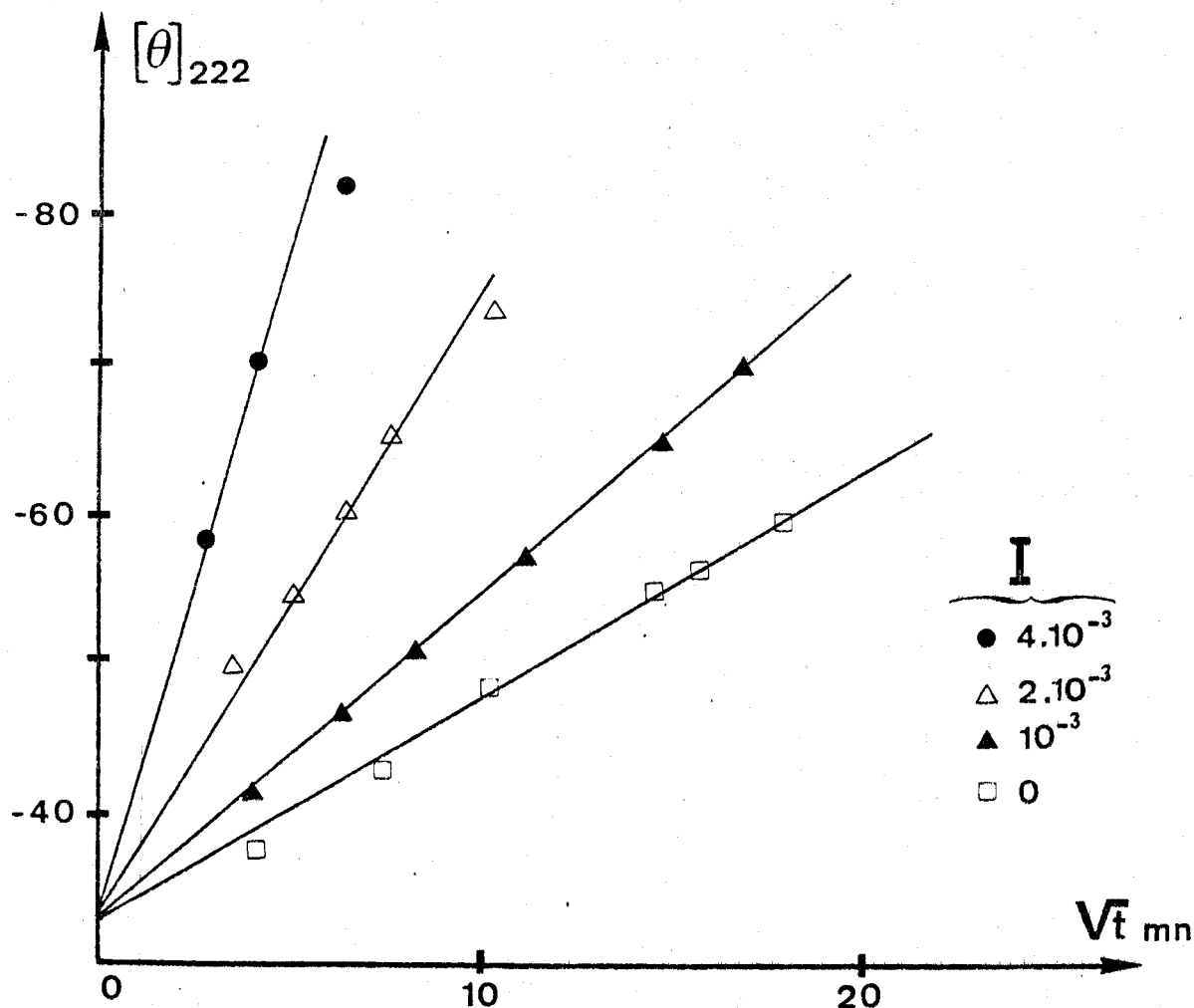


Figure III-27. Variation de $[\theta]_{222}$ en fonction de \sqrt{t} à différentes forces ioniques.

Pour les solutions de force ionique 2 et $4 \cdot 10^{-3}$ M en NaCl les derniers points sont en dehors de la droite, ce qui peut être expliqué par un début de précipitation dans la solution avant même que le phénomène ne soit visible à l'oeil nu.

On peut néanmoins déterminer à partir de ces courbes les constantes de vitesse correspondantes qui sont données dans le tableau III-3.

force ionique	k en unités arbitraires	k en $d^{\circ} \text{cm}^2 \text{décimole}^{-1} \text{mn}^{-1/2}$
0	1.40	228
10^{-3} M	2.20	358
$2 \cdot 10^{-3}$ M	4.20	684
$4 \cdot 10^{-3}$ M	9.25	1500

Tableau III-3. Constantes de vitesse de l'augmentation d'hélicité en fonction de la force ionique. PLGA dans le mélange dioxanne-eau (58,3/41,7 en volume).

La cinétique d'évolution des spectres dichroïques peut donc être représentée par la relation :

$$[\theta]_{222}^t = [\theta]_{222}^o - k \sqrt{t}$$

Les résultats ci dessus suggèrent que la conformation du polymère et la manière dont s'effectue la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le solvant sont fortement dépendantes de la distribution de l'eau et du solvant organique entre la couche de solvation d'une part et le reste du solvant d'autre part. En particulier le fait que les spectres dichroïques évoluent au cours du temps suppose un échange entre les molécules d'eau et les molécules de solvant organique qui modifie la composition de la couche de solvation .

Il faut distinguer deux aspects du phénomène :

. la transition instantanée provoquée par l'augmentation de la concentration en dioxanne.

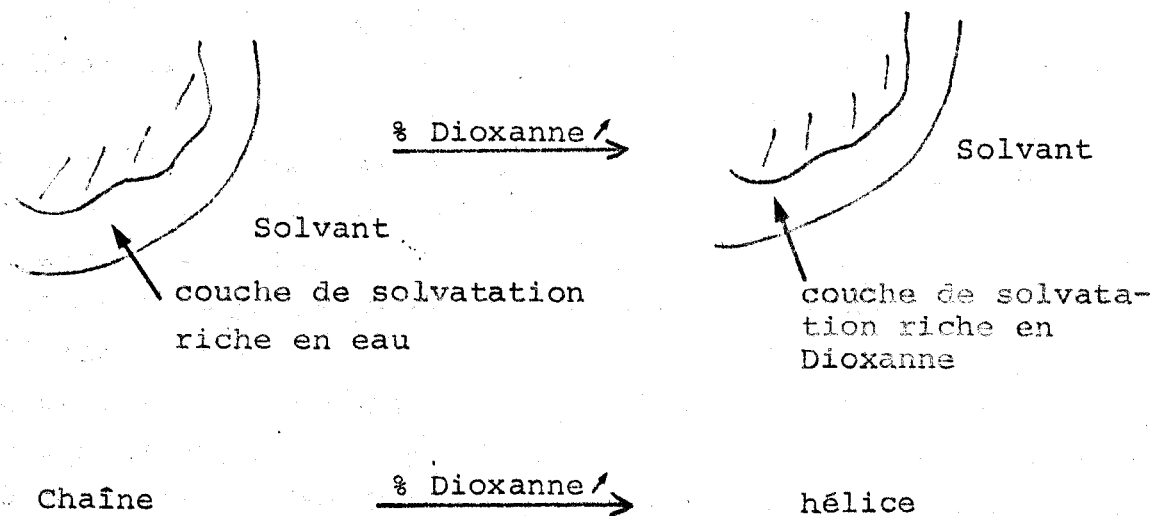
. l'augmentation d'hélicité au cours du temps dans une solution de composition en dioxanne inférieure à celle qui provoque la transition instantanée.

a) Transition instantanée

Si on augmente la concentration en solvant organique dans le mélange on diminue simultanément l'activité de l'eau. La couche de solvatation du polymère est au départ riche en eau. A mesure que l'activité de l'eau dans le mélange de solvant diminue la différence de composition en eau entre la couche de solvatation et le solvant s'accroît. On atteint alors une valeur critique telle qu'elle provoque la destruction de la couche de solvatation du polymère.

Il y a à ce moment un échange rapide entre les molécules d'eau et de dioxanne qui conduit à la formation d'une nouvelle couche de solvatation plus riche en dioxanne que la précédente. Cette couche de solvatation a un caractère hydrophobe plus marqué qui favorise la formation d'une structure hélicoïdale.

De plus, l'augmentation de la teneur en dioxanne dans la couche de solvatation entraîne une diminution de sa constante diélectrique. Les groupes carboxyliques chargés ont alors tendance à s'associer davantage avec les contre ions correspondants pour former des paires d'ions. La charge nette diminue. Ces deux effets favorisent le passage à la forme hélice.



b - Evolution au cours du temps

Considérons maintenant une solution de polymère dans un mélange eau - dioxanne de composition telle qu'on n'ait pas atteint la valeur critique provoquant la destruction de la couche de solvation du polymère. Si on anticipe sur les résultats obtenus par mesure de la solvation préférentielle (chapitre V) on constate que le début de la transition coïncide avec le changement de solvation préférentielle. En d'autres termes on passe d'un domaine où le polymère est préférentiellement solvatoé par le dioxanne à un domaine où il est préférentiellement hydratoé. Le domaine de composition en dioxanne dans lequel on observe une évolution dans le temps est celui pour lequel il y a hydratoé préférentielle. La couche de solvation est donc plus riche en eau que le solvant "extérieur".

Si on laisse évoluer la solution sans agitation et sans modifier aucun paramètre, on va assister à une diffusion du dioxanne du solvant extérieur à la macromolécule vers la couche de solvation, diffusion qui va tendre à compenser la différence de composition en dioxanne entre les deux couches et qui a pour origine la différence de potentiel chimique du dioxanne entre les deux couches. Dans un système à deux composants, la distance moyenne parcourue par une espèce diffusante vérifie la relation $x^2 = 2 Dt$. Donc cette distance est proportionnelle à la racine carrée du temps t . Dans un système à trois composants tel que le système PLGA - eau - dioxanne, cette loi ne s'applique plus en toute rigueur ⁽¹⁶⁾. De plus, dans le cas particulier des macro-ions la diffusion du polymère est perturbée par les fluctuations du potentiel électrostatique. Cet effet est d'autant plus important que l'on opère en absence de sel ⁽¹⁶⁾. Il est donc difficile de donner une forme mathématique au phénomène observé dans notre cas. On peut simplement remarquer que l'on observe expérimentalement une dépendance en fonction de la racine carrée du temps.

Le phénomène de diffusion implique un échange entre molécules d'eau et molécules de dioxanne. La structure de l'eau

dans la couche de solvatation doit donc jouer un rôle important.

Lorsqu'on introduit du sel en solution, les ions modifient la structure de l'eau. Cela se traduit par un changement dans la constante de diffusion. Expérimentalement on observe une augmentation de l'hélicité d'autant plus rapide que la force ionique est élevée.

La diffusion entraîne une augmentation de la concentration en dioxanne dans la couche de solvatation. Nous verrons au chapitre V que l'augmentation d'hélicité est directement liée à la composition en dioxanne de cette couche de solvatation.

5 - Influence de la concentration

Dans un article récent, NITTA, YONEYAMA et OHNO (17) ont étudié l'influence de la concentration en polymère sur la transition induite par le pH en solution aqueuse dans le cas de l'acide polyglutamique. On peut distinguer deux cas selon que la force ionique I est supérieure ou inférieure à la concentration en polymère C_p exprimée dans les mêmes unités. (Cela équivaut à comparer les concentrations en ions compensateurs du polymère et en ions provenant de la force ionique additionnelle). Si I est supérieur à C_p la transition est indépendante de la concentration en polymère. Par contre si C_p est supérieure à I , le pH de transition est très sensible à la concentration en polymère (Figure III-28).

Dans notre cas, la transition est induite par le changement de composition du solvant. Cependant comme la force ionique est très faible et nulle dans certains cas, on peut également se poser le problème de l'influence de la concentration de polymère sur la transition.

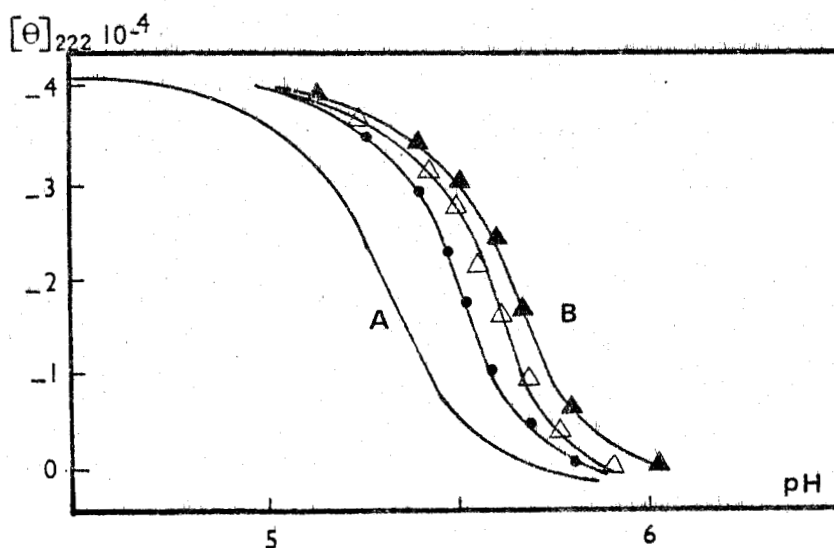


Figure III-28. Influence de la concentration en polymère sur la transition chaîne hélice du PLGA induite par le pH ⁽¹⁷⁾ :

A : I = 0,05 M ; C_P varie de 0,0065 à 0,0132 M
 B : I = 0,005 M ; C_P = 0,0365 M ●
 0,0191 M △
 0,0065 M ▲

Dans le cas des mélanges eau - dioxanne, la figure III-29 montre que l'influence de cette concentration est négligeable, au moins dans le domaine de concentration envisagé.

Dans le cas du chloroéthanol (figure III-30 a), on observe un déplacement important de la transition qui se situe à 28 % de chloroéthanol lorsque la concentration de la solution est de 0,70 g/l et à 63 % de chloroéthanol lorsque la concentration est de 4,90 g/l. Cependant la figure III-30 b montre également que si l'on trace $[\theta]_{222}$ non plus en fonction du % de chloroéthanol, mais en fonction du pH, la transition se situe à pH 6,4 lorsque C = 0,7 g/l et à pH 6,7 lorsque C = 4,9 g/l.

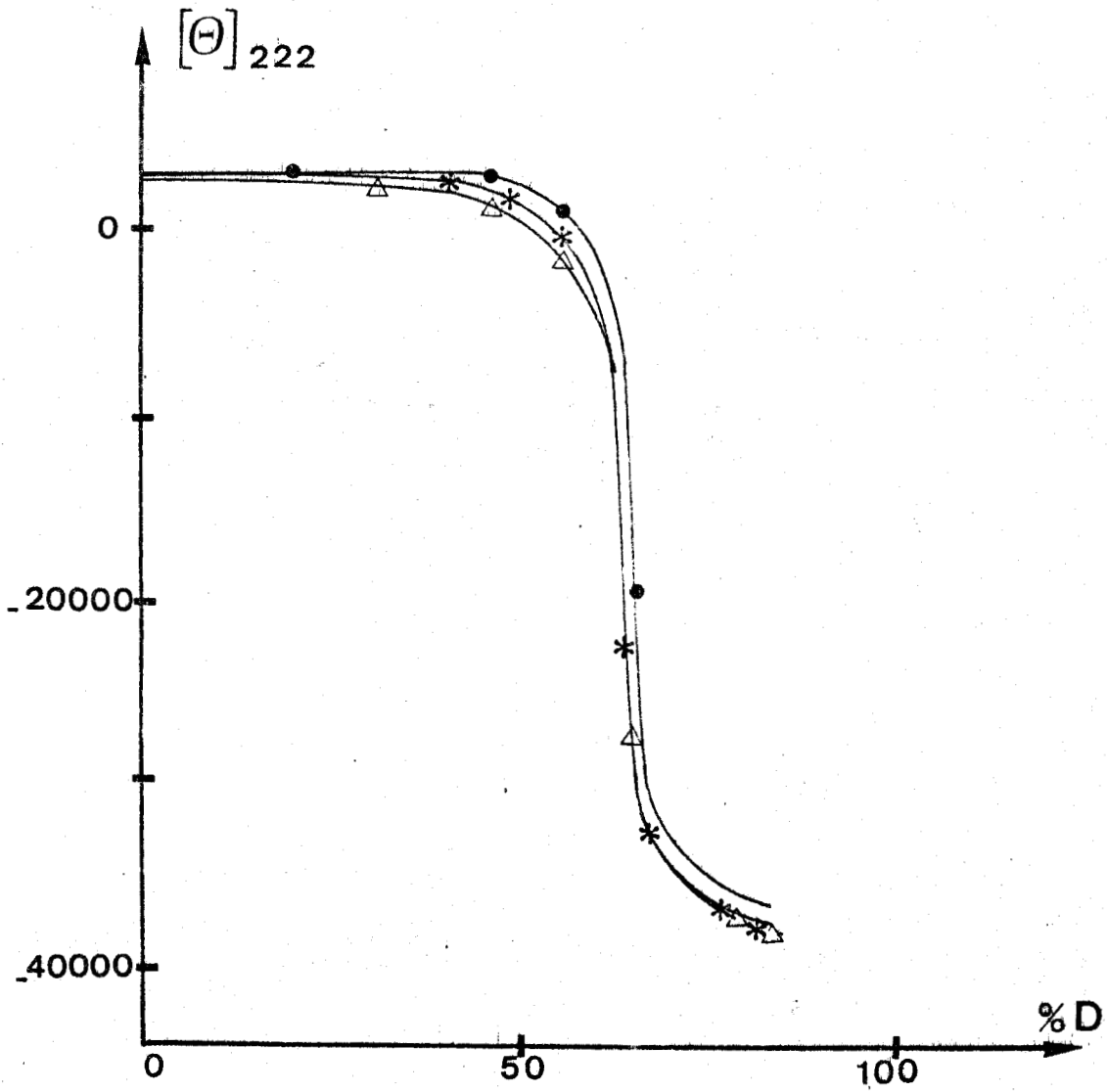


Figure III-29. Influence de la concentration en polymère sur la transition chaîne hélice du PLGA induite par le dioxanne.

$C_p = 0,0052 \text{ M}$ *
 $C_p = 0,0095 \text{ M}$ Δ
 $C_p = 0,324 \text{ M}$ \bullet



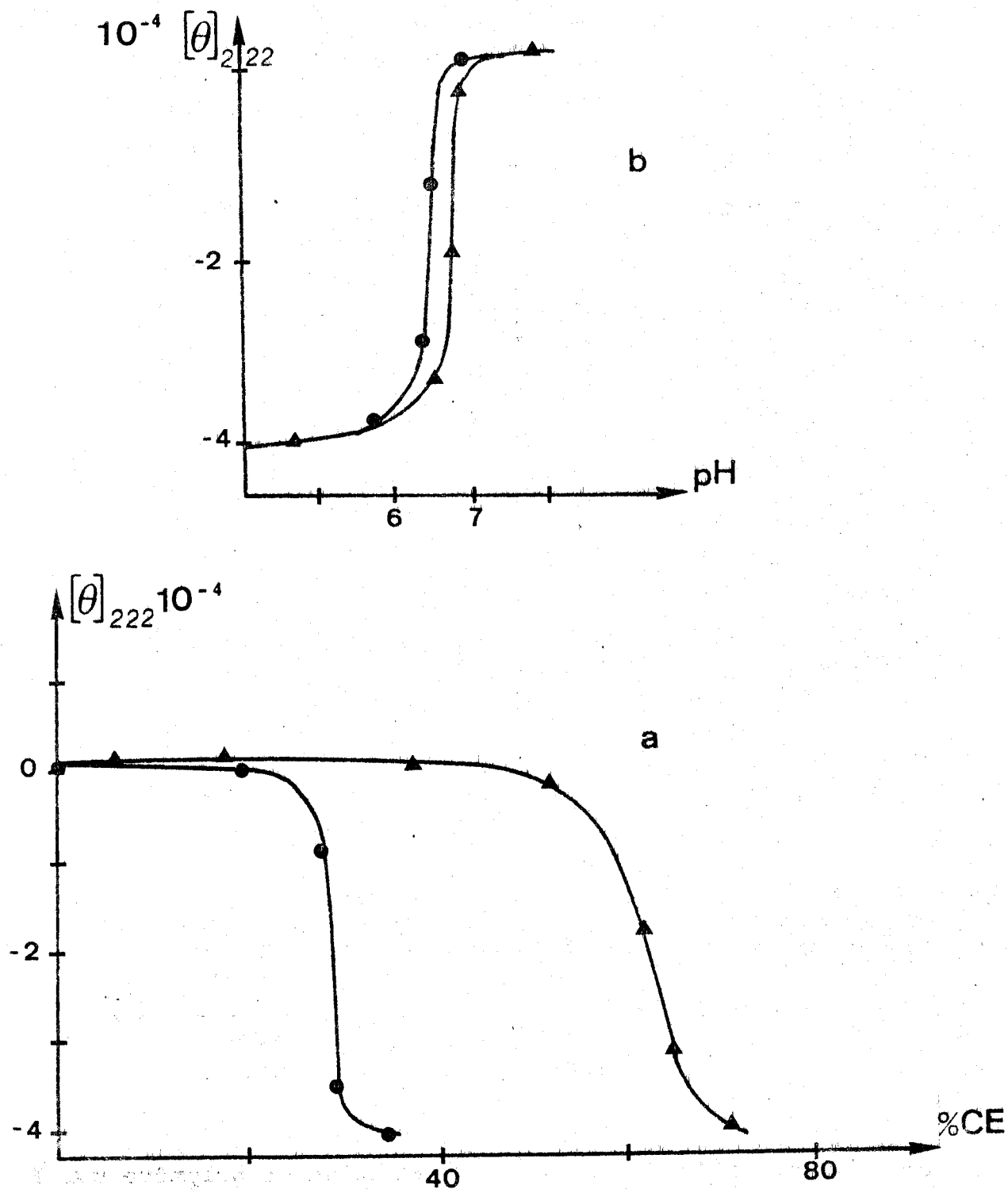


Figure III-30. Influence de la concentration en polymère sur la transition chaîne hélice induite par le chloroéthanol.



- a) $[\theta]_{222}$ en fonction du % de chloroéthanol
 b) $[\theta]_{222}$ en fonction du pH.

$C_p = 0,0054 \text{ M}$ ● ; $C_p = 0,038 \text{ M}$ ▲

Ceci montre une fois encore que la transition induite par le 2 chloroéthanol est en fait une transition induite par le pH. Il y a néanmoins un léger déplacement du pH de transition qui pourrait être attribué cette fois à la différence de concentration. Nous observons donc une augmentation du pH de transition lorsque la concentration en polymère augmente ce qui est contraire aux résultats de NITTA et coll. En fait le résultat que nous obtenons est la résultante de deux effets :

- un effet de concentration similaire à celui observé par NITTA et coll.

- un effet de composition de solvant qui fait que le pH de transition augmente lorsque la proportion en solvant organique croît (voir par exemple la figure III-7).

6 - Influence de la masse moléculaire moyenne du polymère.

La figure III-31 présente les courbes de transition obtenues pour différents échantillons d'acide poly L glutamique de masse moléculaire moyenne en poids \bar{M}_w comprise entre 10 000 et 60 000.

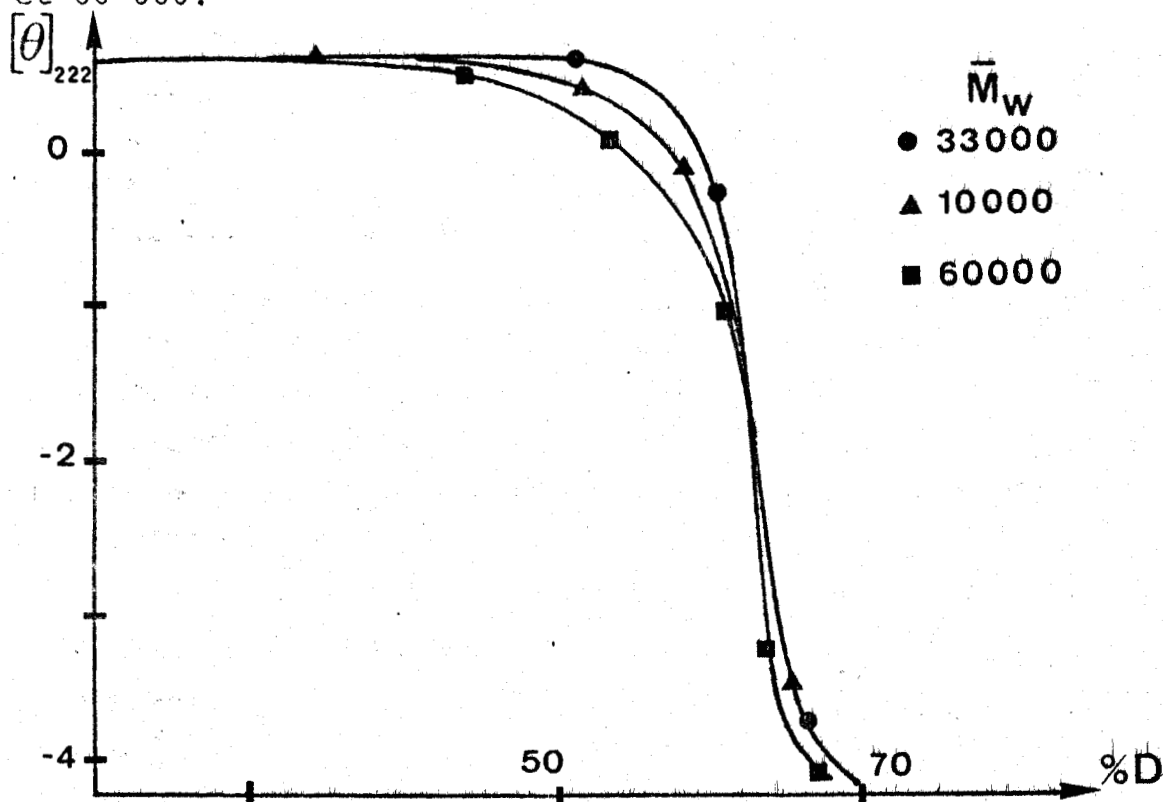
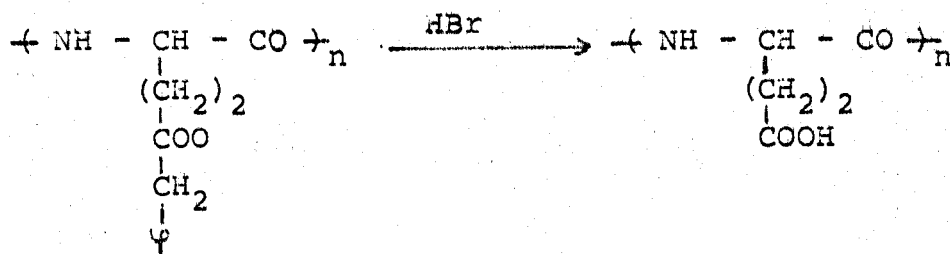


Figure III-31. Effet de la masse moléculaire moyenne sur la transition chaîne hélice induite par le dioxanne.

Les résultats obtenus montrent que la transition induite par le changement de composition du mélange eau - dioxanne est indépendante de la masse moléculaire de l'échantillon, dans le domaine de masses moléculaires envisagé.

7 - Influence de la présence de groupements protecteurs résiduels.

La dernière étape dans la synthèse de l'acide poly L glutamique est la débenzylation du poly L glutamate de benzyle par l'acide bromhydrique.



Cette débenzylation doit être quasi totale. On met à profit le fait que le groupement benzyle présente une bande d'absorption dans l'ultra-violet située à 276 nm, ($\epsilon = 200 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) pour déterminer la teneur en groupements benzyle résiduels. Dans le cas des échantillons utilisés pour cette étude par dichroïsme circulaire, cette teneur est toujours inférieure à 0,25 %.

L'influence de la teneur en groupements benzyle dans le PLGA a été étudiée par RAO et MILLER (18). Ces derniers se sont essentiellement intéressés à la transition induite par le pH et ont examiné les modifications apportées au spectre du PLGA en milieu basique (conformation désordonnée) par la présence de groupements benzyle. La figure III-32 a montré un exemple des résultats obtenus.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'effet de la teneur en groupements protecteurs résiduels sur la transition induite par le dioxanne. Nous avons utilisé pour cela un copolymère d'acide polyglutamique et de polyglutamate d'orthonitrobenzyle contenant 6 % de groupements nitrobenzyle préparé au Laboratoire par J. ESTEVEZ.

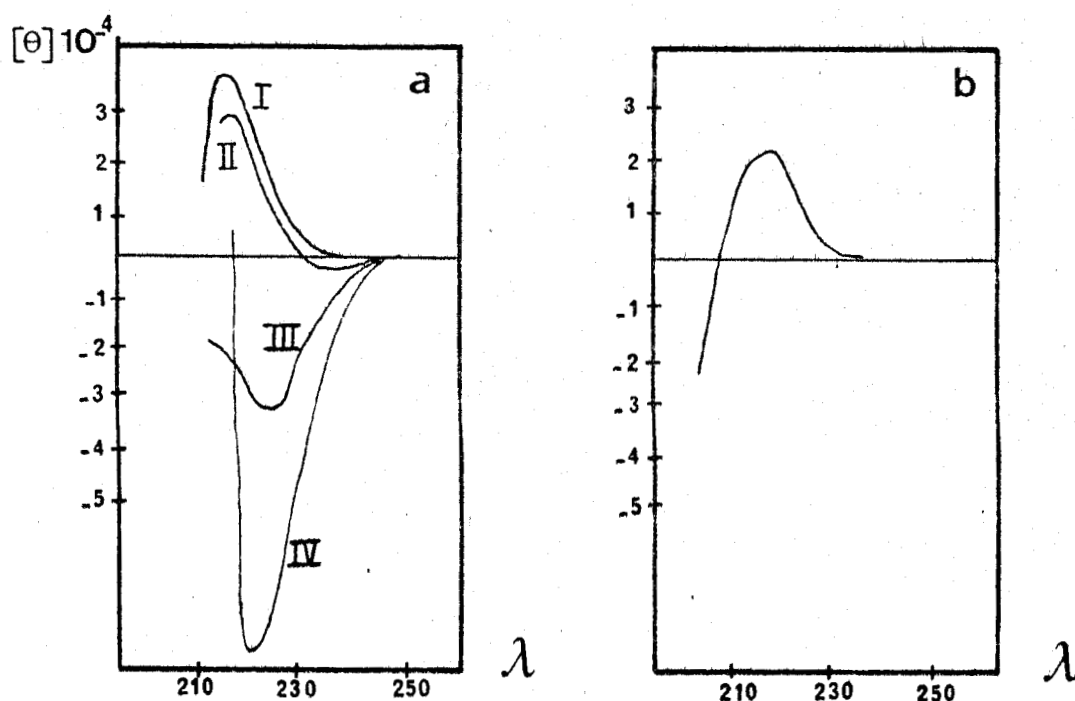


Figure III-32. Influence de la teneur en groupes protecteurs résiduels sur les spectres dichroïques du PLGA (forme chaîne).

a) résultats de RAO et MILLER ⁽¹⁸⁾ : teneur en groupements benzyle égale à : moins de 0,05 % (I) ; 1 % (II) ; 3,8 % (III) ; 16 % (IV).

b) nos résultats : teneur en groupements nitrobenzyle égale à 6 %.

La figure III-33 présente les courbes de transition obtenues pour l'homopolymère de l'acide glutamique et le copolymère à 6 % d'ester nitrobenzylique. On constate que la présence de groupements nitrobenzyle augmente le pourcentage de dioxane correspondant à la demi-transition. Le passage à la forme hélicoïdale est donc moins aisé lorsque le polymère contient quelques groupes protecteurs résiduels.

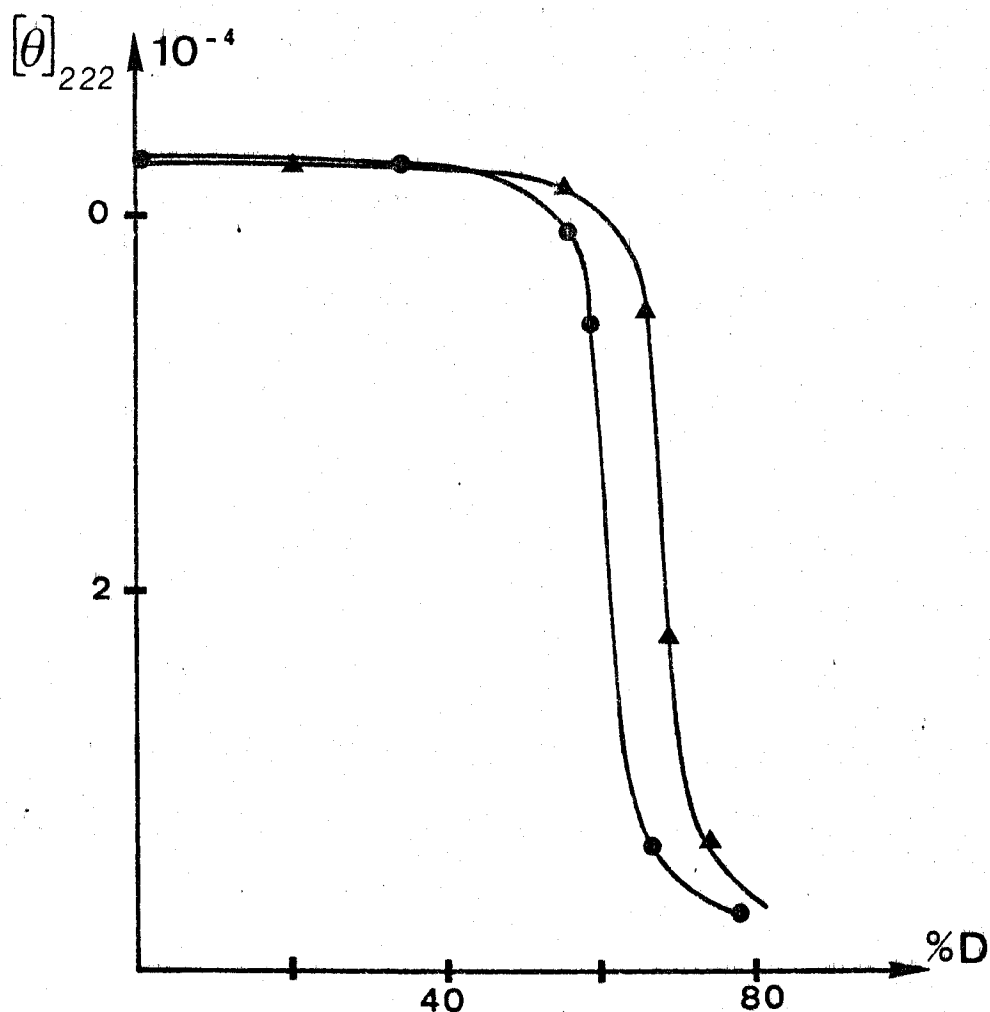


Figure III-33. Transition induite par le dioxanne :

● PLGA contenant moins de 0,25 % de groupes protecteurs

▲ PLGA contenant 6 % de groupes nitrobenzyle.

J. ESTEVEZ et M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE (19) ont montré que, en solution aqueuse, la transition induite par le pH a lieu au contraire à un pH plus élevé lorsqu'on augmente la teneur en groupements nitrobenzyle. Dans ce cas la forme hélicoïdale est donc stabilisée vis-à-vis de la transition induite par le pH.

En ce qui concerne l'allure des spectres obtenus en milieu basique, la figure III-32 b montre que le spectre de la conformation désordonnée n'est pas modifié par la présence de 6 % de groupements nitrobenzyle, ce qui est contraire aux résultats obtenus par RAO et MILLER (18). Une explication possible

à cette différence pourrait être la nature de la chaîne latérale benzyle dans le cas de RAO et MILLER et nitrobenzyle dans notre cas.

8 - Influence de la température.

Considérons une solution aqueuse de PLGA à température ambiante telle que le polymère se trouve dans la zone de transition hélice - chaîne. Si l'on augmente la température de la solution, on constate une destruction progressive de la structure hélicoïdale au profit de la configuration désordonnée. On observe donc la transition provoquée par une augmentation de température. Si l'hélice est déstabilisée par l'augmentation de la température cela signifie que l'entropie de transition est négative, en effet : $\Delta F = \Delta H - T \Delta S$. A température ambiante ΔF est négatif (ex. : - 105 cal/°/mole environ dans NaCl 0,2 M à 25°C). La déstabilisation de l'hélice signifie que ΔF augmente lorsque T augmente. Il faut pour cela que ΔS soit négatif.

Nous avons examiné le comportement du PLGA en mélange de solvants en fonction de la température.

Dans les mélanges à 10 % de chloroéthanol (pH initial 6,45) ou à 60 % de dioxanne, le polymère est à la demi-transition (voir fig. III-12 et III-21). Dans le mélange à 15 % de chloroéthanol le polymère est entièrement hélicoïdal. La figure III-34 montre dans ces trois cas les valeurs de $[m']_{334}$ en fonction de la température. On ne constate aucune variation de $[m']_{334}$ donc aucun changement de conformation entre 22 et 62°C. il n'y a donc pas de déstabilisation de l'hélice lorsque la température augmente. On peut en déduire que l'entropie de transition est nulle dans ces deux solvants.

Ceci est en bon accord avec les résultats de FASMAN et coll. ⁽⁵⁾ qui ont trouvé une entropie nulle dans les mélanges eau - dioxanne et eau - chloroéthanol, en présence de NaCl 0,2 M.

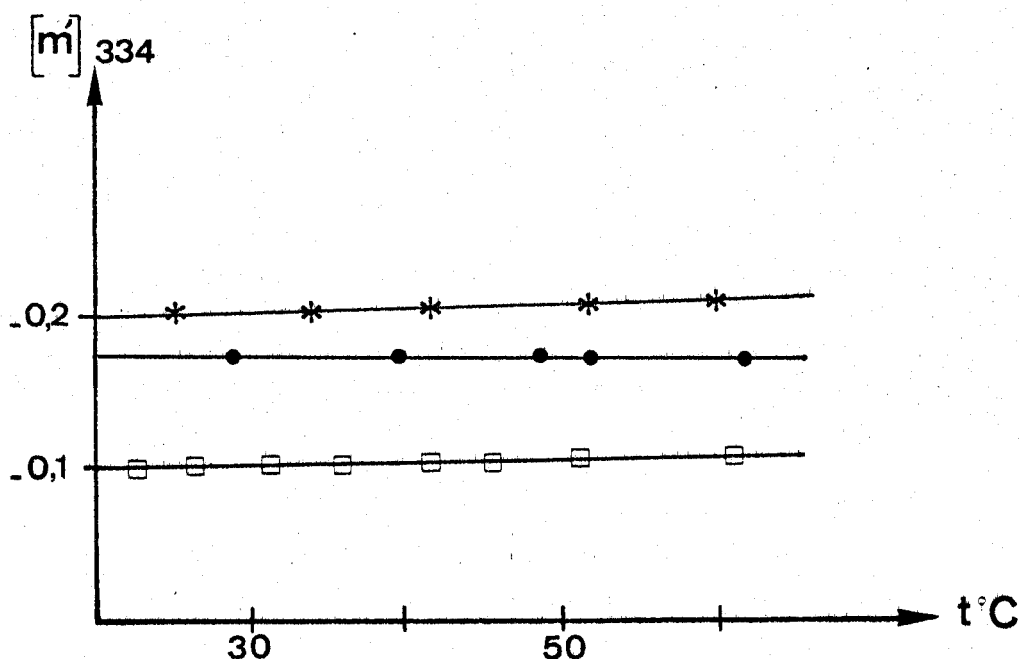


Figure III-34. Variation de $[m']_{334}$ en fonction de la température. PLGA en solution dans les mélanges:
eau * dioxanne (60 % en dioxanne)
eau • chloroéthanol (10 % en CE)
eau □ chloroéthanol (15 % en CE)

DISCUSSION

Dans ce qui précède, la transition induite par le changement de composition en dioxanne a lieu vers 60 % de dioxanne. Cette valeur est indépendante de la masse moléculaire et de la concentration et peu sensible à la force ionique du milieu dans les limites où la transition reste possible.

Nous avons également étudié la transition induite par le dioxanne sur un échantillon différent de masse moléculaire $\overline{M}_w = 27\ 000$. Nous avons obtenu dans ce cas la transition pour un pourcentage en dioxanne de 40 %. Ce résultat est surprenant car il est très éloigné de ceux obtenus sur les autres échantillons et aucun des différents paramètres que nous avons pu envisager ne permet de rendre compte de cette différence.

Dans le cas de l'échantillon $\overline{M}_w = 27\ 000$, les solutions utilisées pour la transition induite par le dioxanne, n'ont pas été dialysées. Elles peuvent donc contenir du sel en excès. Nous avons vu que l'augmentation de la force ionique provoque un déplacement de la transition vers les pourcentages les plus faibles en dioxanne. Cependant, même dans le cas d'une force ionique de 10^{-2} M, le déplacement observé de 62 à 56 % ne peut expliquer la transition observée à 40 %. Pour des forces ioniques plus élevées la transition devient impossible. Nous avons vu que ni la différence de masse moléculaire, ni une éventuelle différence de concentration ne peut justifier les résultats contradictoires obtenus.

Dans tous les cas, la teneur en groupements benzyle a été contrôlée. Elle est toujours inférieure à 0,25 %. De plus la présence de groupes hydrophobes dans la chaîne latérale tendrait plutôt à augmenter le pourcentage de dioxanne à la transition (voir fig. III-32). L'évolution des spectres dichroïques au cours du temps montre que celle ci conduit à une hélicité croissante. Ceci amène donc une diminution du pourcentage de dioxanne à la transition par rapport à sa valeur "instantanée". Mais ici encore, cette évolution se fait dans la limite de quelques pourcents. De plus dans les deux cas (transition à 62 % et transition à 40 %) les spectres ont été enregistrés immédiatement après la préparation des solutions.

Les raisons exactes des différences observées entre deux échantillons apparemment analogues sont donc actuellement obscures. On trouve par ailleurs un reflet de ces contradictions dans la littérature. IIZUKA et YANG ⁽¹³⁾ ont été les premiers à mettre en évidence une transition induite par le dioxanne en mesurant $[m']$ et b_0 en fonction de la composition en dioxanne. La transition obtenue se situe à 40 % comme dans le cas de notre échantillon $\overline{M}_w = 27\ 000$. (Voir figure III-35).

L'échantillon utilisé par IIZUKA et YANG a une masse de 79 000. Leurs solutions ont été préparées par dissolution du polymère suivie d'une dialyse contre l'eau. Ceci montre une fois encore que la différence observée entre nos résultats ne peut

être imputée à la présence de sel dans la solution.

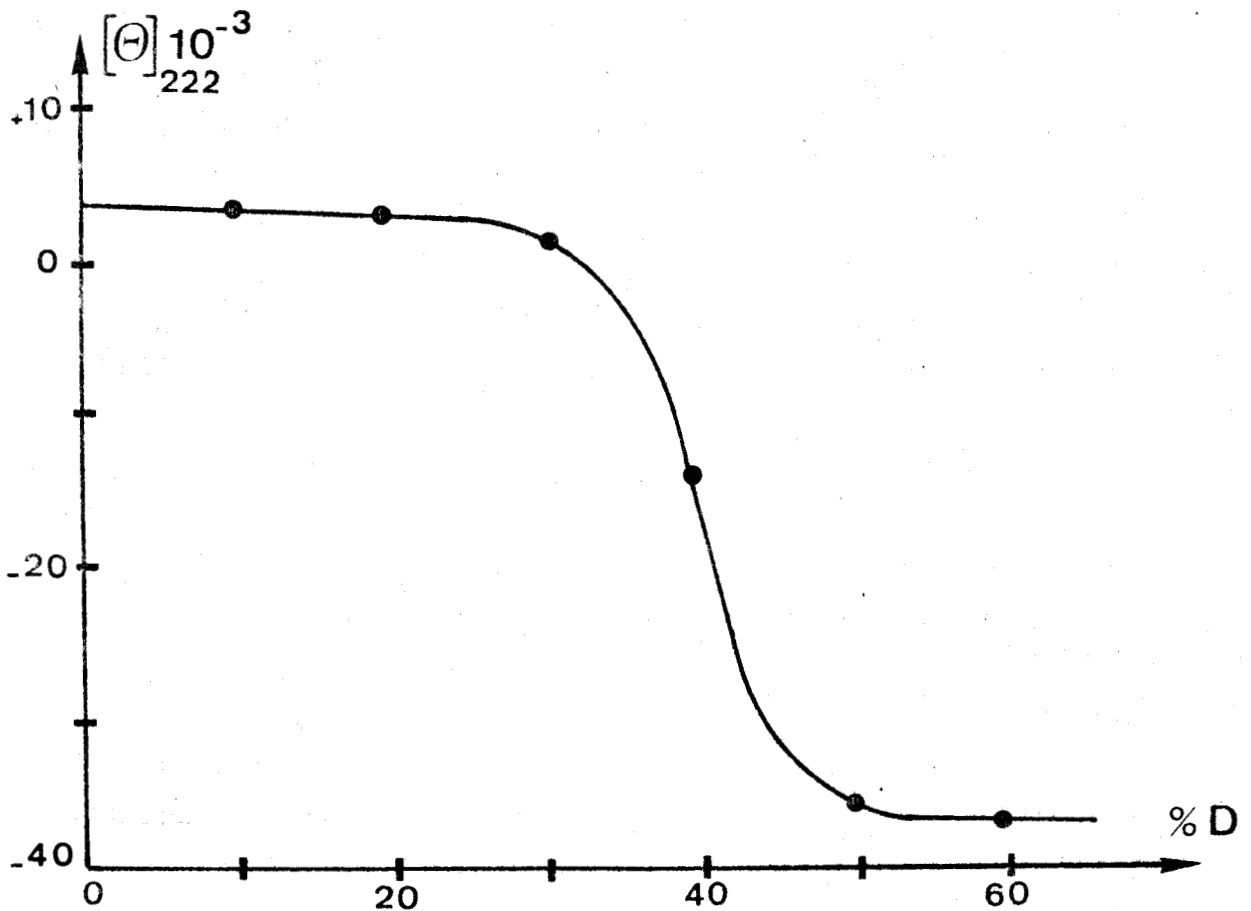


Figure III-35. Transition chaîne hélice induite par le dioxanne pour l'échantillon de PLGA de masse $\overline{M}_w = 27\ 000$.

D'autre part, on trouve dans un article de STEIGMAN et COSANI (20) une courbe de transition pour le PLGA en solution dans un mélange eau dioxanne (50/50 en volume) en fonction du pH ou plus exactement en fonction de α . A pH 7,3 α est égal à 0,75. La figure III-36 montre que pour cette valeur de α le polymère est essentiellement sous forme désordonnée ce qui est en contradiction avec les résultats de YANG. Il semble donc qu'un paramètre encore mal défini fait que la transition a lieu dans certains cas à 40 % de dioxanne et dans d'autres à 60 %. On peut cependant émettre l'hypothèse selon laquelle cette différence serait due à une différence de polydispersité entre nos échantillons. Nous ne disposons malheureusement pas d'informations suffisantes sur cette

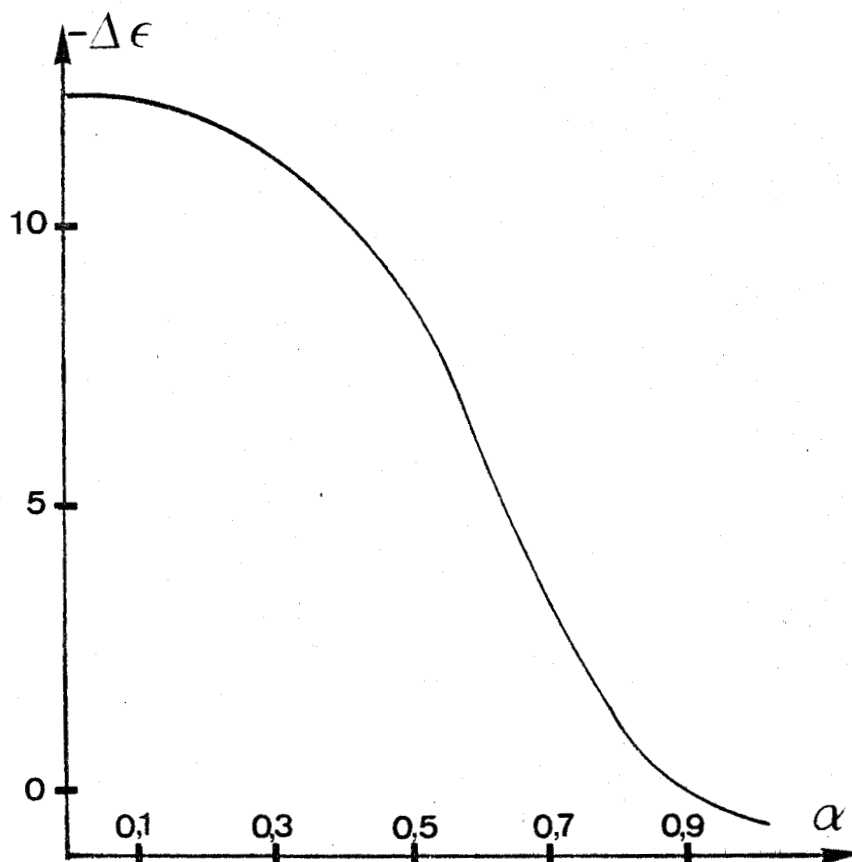


Figure III-36. Variation de $\Delta\epsilon$ avec le coefficient de dissociation α . PLGA dans un mélange eau dioxanne (50/50) (20).

polydispersité. Ceci est d'autant plus important que l'étude potentiométrique et l'étude par absorption préférentielle qui font l'objet des chapitres suivants, ont été faites sur l'échantillon de masse moyenne $\overline{M}_w = 27\ 000$, c'est-à-dire dans les conditions où la transition conformationnelle a lieu pour 40 % en dioxanne.

C - NATURE DES PRECIPITES OBTENUS EN PRESENCE DE SEL.

La conformation qui existe dans les solutions riches en dioxanne est une hélice α comme le montrent les spectres dichroïques obtenus. Le passage de la structure désordonnée à l'hélice α qui se produit lorsqu'on augmente la concentration en dioxanne, n'est possible que pour des solutions contenant peu de sel.

Si on ajoute des quantités croissantes de dioxanne à une solution de PLGA contenant 0,2 M de NaCl, on observe un

précipité dans la solution. Le problème qui se pose est de déterminer la nature de ce précipité.

1 - Dichroïsme circulaire.

BARTERI et PISPISA (9) ont étudié la transition chaîne \rightleftharpoons hélice de la poly L Lysine dans les mélanges eau-isopropanol. Lorsque la force ionique est suffisante ils observent l'apparition d'un précipité en solution. Pour déterminer la nature de ce précipité, la solution est centrifugée et on enregistre le spectre du surnageant. Le spectre du précipité est ensuite calculé par différence entre le spectre de la solution non centrifugée et celui du surnageant. Dans le cas de la poly L Lysine en mélange eau - isopropanol le précipité a pu être identifié à une structure β .

Dans notre cas les tentatives d'identification du précipité par cette méthode n'ont donné aucun résultat et nous nous sommes tournés vers la spectroscopie infra rouge pour tenter de résoudre ce problème :

2 - Spectroscopie infra rouge.

a) Spectres I.R. du précipité

Le PLGA est mis en solution dans l'eau lourde sous forme de sel de sodium en présence de NaCl 0,2 M. On ajoute ensuite du dioxanne de manière à obtenir un mélange D₂O/Dioxanne 50/50. Le polymère précipite alors. Il est ensuite lyophilisé. Le spectre infra rouge du précipité à l'état solide est présenté sur la figure III-37 a.

On observe la bande Amide I située à 1650 cm⁻¹. La bande Amide II située normalement à 1550 cm⁻¹ lorsque le polymère est non deutéré apparaît à 1450 cm⁻¹ lorsque le polymère est deutéré (21) Elle est présente sur ce spectre sous forme d'un épaulement.

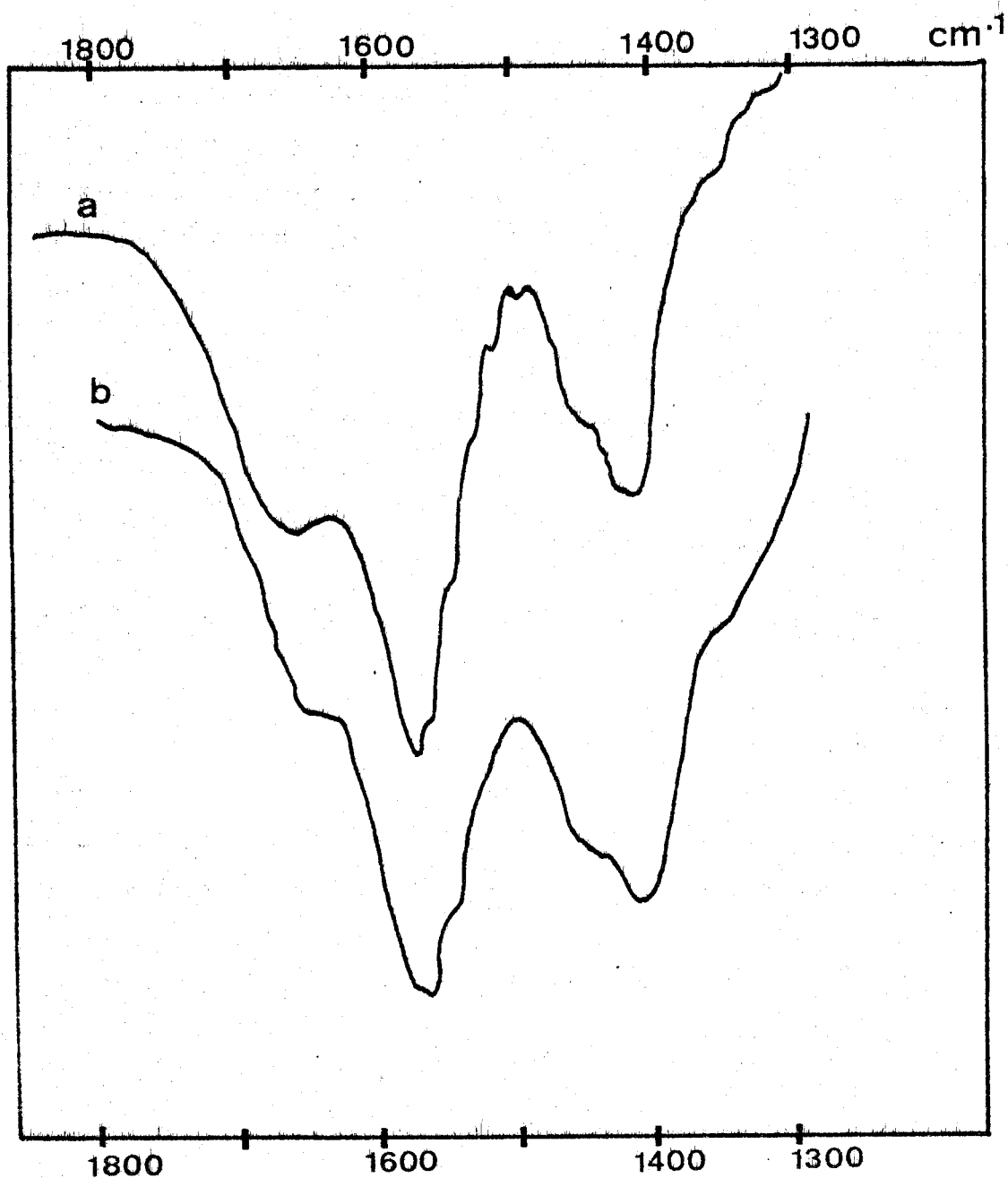


Figure III-37. Spectres infra rouge du PLGA précipité par le dioxanne.

a) précipité sec

b) précipité + mélange D₂O/dioxanne (50/50)



Les deux bandes situées à 1570 - 1575 cm⁻¹ et 1420 cm⁻¹ peuvent être attribuées au groupe carboxylique chargé COO⁻ (22), la seconde masquant en partie la bande Amide II.

LENORMANT et coll. (22) ont montré qu'un changement d'humidité relative peut modifier la conformation du polymère.

Le spectre présenté sur la figure III-37 b a été obtenu à partir du précipité non lyophilisé mais simplement décanté. Le précipité se présente alors sous la forme d'une pâte humidifiée par le mélange eau lourde - dioxanne. Le spectre obtenu est identique à celui enregistré sur le précipité lyophilisé.

L'existence des bandes à 1570 et 1420 cm^{-1} caractéristiques du groupe carboxylique chargé montre que la précipitation du polymère à partir de la solution se fait sans changement d'ionisation. Le précipité obtenu est donc sous la forme sel de sodium.

Lorsque le précipité lyophilisé est mis en présence d'eau il se dissout très rapidement. Ceci indique que le précipité est bien sous forme sel de sodium puisque la forme acide n'est pas directement soluble dans l'eau.

La figure III-38 montre les spectres infra rouge des formes α et β du PLGA obtenues par précipitation à partir de solutions aqueuses en milieu acide (23-24).

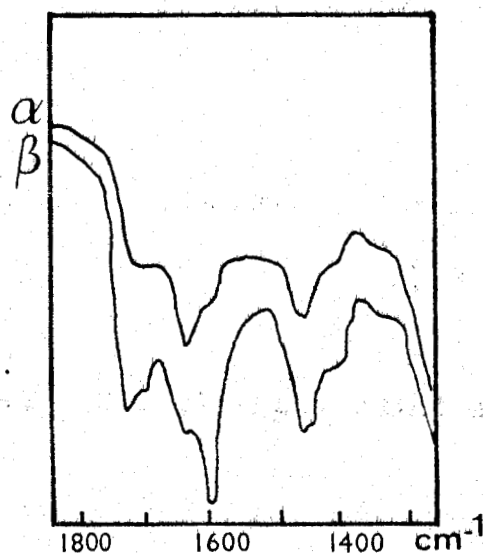


Figure III-38. Spectres infra rouge des formes α et β du PLGA précipité (23,24).

Ces spectres sont différents de ceux de la figure III-37 et présentent en particulier deux bandes situées respectivement à 1705 et 1720 cm^{-1} pour la structure α et la forme β . (attribuées au groupe carboxylique - COOH non ionisé ⁽²²⁾). De plus la forme β présente une bande intense située à 1595 cm^{-1} . Les spectres de la figure III-37 ne présentent aucune bande aux environs de 1700 cm^{-1} . Ceci écarte donc les possibilités de structure α ou β pour le précipité. Il reste la possibilité d'une conformation désordonnée ce qui est en accord avec l'existence des bandes correspondant à COO^- situées à 1570 et 1420 cm^{-1} .

b - Spectre I.R. en solution

La figure III-39 a montré le spectre infra-rouge d'une solution de polyglutamate de sodium dans l'eau lourde à pD ~ 7 conditions dans lesquelles le polymère a une conformation non organisée.

On retrouve la bande Amide I située à 1640 cm^{-1} , la bande Amide II à 1465 cm^{-1} , et les bandes COO^- à 1560 et 1410 cm^{-1} . Ce spectre est très semblable à celui du précipité (figure III-37) et permet d'attribuer à celui-ci une conformation désordonnée.

Nous avons vu que l'addition de dioxanne à une solution de polyglutamate de sodium en présence de sel permet d'obtenir la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le solvant.

La figure III-39 b montre le spectre obtenu par addition de 60 % de dioxanne. Bien que le spectre soit mal résolu on observe l'apparition à 1710 cm^{-1} d'une bande caractéristique de l'hélice α comportant un groupe carboxylique non chargé ^(23,24).

Ceci est en faveur de l'hypothèse de la formation de paires d'ions dans les mélanges riches en dioxanne.

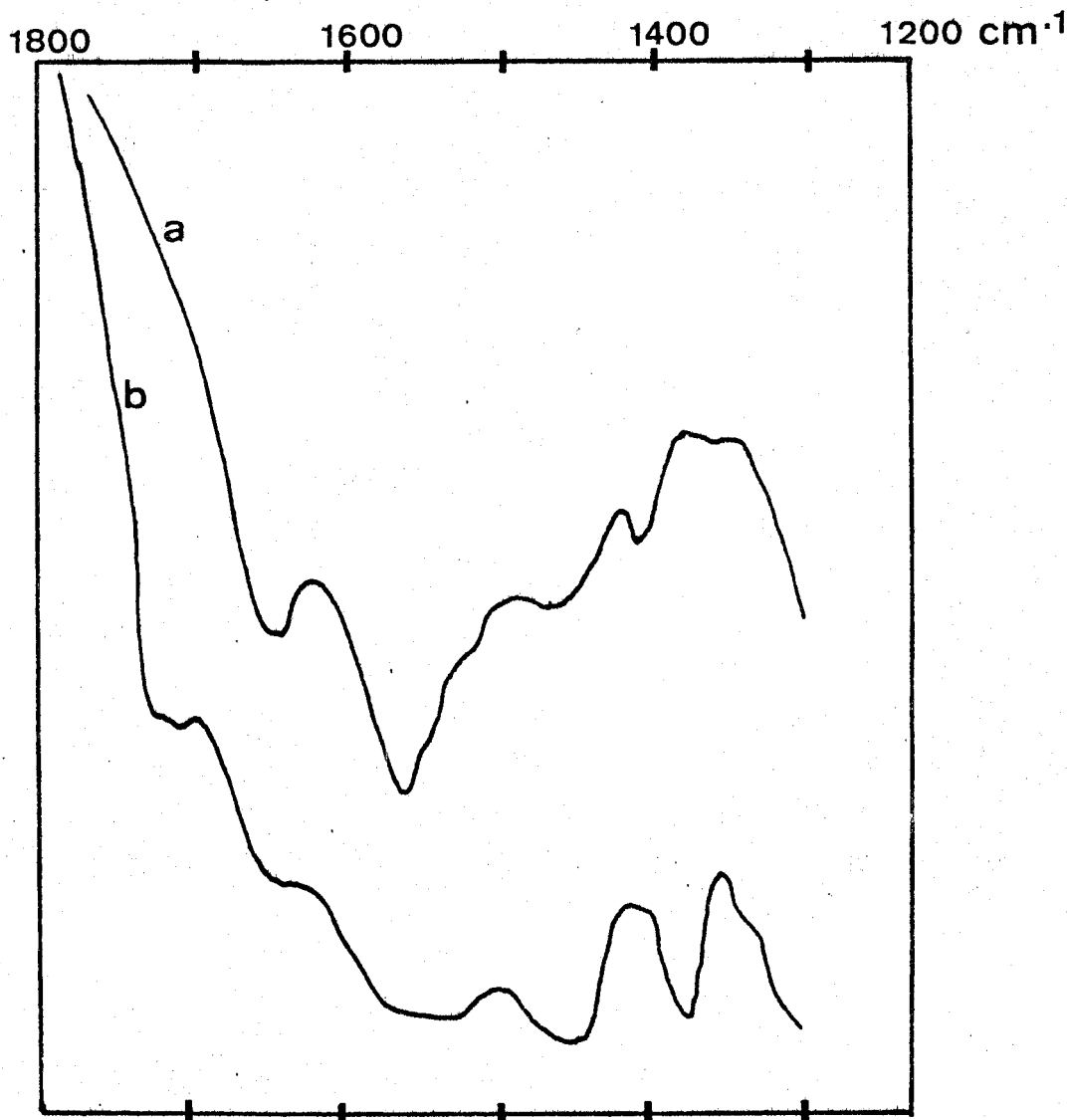


Figure III-39. Spectres infra rouge du sel de sodium du PLGA dans D₂O à pH 7 (a) et dans le mélange D₂O/Dioxanne (50/50) (b).

D - CONCLUSION.

L'étude par dichroïsme circulaire et dispersion optique rotatoire nous a permis de préciser l'influence de divers paramètres sur la transition chaîne \rightleftharpoons hélice en mélanges de solvants et en particulier la transition induite par le solvant. Parmi ces différents paramètres l'effet conjugué de la force ionique et du temps écoulé entre la préparation des solutions et le tracé des spectres est important et peut conduire à une variation importante de l'hélicité du polymère. Ce point qui a été jusqu'à présent négligé dans les études de polypeptides en mélanges de solvants, sera discuté plus loin en relation avec les résultats de solvation préférentielle. Les spectres infra-rouge du précipité

obtenu en présence de sel en milieu riche en dioxanne permettent d'attribuer à celui-ci une conformation non organisée. En absence de sel l'addition de dioxanne induit la transition vers l'hélice α .

C H A P I T R E I V

E T U D E P O T E N T I O M E T R I Q U E

ETUDE POTENTIOMETRIQUE.

L'étude hydrodynamique et l'étude optique nous ont montré que, à pH constant, l'addition de solvant organique renforce la rigidité de l'hélice α et la stabilise vis-à-vis de la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le pH.

L'étude potentiométrique constitue une autre approche du problème et permet d'évaluer les paramètres thermodynamiques qui sont à l'origine de la stabilisation de l'hélice.

En effet les courbes de titration modifiées permettent de déterminer l'énergie libre ΔG° de transition. L'étude en fonction de la température permet de décomposer celle-ci en ses composantes enthalpique et entropique ΔH° et ΔS° selon la relation :

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

RAPPELS THEORIQUES.

A - COURBES DE TITRATION MODIFIEES.

La dissociation d'un monoacide faible, en solution aqueuse peu concentrée dépend de la constante de dissociation K_o définie par la relation :

$$K_o = \frac{[\text{COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{COOH}]} \quad (\text{IV-1})$$

Cette constante est indépendante de la présence en solution de groupements acides déjà ionisés.

Si l'on considère maintenant l'ionisation d'un polyacide faible, le problème se pose de manière différente. Les

groupements acides sont maintenus au voisinage les uns des autres par l'enchaînement macromoléculaire. On a donc une concentration locale importante en groupements acides. Dans ces conditions, l'ionisation du $i^{\text{ème}}$ groupement acide doit être accompagnée d'un travail électrostatique pour soustraire le proton H^+ au potentiel électrostatique Ψ produit par les $(i-1)$ charges négatives déjà présentes.

A une température T la constante d'ionisation apparente K et le pH sont exprimés respectivement par :

$$K = K_0 \exp - e \Psi / kt \quad (\text{IV-2})$$

$$\text{pH} = \text{p}K_0 + \log \frac{[\text{COO}^-]}{[\text{COOH}]} + B \Psi \quad (\text{IV-3})$$

où $B = \frac{0,434 e}{kT}$

et où k est la constante de BOLTZMANN
et e la charge élémentaire.

Si α est le degré de neutralisation, et C la concentration des groupes ionisables, $[\text{COO}^-] = \alpha C$ et $[\text{COOH}] = (1-\alpha)C$

On a donc : $\text{pH} = \text{p}K_0 + \log \frac{\alpha}{1-\alpha} + B \Psi \quad (\alpha, I, F) \quad (\text{IV-4})$

$\Psi (\alpha, I, F)$ exprime que le potentiel électrostatique dépend du nombre de charges déjà présentes (donc du degré de neutralisation α) et dépend également de la force ionique I , c'est-à-dire de l'effet d'écran apporté par des petits ions en solution. Le potentiel dépend enfin de la distance entre les charges, donc de la forme F du polymère en solution.

Dans la pratique, les résultats expérimentaux sont tracés sous forme de courbes de titration modifiées où l'on porte $\text{pH} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$ c'est-à-dire $\text{p}K_0 + 0,434 \frac{e}{kT}$ en fonction de α . La valeur de $\text{p}K_0$ peut alors être obtenue par extrapolation à $\alpha=0$. Dans le cas de l'acide polyacrylique aucun changement de conformation n'a lieu lorsqu'on augmente le degré de dissociation α .

La quantité $\text{pH} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$ augmente alors de manière quasi-linéaire lorsque α croît (Fig. IV-1 a).

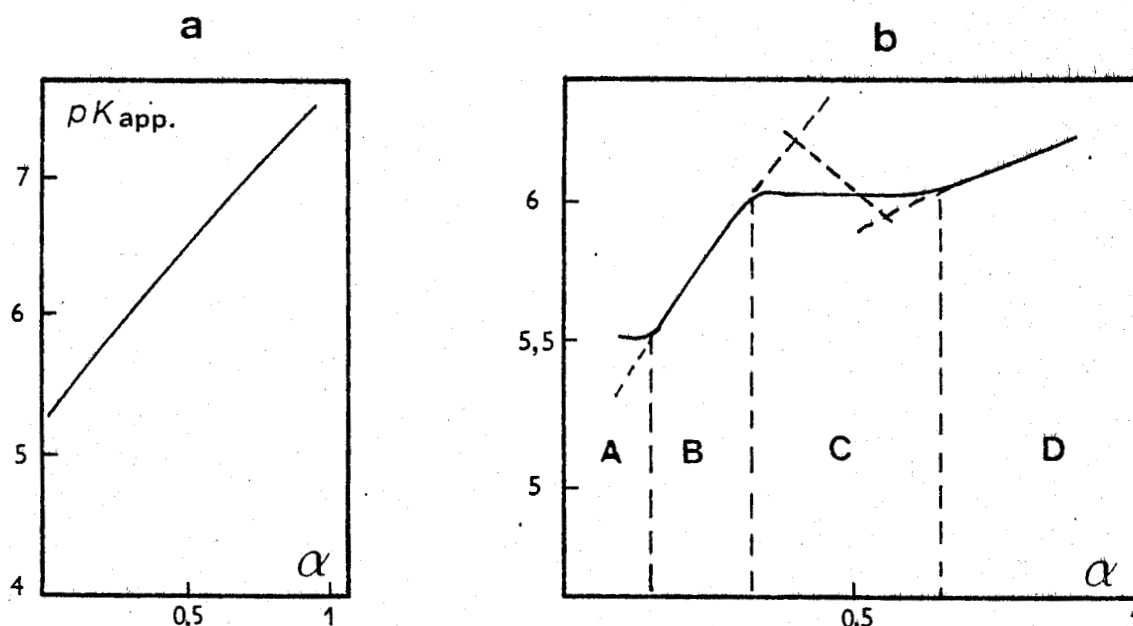


Figure IV-1. Courbes de titration modifiées.

a) acide polyacrylique

b) acide polyglutamique.

Dans le cas de l'acide polyglutamique, une transition conformationnelle a lieu lorsque α augmente et la courbe de titration modifiée reflète cette transition hélice \rightleftharpoons chaîne (Figure IV-1 b). WADA ⁽¹⁾ a proposé de décomposer la courbe obtenue en quatre parties, chacune étant caractéristique d'un état de conformation du polyacide :

La partie B caractérise la titration du polyacide complètement hélicoïdal, la partie D la titration du polyacide sous forme totalement désordonnée. La pente des parties B et D est différente ce qui montre bien que la manière dont varie le pK apparent dépend de la forme de la molécule en solution.

La région C correspond à la zone de transition c'est-à-dire à un état d'équilibre entre la chaîne et l'hélice.

Dans la région A, la courbe expérimentale dévie de la courbe extrapolée pour l'hélice, ce qui a été attribué aux phénomènes d'agrégation qui ont lieu aux bas pH en solution purement aqueuse.

B - DETERMINATION DE LA FRACTION D'HELICE F_H A PARTIR DES COURBES DE TITRATION MODIFIEES.

Le calcul de la fraction d'hélice à un pH donné, donc à une valeur de α donnée, a été établi théoriquement par ZIMM et RICE (2) et expérimentalement par NAGASAWA et HOLTZER (3).

Le point C de la figure IV-1 représente l'état d'équilibre entre la chaîne et l'hélice à ce pH. Comme la manière dont varie le pH dépend de la forme de la molécule, l'état d'équilibre est constitué d'un mélange d'hélice et de chaîne dont les coefficients de dissociation doivent être différents : $\alpha = \alpha_a$ pour 100 % d'hélice et $\alpha = \alpha_b$ pour la conformation désordonnée (voir figure IV-1 b). La fraction d'hélice est alors donnée par

$$F_H = \frac{(\alpha_b - \alpha_c)}{(\alpha_b - \alpha_a)}$$

En pratique on utilise la méthode graphique suivante : On trace sur un calque la courbe $\log \frac{(1-\alpha)}{\alpha} = f(\alpha)$ à la même échelle que la courbe expérimentale et on déplace cette courbe parallèlement à l'axe des ordonnées. Lorsque cette courbe passe par le point C, son intersection avec les courbes extrapolées pour l'hélice et la chaîne donne les points a et b.

Cette méthode permet en particulier de déterminer $\alpha_{1/2}$ le coefficient de dissociation à la demi-transition.

C - DETERMINATION DE L'ENERGIE LIBRE DE TRANSITION A PARTIR DES COURBES DE TITRATION.

ZIMM et RICE (2) ainsi que NAGASAWA et HOLTZER (3) ont montré que l'énergie libre de transition hélice \rightleftharpoons chaîne peut être déterminée à partir des courbes $\text{pH} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha} = f(\alpha)$

La surface A comprise entre la courbe expérimentale et les courbes extrapolées pour l'hélice et la chaîne est proportionnelle à l'énergie libre de transition ΔG° selon la relation :

$$\Delta G^\circ = - 2,3 RT \cdot A \quad (\text{IV-5}).$$

Il est important de noter que cette énergie libre correspond à la transition entre les conformères non chargés, c'est-à-dire qu'elle ne contient pas de terme d'énergie libre électrostatique.

Comme l'énergie libre est liée à l'enthalpie libre et à l'entropie de transition par la relation $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$, une étude en fonction de la température permet de déterminer ΔH° et ΔS° par la pente et l'ordonnée à l'origine de la courbe $\Delta G^\circ = f(T)$.

La détermination de l'énergie libre de transition permet d'évaluer la stabilité de l'hélice α dans les différentes conditions de solvant et de température. La détermination graphique de ΔG° fait intervenir l'extrapolation à $\alpha = 0$ des deux parties de courbes correspondant à la titration de l'hélice et à celle de la chaîne. Le choix de la valeur de pK_0 à laquelle ces courbes sont extrapolées est donc de la plus grande importance car elle conditionne la validité des valeurs de ΔG° .

Le premier problème est de savoir si on doit extrapoler les deux courbes correspondant à l'hélice et à la chaîne à la même valeur de pK_0 ou si ces deux conformations ont un pK_0 intrinsèque différent. Ce problème a été examiné en détail par OLANDER et HOLTZER ⁽⁴⁾ qui ont conclu que pK_0 est indépendant du contenu hélicoïdal du polymère. Dans ces conditions on extrapole d'abord la partie de courbe correspondant à l'hélice qui nécessite une extrapolation plus courte et donc plus facile que pour la partie chaîne (de $\alpha = 0,2$ à $\alpha = 0$ contre $\alpha = 0,65 \rightarrow \alpha = 0$ pour la chaîne). On détermine ainsi une valeur de pK_0 que l'on utilise pour extrapoler la partie de courbe correspondant à la titration de la chaîne, ce qui est généralement plus délicat.

D'autres auteurs, tels HERMANS ⁽⁵⁾ extrapolent séparément les deux portions de courbe. Ils obtiennent parfois la même

valeur de pK_0 mais dans d'autres cas la valeur de pK_0 pour la chaîne (pK_{0c}) est nettement plus élevée que la valeur de pK_0 pour l'hélice (pK_{0h}), surtout lorsque la force ionique du milieu est faible. Cependant il faut remarquer que HERMANS obtient généralement pour ΔG^0 des valeurs en bon accord avec celles d'autres auteurs qui utilisent une extrapolation commune.

Le second problème consiste à choisir le procédé d'extrapolation le mieux adapté à l'allure de la courbe expérimentale, c'est-à-dire une extrapolation soit linéaire soit curviligne.

D'après l'approximation de DEBYE et HUCKEL, la relation linéaire entre $(pH - \log \frac{\alpha}{1-\alpha} - pK_0)$ et α n'est linéaire que pour des poly ions à faible densité de charge, c'est-à-dire seulement pour $(pH - \log \frac{\alpha}{1-\alpha} - pK_0) < 0,434$. Cependant MANNING et ZIMM (6) ont montré que le domaine de linéarité des courbes de titration devait être plus grand sans cependant préciser la limite de ce domaine.

On peut dans tous les cas affirmer que la partie de courbe correspondant à la titration de l'hélice doit être plus linéaire que celle correspondant à la chaîne puisque la densité de charge y est moins élevée.

En ce qui nous concerne nous avons choisi :

- d'extrapoler à la même valeur de pK_0 pour l'hélice et la chaîne.

- de prolonger par extrapolation l'allure naturelle de la courbe de manière linéaire ou curviligne selon les cas.

On constate que l'extrapolation est d'autant plus linéaire que la force ionique du milieu est élevée.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Depuis l'étude théorique de la transition hélice \rightleftharpoons chaîne des polyélectrolytes par ZIMM et RICE (2) et la première étude expérimentale de WADA (1) présentant des courbes de titration modifiées, de nombreux articles ont été publiés concernant

la détermination des paramètres thermodynamiques de la transition hélice \rightleftharpoons chaîne du PLGA par potentiométrie.

La plupart ont été consacrés à l'étude en solution aqueuse :

- . influence de la force ionique de la solution (1,3,4)
- . nature du contre-ion (7-11)
- . effet de la température sur la valeur de pK_o et ΔG^o (4,5,12).

Les études concernant la transition dans les mélanges de solvants sont moins nombreuses. Les premières ont été consacrées aux mélanges eau - alcool, sans doute en raison du caractère dénaturant de l'alcool vis-à-vis des protéines. On peut citer à ce propos HERMANS (13), OLANDER et HOLTZER (4) (mélange eau - éthanol) ainsi que DUBIN (14) (mélange eau - t Butanol). L'étude la plus complète a été faite par CONIO et coll. (15-16) qui ont étudié l'effet des alcools aliphatiques (du méthanol au n-butanol) sur les paramètres de la transition hélice \rightleftharpoons chaîne de la poly L ornithine et de l'acide poly L glutamique.

Il faut encore mentionner une étude dans les mélanges eau - dioxanne (BYCHKOVA et coll. (17)), et dans le N methyl acétamide pur (HARRY et FRANZEN (18)).

Tous ces auteurs mettent en évidence une augmentation de la valeur de l'énergie libre de transition lorsqu'on ajoute un solvant organique à la solution aqueuse de PLGA. L'hélice est donc stabilisée.

Les divergences apparaissent lorsqu'il s'agit d'attribuer à cette stabilité accrue une origine enthalpique ou entropique. CONIO et coll. (15-16) par exemple attribuent cette stabilisation à une variation importante du terme entropique tandis que BYCHKOVA et coll. (17) trouvent à cette stabilisation une origine enthalpique.

Tous ces auteurs postulent que l'interprétation des mesures potentiométriques dans un mélange eau/solvant organique se fait de la même manière que dans l'eau. Nous avons également interprété nos résultats expérimentaux de cette façon.

RESULTATS EXPERIMENTAUX.

A - MELANGES EAU/DIOXANNE ET NaCl 0,2 M/DIOXANNE. ETUDE A TEMPERATURE AMBIANTE.

1 - Courbes de titration $\alpha = f(\text{pH})$

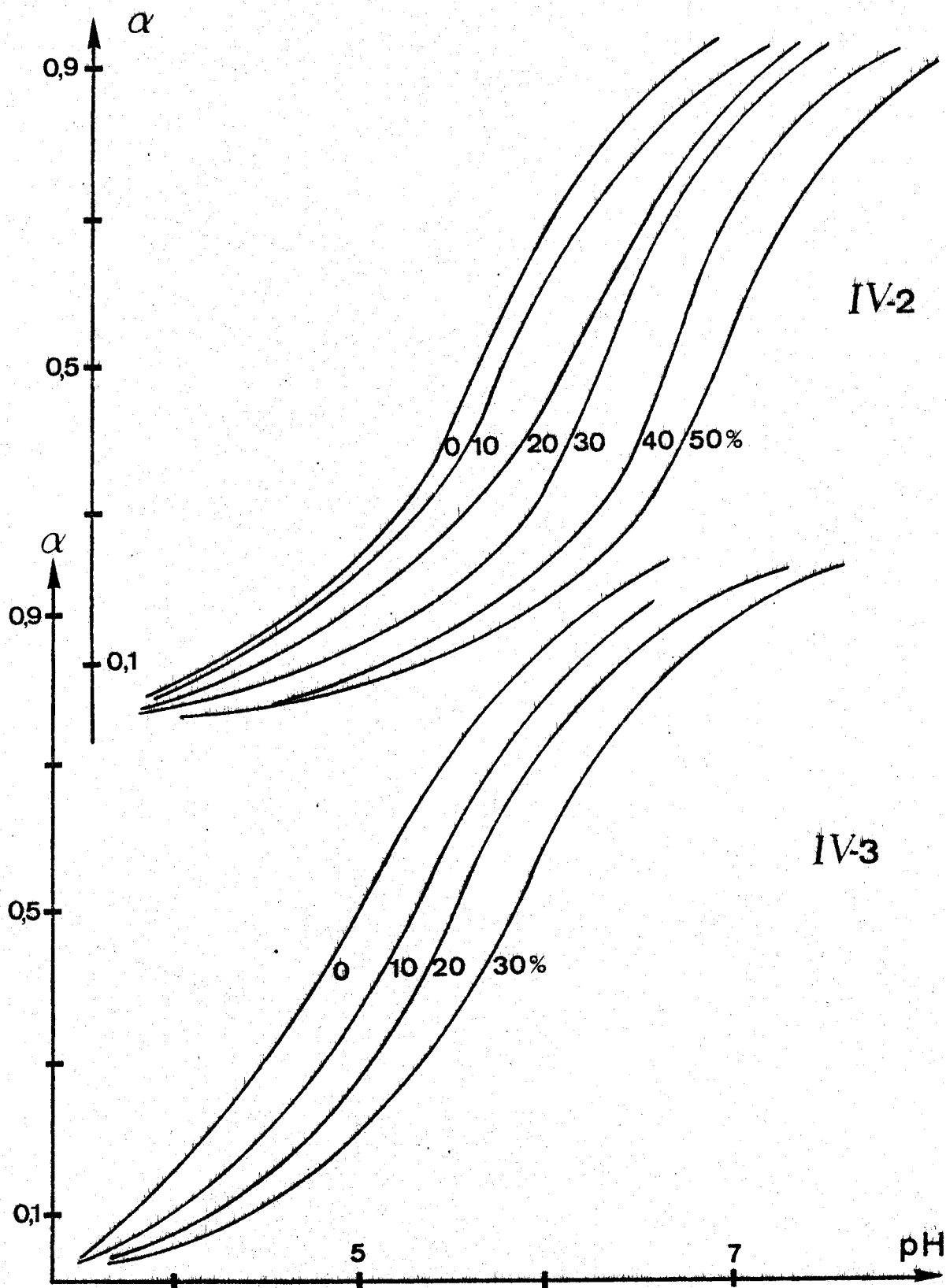
Les figures IV-2 et IV-3 présentent les courbes de titration $\alpha = f(\text{pH})$ du PLGA dans des mélanges eau - dioxanne et NaCl 0,2 M/dioxanne à différentes compositions en dioxanne. Dans le cas des mélanges NaCl 0,2 M - Dioxanne, la teneur en dioxanne est limitée à 30 % en raison du phénomène de précipitation qui a lieu au-delà de cette composition. On observe un net déplacement des courbes vers les pH élevés lorsque le taux de dioxanne augmente. A pH constant, le taux de dissociation est d'autant plus faible que la quantité de dioxanne est grande. On peut expliquer ceci qualitativement par une diminution de la constante diélectrique qui rend l'ionisation des fonctions acides plus difficiles. Cela doit amener une augmentation du pK_A du polyacide. En absence de dioxanne, le degré d'ionisation est plus important lorsque la force ionique n'est pas nulle. Cela peut être interprété par un effet d'écran. Les petits ions jouent le rôle d'écran électrostatique entre les charges COO^- du polymère. Les interactions sont diminuées et se traduisent par une ionisation plus facile.

2 - Courbes de titration modifiées.

Le tracé des courbes de titration modifiées $(\text{pH} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha}) = f(\alpha)$ fait apparaître les différentes parties de courbe correspondant à la titration de l'hélice, de la chaîne, et à la transition chaîne \rightleftharpoons hélice.

a) *Mélanges NaCl 0,2 M - Dioxanne* (figure IV-4).

Pour 0 % de dioxanne, la courbe présente une déviation pour $\alpha < 0,21$ dans la partie hélicoïdale. Cet effet a été attribué à la formation d'agrégats d'hélices ce qui modifie la valeur



Figures IV-2 et IV-3. Courbes $\alpha = f(\text{pH})$. Mélanges H₂O/Dioxanne et mélanges NaCl 0,2 M/Dioxanne



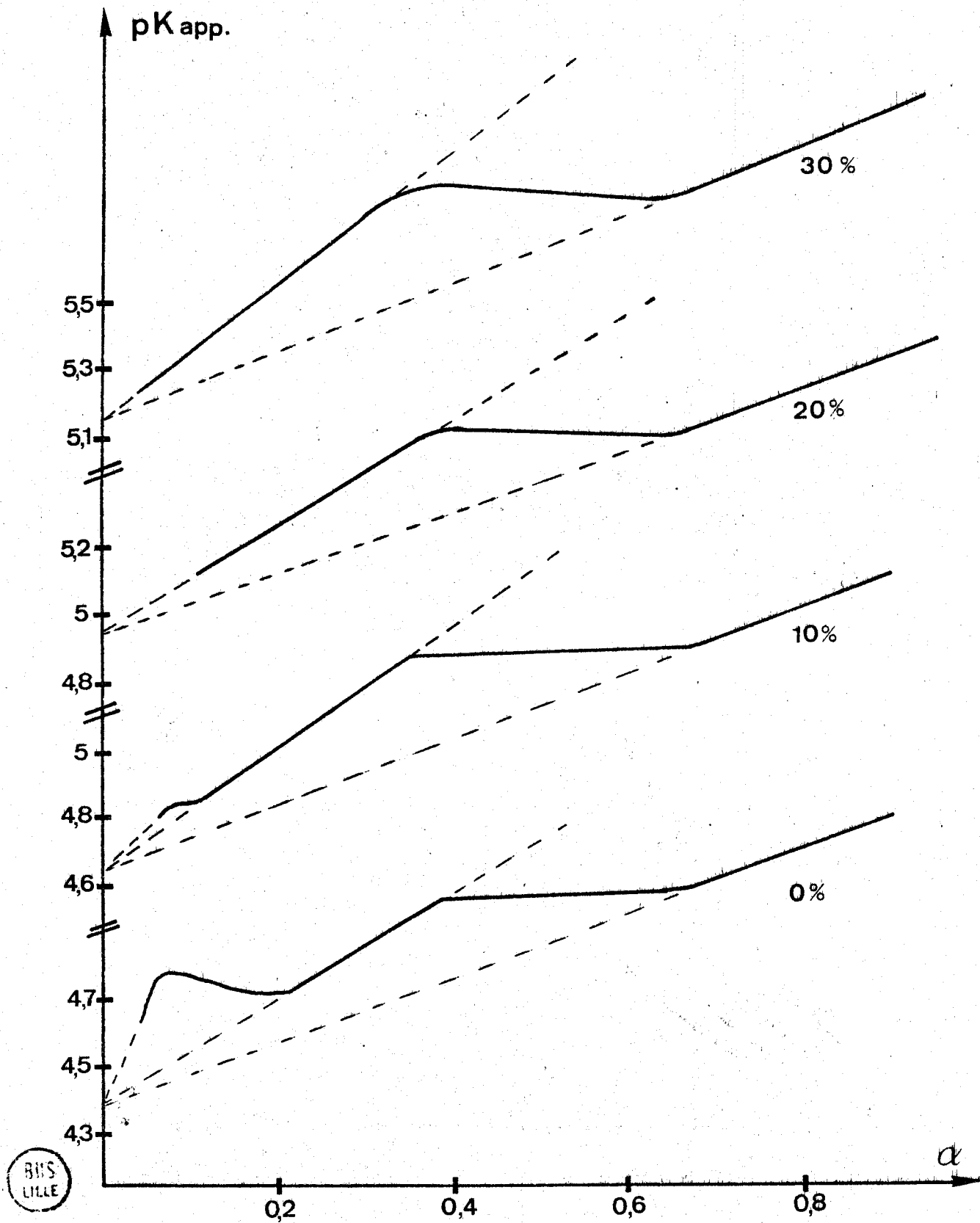


Figure IV-4. Courbes de titration modifiées. Mélanges NaCl 0,2 M Dioxanne.

du pK apparent. DUBIN (14) a émis l'hypothèse que la surface comprise entre la courbe expérimentale et la courbe extrapolée pour l'hélice, est proportionnelle à l'énergie libre de la transition hélices agrégées \rightleftharpoons hélices non agrégées. Ce problème n'a cependant pas encore reçu de traitement quantitatif. Lorsque la composition en solvant organique augmente, la déviation due à l'agrégation disparaît progressivement, ce qui montre que le dioxanne stabilise l'hélice vis-à-vis des agrégats. Les courbes de titration modifiées permettent de déterminer les valeurs de α au début et à la fin de la transition. Ces valeurs sont données dans le tableau IV-1 ainsi que les valeurs correspondantes du pH.

%	H ₂ O/Dioxanne		NaCl 0,2 M/Dioxanne	
	α	pH	α	pH
0	0,29 - 0,57	5,25 - 5,75	0,38 - 0,67	4,75 - 5,40
10	0,30 - 0,61	5,40 - 6,00	0,36 - 0,67	5,10 - 5,65
20	0,33 - 0,69	5,70 - 6,35	0,38 - 0,66	5,30 - 5,85
30	0,30 - 0,62	5,95 - 6,50	0,35 - 0,65	5,60 - 6,15
40	0,31 - 0,68	6,30 - 6,95		
50	0,29 - 0,70	6,50 - 7,30		

Tableau IV-1. Valeurs du pH et du coefficient de dissociation α correspondant à la zone de transition.

On voit que le domaine de valeurs de α dans lequel se produit la transition est peu sensible à la composition du solvant, tandis que le domaine de pH correspondant est déplacé vers les valeurs élevées. Ceci confirme le résultat obtenu à partir des courbes $\alpha = f(\text{pH})$.

b - Mélanges eau pure - dioxanne (figure IV-5).

En absence de sel, les extrapolations ont été faites de manière curviligne pour prolonger l'allure naturelle des courbes expérimentales. Les valeurs de α et du pH au début et à

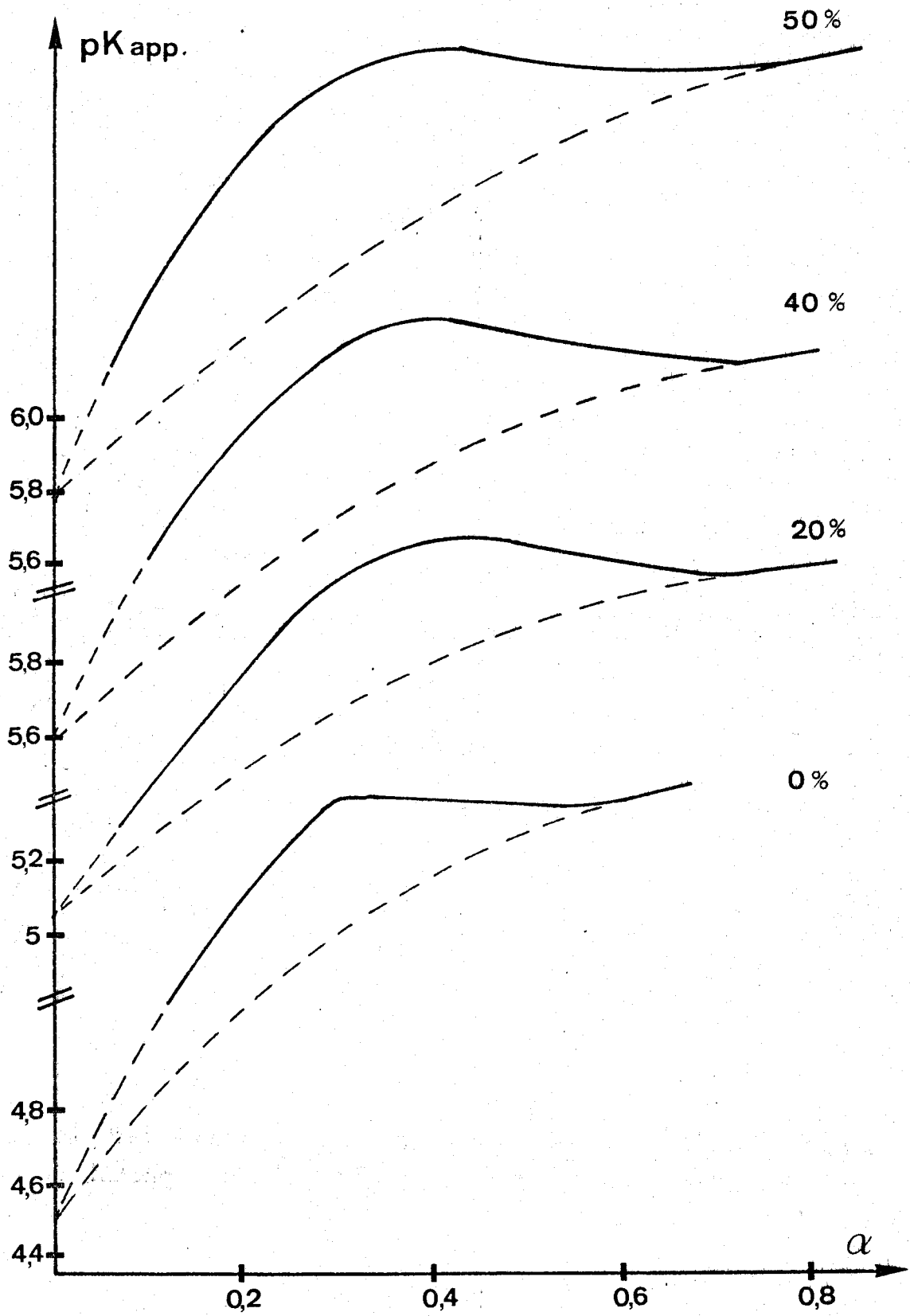


Figure IV-5. Courbes de titration modifiées : mélanges H_2O - dioxanne.

la fin de la transition sont également données dans le tableau IV-1. On retrouve le même effet qu'en présence de sel, c'est-à-dire des valeurs de α sensiblement constantes tandis que le domaine de pH est déplacé vers les valeurs élevées.

3 - Calcul de la fraction d'hélice.

L'hélicité du PLGA aux différentes valeurs de α a été calculée selon la méthode proposée par NAGASAWA et HOLTZER (voir plus haut). Les résultats obtenus sont représentés sur la figure IV-6 selon $F_H = f(\alpha)$ (où F_H est la fraction d'hélice).

En présence de NaCl 0,2 M (figure IV-6 a), les courbes $F_H = f(\alpha)$ sont peu modifiées par l'addition de dioxanne. La valeur de α pour laquelle $F_H = 0,5$ ($\alpha_{1/2}$) est comprise entre 0,47 et 0,50.

En absence de sel (figure IV-6 b), il n'y a pas non plus d'effet très net dû à l'addition de dioxanne. Les valeurs de $\alpha_{1/2}$ semblent varier de manière aléatoire et sont comprises entre 0,41 et 0,48. Le domaine de transition est donc obtenu pour des valeurs de α plus faibles qu'en présence de sel, quelle que soit la teneur en dioxanne. Cela signifie que l'hélice est stabilisée par la présence de sel en solution lorsque la transition est induite par le pH. Nous avons vu par dichroïsme circulaire que c'est également le cas lorsque la transition est induite par l'addition de dioxanne. Si on compare les courbes $F_H = f(\alpha)$ pour 0 et 50 % de dioxanne, on constate que dans le second cas la transition se fait sur une plus large gamme de valeurs de α . Cela doit signifier une transition moins coopérative en présence de dioxanne.

Pour évaluer quantitativement cet effet, nous avons utilisé l'équation empirique de STEIGMAN et COSANI (19) :

$$F_H = \frac{1}{1 + e^{-a+b\alpha}} \quad (\text{IV-6})$$

dans laquelle a et b sont des constantes.

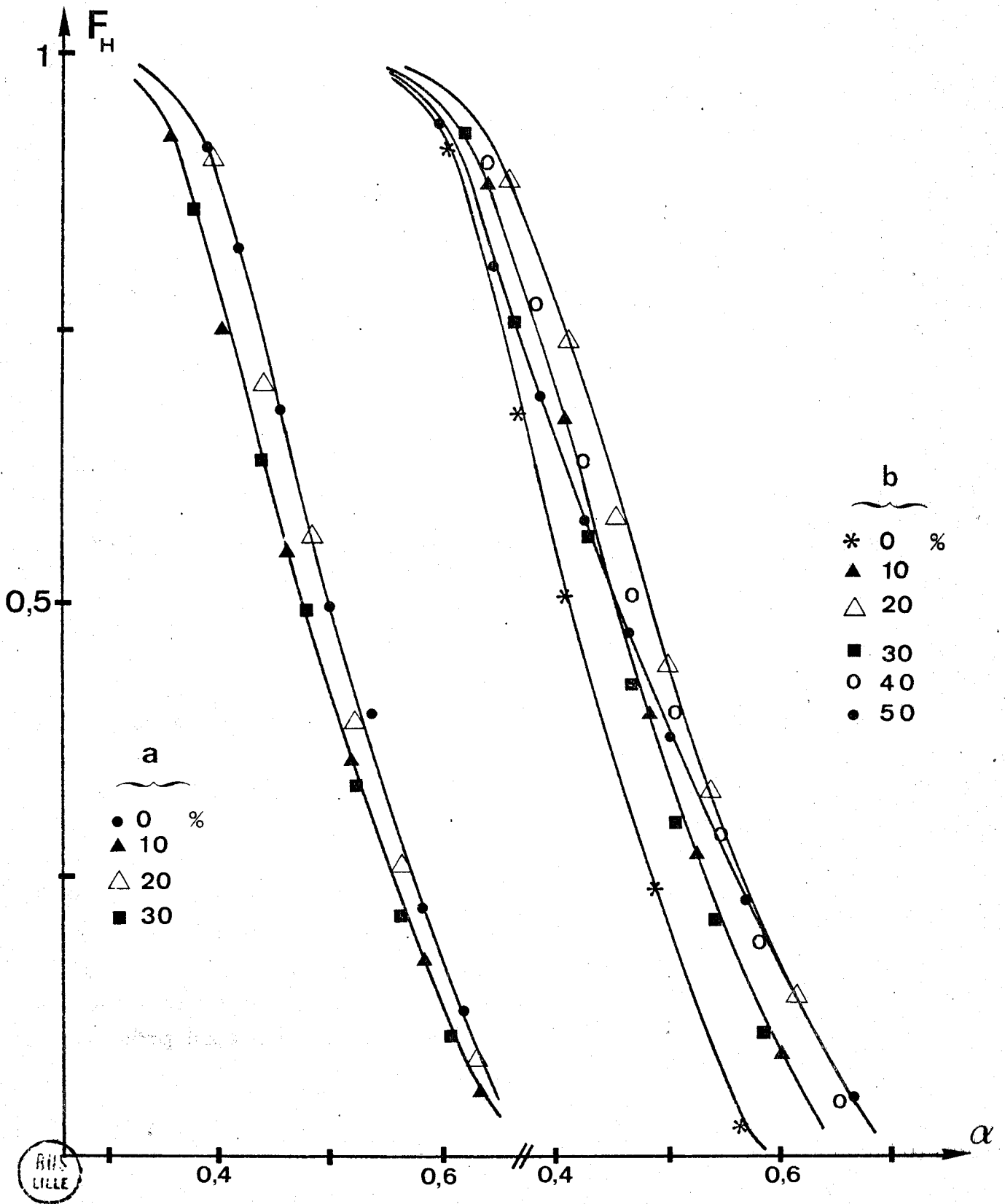


Figure IV-6. Courbes $f_H = f(\alpha)$
a) Mélanges NaCl 0,2 M - Dioxanne
b) Mélanges H₂O - Dioxanne.



Cette equation peut être écrite :

$$\frac{F_H}{I} - 1 = e^{-a+bx}$$

(IV-7)

ou encore :

$$\text{Log} \frac{F_H}{F_H - I} = a - bx$$

Dans cette equation b est une mesure de la coopérativité de la transition et sera d'autant plus grand que la transition est plus coopérative. Cependant c'est une mesure arbitraire qui ne peut être comparée à d'autres paramètres utilisés pour chiffrer la coopérativité tels que les paramètres σ et s utilisés par exemple par ZIMM et RICE (2) et qui reposent sur un modèle et une théorie mathématique.

Nous avons utilisé l'équation de STEIGMAN et COSANI pour les mélanges eau - dioxanne à 0 et 50 % de dioxanne

(Figure IV-7).

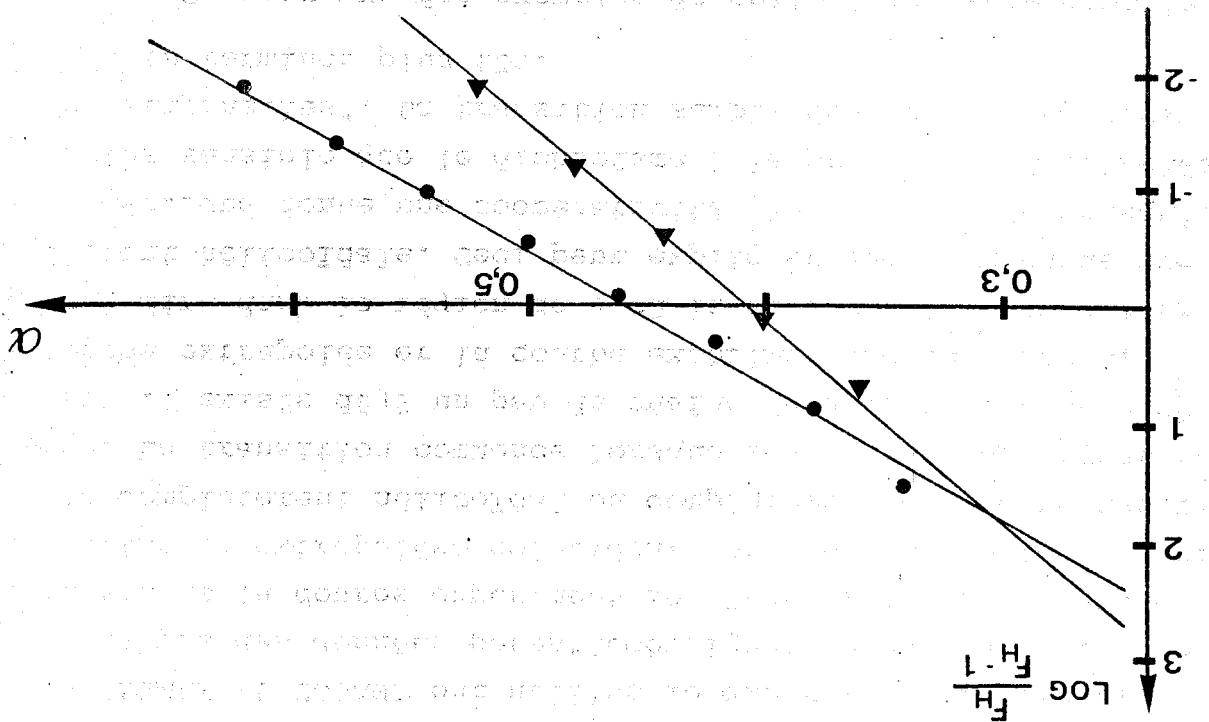


Figure IV-7. Représentation de l'équation de STEIGMAN et COSANI :

▼ dans l'eau ; dans le mélange eau dioxanne

● (50/50)

$$\text{Log} \frac{F_H}{F_H - I} = a - bx$$

Nous obtenons $b = 17,0$ à 0 % de dioxanne

$b = 11,25$ à 50 % de dioxanne

Lorsque $F_H = 0,5$: $a = b\alpha$ et $\alpha_{1/2} = \frac{a}{b}$

Pour 0 % dioxanne : $\alpha_{1/2} = 0,41$

50 % dioxanne : $\alpha_{1/2} = 0,46$.

STEIGMAN et COSANI ont calculé b et $\alpha_{1/2}$ pour ces deux solvants

et ont trouvé $b = 13,1$ $\alpha_{1/2} = 0,39$ pour 0 % dioxanne

$b = 12,55$ $\alpha_{1/2} = 0,59$ pour 50 % dioxanne.

L'écart avec nos résultats est assez important. Seules les valeurs de $\alpha_{1/2}$ dans l'eau pure sont en bon accord.

Ces différences peuvent être attribuées à la méthode utilisée pour la détermination de F_H . Nous avons calculé F_H par une méthode graphique à partir des courbes de titrations, tandis que STEIGMAN et COSANI ont utilisé le dichroïsme circulaire. Or l'analyse des données potentiométriques repose sur l'interprétation de la courbe expérimentale. Quand les courbes expérimentales et extrapolées coïncident, on suppose que le polymère est ou complètement hélicoïdal ou complètement en chaîne désordonnée. La transition commence lorsque les courbes divergent. En fait il existe déjà un peu de chaîne dans la région de α où la courbe extrapolée et la courbe expérimentale coïncident, c'est-à-dire dans la région de α où la conformation est essentiellement hélicoïdale. Ceci peut expliquer que la méthode potentiométrique donne une coopérativité plus importante puisqu'elle est moins sensible que le dichroïsme à la présence d'"impuretés conformationnelles". La transition semble donc commencer plus tard et se terminer plus tôt.

On retrouve des exemples de cette différence dans la littérature. C'est ainsi que dans NaCl 0,2 M $b = 15,5$ d'après les données potentiométriques de NAGASAWA et HOLTZER ⁽³⁾ tandis que $b = 9,3$ d'après des données de dichroïsme circulaire (STEIGMAN et COSANI ⁽¹⁹⁾).

La comparaison des valeurs obtenues pour 0 et 50 % de dioxanne montre cependant que l'addition de dioxanne augmente la valeur de $\alpha_{1/2}$ et diminue la coopérativité de la transition. Ceci n'apparaît pas nettement si l'on examine simplement les courbes de transition en fonction du pH. Les résultats de STEIGMAN et COSANI montrent également une diminution de la coopérativité par addition de dioxanne, cependant beaucoup moins nette. (α passe de 13,06 dans l'eau à 11,28 dans le mélange eau-dioxanne 60/40 et à 12,55 dans le mélange eau-dioxanne 50/50).

PTITSYN et coll. (20) ainsi que HAGNAUER et MILLER (21) ont utilisé une méthode viscosimétrique pour évaluer la coopérativité de la transition et en déduisent une augmentation de la coopérativité due à l'addition de solvant organique. Ceci est contraire aux résultats obtenus ci-dessus et montre l'importance du choix de la méthode utilisée pour évaluer la coopérativité.

4 - Constantes de dissociation intrinsèque pK_0 .

L'extrapolation des courbes de titration modifiées permet de déterminer les valeurs de la constante de dissociation intrinsèque pK_0 . Les valeurs obtenues à 25°C pour différents mélanges sont portées dans le tableau IV-2. La valeur $pK_0 = 4,40$ obtenue dans NaCl 0,2 M à 25°C est en très bon accord avec les valeurs de NAGASAWA et HOLTZER (3) ($pK_0 = 4,45$) et BYCHKOVA et collaborateurs (17) ($pK_0 = 4,37$). On observe une augmentation régulière de pK_0 avec la composition en dioxanne que ce soit en présence ou en absence de sel, les valeurs obtenues en absence de sel étant toujours légèrement supérieures.

Cette augmentation de pK_0 avec la composition explique l'augmentation du pH de transition observée alors que $\alpha_{1/2}$ ne varie pratiquement pas. Sur la figure IV-8 ont été tracées les valeurs de pK_0 en fonction de la constante diélectrique du milieu ϵ .

La constante diélectrique de l'eau est 78,3 à 25°C (22). Pour les solutions salines, nous avons utilisé la relation (23) :

$$\epsilon = \epsilon_{H_2O} + 2 \delta C \quad (IV-8)$$

où C est la concentration en sel en moles/l. δ est une constante dépendant de la nature du sel. ϵ_{H_2O} est la constante diélectrique de l'eau pure.

% Dioxanne	pK_o (0,2 M NaCl)	pK_o (H_2O)
0	4,40	4,45
10	4,68	4,80
20	4,95	5,05
30	5,18	5,26
40		5,60
50		5,75

Tableau IV-2. Valeurs de pK_o pour différents mélanges avec le dioxanne à 25°C.

Pour NaCl et KCl, δ est égal à - 5,5 l/mole et - 5,0 l/mole, respectivement. ϵ est ainsi égal à 76,1 pour NaCl 0,2 M et 77,3 pour 0,1 M KCl.

Dans le cas des mélanges avec des solvants organiques nous avons supposé que la constante diélectrique du mélange varie linéairement avec sa composition (Dioxanne : $\epsilon = 2,2$ Ethanol : $\epsilon = 24,3$). Des mesures récentes de JANNAKOUDAKIS et coll. (24) montrent que c'est effectivement le cas sauf pour les mélanges contenant plus de 75 % en volume de dioxanne.

La figure IV-8 présente également des données de la littérature relatives au PLGA dans des mélanges KCl 0,1 M - éthanol (13,15) et à l'acide acétique dans des mélanges eau dioxanne (25).

Dans tous les cas, pK_o varie linéairement avec la constante diélectrique du solvant.

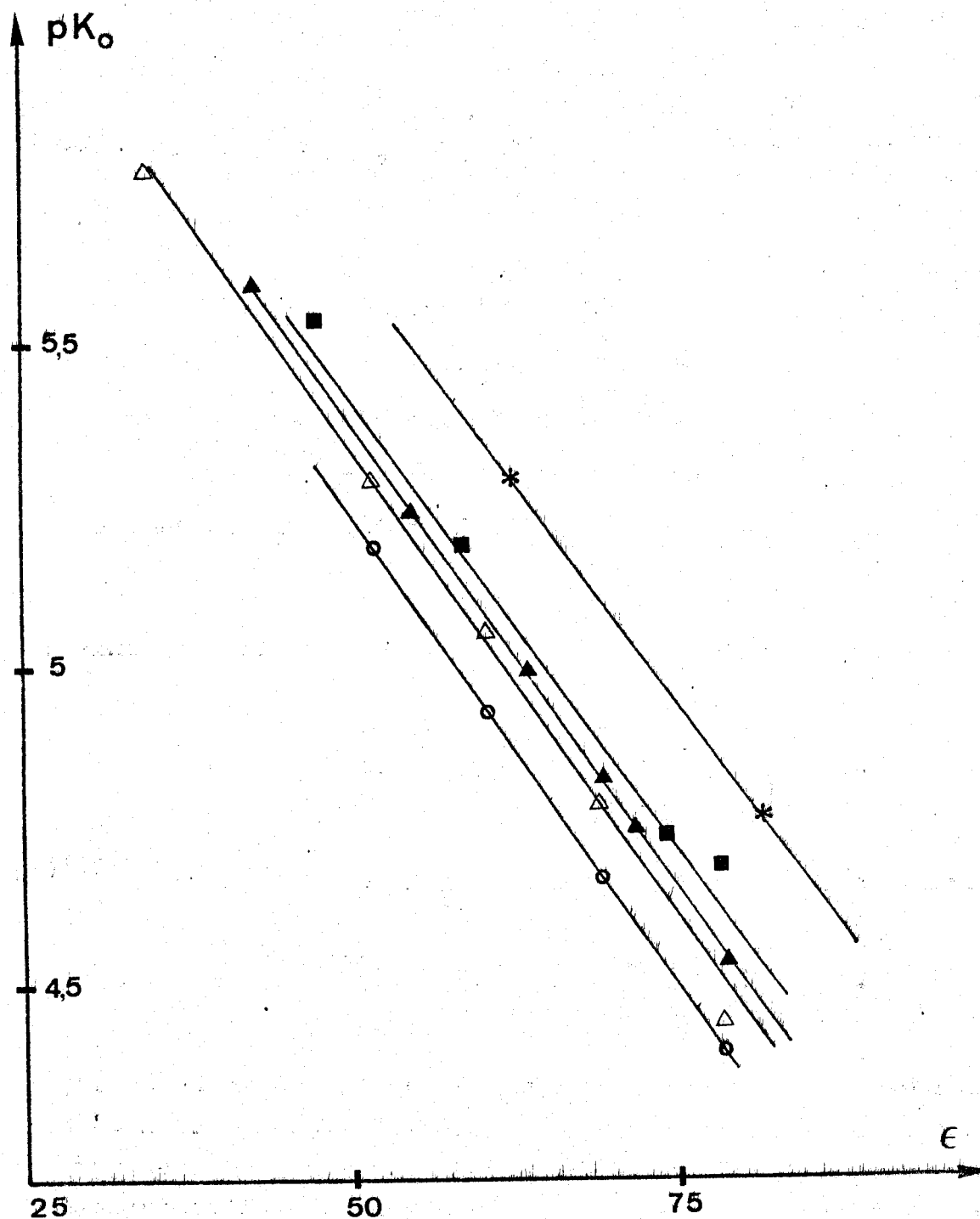


Figure IV-8. Variation du pK_0 du PLGA avec la constante diélectrique ϵ du mélange de solvants :

- \circ NaCl 0,2 M/Dioxanne ; Δ H₂O/Dioxanne ;
- \blacktriangle KCl 0,1 M/Ethanol⁽¹³⁾ ; \blacksquare KCl 0,1 M/Ethanol⁽¹⁵⁾
- * Variation du pK_0 de l'acide acétique dans les mélanges eau - dioxanne.

Cet effet peut être exprimé par la loi de BORN (26)

$$- \log \frac{s^K_A}{H_2O^K_A} = \frac{e^2}{rkT \log 10} \left[\frac{1}{\epsilon} - \frac{1}{\epsilon_{H_2O}} \right] = pK_s - pK_{H_2O} = \Delta pK \quad (IV-9)$$

où s^K_A et $H_2O^K_A$ sont les constantes de dissociation dans le mélange de solvants et dans l'eau

e est la charge du proton

k est la constante de BOLTZMANN

T est la température absolue

ϵ et ϵ_{H_2O} les constantes diélectriques du solvant et de l'eau.

Pour le système PLGA - eau - dioxanne, cette équation donne :

$$\Delta pK = - \log \frac{s^K_A}{H_2O^K_A} = - 1,79 + \frac{140}{\epsilon}$$

tandis que pour l'acide propionique dans le même mélange (27) :

$$\Delta pK = - \log \frac{s^K_A}{H_2O^K_A} = - 1,77 + \frac{140}{\epsilon}$$

L'effet du dioxanne sur l'ionisation du PLGA est donc analogue à celui observé sur les petites molécules modèles. Ceci n'est pas surprenant puisque les valeurs de pK_0 sont obtenues par extrapolation à $\epsilon = 0$ ce qui annule les effets électrostatiques entre groupements carboxyliques voisins.

Ce résultat peut dans une certaine mesure justifier les extrapolations utilisées pour établir les valeurs de pK_0 .

5 - Energie libre de transition hélice \rightleftharpoons chaîne

Comme nous l'avons vu précédemment, les courbes de titration modifiées permettent de déterminer l'énergie libre de

transition hélice non chargée \rightarrow chaîne non chargée.

Nous avons mesuré cette énergie pour les mélanges eau - dioxanne et NaCl 0,2 M - dioxanne à 25°C. Les valeurs obtenues sont portées sur la figure IV-9 sous la forme de courbes $\Delta G^{\circ} = f(\% \text{ dioxanne})$. Nous avons également représenté la variation de ΔG° dans des mélanges KCl 0,1 M/ethanol d'après CONIO et PATRONE (15).

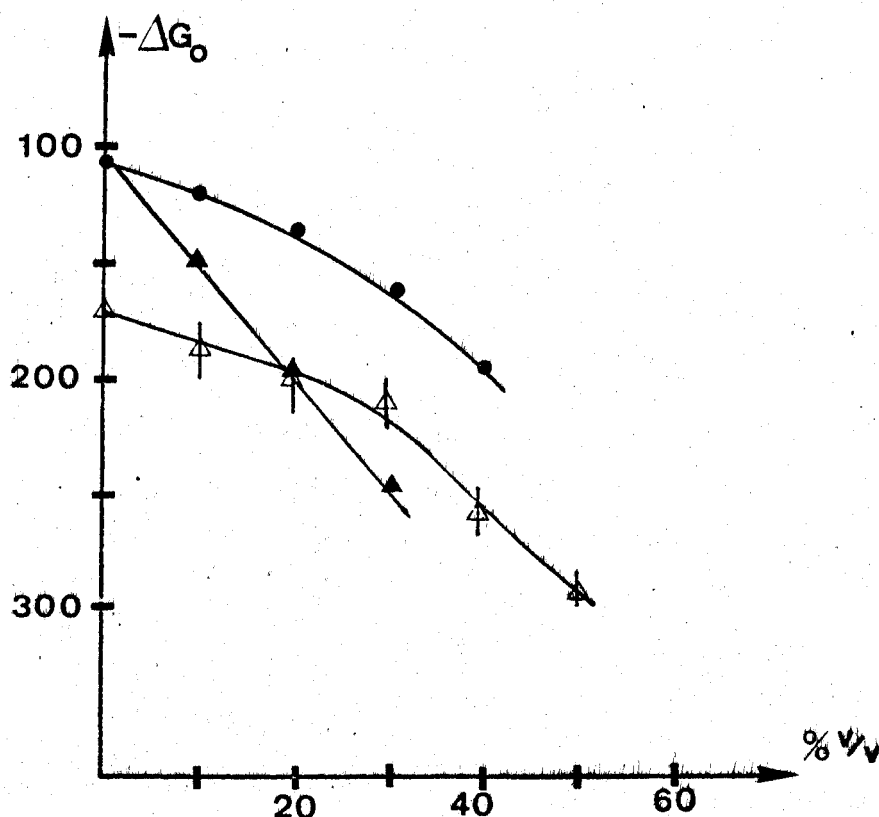


Figure IV-9. Variation de l'énergie libre de transition ΔG° avec la composition du solvant.

- NaCl 0,2 M/Dioxanne ; Δ H₂O - Dioxanne ;
- ▲ KCl 0,1 M/ethanol (15).

Pour 0 % de dioxanne dans NaCl 0,2 M,
 $\Delta G^{\circ} = -106$ cal/mole ce qui est en bon accord avec les valeurs proposées par d'autres auteurs :

HERMANS (5)	ΔG° dans KCl 0,1 M = - 105 cal/mole
CIFERRI et coll. (28)	ΔG° dans NaCl 0,2 M = - 107 cal/mole

En absence de sel, les valeurs de ΔG° sont moins précises en raison des extrapolations curvilignes utilisées pour obtenir le même pK_o pour l'hélice et la chaîne.

Cependant en absence de sel et de dioxanne nous obtenons $\Delta G^\circ = - 175$ cal/mole ce qui est en assez bon accord avec la valeur $\Delta G^\circ = - 192$ cal/mole donnée par OLANDER et HOLTZER ⁽⁴⁾ pour le PLGA dans NaCl 0,01 M. Que ce soit en présence ou en absence de sel, l'addition de dioxanne provoque une augmentation de la valeur absolue de ΔG° ce qui signifie une augmentation de l'énergie de stabilisation de l'hélice α vis-à-vis de la transition. La variation de ΔG° avec la composition est linéaire jusqu'à environ 25 % de dioxanne.

La variation de ΔG° avec la composition du solvant est plus importante dans le cas des mélanges KCl 0,1 M - ethanol que dans le cas des mélanges NaCl 0,2 M - Dioxanne.

Cette différence pourrait être due à la force ionique ou la nature différente du sel. Cependant CIFERRI et collaborateurs ⁽²⁸⁾ ont montré que le changement de force ionique de 0,1 M à 0,2 M avait peu d'effet sur la valeur de ΔG° dans le cas de KCl ou KSCN. De plus, les contre-ions K^+ et Na^+ ont le même effet sur la variation de ΔG° ⁽¹¹⁾. La différence observée doit donc être attribuée à la nature du solvant organique.

Pour confirmer cela nous avons mesuré ΔG° dans un mélange 0,2 M NaCl/Ethanol (81/19 ; v/v) et nous avons trouvé $\Delta G^\circ = - 190$ cal/mole ce qui correspond aux résultats dans KCl 0,1 M/Ethanol.

Dans NaCl 0,2 M, la valeur obtenue pour 33 % de dioxanne dévie fortement du comportement linéaire observé jusqu'à 25 %. Cela est probablement dû à la proximité de la zone où le PLGA précipite en présence de sel.

Si on considère la partie linéaire de la courbe, que ce soit en présence ou en absence de sel, on constate que le transfert de la molécule de PLGA d'une solution aqueuse à une solution contenant 10 % de dioxanne, met en jeu une énergie libre d'environ 16 calories/mole.

On peut comparer cette valeur à celle obtenue pour le mélange avec l'éthanol et à d'autres données disponibles dans la littérature :

- pour le PLGA, le transfert de la solution aqueuse à une solution contenant 10 % d'éthanol met en jeu une énergie libre de 41 cal/mole (15).

- Dans le cas de la poly L Lysine, le même transfert à une solution contenant 10 % d'éthanol met en jeu la même énergie libre (41 cal/mole) (29)

Il semble donc que cette quantité soit peu sensible à la nature de la chaîne latérale du polypeptide.

- Dans le cas des molécules modèles (amides ou amino-acides) le transfert du groupe peptidique de l'eau à un mélange à 10 % d'éthanol met en jeu une énergie libre de 60 cal/mole ce qui est voisin des valeurs obtenues pour les polypeptides dans les mêmes solvants (30).

Malheureusement nous ne disposons pas des données correspondantes pour les mélanges eau - dioxanne.

Cependant il est clair que le dioxanne a un effet stabilisant beaucoup moins important que l'éthanol sur l'hélice α .

Ces résultats peuvent être exprimés d'une manière différente en faisant intervenir non plus la composition en volume du mélange mais la concentration en groupements méthylène CH_2 introduits par le solvant organique (31). Cette méthode présente l'avantage de tenir compte du caractère hydrophobe du solvant employé. La concentration exprimée en mole de méthylène par litre de solvant mm/l est alors reliée au pourcentage en volume P par la relation :

$$C = 10 \frac{n d}{M} P \quad (\text{IV-10})$$

où d est la densité du solvant organique, M sa masse moléculaire et n le nombre de groupes méthylène par molécule de solvant. Par exemple $n = 2$ pour l'éthanol et $n = 4$ pour le dioxanne. On peut

alors calculer l'incrément d'énergie libre $\Delta(\Delta G^{\circ})$ par mole de méthylène. $\Delta(\Delta G^{\circ})/\text{mm}$.

CONIO et PATRONE ont étudié les mélanges de l'eau avec le méthanol, l'éthanol, le propanol, le butanol, dans le cas du PLGA et de la poly L ornithine. Les résultats montrent que l'incrément d'énergie libre par mole de méthylène est constant et égal à -13 cal/mm ⁽¹⁶⁾. Cette grandeur semble donc indépendante du type d'alcool utilisé, mais aussi de la nature de la chaîne latérale du polypeptide.

Un calcul analogue, appliqué à nos résultats dans les mélanges eau - dioxanne, donne $\Delta(\Delta G^{\circ})/\text{mm} = -3 \text{ cal/mm}$ ce qui confirme le pouvoir stabilisant plus faible du dioxanne.

La variation de ΔG° peut également être tracée en fonction de la constante diélectrique du mélange de solvants ^(14,22) (figure IV-10).

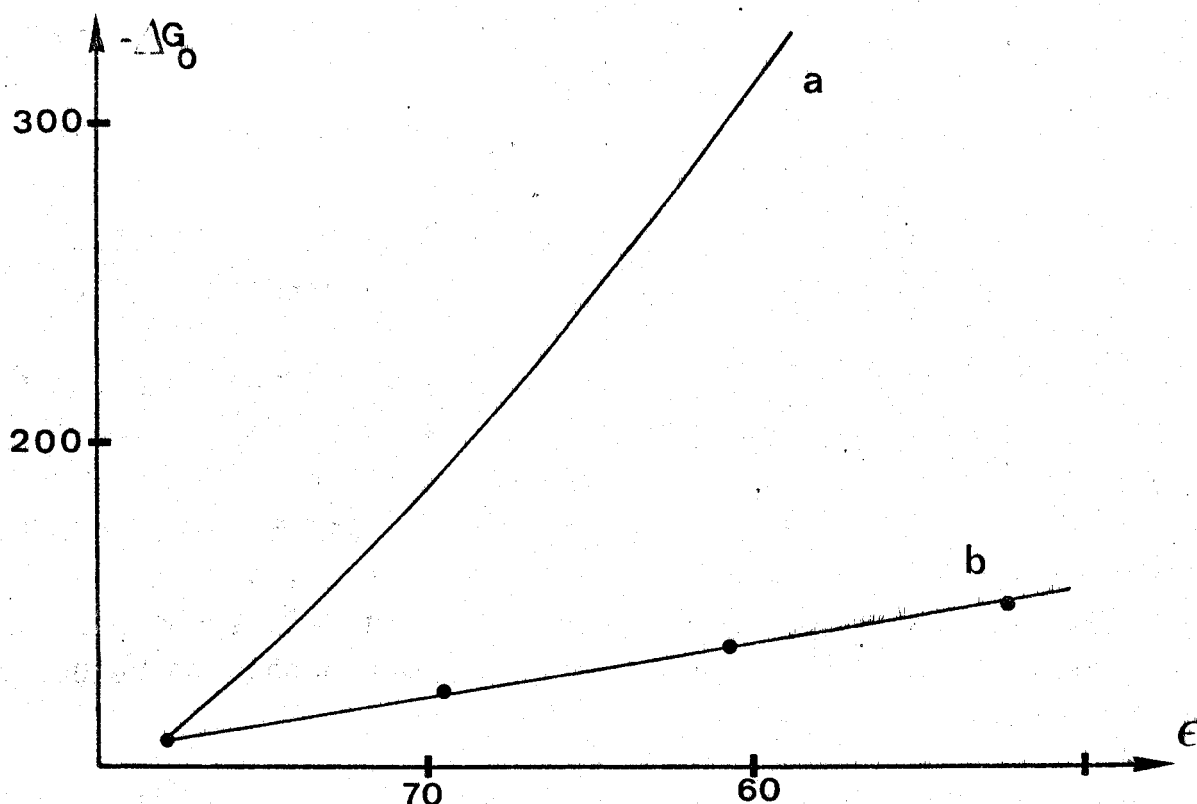


Figure IV-10. Variation de ΔG° avec la constante diélectrique ϵ
a - mélanges KCl 0,1 M/alcool ⁽¹⁵⁾
b - mélanges NaCl 0,2 M/Dioxanne.

Pour les mélanges eau - alcool tous les points expérimentaux se placent sur une seule courbe quelle que soit la nature de l'alcool envisagé.

On peut donc dire que dans une série homologue de solvants, l'énergie libre de transition ne dépend que de la constante diélectrique. Cependant cela ne peut être étendu à tous les types de solvants puisque la courbe $\Delta G^{\circ} = f(\epsilon)$ obtenue pour les mélanges avec le dioxanne est très différente de celle correspondant aux alcools.

Ceci montre que la constante diélectrique n'est pas le seul paramètre pouvant faire varier l'énergie libre de transition.

B - MELANGE NaCl 0,2 M/DIOXANNE ; ETUDE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE ; DETERMINATION DES PARAMETRES THERMODYNAMIQUES.

Les courbes de titration $\alpha = f(\text{pH})$ pour les mélanges NaCl 0,2 M - dioxanne à 10 et 30 % sont données sur les figures IV-11 et IV-12 pour différentes températures comprises entre 3°C et 55°C.

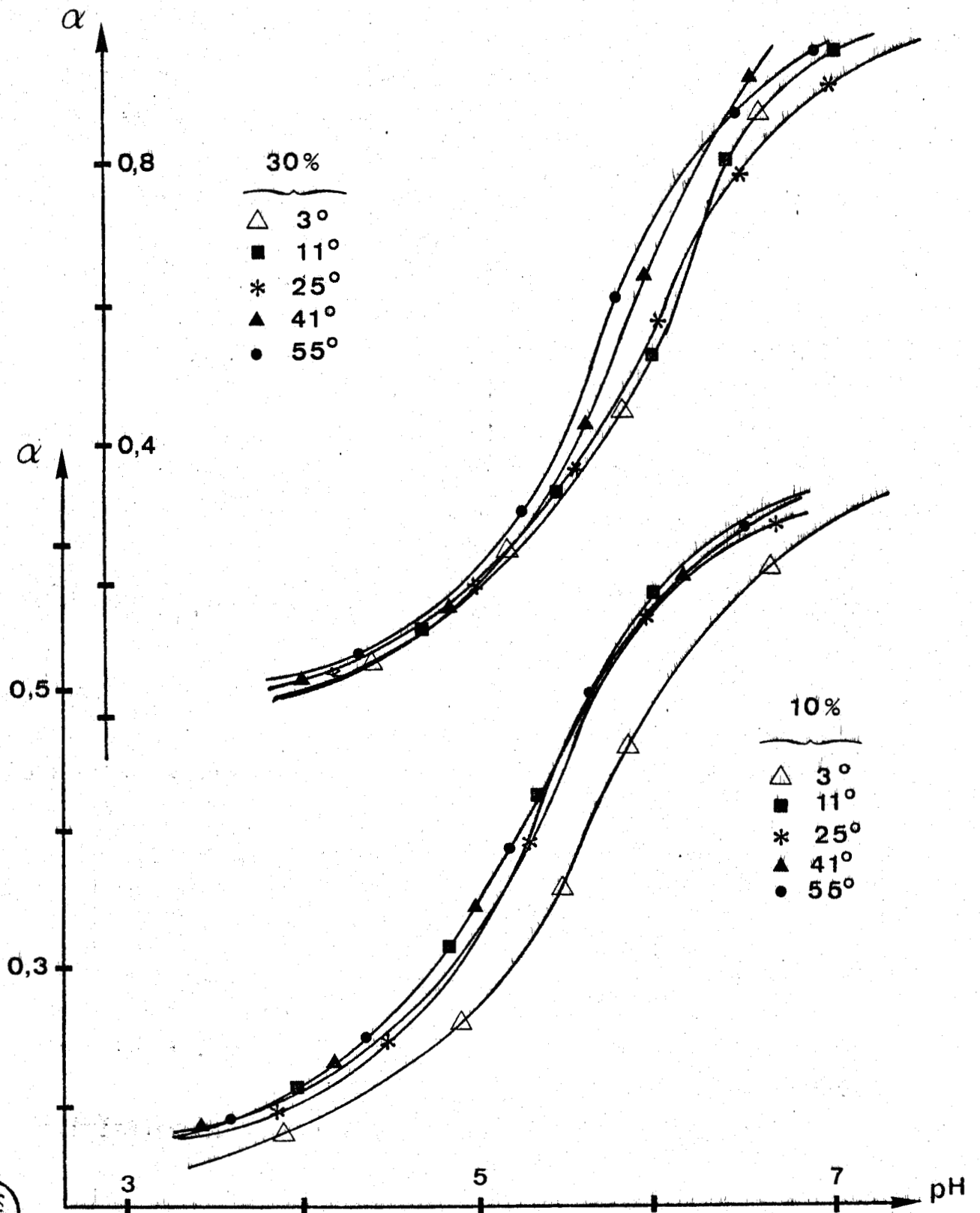
A 10 % de dioxanne les courbes sont peu sensibles à la variation de température. Seule la courbe correspondant à $t = 3^{\circ},5 \text{ C}$ est déplacée vers les valeurs élevées de pH.

A 30 % de dioxanne, les courbes sont légèrement déplacées vers les pH élevés à mesure que la température diminue. Cela correspond à une augmentation de la constante d'ionisation du polyacide lorsque la température augmente.

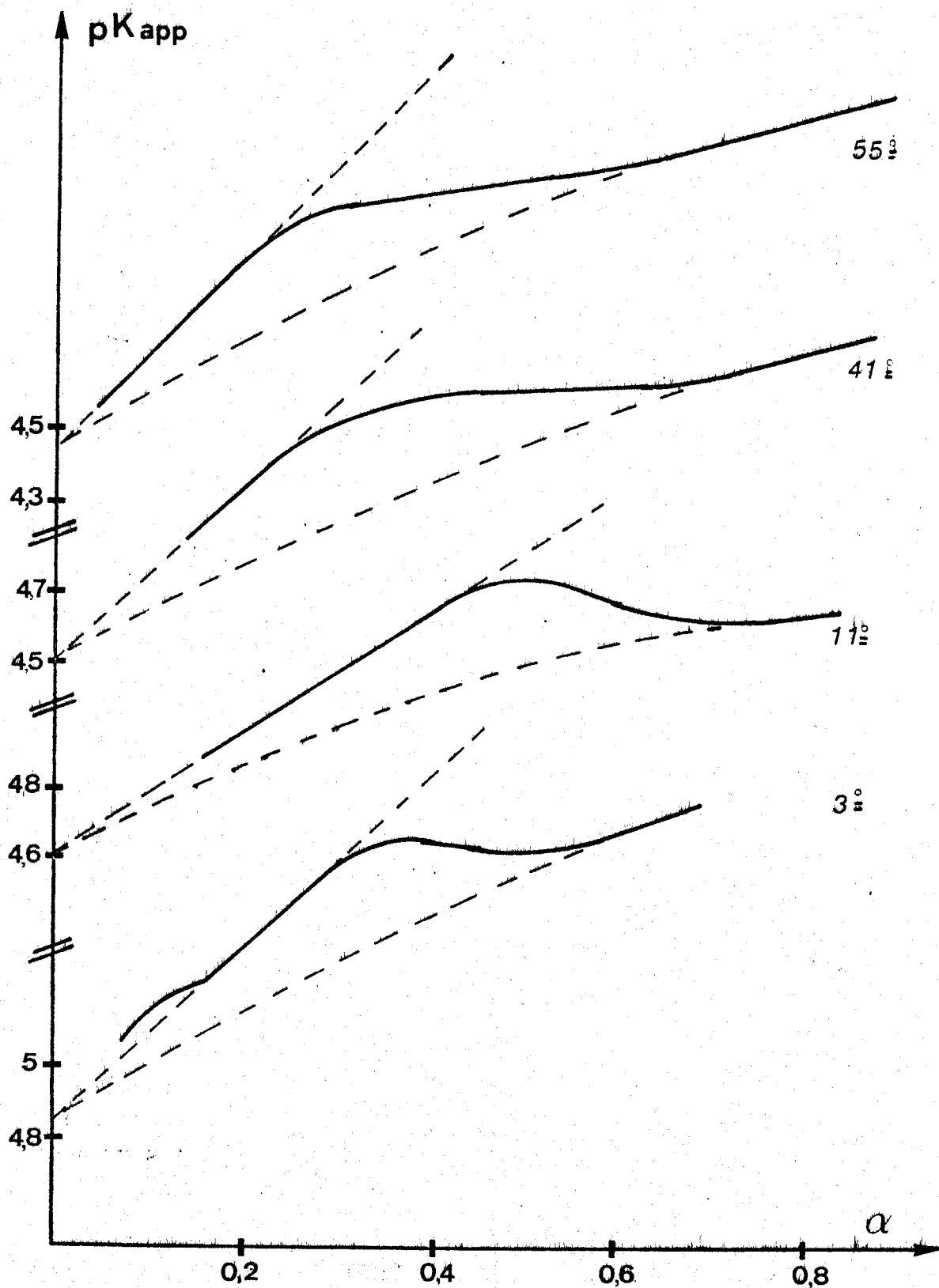
Les courbes de titration modifiées $\text{pH} - \log \left(\frac{\alpha}{1-\alpha} \right) = f(d)$ sont données sur les figures IV-13 à IV-15.

1 - Constantes de dissociation pK_0

Ces courbes permettent de déterminer les valeurs de pK_0 aux différentes températures. Le tableau IV-3 montre que pK_0 diminue lorsque la température augmente, dans tous les mélanges.



Figures IV-11 et IV-12. Variation de α avec le pH à différentes températures pour les mélanges NaCl 0,2 M/Dioxanne à 10 et 30 % de dioxanne.



BUS
LILLE

Figure IV-13. Courbes de titration modifiées à différentes températures pour le PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M/Dioxane à 10 % en dioxane.

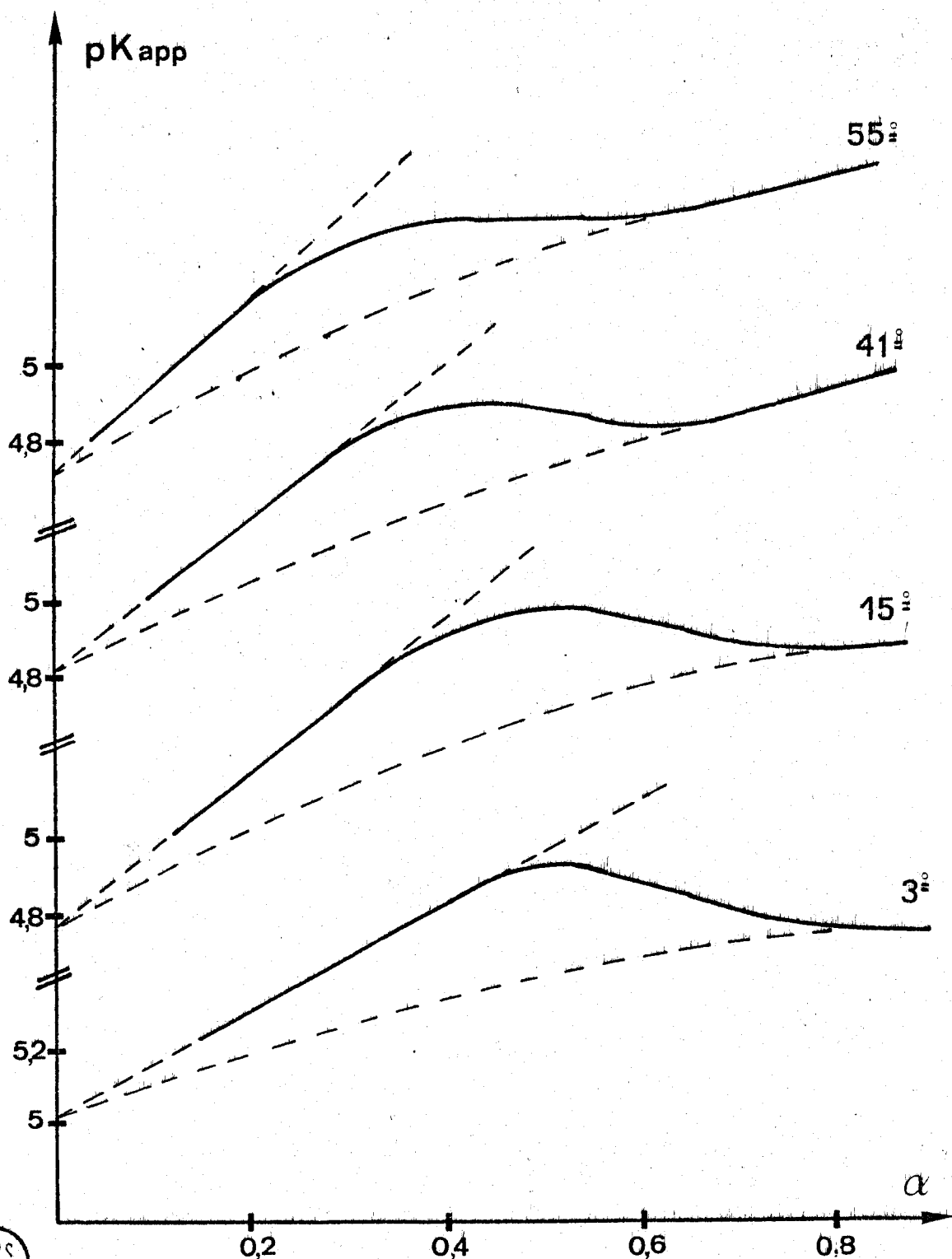


Figure IV-14. Courbes de titration modifiées à différentes températures pour le PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne à 20 % en dioxanne.

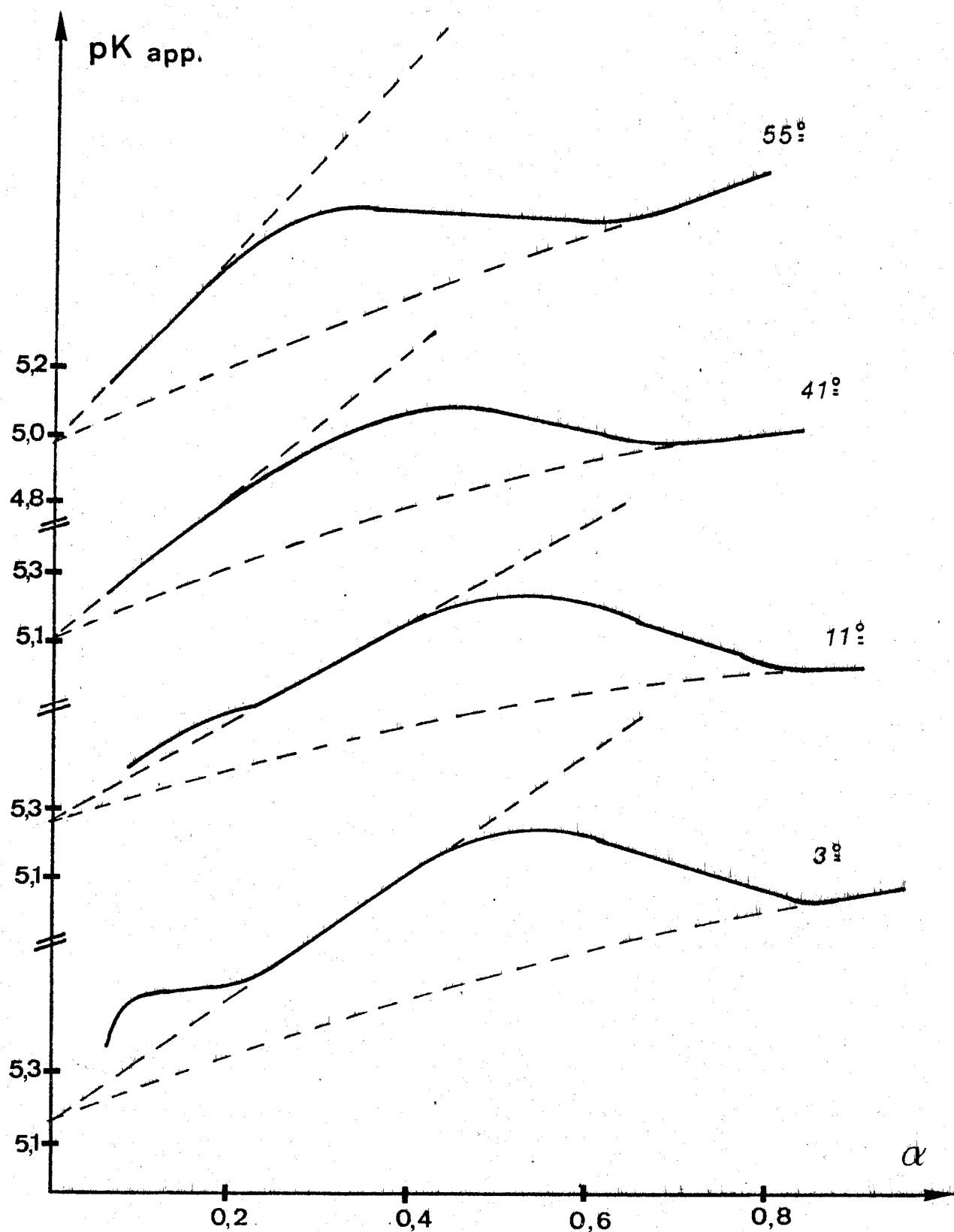


Figure IV-15. Courbes de titration modifiées à différentes températures pour le PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne à 30 % en dioxanne.



% Dioxanne	t°C	pK _o
10	3,5	4,85
	11,5	4,63
	25	4,68
	41	4,53
	55	4,46
20	3,5	5,02
	15	4,80
	25	4,95
	41	4,83
	55	4,71
30	3,5	5,16
	11,5	5,25
	25	5,18
	41	5,11
	55	4,98

Tableau IV-3. Variation de pK_o avec la température dans divers mélanges NaCl 0,2 M - Dioxanne.

L'enthalpie d'ionisation ΔH est fonction de la constante d'ionisation K_o selon la relation :

$$\Delta H = - RT \text{ Log } K_o$$

$$\text{D'où } pK_o = \frac{\Delta H}{2,3 R} \frac{1}{T}$$

La pente de la courbe $pK_o = f\left(\frac{1}{T}\right)$ fournit la valeur de ΔH . Les valeurs obtenues sont peu précises:

pour 10 % de dioxanne $\Delta H = 2900 \pm 200$ cal/mole

pour 20 % de dioxanne $\Delta H = 2500 \pm 500$ cal/mole

pour 30 % de dioxanne $\Delta H = 2300 \pm 600$ cal/mole.

Cependant on peut noter une augmentation importante de ΔH lorsqu'on ajoute du dioxanne au milieu (la valeur de ΔH en milieu purement aqueux est de 550 cal/mole).

Cet effet est identique à celui observé en présence d'alcool par CONIO et PATRONE ⁽¹⁵⁾.

2 - Valeurs du coefficient de dissociation à la demi-transition

$\alpha_{1/2}$

$\alpha_{1/2}$ est la valeur de α lorsque $F_H = 0,5$ (demi-transition).

La figure IV-16 représente les variations de $\alpha_{1/2}$ en fonction de la température pour différents mélanges NaCl 0,2 M/Dioxanne.

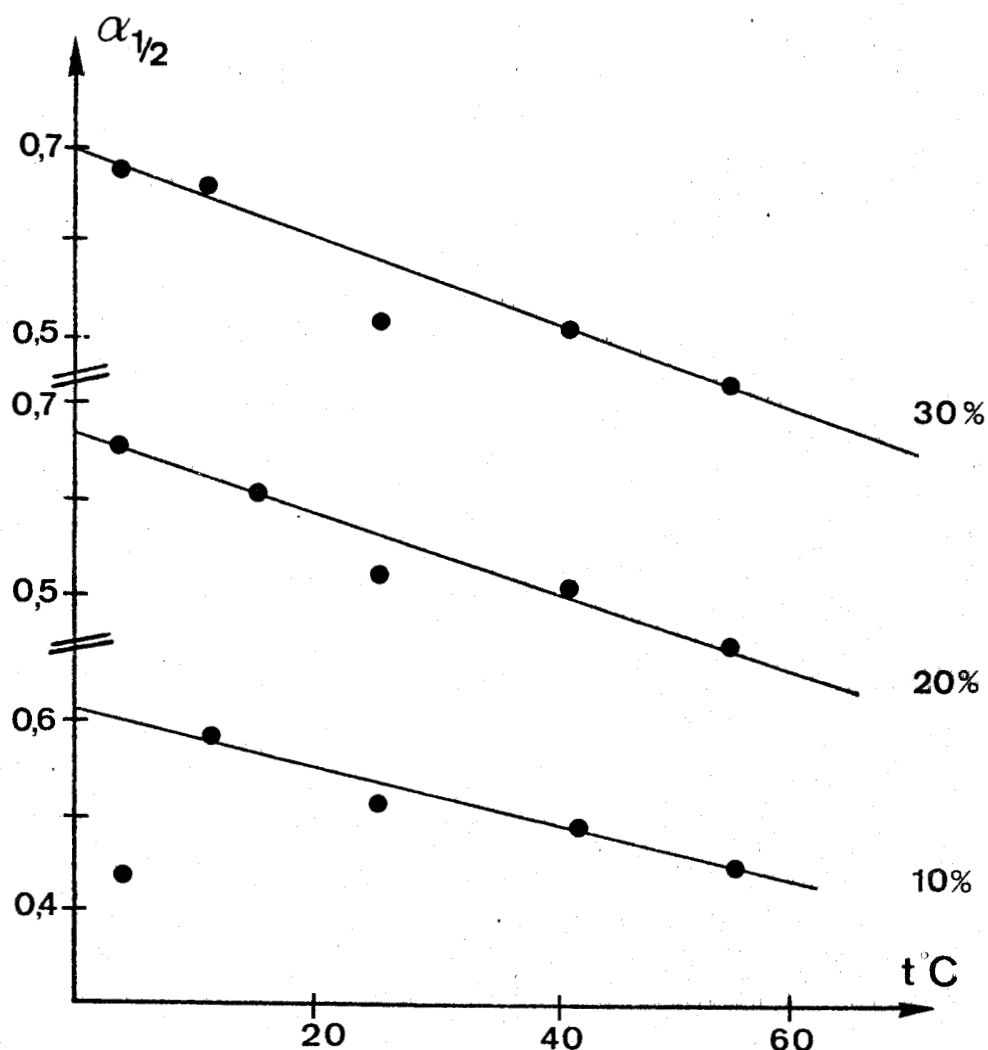


Figure IV-16. Variation de $\alpha_{1/2}$ avec la température pour différentes compositions du mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne.

Dans tous les cas $\alpha_{1/2}$ diminue lorsque la température croît. Cela signifie que le domaine de stabilité de l'hélice α diminue lorsque la température augmente. Ceci apparaît d'ailleurs clairement lorsqu'on examine les courbes de titration modifiées. La partie de courbe correspondant à la titration de l'hélice diminue à mesure que la température augmente. Cette variation de $\alpha_{1/2}$ est peu sensible à la composition du solvant comme le montre le tableau IV-4 qui donne l'ordonnée à l'origine et la pente de la courbe $\alpha_{1/2} = f(t^\circ)$.

% dioxanne	$\alpha_{1/2}$ à $t = 0^\circ\text{C}$	pente en d°^{-1}
10	0,62	- 4,1 10^{-3}
20	0,64	- 3,9 10^{-3}
30	0,67	- 4,7 10^{-3}

Tableau IV-4. Ordonnée à l'origine et pente de la courbe $\alpha_{1/2} = f(t^\circ)$.

Dans les mêmes conditions la valeur du pH à la demi-transition $\text{pH}_{1/2}$ diminue quand la température croît ce qui est dû à la diminution de pK_O et de $\alpha_{1/2}$ dans ces conditions. A température constante $\text{pH}_{1/2}$ augmente avec la composition en dioxanne. Ceci est dû à l'augmentation de pK_O puisque $\alpha_{1/2}$ est alors sensiblement constant. (figure IV-17).

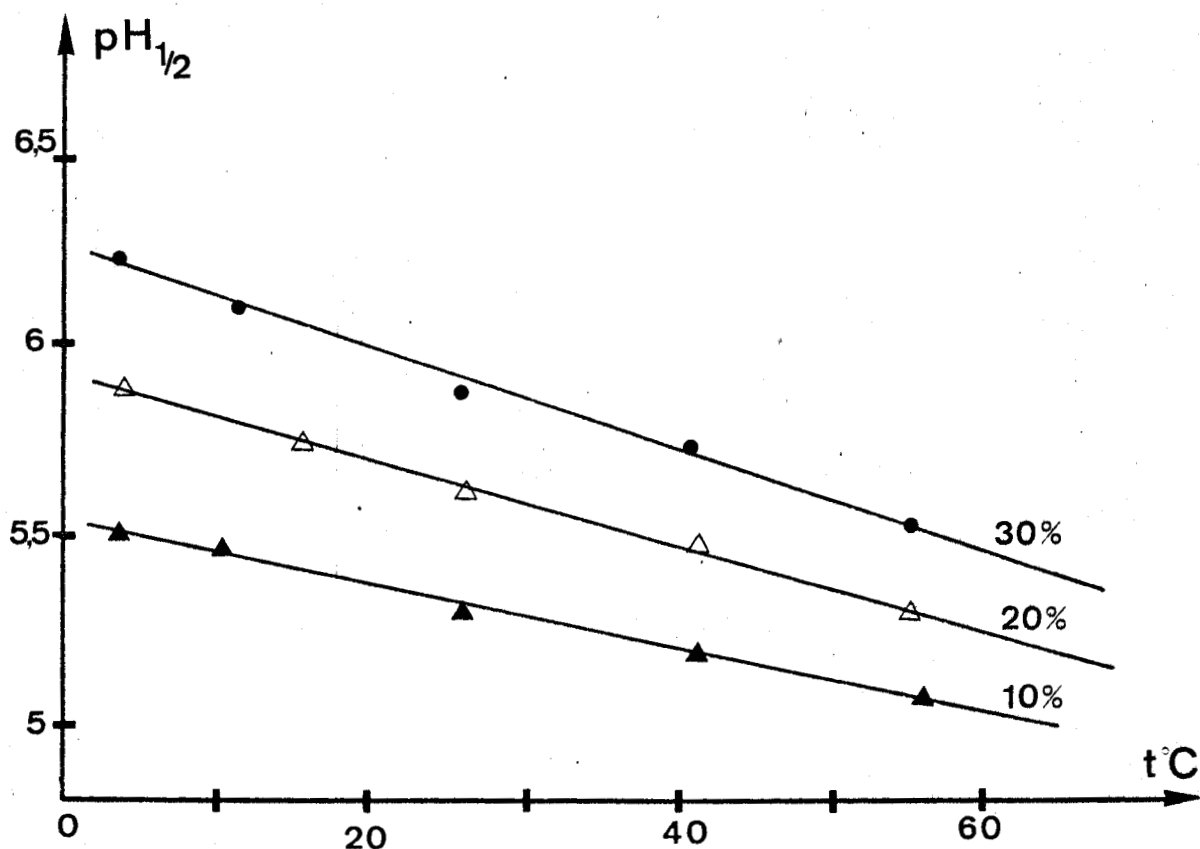


Figure IV-17. Variation du pH de demi-transition avec la température pour différentes compositions du mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne.

3 - Variation de l'énergie libre de transition avec la température.

La variation de l'énergie libre de transition dans les mélanges NaCl 0,2 M/Dioxanne a été étudiée par BYCHKOVA et collaborateurs (17) pour des mélanges à 25 % et 33 % de dioxanne. Selon ces auteurs, la variation de ΔF° en fonction de la température pour ces deux mélanges peut être représentée par une seule droite bien que les points expérimentaux soient très dispersés. L'enthalpie ΔH° et l'entropie ΔS° de transition seraient donc identiques dans les deux mélanges. Les valeurs proposées sont :

$$\Delta H^\circ = - 1700 \text{ cal/mole}$$

et
$$\Delta S^\circ = - 4,86 \text{ unités entropiques}$$

Dans NaCl 0,2 M pur les valeurs correspondantes varient selon les auteurs.

Le tableau IV-5 présente quelques résultats publiés dans la littérature pour le PLGA dans NaCl 0,2 M.

Auteurs	Réf.	ΔG° 25°	ΔH°	ΔS°
CIFERRI et coll.	28	- 107	- 1200	- 3,3
MILLER et NYLUND	12	- 130 \pm 9	- 1000	- 2,8
OLANDER et HOLTZER	4	- 167 \pm 20	- 975 \pm 50	- 2,67 \pm 0,2

Tableau IV-5. Paramètres thermodynamiques de la transition chaîne hélice du PLGA en solutions aqueuses (données de la littérature).

A l'examen de ce tableau, il apparaît certaines différences dans les valeurs de ΔS° et de ΔG° à 25°C. Ceci est probablement dû à la méthode d'extrapolation utilisée pour les courbes de titration modifiées (choix de la valeur de pK_0 , extrapolations linéaires ou curvilignes). Cependant, quel que soit le couple de valeurs ΔH° et ΔS° choisies pour caractériser la transition en solution aqueuse, les valeurs trouvées par BYCHKOVA et coll. montrent une diminution de l'enthalpie et de l'entropie de transition lorsque le milieu contient du dioxanne. La stabilisation de l'hélice se traduit par une diminution de l'énergie libre de transition (ou une augmentation en valeur absolue de ΔG°).

Or $\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}$. Si ΔG° diminue ce peut être soit par diminution de ΔH° soit par augmentation de ΔS° . Selon BYCHKOVA et coll. ΔH° et ΔS° diminuent lorsqu'on ajoute du dioxanne. La stabilisation serait donc d'origine enthalpique puisque le terme entropique varie dans un sens défavorable.

Si on examine la variation de ΔG° avec la composition en dioxanne, à température ambiante on constate qu'elle est perturbée au delà de 25 % par la proximité de la précipitation (voir figure IV-9). C'est pourquoi nous avons mesuré les valeurs de ΔG° en fonction de la température (entre 3 et 55°C) pour les mélanges à 10, 20 et 30 % en dioxanne.

Les valeurs obtenues sont représentées sur la figure IV-18.

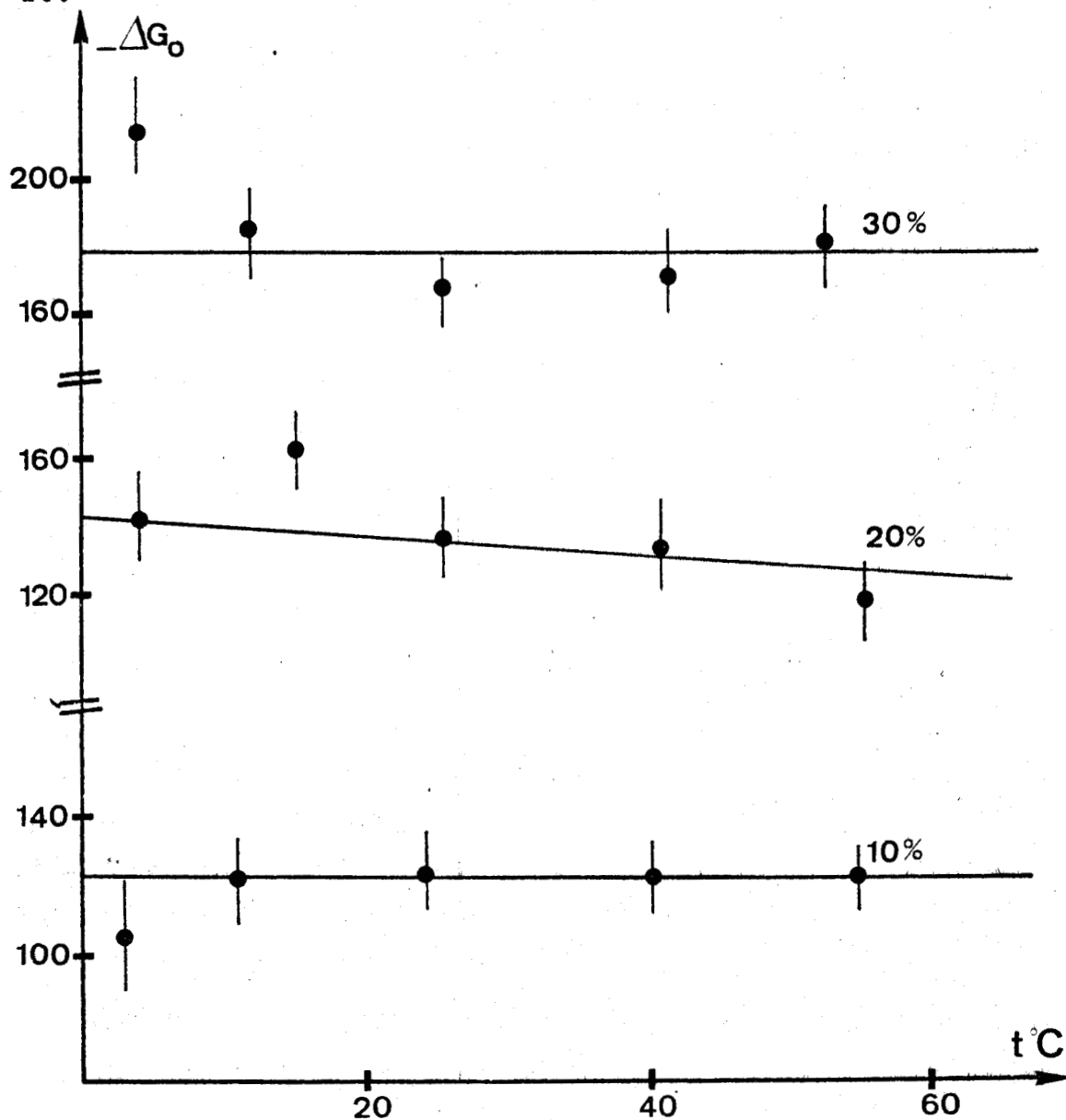


Figure IV-18. Variation de ΔG° avec la température pour différentes compositions du mélange NaCl 0,2 M/Dioxanne.

La pente et l'ordonnée à l'origine de cette courbe $\Delta G^\circ = f(t^\circ)$ permettra de déterminer ΔS° et ΔH° . Ces valeurs sont présentées dans le tableau IV-6.

	% Dioxanne				% ethanol ^{b)}		
	0 ^{a)}	10	20	30	10	20	27
ΔG° 25°C	- 107	- 124	- 137	- 164	- 148	- 204	- 240
ΔH°	- 1200	- 124	- 200	- 180	- 398	- 204	- 240
ΔS°	- 3,3	0	- 0,3	~ 0	- 0,84	0	0

a) nous avons choisi comme référence les valeurs de CIFERRI et coll. ⁽²⁸⁾ car elles correspondent à nos propres valeurs expérimentales en ce qui concerne la valeur de ΔG° à 25°C.

b) résultats de CONIO et PATRONE ⁽¹⁵⁾

Tableau IV-6. Paramètres thermodynamiques de la transition chaîne-hélice du PLGA dans différents mélanges eau-solvant organique.

Entre 0 et 10 % de dioxanne l'enthalpie ΔH° augmente tandis que l'entropie ΔS° augmente également et devient pratiquement nulle. Ces valeurs sont ensuite pratiquement constantes jusqu'à 30 % de dioxanne. Dans ces conditions la variation du terme enthalpique est défavorable tandis que la variation du terme entropique est favorable à la stabilisation de l'hélice. Celle-ci a donc surtout une origine entropique.

Un tel résultat est tout à fait opposé aux conclusions tirées par BYCHKOVA et coll.

Par contre les résultats obtenus par CONIO et PATRONE pour les mélanges KCl 0,1 M/éthanol conduisent également à attribuer à la stabilisation de l'hélice α une origine entropique, donc en accord avec nos propres résultats.

BYCHKOVA et coll. ont discuté l'origine de la différence entre leurs résultats et ceux de CONIO et PATRONE. Selon eux cette différence provient du choix de la valeur de pK_0 et de l'utilisation par CONIO et PATRONE d'extrapolations linéaires. BYCHKOVA et coll. utilisent comme valeur de pK_0 pour un

mélange donné celle de l'acide acétique dans le mélange correspondant et extrapolent ensuite la courbe expérimentale à cette valeur. Dans notre cas les courbes ont été extrapolées sans préjuger de la valeur de pK_0 . Cependant les valeurs utilisées par BYCHKOVA et coll. ($pK_0 = 4,95$ pour le mélange à 25 % de dioxanne : $\epsilon = 57,6$ et $pK_0 = 5,20$ pour le mélange à 33 % de dioxanne : $\epsilon = 51,5$) sont en bon accord avec nos valeurs expérimentales. Dans la plupart des cas nos valeurs de pK_0 sont pourtant obtenues par extrapolation linéaire.

Une fois obtenue la valeur de pK_0 par extrapolation de la partie "hélice", l'énergie de transition (c'est-à-dire la surface comprise entre la courbe expérimentale et les courbes extrapolées) ne dépend plus que de cette valeur de pK_0 et de l'allure de la partie "chaîne" de la courbe de titration.

La valeur de ΔG^0 repose donc sur le choix de pK_0 qui est le même dans les deux cas. Les différences observées ont donc une autre origine. Au delà de 33 % de dioxanne dans NaCl 0,2 M, le PLGA précipite. Il est donc possible que les mesures de ΔG^0 à cette composition soient perturbées par la précipitation même si celle-ci n'est pas visible à l'oeil nu.

Il faut d'ailleurs remarquer que dans ces conditions de solvant, un abaissement de température favorise la précipitation. Si un équilibre entre la solution et le précipité existe, l'énergie de transition mesurée correspond non plus à un mais à deux équilibres. Dans ces conditions le tracé d'une courbe commune pour les mélanges à 25 % et 33 % de dioxanne n'est pas justifié.

C - AUTRES MELANGES NaCl 0,2 M/SOLVANT ORGANIQUE A TEMPERATURE AMBIANTE.

Nous avons vu qu'il est possible d'exprimer le pouvoir stabilisant des solvants organiques vis-à-vis de l'hélice α en définissant un incrément d'énergie libre par mole de méthylène dans le solvant $\Delta(\Delta G^0)/mm$. Dans la série homologuée des alcools cet incrément est constant (donc indépendant du type d'alcool) et égal à - 13 cal/mm⁽¹⁶⁾. Dans le cas du dioxanne la valeur

correspondante est de -3 cal/mm. . Le pouvoir stabilisant du dioxanne est donc moins élevé que celui des alcools.

Nous avons mesuré l'énergie libre de transition du PLGA en fonction de la composition du solvant pour des mélanges de NaCl 0,2 M avec l'acétone, la méthyl éthyl cétone et le 2 - chloroéthanol. Les valeurs de ΔF° obtenues sont représentées sur la figure IV-19 en fonction du pourcentage en volume de solvant organique.

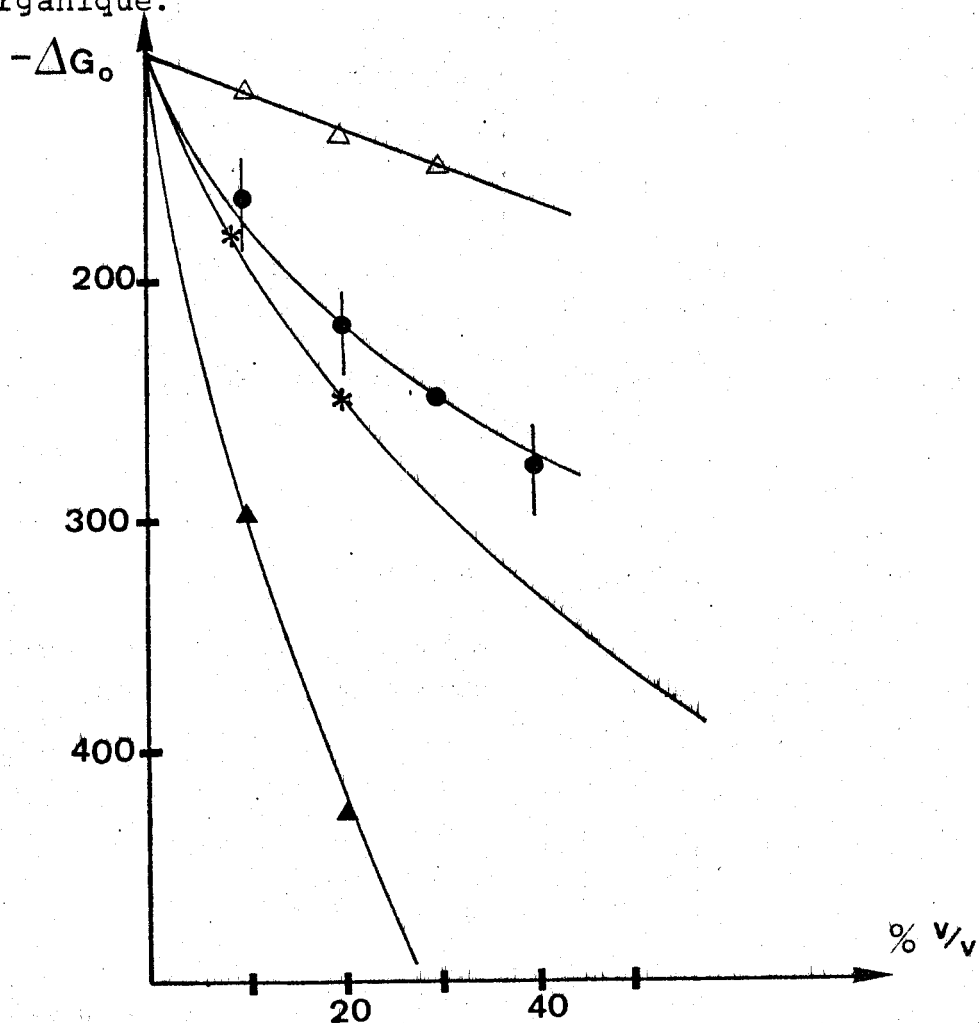


Figure IV-19. Variation de ΔF° avec la composition du solvant :
 Δ NaCl 0,2 M/Dioxanne ; ● NaCl 0,2 M/Acétone ;
 * NaCl 0,2 M/méthyléthylcétone ;
 ▲ NaCl 0,2 M/chloroéthanol.

On observe un pouvoir stabilisant croissant lorsqu'on passe de l'acétone à la méthyléthylcétone et au 2 chloroéthanol. Cet effet apparaît également si on trace ΔF° en fonction de la constante diélectrique ϵ . (Figure IV-20).

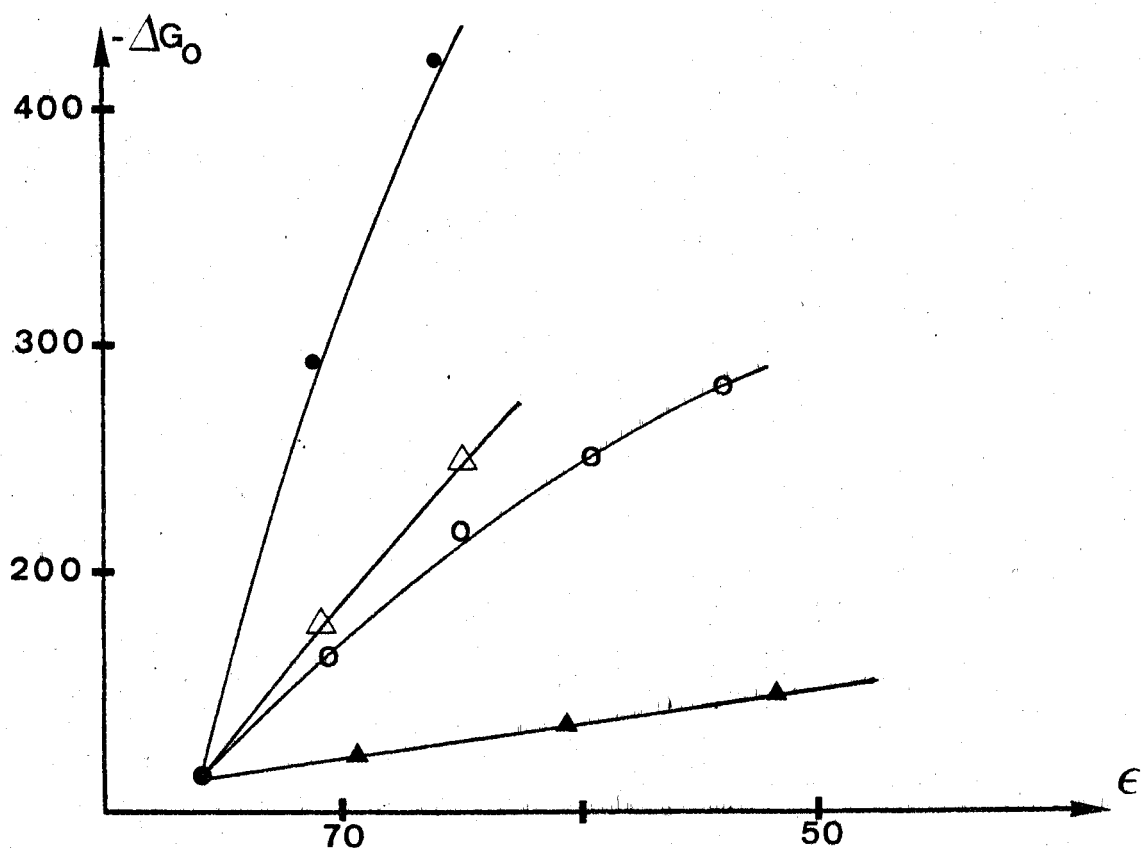


Figure IV-20. Variation de ΔF° avec la constante diélectrique ϵ :
 ▲ NaCl 0,2 M/Dioxanne ; ○ NaCl 0,2 M/Acétone ;
 △ NaCl 0,2 M/Méthyléthylcétone ;
 ● NaCl 0,2 M/Chloroéthanol.

Les valeurs expérimentales permettent de calculer pour chaque solvant organique l'incrément d'énergie libre par mole de méthylène $\Delta(\Delta F^{\circ})/\text{mm}$ (Tableau IV-7).

Type de solvant	$\Delta(\Delta F^{\circ})/\text{mm}$
NaCl 0,2 M/Dioxanne	- 3 cal.
KCl 0,1 M/Ethanol ^{a)}	- 13 cal.
NaCl 0,2 M/Acétone	- 17 cal.
NaCl 0,2 M/Méthyléthylcétone	- 32 cal.
NaCl 0,2 M/2 Chloroéthanol	- 53 cal.
H ₂ O/t. Butanol ^{b)}	- 57 cal.

a) G. CONIO E. PATRONE S. BRIGHETTI (16)

b) P.L. DUBIN (14)

Tableau IV-7. Valeurs de l'incrément d'énergie libre de transition pour le PLGA dans différents mélanges.

Ces résultats appellent deux remarques :

- tout d'abord on n'observe pas pour les deux types de cétones étudiés une valeur commune de $\Delta(\Delta G^{\circ})/\text{mm}$ comme c'est le cas pour la série méthanol-éthanol-propanol-butanol. (la méthyl éthyl cétone a un pouvoir stabilisant plus important que l'acétone). On peut attribuer ceci au fait que les quatre alcools envisagés sont primaires et linéaires tandis que les deux cétones ne peuvent pas être considérées comme exactement homologues. Ceci est confirmé par le fait que la valeur de $\Delta(\Delta G^{\circ})/\text{mm}$ pour le mélange eau t-Butanol est beaucoup plus importante que la valeur correspondante obtenue avec l'alcool isomère n butanol (- 57 cal/mm contre - 13 cal/mm).

- Le 2 chloroéthanol a pour constante diélectrique 25,8 ce qui est très voisin de la constante diélectrique de l'éthanol ($\epsilon = 24,3$). Il devrait donc avoir un effet analogue sur l'énergie de transition. Ce n'est visiblement pas le cas comme le montrent les courbes de la figure IV-20 et les valeurs de $\Delta(\Delta G^{\circ})/\text{mm}$.

Ceci confirme que la constante diélectrique ne suffit à expliquer les variations de ΔG° que dans le cas d'une série de composés organiques homologues. A constante diélectrique égale un changement dans la nature ou la géométrie de la molécule de solvant provoque d'importantes variations de ΔG° .

Cela laisse entrevoir le rôle important joué par la solvatation du polymère sous ses différentes conformations ce qui pourrait justifier l'importance du terme entropique dans l'expression de ΔG° .

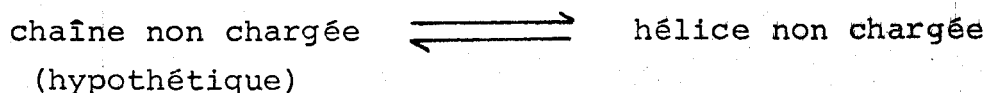
D - TRANSITION INDUITE PAR LE SOLVANT

Les résultats obtenus ci dessus concernent la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le pH dans différents mélanges eau - solvant organique. L'énergie libre ΔG° mesurée dans ces conditions correspond à la transition chaîne non chargée \rightleftharpoons hélice non chargée.

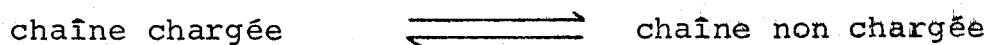
La transition chaîne hélice peut également être induite par le solvant, à pH constant en augmentant la proportion de solvant organique dans la solution en absence de sel (voir chapitre III). On a alors une transition entre la chaîne chargée et l'hélice partiellement chargée associée à ses contre-ions.

Dans le cas de l'échantillon utilisé pour les mesures potentiométriques ($\overline{M}_w = 27\ 000$) cette transition a lieu pour 40 % de dioxanne. La figure IV-21 montre la variation de l'ellipticité à 222 nm $[\theta]_{222}$ et de l'énergie libre de transition ΔG° avec la composition en dioxanne pour cet échantillon. On constate qu'une variation importante de ΔG° accompagne la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le solvant entre 30 et 50 % de dioxanne.

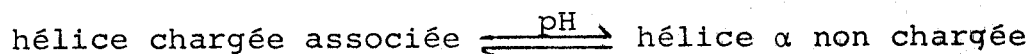
Avant 30 % en dioxanne la structure qui est présente en milieu basique est une chaîne chargée. Lorsqu'on abaisse le pH on passe progressivement à l'hélice α non chargée. Nous avons vu qu'il est possible, à partir de la courbe de titration modifiée, de déterminer l'énergie libre ΔG° de transition. Cependant cette valeur de ΔG° correspond à la transition entre conformères non chargés c'est-à-dire à la transition :



L'énergie libre mesurée ΔG° ne tient pas compte du terme d'énergie électrostatique correspondant à la transformation :



Au-delà de 40 % en dioxanne la structure présente en milieu basique est une hélice partiellement chargée avec une association importante des contre-ions due à la diminution de la constante diélectrique. L'abaissement du pH entraîne la formation de l'hélice α non chargée :



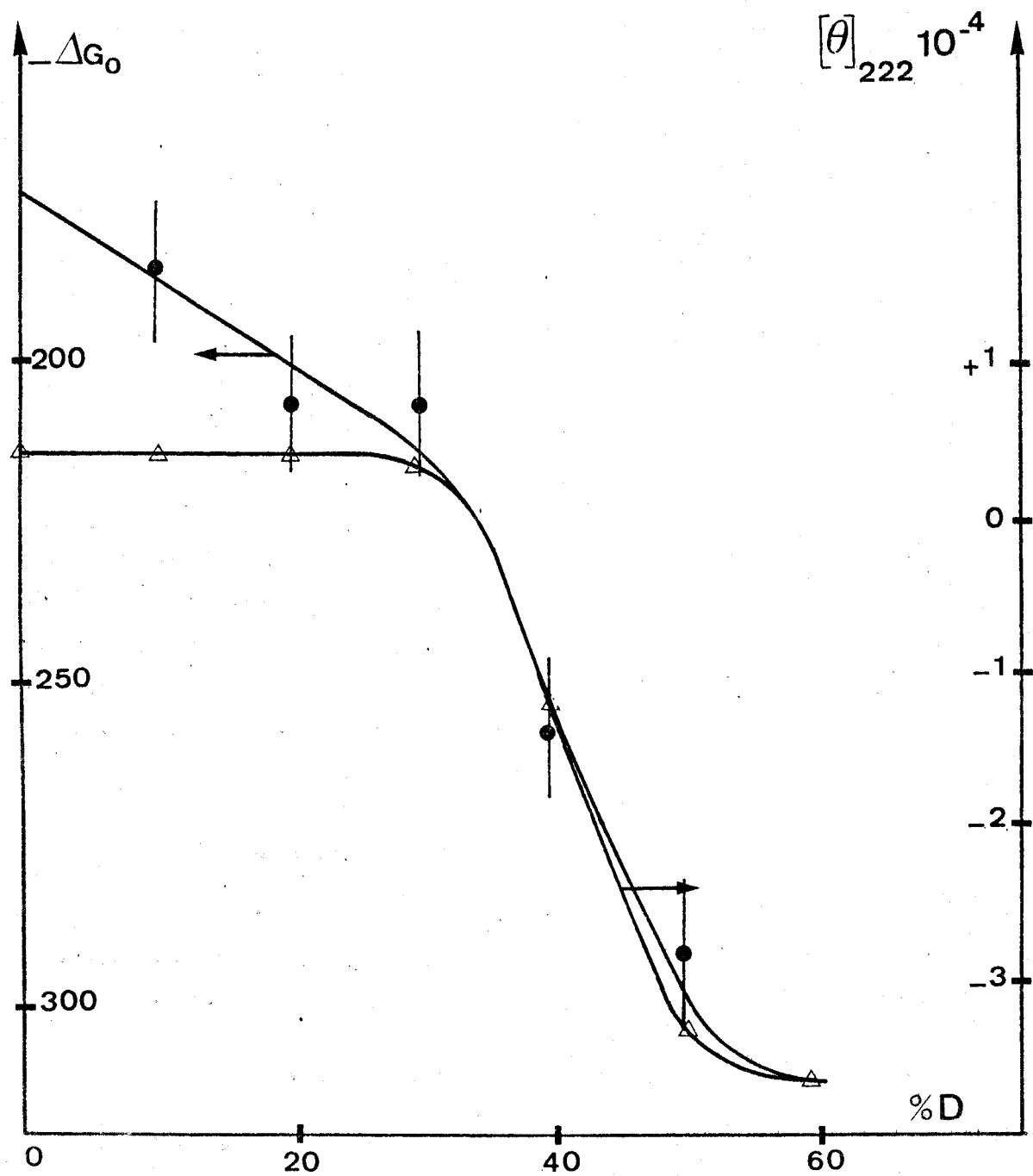
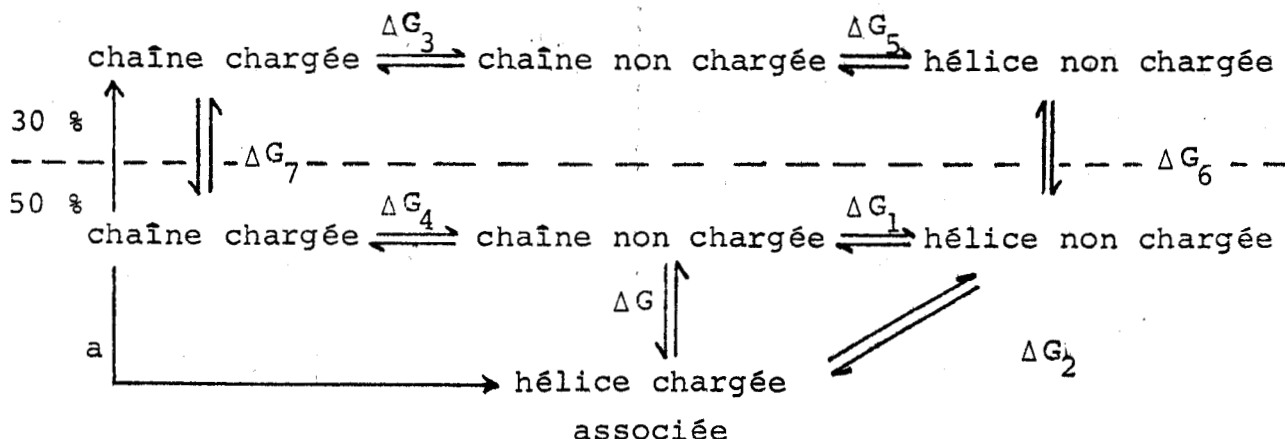


Figure IV-21. Variation de ΔG° et de $[\theta]_{222}$ en fonction de la teneur en dioxanne. Echantillon de PLGA de masse $\overline{M}_w = 27\ 000$.

Le schéma ci dessous représente le cycle donnant les différents états de la molécule.



ΔG_3 et ΔG_4 sont des termes purement électrostatiques correspondant à la charge de la chaîne en milieu pauvre et riche en dioxanne.

ΔG_5 et ΔG_1 sont les énergies de transition entre chaîne non chargée et hélice non chargée en milieu pauvre et riche en dioxanne. ΔG_1 est l'énergie qui serait mesurée s'il n'y avait pas de transition induite par le solvant.

ΔG_2 est l'énergie libre de transition entre l'hélice chargée associée présente en milieu basique riche en dioxanne et l'hélice non chargée en milieu riche en dioxanne.

La variation d'énergie observée sur la figure IV-21 correspond à la différence $\Delta G = \Delta G_1 - \Delta G_2$ et à la transition chaîne non chargée - hélice chargée associée en milieu riche en dioxanne.

Dans la pratique, lors de la transition induite par le dioxanne on passe de la chaîne chargée en milieu pauvre en dioxanne à l'hélice chargée associée en milieu riche en dioxanne (étape a). Pour passer de la valeur ΔG mesurée à l'énergie réelle mise en jeu dans l'étape a, il faudrait faire intervenir l'énergie ΔG_4 qui est l'énergie électrostatique nécessaire pour charger la chaîne ainsi que l'énergie ΔG_7 qui correspond à la différence de solvatation de la chaîne dans les deux milieux.

CONCLUSION

L'étude potentiométrique nous a montré que l'hélice α est stabilisée par rapport à la conformation désordonnée lorsqu'on ajoute à la solution un solvant organique. L'étude en fonction de la température montre que la variation d'enthalpie est défavorable tandis que la variation d'entropie est favorable à la stabilisation de l'hélice. Si on suppose que l'entropie de l'hélice varie peu lorsque l'on passe de l'eau au mélange eau - dioxanne, les résultats expérimentaux indiquent que l'entropie de la conformation désordonnée doit être plus grande dans l'eau que dans le mélange eau-dioxanne. Cela peut paraître curieux si l'on considère l'étude viscosimétrique qui montre que la conformation désordonnée est moins rigide dans le mélange de solvants. Il faut cependant remarquer que les paramètres thermodynamiques déterminés ci dessus correspondent à une transition entre conformères non chargés et ne tiennent pas compte des effets électrostatiques qui ont un effet prépondérant sur la conformation du polymère.

CHAPITRE V

ETUDE DE LA SOLVATATION

SOLVATATION PRÉFÉRENTIELLE

DEFINITION

Lorsqu'une macromolécule est dissoute dans un solvant donné, la conformation qu'elle adopte dépend de la nature et de la force des interactions soluté-solvant. Ces interactions peuvent être décrites à l'aide du paramètre χ_{12} introduit par FLORY et HUGGINS^(1a). On distingue les bons solvants pour lesquels χ_{12} prend des valeurs faibles ou négatives et les mauvais solvants pour lesquels χ_{12} est voisin de 0,5 (solvant thêta). En solution dans un bon solvant le polymère adopte une conformation déployée qui favorise les interactions polymère - solvant. Dans un mauvais solvant au contraire, les molécules de polymères se ramassent sur elles mêmes pour limiter les interactions avec le solvant. On a alors affaire à une conformation beaucoup plus compacte dans laquelle les interactions polymère - polymère sont favorisées aux dépens des interactions polymère solvant. Cet effet conformationnel est défini par un coefficient d'expansion moléculaire α qui caractérise l'influence du solvant sur la géométrie des chaînes.

Dans le cas de solutions diluées α est exprimé en fonction de χ_{12} par la relation (1b) :

$$\alpha^5 - \alpha^3 = 2 C (0,5 - \chi_{12}) M^{1/2} \quad (V-1)$$

dans laquelle C est une constante et M la masse moléculaire du polymère.

Dans le cas où χ_{12} est inférieur à 0,5, l'expansion du polymère augmente avec sa masse moléculaire.

Pour un polymère de masse donnée α augmente avec la qualité du solvant (c'est-à-dire avec la diminution de χ_{12}).

Si le polymère est dissous indépendamment dans deux solvants qui présentent des affinités différentes pour le soluté, c'est-à-dire deux valeurs différentes χ_{12}^1 et χ_{12}^2 du paramètre d'interaction, on peut mesurer deux valeurs α_1 et α_2 du coefficient d'expansion. Si le polymère est dissous dans un mélange de composition déterminée des deux solvants ci-dessus le coefficient d'expansion α obtenu ne peut être calculé de manière simple à partir de α_1 , α_2 et de la composition du mélange de solvants.

Ce phénomène est dû au fait que la macromolécule a une affinité plus grande pour l'un des deux solvants constituant le mélange. Par conséquent la couche de solvatation qui se trouve au voisinage d'une macromolécule a une composition différente de la composition globale du mélange des deux solvants. Ce phénomène porte le nom de solvatation préférentielle. Le coefficient d'expansion α de la macromolécule en solution dans un mélange de solvant dépend évidemment de la composition de la couche de solvatation, donc de l'adsorption préférentielle de l'un des deux solvants constituant le mélange.

Il faut préciser ici ce qu'on entend par mélange de solvants. C'est un mélange de deux constituants liquides de bas poids moléculaire; miscibles entre eux, qui se comporte comme solvant vis-à-vis du polymère.

Ce mélange peut être constitué par deux solvants du polymère, par un solvant et un précipitant, ou même parfois par deux précipitants dont le mélange peut être solvant du polymère.

Selon SHULTZ et FLORY ⁽²⁾ l'expression du coefficient d'expansion moléculaire d'un polymère dans un mélange de solvants est une expression de la forme :

$$\alpha^5 - \alpha^3 = 2 C M^{1/2} Y(\phi_1) \quad (V-2)$$

Cette expression est formellement analogue à la relation (V-1). Cependant $Y(\phi_1)$ est une expression complexe qui fait intervenir :

ϕ_1 la fraction en volume du solvant 1

V_1 et V_2 les volumes molaires des deux solvants

χ_{12} , χ_{13} et χ_{23} qui sont les paramètres d'interactions solvant 1 - solvant 2, solvant 1 - polymère et solvant 2 - polymère.

SHULTZ et FLORY (2) ainsi que COWIE et BYWATER (3) ont déterminé expérimentalement les valeurs du coefficient d'expansion moléculaire α pour des systèmes tels que :

polystyrène - tétrachlorure de carbone - cyclohexane
ou polystyrène - benzène-isopropanol.

La comparaison des résultats obtenus montre que la théorie décrit assez bien la solvation préférentielle des solutés macromoléculaires lorsque les systèmes sont peu polaires. Par contre des écarts importants sont observés lorsque les systèmes envisagés présentent de fortes interactions moléculaires. Le système acide polyglutamique eau-dioxanne est un de ces systèmes où les interactions peuvent être importantes.

Dans tous les cas il reste vrai que le coefficient d'expansion moléculaire est d'autant plus grand que le solvant est bon solvant. Le paramètre d'interaction χ déterminé expérimentalement dépend de chaque paramètre d'interaction χ_{ij} ainsi que du degré de solvation préférentielle.

DIFFERENTES METHODES PHYSICO-CHIMIQUES

PERMETTANT LA DETERMINATION DE LA SOLVATION PREFERENTIELLE

Les principales méthodes utilisées pour la détermination de la solvation préférentielle sont la diffusion de la lumière, la réfractométrie différentielle avant et après équilibre de dialyse, les mesures de densité, l'ultracentrifugation,

la spectroscopie infra rouge, l'inhibition de fluorescence et la résonance magnétique nucléaire.

Nous donnerons rapidement le principe de ces différentes méthodes pour décrire ensuite de manière approfondie la réfractométrie différentielle que nous avons utilisée dans le cas du système acide polyglutamique - eau - dioxanne.

A - LA DIFFUSION DE LA LUMIERE.

Pour une solution de concentration C, d'un polymère de masse moléculaire moyenne en poids \overline{M}_w , on peut écrire la relation :

$$\frac{KC}{R} = \frac{1}{\overline{M}_w} + 2 A_2 C + 3 A_3 C^2 + \dots \quad (V-3)$$

où

$$K = \frac{2 \pi^2 n^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$$

n indice de réfraction du solvant

N_A nombre d'AVOGADRO

λ longueur d'onde de la lumière dans le vide

$\frac{dn}{dc}$ incrément d'indice de réfraction

R rapport de RAYLEIGH de la solution

(extrapolé si nécessaire à angle nul)

$A_2, A_3 \dots$ sont les deuxième et troisième coefficients du viriel.

Lorsqu'on envisage la diffusion de lumière par un polymère en solution dans un mélange binaire, on constate généralement que la masse moléculaire dépend à la fois de la nature et de la composition du solvant.

Ceci provient de la solvatation préférentielle et en particulier du fait que la valeur moyenne de l'incrément $\frac{dn}{dc}$ de

la solution est différente de sa valeur au voisinage immédiat du polymère.

L'analyse théorique de ce phénomène a été faite par EWART, ROE, DEBYE et Mc CARTNEY ⁽⁴⁾ par KIRKWOOD et GOLDBERG ⁽⁵⁾ par STOCKMAYER ⁽⁶⁾ ainsi que par STRAZIELLE et BENOIT ⁽⁷⁾

Ces théories proposent d'exprimer la quantité $\frac{dn}{dc}$ en tenant compte de la solvatation préférentielle. EWART et coll. ⁽⁴⁾ proposent une relation qu'on peut écrire :

$$R = \frac{2 \pi^2 n_{12}^2}{\lambda^4 N_A} \left[\frac{dn}{dc} + \gamma_1 \frac{dn_{12}}{d\phi_1} \right]^2 \text{ M.C.} \quad (\text{V-4})$$

n_{12} est l'indice du mélange de solvants

$\frac{dn_{12}}{d\phi_1}$ est la variation de cet indice avec la composition du mélange en solvant 1 (exprimée en fraction en volume)

γ_1 est le coefficient de solvatation préférentielle du solvant 1 défini par :

$$\gamma_1 = - \frac{d\phi_1}{dc} \quad (\text{V-5})$$

STRAZIELLE et BENOIT ⁽⁷⁾ quant à eux proposent la relation :

$$R = \frac{2 \pi^2 n_{12}^2}{\lambda^4 N_A} \left[\frac{dn}{dc} + \frac{x_1}{M_3} N_A \frac{dn_{12}}{dv_1} \right]^2 \text{ M.C.} \quad (\text{V-6})$$

où v_1 est le nombre de molécules de solvant 1 par unité de volume.

x_1 est le nombre de molécules de solvant 1 en excès absolu par macromolécule. C'est la différence entre le nombre N'_1 de moles de solvant 1 adsorbé préférentiellement par chaque chaîne et le nombre de moles N_1 de solvant dans le même volume en l'absence de solvatation préférentielle.

En d'autres termes la mesure fournit une masse apparente $\bar{M}_{app.}$ liée à la masse vraie \bar{M} par la relation :

$$\bar{M}_{app.} = \bar{M} \left[1 + \frac{x_1}{M} N_A \frac{dn_{12}/dv_1}{dn/dc} \right]^2 \quad (V-7)$$

ou encore

$$\bar{M}_{app.} = \bar{M} \left[1 + x_1 \frac{V_1}{M} \frac{dn_{12}/d\phi_1}{dn/dc} \right]^2 \quad (V-8)$$

On peut alors déterminer x_1 par mesure de la masse apparente si l'on connaît la masse vraie ainsi que l'incrément d'indice de réfraction de la solution $\frac{dn}{dc}$ et celui du mélange de solvants purs $dn_{12}/d\phi_1$.

Il faut remarquer que la valeur de x_1 ne peut être déterminée avec une précision satisfaisante que si le second terme entre parenthèses (équation V-8) n'est pas trop petit devant 1. Il faut donc que le facteur $dn_{12}/d\phi_1$ ne soit pas trop faible. Dans la pratique la différence d'indice entre les deux solvants purs doit être au moins égale à 0,1.

Les principales déterminations expérimentales de la solvatation préférentielle par diffusion de lumière ont été faites sur des polymères vinyliques et surtout sur le polystyrène.

Celui-ci a été étudié dans des mélanges benzène-cyclohexane (7,8), benzène-heptane (3), benzène-alcool (3,4). Dans tous les cas, le bon solvant c'est-à-dire le benzène est solvato préférentiellement même dans des mélanges peu concentrés en benzène.

Des systèmes plus polaires ont également été étudiés. Citons le système polyméthacrylate d'éthylène glycol - propanol - eau (9) ou polyoxyéthylène - tétrachlorure de carbone - méthanol (10). On observe alors, pour une certaine composition du solvant, une inversion de l'adsorption préférentielle. C'est le cas en particulier pour le premier des exemples cités. Lorsqu'on augmente la proportion de propanol, on observe d'abord

une solvation préférentielle par le propanol puis vers $\phi_1 = 0,5$ l'adsorption est inversée et on observe une hydratation préférentielle pour les teneurs élevées en alcool.

Pour ce qui est du mélange eau - dioxanne il n'existe à notre connaissance que l'étude du polyméthacrylate de méthyle⁽⁹⁾ et de la polyvinylpyrrolidone⁽¹¹⁾. Dans ce dernier cas le domaine d'étude est limité à 50 % de dioxanne pour des raisons de solubilité.

Entre 0 et 50 % de dioxanne on observe une adsorption préférentielle de dioxanne (Figure V-1).

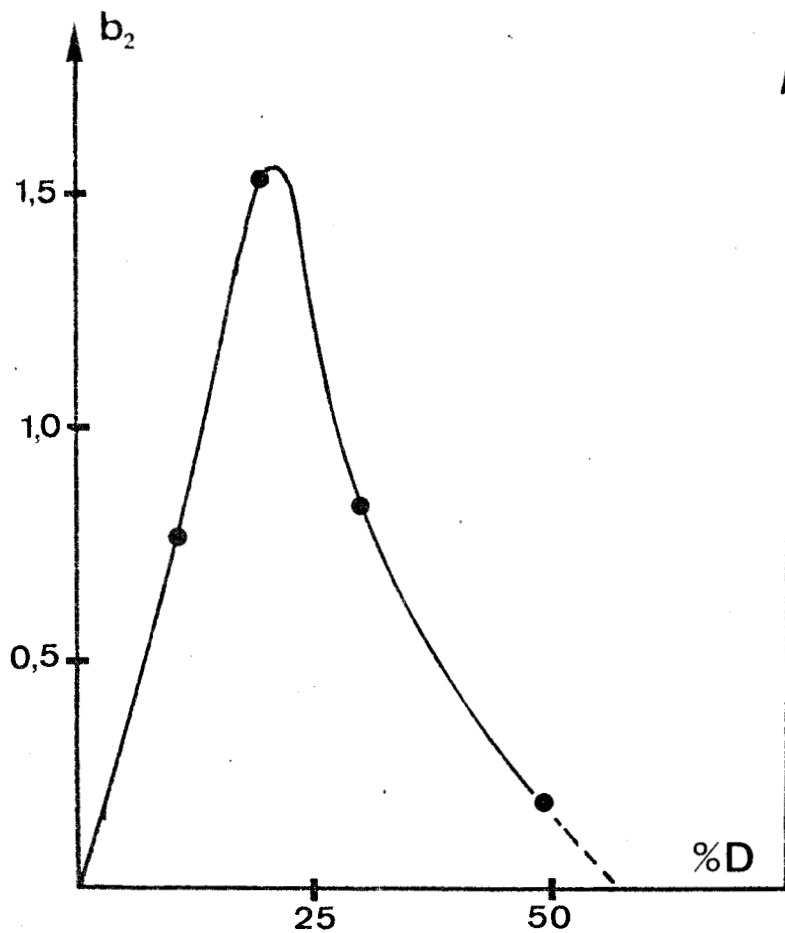


Figure V-1. Variation du coefficient de solvation préférentielle b_2 pour le système polyvinylpyrrolidone-eau-dioxanne⁽¹¹⁾.

Ce solvant est pourtant un mauvais solvant de la polyvinylpyrrolidone. Dans le cas du polyméthacrylate de méthyle on observe également une solvation préférentielle par le dioxanne qui est cette fois un bon solvant du polymère.

Sur la figure V-1 le paramètre de solvation préférentielle est exprimé par b_2 , nombre de molécules de solvant 2 (dioxanne) en excès absolu par motif monomère (11).

b_2 est relié à x_2 (voir relation V-6) par :

$$b_2 = \frac{x_2}{M} m = m \frac{\gamma_2}{V_2} \quad (V-9)$$

où m est la masse de l'unité monomère et V_2 le volume molaire du solvant 2 (dioxanne).

Une adsorption préférentielle du moins bon solvant dans un mélange riche en bon solvant a été également observée par MOLDOVAN et STRAZIELLE (10) pour le système polyoxyéthylène-tétrachlorure de carbone - méthanol.

Dans le domaine des polypeptides, on peut citer l'étude de la solvation préférentielle du polyglutamate de benzyle dans les mélanges chloroforme - acide dichloracétique par STRAZIELLE, DUFOUR et MARCHAL (12).

B - LES EQUILIBRES DE DIALYSE.

Le phénomène de dialyse entre une solution ternaire polymère-solvant 1 - solvant 2 et le mélange binaire de solvants de même composition, est à la base d'une seconde méthode pour atteindre les coefficients de solvation préférentielle.

Dans la relation V-6 la valeur de $\frac{dn}{dc}$ est déterminée à fraction volumique constante du solvant 1 et nous le noterons $(\frac{dn}{dc})_{\phi_1}$. CASSASSA et EISENBERG (13) ont montré que par équilibre de dialyse (c'est-à-dire après égalisation des potentiels chimiques des deux solvants dans les deux phases) l'expression du rapport de RAYLEIGH ne contient plus le terme de solvation

préférentielle. L'incrément d'indice de réfraction déterminé dans ces conditions noté $(\frac{dn}{dc})_{\mu}$, est différent de $(\frac{dn}{dc})_{\phi_1}$.

Le coefficient de solvatation préférentielle $\gamma_1 = - \frac{d\phi_1}{dc}$ s'écrit :

$$\gamma_1 = \frac{(\frac{dn}{dc})_{\mu} - (\frac{dn}{dc})_{\phi_1}}{(\frac{dn}{d\phi_1})} \quad (V-10)$$

et peut être obtenu par la mesure de trois incréments d'indice de réfraction.

Les résultats obtenus par cette méthode sont généralement en bon accord avec ceux fournis par les mesures de diffusion de lumière.

C - AUTRES METHODES

1 - Mesures de densité

Les variations de composition du mélange de solvant après dialyse peuvent également être détectées par des mesures de densité. La différence entre le volume spécifique partiel du polymère \bar{v} avant dialyse et \bar{v}_a après dialyse peut être reliée au coefficient de solvatation préférentielle par la relation

$$\gamma = \frac{(\bar{v} - \bar{v}_a) u_2 \bar{v}_1}{(v_0 - \bar{v}_1)} \quad (V-11)$$

où u_2 est la fraction en volume du solvant 2

\bar{v}_1 est le volume spécifique partiel du solvant 1

v_0 est le volume spécifique du solvant binaire.

2 - L'ultracentrifugation

La constante de sédimentation du soluté dans une solution macromoléculaire est donnée par :

$$S = (1 - \rho \bar{v}_3) \frac{\bar{M}}{\epsilon N_A} \quad (V-12)$$

ϵ est le coefficient de frottement de translation

ρ est la densité du solvant

\bar{v}_3 est le volume spécifique partiel du polymère

Dans un mélange de solvants la relation (V-12) devient :

$$s^* = (1 - \rho_{12} \bar{v}_{3,app}) \frac{\bar{M}_{app}}{\epsilon N_A} \quad (V-13)$$

où $\bar{v}_{3,app}$ et \bar{M}_{app} sont le volume spécifique partiel et la masse apparente du soluté.

On a alors
$$\bar{M}_{app} = \bar{M} \left(1 + \gamma \frac{M_1}{\bar{M}} \right) \quad (V-14)$$

$$\bar{v}_{3,app} = \frac{v_3 \bar{M} + \gamma v_1 M_1}{\bar{M} + \gamma M_1} \quad (V-15)$$

où v_1 et M_1 sont le volume spécifique et la masse molaire du solvant 1.

En couplant les mesures de sédimentation et les mesures de viscosité on peut déterminer le coefficient de solvation préférentielle ⁽¹⁴⁾.

3 - Méthodes spectroscopiques.

a - La spectroscopie infra-rouge a été utilisée pour mettre en évidence des interactions spécifiques entre l'un des solvants

et un groupe fonctionnel dans un polymère (par exemple des liaisons hydrogènes). On observe alors un déplacement des fréquences des bandes d'absorption qui est dû à la formation de complexe du type 1-1 ou 1-2 entre le polymère et l'un des solvants (15).

b - La résonance magnétique nucléaire

On mesure le temps de relaxation spin-réseau des protons d'un des deux solvants. Ce temps de relaxation dépend de la présence du polymère, du deuxième solvant et de la composition du solvant au voisinage de la macromolécule (16).

c - L'inhibition de fluorescence

Si on met en solution un polymère porteur d'un groupe fluorescent dans un mélange de solvants dont l'un inhibe la fluorescence, la mesure de cette inhibition fournit des informations sur la composition du solvant au voisinage du groupe fluorescent (17).

SOLVATATION PREFERENTIELLE ET CONFORMATION DES POLYPEPTIDES

Dans la plupart des cas les polymères qui ont fait l'objet d'études de solvatisation préférentielle sont des polymères vinyliques. Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement aux polypeptides et aux protéines. Dans ce cas le principe de la détermination la solvatisation préférentielle par diffusion de lumière ou mesures d'incrément d'indice reste valable. Cependant le problème devient un peu plus complexe en raison de l'aptitude des polypeptides à subir des transitions conformationnelles. Dans le cas des polymères vinyliques, le polymère prend en solution une conformation plus ou moins déployée selon la qualité du solvant. Cependant toutes ces conformations peuvent être classées comme conformation désordonnée tant que les polymères étudiés sont atactiques. Dans le cas des

polypeptides et des protéines, il existe des conformations organisées parfaitement définies en particulier l'hélice α . Dans ces conditions l'affinité de l'un ou l'autre des solvants qui constituent le mélange, vis-à-vis du polymère, pourra être très différente selon la conformation adoptée par celui-ci. On peut donc s'attendre à observer de manière plus fréquente des phénomènes d'inversion de la solvation préférentielle accompagnant la transition conformationnelle.

Examinons de plus près le système acide polyglutamique - eau - dioxanne. En solution aqueuse le polymère est soluble sous ses deux formes, forme ionisée en milieu basique (conformation désordonnée) et forme non ionisée en milieu acide (conformation hélicoïdale). En milieu très acide, le PLGA subit des phénomènes d'agrégation et de précipitation. Nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales où ces phénomènes sont négligeables et nous ne considérerons que des hélices α isolées solubles. On peut donc dire que l'eau est un bon solvant du polymère sous ses deux formes.

Il faut noter cependant que le polymère n'est pas directement soluble sous la forme acide. On ne peut obtenir celle-ci que par abaissement du pH d'une solution de la forme sel ou par passage sur une résine échangeuse d'ions. Dans le mélange eau - dioxanne en milieu acide, la forme hélice est soluble. Nous avons vu que l'addition de dioxanne stabilise la conformation hélicoïdale. En milieu basique, le problème est différent selon que l'on est ou non en présence de sel. En absence de sel, l'addition de dioxanne à la solution aqueuse provoque la transition vers l'hélice et le comportement du mélange est celui d'un bon solvant. En présence de sel, la transition chaîne hélice n'est pas observée lorsqu'on ajoute du dioxanne et l'on aboutit à la précipitation du polymère. L'addition de dioxanne diminue donc la solubilité du PLGA sous la forme chaîne. L'étude viscosimétrique le confirme, en effet la molécule prend une conformation de plus en plus compacte quand on ajoute du dioxanne.

Dans l'eau l'augmentation de la force ionique diminue également la qualité du solvant pour le PLGA sous forme ionisée (18). En résumé, on peut donc considérer l'eau comme bon solvant pour

les deux conformations. Par contre le mélange eau - dioxanne est un mauvais solvant de la forme chaîne et un bon solvant de l'hélice.

DETERMINATION DE LA SOLVATATION PREFERENTIELLE ET ABSOLUE
PAR REFRACTOMETRIE DIFFERENTIELLE.

Bien qu'elle ait permis de mettre en évidence la transition hélice chaîne de l'acide polyglutamique ⁽¹⁹⁾ et du polyglutamate de benzyle ⁽²⁰⁾, la réfractométrie différentielle a surtout été utilisée pour déterminer la solvatisation préférentielle de polypeptides et protéines en mélanges de solvants. En ce qui concerne les protéines, on peut citer INOUE et TIMASHEFF qui ont étudié par diffusion de lumière et réfractométrie différentielle des systèmes tels que β lactoglobuline/eau/2-chloroethanol²¹ ou lysosyme/eau/2-chloroethanol ⁽²²⁾. Ces auteurs ont également proposé une méthode de détermination de la solvatisation absolue par le solvant organique, et ont pu montrer que le changement de solvatisation absolue d'une protéine accompagne la transition conformationnelle ^(23,24).

Plus récemment une étude par réfractométrie différentielle et par résonance magnétique nucléaire, du système poly[N⁵ (3 hydroxypropyl) L glutamine] (PHPG) - eau - dioxanne a été publiée par INOUE et IZUMI ⁽²⁵⁾.

La solvatisation préférentielle de ce polypeptide en mélange eau - chloroethanol a également été étudiée par mesures de densité ⁽²⁶⁾.

Nous allons maintenant exposer la théorie de INOUE et TIMASHEFF que nous avons appliquée au cas du système PLGA - eau - dioxanne.

Théorie :

La solvatisation préférentielle peut être déterminée par comparaison de l'incrément d'indice de réfraction avant et après

dialyse c'est-à-dire avant et après redistribution des solvants à travers une membrane imperméable à la macromolécule.

Le terme solvatation préférentielle est pris ici dans son sens le plus large. Il signifie que dans le domaine immédiat près de la macromolécule, l'un des solvants est en excès par rapport à la composition du reste du mélange. La nature des interactions à l'origine de la solvatation préférentielle n'est pas précisée. Il peut s'agir aussi bien d'une simple affinité thermodynamique que d'une formation de complexes (par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes par exemple). Pour la précision de la méthode il est nécessaire que les deux solvants aient des indices de réfraction assez différents.

La notation utilisée dans la suite du texte sera la notation traditionnelle proposée par SCATCHARD⁽¹⁷⁾ et STOCKMAYER⁽¹⁶⁾ et largement utilisée dans la littérature. Le polymère est alors le composant 2, l'eau le composant 1 et le solvant organique le composant 3.

Dans le cas où la solution contient du sel, elle sera assimilée à un système à trois composants dans lequel le composant 1 est l'ensemble (eau + électrolyte).

Si on exprime la concentration en molalité, la solvatation préférentielle du composant 3 sur la macromolécule est mesurée directement par la différence entre l'incrément d'indice de réfraction mesuré à potentiel chimique constant μ_3 du composant 3 et à molalité constante m_3 de ce composant :

$$\left(\frac{\partial n}{\partial m_2}\right)_{T,P,\mu_3} = \left(\frac{\partial n}{\partial m_2}\right)_{T,P,m_3} + \left(\frac{\partial n}{\partial m_3}\right)_{T,P,m_2} \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{T,P,\mu_3} \quad (V-16)$$

n est l'indice de réfraction

m_i est la molalité du composant i (moles/1000 g du solvant principal 1) et μ_i son potentiel chimique

T est la température et P la pression.

Il est plus commode d'exprimer la concentration en grammes par millilitre de solution.

On obtient alors :

$$\frac{M_3}{M_2} \left[\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right]_o^{T,P,\mu_3} = \left[\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right]_o^{T,P,\mu_3} \quad (V-17)$$

$$= \frac{1}{1 - \bar{v}_3 C_3} \left[\left(\frac{\partial n}{\partial C_2} \right)_{T,P,\mu_3} - \left(\frac{\partial n}{\partial C_2} \right)_{T,P,m_3} \right] \frac{1}{\left(\frac{\partial n}{\partial C_3} \right)_{T,P,m_2}}$$

Ici M_i est le poids moléculaire du composant i , g_i la concentration en gramme du composant i par gramme du composant 1, \bar{v}_3 le volume spécifique partiel du composant 3 et C_i la concentration du composant i en grammes par millilitre de solution. L'indice o indique l'extrapolation à concentration nulle en polymère.

L'incrément d'indice de réfraction à molalité constante du composant 3 $\left(\frac{\partial n}{\partial C_2} \right)_{T,P,m_3}$ est mesuré sur les solutions de polymère en utilisant comme référence le solvant ayant la même molalité en composant 3. L'incrément d'indice à potentiel chimique constant du composant 3 $\left(\frac{\partial n}{\partial C_2} \right)_{T,P,\mu_3}$ a été mesuré sur la solution de polymère, en équilibre de dialyse avec son dialysat, par rapport au dialysat.

En réalité cette mesure donne $\left(\frac{\partial n}{\partial C_2} \right)_{T,\mu_1,\mu_3}$. La valeur de $\left(\frac{\partial n}{\partial C_2} \right)_{T,P,\mu_3}$ serait obtenue en effectuant les mesures sous une pression égale à la pression osmotique de la solution.

STIGTER (28) a montré que la différence entre $\left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)_{T,P,\mu_3}$ et $\left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)_{T,\mu_1,\mu_3}$ est négligeable. On peut donc assimiler avec une bonne approximation $\left(\frac{\partial n}{\partial C_2} \right)_{T,P,\mu_3}$ à $\left(\frac{\partial n}{\partial C_2} \right)_{T,\mu_1,\mu_3}$.

La solvation préférentielle $\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2} \right)_{T,\mu_1,\mu_3}$ ou $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T,\mu_1,\mu_3}$ est nulle quand la quantité de solvant 3 pour 1000 g ou par gramme d'eau est identique de chaque côté de la membrane à l'équilibre. Si on définit comme état de solvation nulle celui pour lequel la quantité de solvant 3 par millilitre

de solution est identique des deux côtés de la membrane, la solvation préférentielle est exprimée par :

$$\left(\frac{\partial C_3}{\partial C_2}\right)_{T, \mu_1, \mu_3} = \left[\left(\frac{\partial n}{\partial C_2}\right)_{T, \mu_1, \mu_3} - \left(\frac{\partial n}{\partial C_2}\right)_{T, P, C_3} \right] \frac{1}{\left(\frac{\partial n}{\partial C_3}\right)_{T, P, C_2}} \quad (V-18)$$

La mesure des incréments d'indice de réfraction ne donne qu'une interaction préférentielle. On mesure en fait le changement de potentiel chimique du solvant 3 dû à son interaction avec le polymère par rapport à son potentiel chimique dans le mélange de solvants, en absence de polymère.

Si l'on veut établir une corrélation entre la conformation du polymère et son état de solvation, il faut déterminer la solvation absolue du polymère par chacun des solvants. En effet, une comparaison directe entre la solvation préférentielle et la conformation est compliquée par le fait que l'état de référence varie avec la composition du solvant. Pour cela considérons un sac à dialyse formé par une membrane imperméable à la macromolécule mais perméable aux deux solvants. On introduit dans ce sac à dialyse 1 gramme du composant 1 et g_3 grammes du composant 3. Le sac est immergé dans un volume infini (ou un large excès) du mélange de solvants de même composition.

On ajoute maintenant au contenu du sac une petite quantité dg'_2 grammes du composant 2 (polymère). Si A_1 est le nombre de grammes du composant 1 qui se lie à un gramme de polymère et A_3 le nombre de grammes du composant 3 qui se lie au polymère, la quantité de solvant à l'état libre à l'intérieur du sac décroît de $A_1 dg'_2$ pour le composant 1 et $A_3 dg'_2$ pour le composant 3.

La concentration du composant 3 en gramme par gramme de composant 1 devient

$$g'_3 = (g_3 - A_3 dg'_2) / (1 - A_1 dg'_2) \quad (V-19).$$

Lorsqu'on a atteint l'équilibre entre l'intérieur et l'extérieur du sac à dialyse, à température et pression constantes T et P, les potentiels chimiques du composant 3 à l'intérieur et à l'extérieur du sac, μ_3^i et μ_3^e doivent être égaux.

$$\mu_3^i = \mu_3^e$$

ou encore

$$RT \text{ Log } g_3^i + RT \text{ Log } \gamma_3^i = RT \text{ Log } g_3^e + RT \text{ Log } \gamma_3^e \quad (\text{V-20})$$

Si on suppose que la différence entre les coefficients d'activité γ_3^i et γ_3^e du composant 3 à l'intérieur et à l'extérieur est uniquement due aux interactions avec le polymère, on peut écrire :

$$\gamma_3^i = \gamma_3^e \cdot F_3^i$$

où F_3^i est la fraction de composant 3 à l'intérieur du sac, qui n'est pas liée au polymère.

$$\text{On a donc : } g_3^i \cdot F_3^i = g_3^e$$

A l'intérieur du sac, la concentration en composant 3 non lié est égale à la concentration à l'extérieur, ceci à l'équilibre de dialyse. Pour maintenir cette égalité il faut que le composant 3 diffuse à travers la membrane. La quantité correspondante est :

$$dg_3 = (g_3 - g_3')$$

en grammes de composant 3 par gramme d'eau.

En utilisant l'équation (IV-19) on obtient :

$$dg_3 = g_3 - g_3' = (A_3 - g_3 A_1) dg_2' / (1 - A_1 dg_2') \quad (\text{V-21})$$

La concentration du composant 2 à l'intérieur du sac est alors :

$$dg_2 = dg_2' / (1 - A_1 dg_2')$$

Le coefficient de solvation préférentielle devient :

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T, P, \mu_3} = A_3 - g_3 A_1 \quad (\text{V-22})$$

Si on connaît le degré d'hydratation A_1 du polymère, on peut calculer A_3 , quantité absolue de solvant organique liée à un gramme de polymère :

$$A_3 = \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{P,T,\mu_3} + g_3 A_1 \quad (V-23)$$

Le coefficient $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{P,T,\mu_3}$ (équation V-22) est positif si le composant adsorbé préférentiellement est le composant 3. Dans le cas contraire (hydratation préférentielle) ce coefficient est négatif. La solvation préférentielle par le composant 1 est alors exprimée par :

$$\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2}\right)_{P,T,\mu_3} = - \frac{g_1}{g_3} \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{T,P,\mu_3} \quad (V-24)$$

ou

$$\left(\frac{\partial C_1}{\partial C_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} = - \frac{C_1}{C_3} \left(\frac{\partial C_3}{\partial C_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3} \quad (V-25)$$

Les coefficients $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{T,P,\mu_3}$ et $\left(\frac{\partial C_3}{\partial C_2}\right)_{T,\mu_1,\mu_3}$ représentent l'interaction préférentielle entre le solvant organique et le polymère, c'est-à-dire une comparaison des compositions du solvant dans le voisinage immédiat du polymère et l'extérieur.

Supposons un système dans lequel les quantités absolues d'eau et de solvant organique liées au polymère sont indépendantes de la composition du solvant. Dans un tel système, la composition de la couche de solvation est constante, tandis que la composition du solvant varie. La solvation préférentielle va donc varier avec la composition du solvant tandis que la solvation absolue est constante. On pourra par exemple, observer une hydratation préférentielle lorsque la teneur en eau du solvant deviendra inférieure à la teneur en eau de la couche de solvation.

Inversement, une augmentation de la quantité absolue de solvant organique lié au polymère peut être masquée par l'évolution de la composition du solvant. Ceci explique qu'on n'observe dans certains cas aucune corrélation entre la variation de solvation préférentielle et la transition conformationnelle. C'est le cas par exemple du système lysosyme - eau - 2 chloroethanol (figure V-2) étudié par TIMASHEFF⁽²²⁾. Dans d'autres cas au contraire, l'évolution de la solvation préférentielle est parallèle à la transition conformationnelle⁽²⁶⁾.

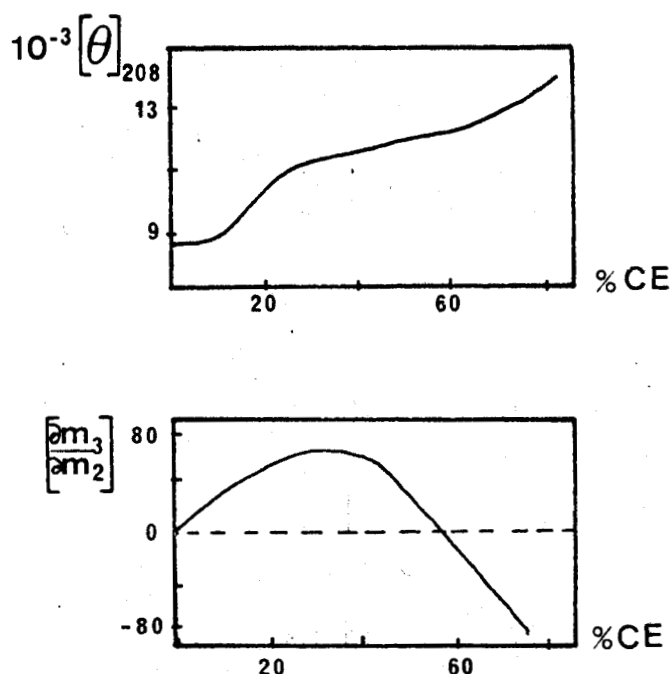


Figure V-2. Variation du coefficient de solvation préférentielle $\frac{\partial m_3}{\partial m_2}$ et de l'ellipticité molaire à 208 nm pour le système lysosyme - eau - 2 chloroethanol⁽²²⁾.

Pour faire apparaître une corrélation entre la conformation du polymère et les interactions polymère - solvant, on peut calculer la quantité absolue A_3 de solvant organique lié au soluté, à partir de l'équation V-23. La figure V-3 montre les résultats obtenus par INOUE et TIMASHEFF pour le système

β Lactoglobuline A - eau - 2 chloroethanol (24). On observe dans ce cas une très bonne corrélation entre la variation de solvata-tion absolue par le chloroethanol et la transition vers une structure plus hélicoïdale.

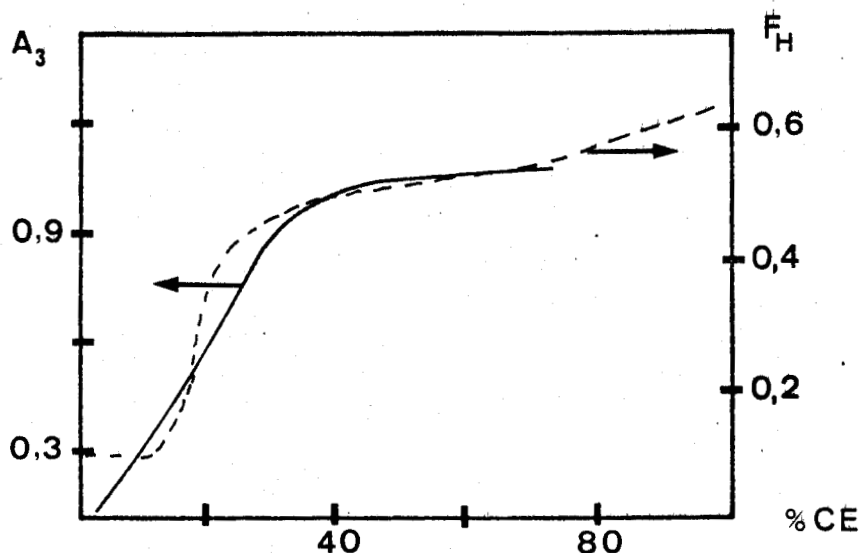


Figure V-3. Variation de la solvata-tion absolue A_3 par le chloro-ethanol et variation de l'hélicité F_H pour le système β Lacto-globuline - eau - 2 chloroethanol (24).

En dehors du terme $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{T,P,\mu_3}$ qui est une grandeur ex-périmentale, la détermination de A_3 nécessite la connaissance du terme A_1 qui est le nombre de grammes d'eau adsorbée par gram-me de polymère.

DETERMINATION DE L'HYDRATATION DES PROTEINES ET DES POLYPEPTIDES
EN SOLUTION AQUEUSE ET DANS DES MELANGES DE SOLVANTS.

Pour calculer A_3 à partir de la relation (V-3) pour toutes les compositions du solvant, il faut :

- connaître le degré d'hydratation en solution purement aqueuse
- connaître la manière dont évolue ce degré d'hydratation lorsqu'on modifie la composition du solvant.

Un certain nombre de facteurs peuvent modifier ce degré d'hydratation. Par exemple :

- . lorsqu'on ajoute à la solution aqueuse un solvant organique on diminue en général la constante diélectrique ce qui favorise la formation de paires d'ions. Dans ce cas l'aptitude des groupes ionisés à fixer des molécules d'eau diminue (24,29).
- . au cours de la dénaturation restructurante des protéines, certains groupes polaires qui se trouvaient à l'intérieur de la molécule, soustraits à l'influence du solvant, se trouvent exposés au solvant après la transition. Ils augmentent alors le degré global d'hydratation de la protéine. Cette augmentation du degré d'hydratation dû au changement de conformation a été estimée à 15 à 20 % par INOUE et TIMASHEFF (24).

A - DEGRE D'HYDRATATION DES PROTEINES ET DES POLYPEPTIDES EN SOLUTIONS PUREMENT AQUEUSES.

1 - Protéines.

Des méthodes nombreuses et très variées ont été utilisées pour déterminer le degré d'hydratation des protéines en

solutions aqueuses. Le tableau V-1 regroupe les résultats publiés dans la littérature pour quelques unes d'entre elles.

Soluté / Méthode	β lactoglobuline	Sérum albumine	Lysosyme	Hemoglobine	Ovalbumine
Méthodes hydrodynamiques (diffusion)	0,72 (30a)	1,07 (30a) 0,48 (31)	0,89 (30a)	0,36 (30a)	0,45 (30a)
Méthodes hydrodynamiques (viscosité)	0,61 (30b)	0,75 (30b) 0,40 (31)		0,69 (30b)	
Equilibre isopiéristique	0,32 (32)	0,32 (32)	0,25 (32)	0,25-0,30 (33)	0,30 (32)
R M N		0,43 (34) 0,40 (35)	0,36 (34) 0,34 (35)	0,45 (34) 0,42 (35)	0,31 (34) 0,33 (35)
Autres méthodes (36)	0,20	0,31	0,24-0,32	0,23	0,16

Tableau V-1. Degré d'hydratation de quelques protéines en solution purement aqueuse. en g. d'eau / g. de protéine.

On remarque à l'examen de ce tableau que les méthodes hydrodynamiques fournissent des valeurs nettement supérieures à celles obtenues par les autres méthodes.

Les valeurs trouvées par BULL et BREESE (32) par la méthode de l'équilibre isopiéristique sont celles utilisées par

INOUE et TIMASHEFF (24) pour calculer la solvatation absolue par le chloroéthanol dans les systèmes eau - chloroéthanol. Si on compare la β lactoglobuline qui contient 40 % de groupes polaires et l'acide polyglutamique qui est constitué uniquement de groupes polaires, on est conduit à attribuer à ce dernier un degré d'hydratation d'environ 0,8 g/g de polymère. Ceci correspond à six à sept molécules d'eau par résidu, ce qui est en accord avec les valeurs proposées par ailleurs (23) (6 à 8 molécules d'eau par groupe ionisable).

2 - Polypeptides.

En ce qui concerne les polypeptides les principaux résultats expérimentaux ont été établis par KUNTZ (34,35) au moyen de la résonance magnétique nucléaire. La méthode consiste à geler rapidement l'échantillon dans l'azote liquide afin de figer l'état de solvatation existant à température ambiante. L'échantillon est ensuite amené à une température comprise entre - 20 et - 60°C pour effectuer la mesure. Dans ces conditions l'eau "solvant" est gelée tandis que l'eau incluse dans la couche de solvatation ne l'est pas et donne naissance à un signal R.M.N.

La surface du pic obtenu est proportionnelle à la quantité de protéine ou de polypeptide dans l'échantillon ce qui montre que le signal ne provient que de l'eau d'hydratation (34).

Pour déterminer la quantité d'eau à partir de la surface du pic obtenu, il faut avoir recours à un étalonnage. On utilise pour cela une solution aqueuse de sérum albumine dont le degré d'hydratation est connu par d'autres méthodes.

KUNTZ a pu déterminer ainsi le degré d'hydratation de plusieurs homopolypeptides. Il obtient en particulier les résultats suivants :

Acide polyglutamique	: (pH 7-12)	: COO ⁻	7,5 moles H ₂ O / résidu
Acide polyglutamique	: (pH 4- 5)	: COOH	2 moles H ₂ O / résidu
Acide polyaspartique	: (pH 8-12)	: COO ⁻	6 moles H ₂ O / résidu
Acide polyaspartique	: (pH 4- 5)	: COOH	2 moles H ₂ O / résidu.

Notons que la valeur trouvée par KUNTZ pour l'acide polyglutamique ionisé est en bon accord avec celles proposées plus haut. KUNTZ a remarqué que pour la forme non ionisée de l'acide polyglutamique et de l'acide polyaspartique l'hydratation est insensible à la température entre - 25 et - 45°C tandis que pour les formes ionisées l'hydratation varie avec la température. Pour le PLGA, il obtient :

6,3 moles H₂O par résidu à - 45°C

7,7 moles H₂O par résidu à - 35°C

8,3 moles H₂O par résidu à - 25°C

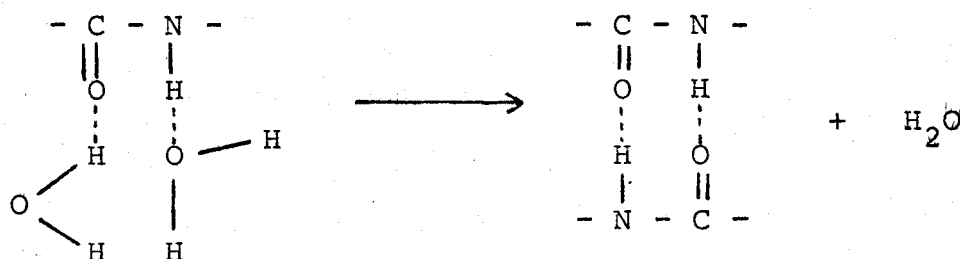
Ces résultats semblent étonnants et, de plus, posent le problème de savoir si les résultats obtenus à ces températures peuvent être raisonnablement extrapolés à la température ambiante.

A partir des valeurs trouvées pour les différents amino acides KUNTZ a calculé le degré d'hydratation de quelques protéines qu'il compare à la valeur mesurée. Celle-ci est systématiquement inférieure de 5 à 10 % à la valeur calculée ce qui confirme l'existence d'un certain nombre de groupes polaires soustraits à l'influence du solvant, dans l'état natif (24).

Une méthode par spectrométrie dans le proche infrarouge a été développée récemment par Mc CABE et FISHER (37) pour déterminer l'hydratation de petites molécules en solution. Cette méthode a été utilisée par SUBRAMANIAN et FISHER (35) pour étudier l'hydratation de l'acide polyglutamique et de la polylysine mais aucun résultat quantitatif n'a pu être tiré de ce travail. La même méthode a été utilisée au laboratoire (39) pour l'acide poly aspartique. Elle donne 7,5 moles d'eau par résidu sous forme ionisée et 5,8 moles d'eau par résidu sous forme acide. Ceci est en bon accord avec les résultats de KUNTZ pour la forme ionisée mais l'écart est important en ce qui concerne la forme acide.

Pour la poly N⁵ -(3 hydroxypropyl) L glutamine INOUE et IZUMI (25) ont employé la méthode par RMN et trouvent 3,5 moles d'eau par résidu. Notons que dans ce cas la chaîne latérale n'est pas ionisable.

Les méthodes précédentes ne fournissent qu'une évaluation globale de l'hydratation sur l'ensemble du résidu. La localisation des molécules d'eau, c'est-à-dire leur répartition entre le groupement peptidique et la chaîne latérale a été assez peu étudiée. En 1948, MELLON et coll. ⁽⁴⁰⁾ ont étudié l'hydratation de la polyglycine dont la chaîne latérale ne comporte pas de groupements hydrophiles. Leur étude conduit à attribuer une à deux moles d'eau d'hydratation par résidu, localisées au niveau du groupe peptidique. Par contre, en 1968, BULL et BREESE ⁽³²⁾ trouvent non seulement que le groupe peptidique ne fixe pas d'eau mais aussi qu'il inhibe la fixation d'eau par les groupes polaires. Plus récemment les travaux théoriques de HOPFINGER ⁽⁴¹⁾ ainsi que de PULLMAN et PORT ⁽⁴²⁾ permettent de prévoir une à deux moles d'eau par groupe peptidique, valeur utilisée par KUNTZ ⁽³⁵⁾. Par proche infra-rouge, on trouve également une à deux moles d'eau par résidu ⁽³⁹⁾. Remarquons enfin que lors d'une transition désordre → ordre telle que la transition chaîne ↔ hélice l'aptitude à l'hydratation des groupes peptidiques doit diminuer du fait de la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires.



Ceci est confirmé par l'observation que le degré d'hydratation des protéines dépend de leur taux d'hélicité ⁽⁴³⁾.

En résumé on peut donc attribuer une à deux moles d'eau au groupe peptidique, les autres étant fixées au niveau de la chaîne latérale

B - HYDRATATION ET SOLVATATION DES POLYPEPTIDES DANS LES MELANGES EAU - SOLVANT ORGANIQUE.

INOUE et IZUMI (25) ont utilisé la méthode de KUNTZ (35) pour mesurer l'hydratation ainsi que la solvatisation absolue par le dioxanne de la poly [N^5 (3 hydroxypropyl) L glutamine] en mélange eau - dioxanne. Les résultats obtenus montrent que tandis que l'hydratation varie entre 3,5 et 2 moles d'eau par résidu entre 0 et 60 % de dioxanne, la solvatisation par le dioxanne est très faible et varie entre 0,03 et 0,09 mole de dioxanne par résidu.

Cette étude est la seule dans laquelle la solvatisation ait été mesurée directement et non calculée au moyen de la relation (V-23). La poly [N^5 (3 hydroxypropyl) L glutamine] a également été étudiée par densitométrie dans le mélange eau - 2 chloro éthanol (26).

Cas du système acide polyglutamique - eau - dioxanne

Certains facteurs tels que le changement de constante diélectrique ou une modification de l'exposition des groupes polaires au solvant peuvent entraîner une variation de l'hydratation à mesure que la composition du solvant change.

L'étude du système PLGA - eau - dioxanne a été faite dans des mélanges contenant entre 0 et 50 % en dioxanne. La constante diélectrique varie alors entre 78 et 40 ce qui est insuffisant pour modifier sensiblement l'aptitude des groupes ionisés à fixer des molécules d'eau (29). On peut donc considérer qu'en milieu basique sous forme ionisée le polymère retient 6 à 8 molécules d'eau par résidu dans tout le domaine de composition en dioxanne (23,35).

En milieu basique sous forme ionisée, le PLGA adopte une conformation désordonnée assez étendue (le coefficient a de l'équation de MARK-HOUWINK est voisin de 1). On peut donc considérer que tous les groupes polaires sont exposés au solvant

dans tout le domaine étudié. Lorsque la molécule est sous forme hélicoïdale, tous les groupes polaires sont également accessibles au solvant.

Contrairement au cas des protéines, il n'y a donc pas lieu d'introduire une correction au terme d'hydratation pour tenir compte d'un changement de conformation.

Si la transition conformationnelle ne provoque aucun changement d'hydratation au niveau des chaînes latérales, nous avons vu qu'elle s'accompagne d'un changement d'hydratation au niveau du groupe peptidique, dû à la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires. Cette variation peut être estimée à environ 1,5 moles d'eau par résidu.

Les résultats de INOUE et IZUMI (25) pour le système PHPG/eau/dioxanne montrent que l'hydratation passe de 3,5 à 2 molécules d'eau par résidu au cours de la transition. Il y a lieu de tenir compte d'une correction analogue dans le cas de notre système PLGA/eau/dioxanne.

Les calculs de solvatation par le dioxanne en milieu basique seront faits de deux façons :

- . tout d'abord en supposant 6 à 9 molécules d'eau d'hydratation en milieu aqueux, sans modifier cette valeur au cours de la transition
- . ensuite en supposant 8 molécules d'eau avant la transition mais en apportant une correction telle qu'il n'y ait plus que 6 molécules d'eau à la fin de cette transition.

En milieu acide, les calculs de solvatation absolue par le dioxanne seront effectués en supposant 3 à 6 molécules d'eau d'hydratation par résidu.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les mesures ont été effectuées en milieu basique (pH 12) et en milieu acide (pH 4,5 ; 4,8 et 5,15) en présence ou en absence de NaCl.

A pH basique et en présence de NaCl 0,2 M le domaine d'étude est limité à 33 % de dioxanne par la précipitation du polymère. Dans ce domaine, aucune transition conformationnelle n'est observée.

A pH basique, en absence de sel, le polymère subit une transition chaîne \rightleftharpoons hélice située pour cet échantillon vers 40 % de dioxanne (Figure V-4).

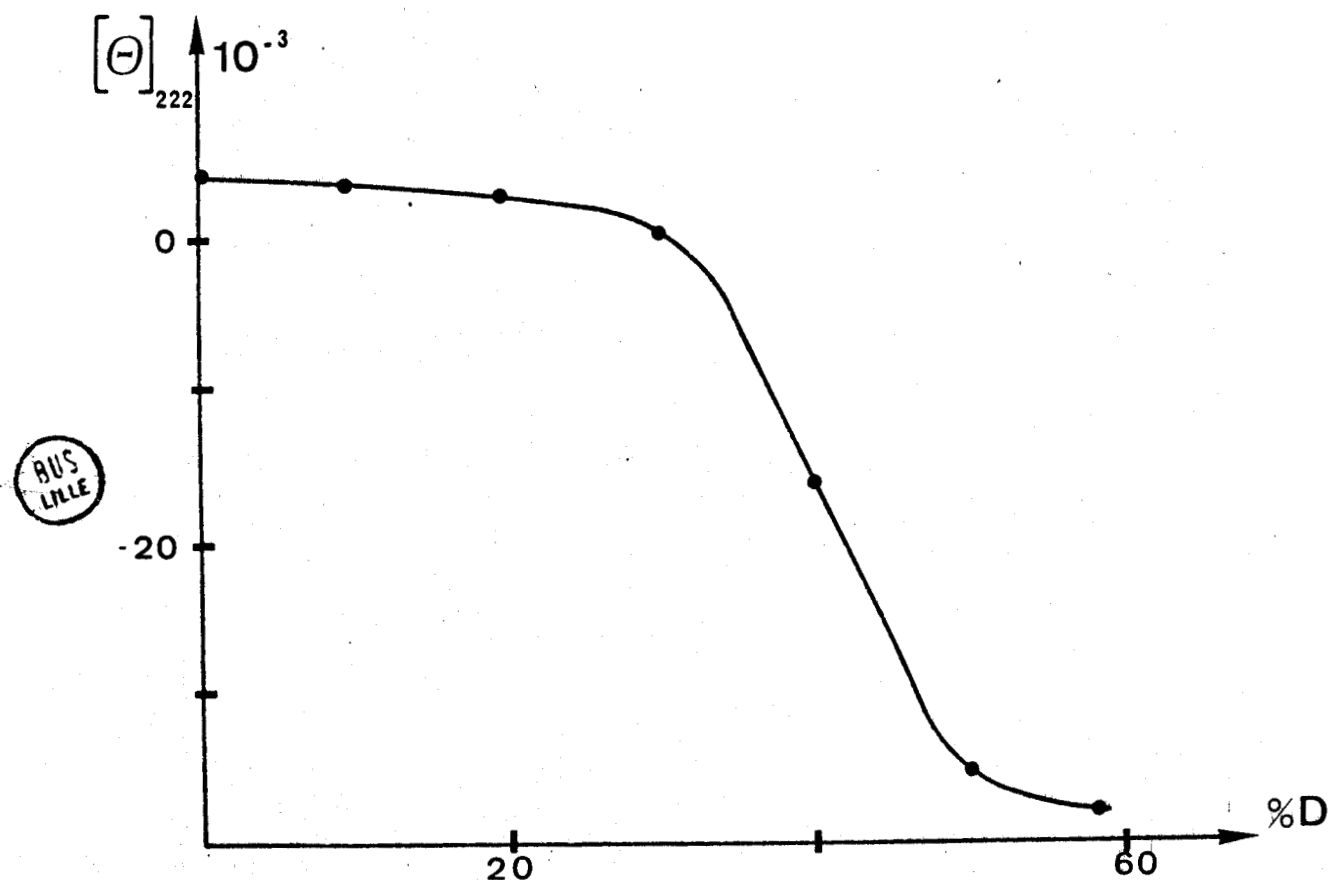


Figure V-4. Variation de l'ellipticité à 222 nm en fonction de la composition en dioxanne pour le système PLGA-eau-dioxanne.

En milieu acide, le polymère est sous forme hélicoïdale quelle que soit la composition du solvant. On n'observe donc aucune transition conformationnelle. Seule l'étude viscosimétrique révèle une augmentation de rigidité de l'hélice α du PLGA que nous avons attribuée à un renforcement des liaisons hydrogène intramoléculaires dû à la présence de dioxanne.

L'étude par solvatisation préférentielle devrait permettre de mettre en évidence une éventuelle adsorption préférentielle de dioxanne sur la molécule.

A - ETUDE EN MILIEU BASIQUE

1 - Coefficients de solvatisation préférentielle.

Le tableau V-2 donne les valeurs des incréments d'indice de réfraction et du coefficient d'adsorption préférentielle en fonction de la composition du mélange pour le système PLGA/eau/dioxanne en milieu basique.

$(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{m_3}$ et $(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{\mu_3}$ sont les incréments d'indice de réfraction avant et après dialyse, $(\frac{\partial n}{\partial C_3})$ est l'incrément d'indice du mélange de solvants purs.

Le coefficient d'adsorption préférentielle $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ est calculé à partir de la relation V-17.

C_3 est la concentration (en g/ml de solution) du composant 3 (dioxanne). \bar{V}_3 est le volume spécifique partiel du dioxanne dans le mélange de solvants.

Pour le calcul de \bar{V}_3 nous avons utilisé les données de MALCOLM et ROWLINSON ⁽⁴⁴⁾ (voir partie expérimentale).

Lorsque $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ est négatif (hydratation préférentielle), la solvatisation est exprimée par $(\frac{\partial g_1}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ qui est égal à :

$$- \frac{g_1}{g_3} (\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$$

Fraction en volume de dioxanne	C_3 g/ml	\bar{v}_3 ml/g	$(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{m_3}$ ml/g	$(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{\mu_3}$ ml/g	$(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{m_2}$ ml/g	$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ g/g	$(\frac{\partial g_1}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ g/g
0	0		0,134		0,098		
10	0,103	0,911	0,122	0,139	0,100	0,187	
20	0,207	0,917	0,105	0,111	0,100	0,074	
30	0,310	0,925	0,101	0,089	0,097	- 0,168	0,380
40	0,413	0,931	0,097	0,077	0,097	- 0,325	0,685
45	0,465	0,936	0,095		0,092		

Tableau V.2. Valeurs du volume partiel du dioxanne, des incréments d'indices et des coefficients d'adsorption préférentielle pour le système PLGA/eau/dioxanne en milieu basique.

Le tableau V-3 donne les valeurs numériques obtenues pour le système PLGA/NaCl 0,2 M/Dioxanne en milieu basique. En ce qui concerne les valeurs du volume spécifique partiel du dioxanne dans les mélanges NaCl 0,2 M/Dioxanne, il n'existe pas de données dans la littérature et nous avons utilisé les valeurs correspondant aux mélanges eau - dioxanne.

Les figures V-5 et V-6 montrent la variation des incréments d'indice de réfraction et du coefficient $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en fonction de la composition.

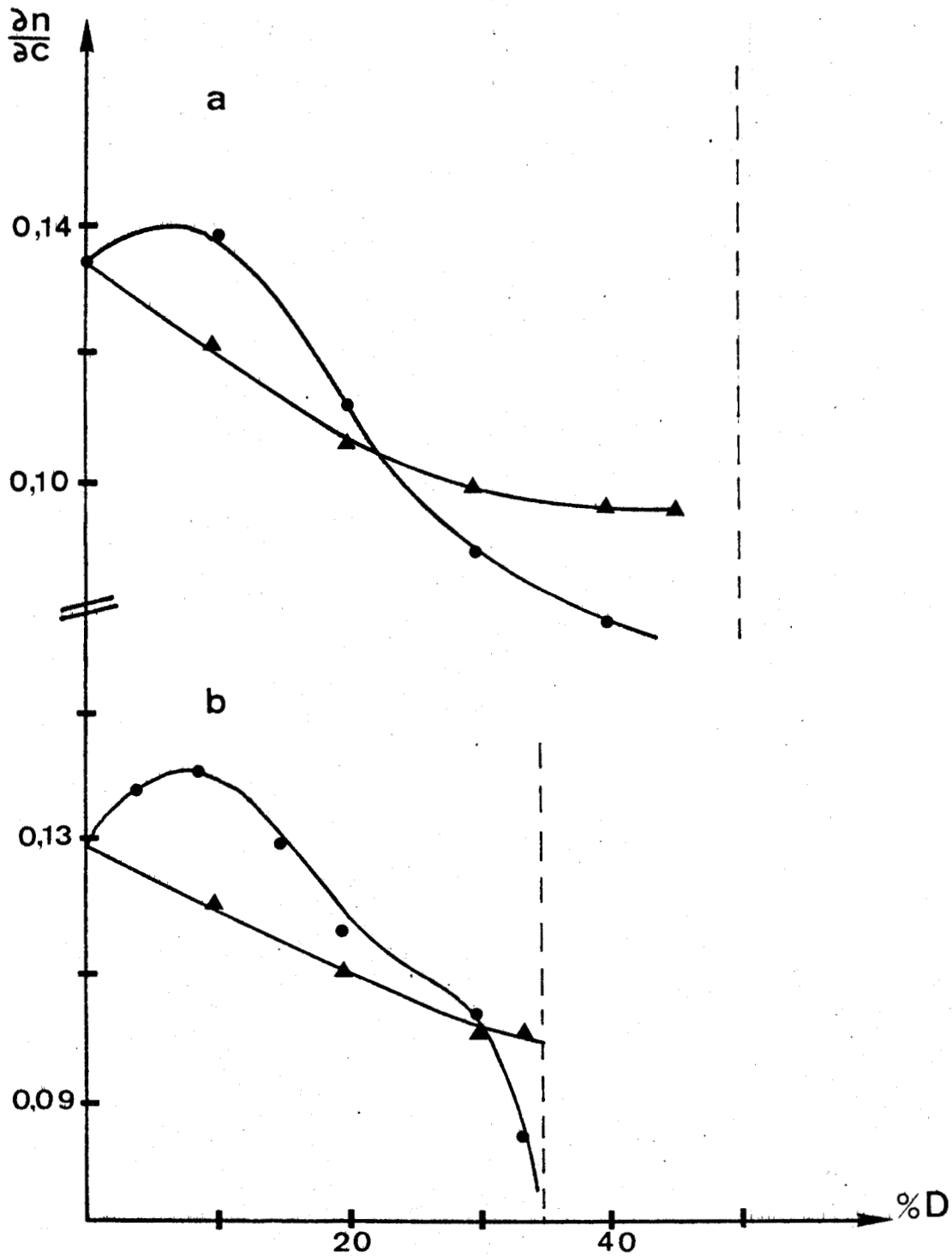


Figure V-5. Variation des incréments d'indice de réfraction du PLGA avant (▲) et après dialyse (●)

a) dans le mélange H₂O - Dioxanne

b) dans le mélange NaCl 0,2 M - Dioxanne.



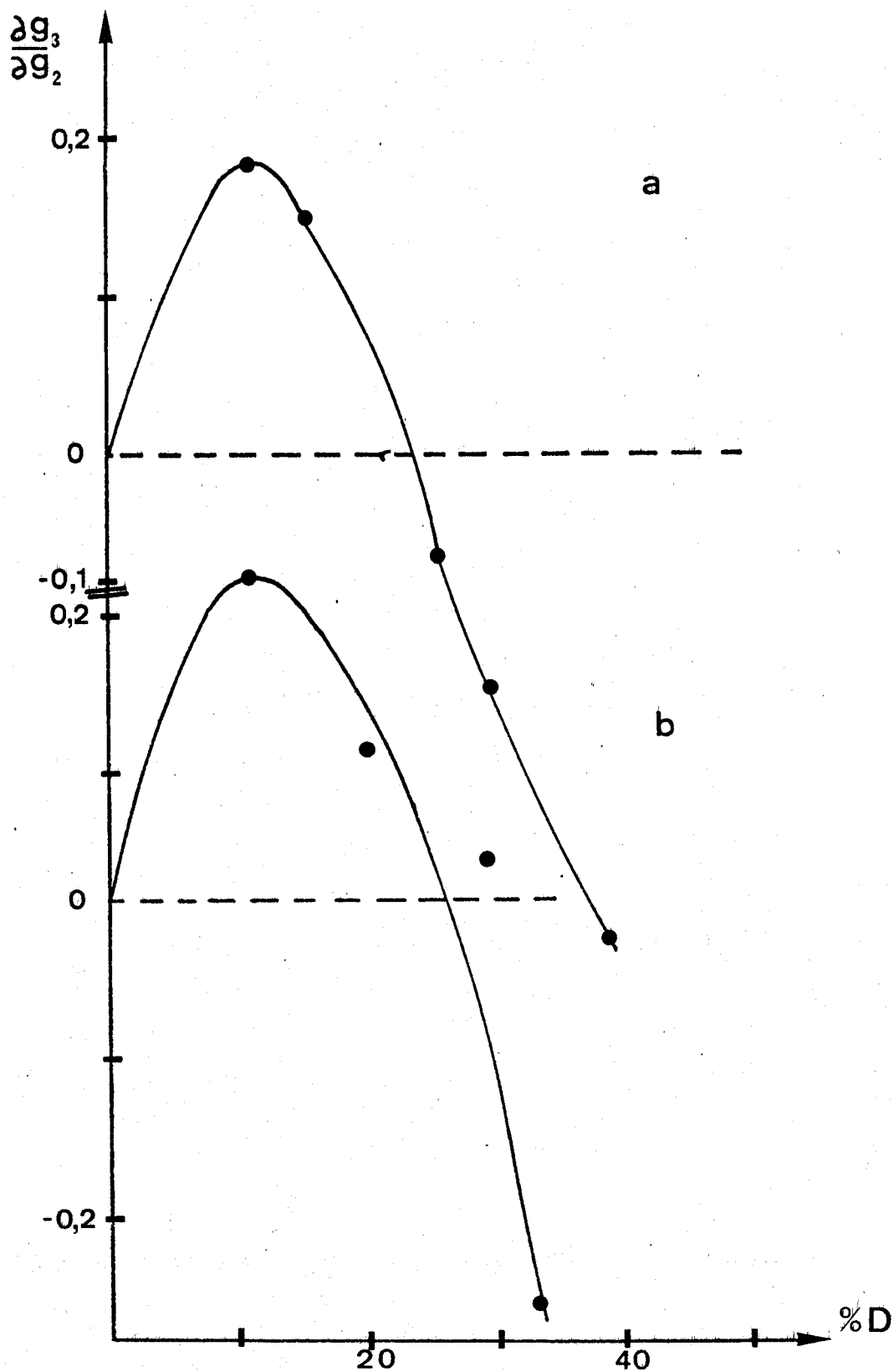


Figure V-6. Variation du coefficient de solvation préféren-
tielle $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu}$

a) dans le mélange H₂O - Dioxanne

b) dans le mélange NaCl 0,2 M - Dioxanne.

Fraction en volume de dioxanne	C_3 g/ml	\bar{v}_3 ml/g	$(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{m_3}$ ml/g	$(\frac{\partial n_3}{\partial C_2})_3$ ml/g	$(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{m_2}$ ml/g	$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ g/g	$(\frac{\partial g_1}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ g/g
0	0		0,129		0,098		
5	0,052	0,909	0,125	0,139	0,098	0,150	
10	0,103	0,911	0,121	0,140	0,100	0,209	
15	0,155	0,914	0,115	0,131	0,101	0,185	
20	0,207	0,917	0,110	0,116	0,098	0,075	
30	0,310	0,925	0,102	0,104	0,098	0,029	
33	0,341	0,927	0,102	0,085	0,097	0,249	0,482

Tableau V-3. Valeurs du volume partiel du dioxanne, des incréments d'indice et des coefficients d'adsorption préférentielle pour le système PLGA/NaCl 0,2 M/Dioxanne en milieu basique.

En absence ou en présence de NaCl, on observe une inversion de la solvatation préférentielle située dans le premier cas vers 22 % de dioxanne et dans le second cas vers 30 %. En présence de NaCl l'inversion d'adsorption préférentielle a lieu juste avant le domaine de précipitation du polymère.

Il y a adsorption préférentielle de dioxanne aux faibles compositions en dioxanne et adsorption préférentielle d'eau pour les milieux plus riches en dioxanne.

En présence ou en absence de sel le maximum d'absorption préférentielle est situé vers 10 % de dioxanne et sa valeur est pratiquement identique dans les deux cas c'est-à-dire environ 0,2 gramme par gramme de polymère. Cela signifie qu'il y a

environ 0,3 mole de dioxanne par résidu en excès par rapport à la composition du solvant en absence de solvation préférentielle.

Si on compare à d'autres systèmes polymère - eau - dioxanne (tels que polyméthacrylate de méthyle - eau - dioxanne ⁽⁹⁾ et polyvinylpyrrolidone - eau - dioxanne ⁽¹¹⁾) on constate également une adsorption préférentielle de dioxanne dans les mélanges pauvres en dioxanne. Cependant, dans le cas du polyméthacrylate de méthyle, le dioxanne est le meilleur solvant du polymère, tandis que dans le cas de la polyvinylpyrrolidone, comme dans le cas de l'acide polyglutamique le dioxanne est le moins bon solvant. Dans le cas de la polyvinylpyrrolidone l'absorption préférentielle de dioxanne est plus marquée puisqu'on trouve 1,5 moles de dioxanne en excès par rapport à la composition moyenne, pour un résidu.

2 - Comparaison avec les théories existantes.

a - *théorie de SHULTZ et FLORY.*

Des expressions théoriques permettant le calcul de l'adsorption préférentielle à partir des paramètres d'interaction ont été proposées par différents auteurs. SHULTZ et FLORY ⁽²⁾ expriment l'adsorption préférentielle par :

$$b_1 = - \frac{m_2 \bar{v}_2}{V_1} \phi_1 \phi_3 \left[\frac{(\phi_1 - \phi_3) \chi_{13} + \chi_{12} - 1 \chi_{23} + (1 - 1)}{1 \phi_1 + \phi_3 - 2 \chi_{13} \phi_1 \phi_3} \right] \quad (V-26)$$

(Nous utilisons ici la notation suivante : 1 : eau 2 : polymère 3 : dioxanne).

b_1 est le nombre de molécules d'eau en excès par motif monomère

m_2 est la masse du motif monomère

\bar{v}_2 le volume spécifique partiel du polymère

1 le rapport des volumes molaires V_1 et V_3 : $\frac{V_1}{V_3}$

ϕ_1 et ϕ_3 sont les fractions en volume des deux solvants

χ_{ij} est le paramètre d'interaction entre les espèces i et j .

Les différents paramètres χ_{ij} sont calculés à partir des relations :

$$\chi_{13} = \frac{\Delta G^E}{x_1 x_3 RT}$$

$$(1 - \chi_{12}) = A_2 \cdot \frac{V_1}{\bar{v}_2} \quad (V-27)$$

$$(1 - \chi_{23}) = A_2 \cdot \frac{V_3}{\bar{v}_2}$$

x_1 et x_3 sont les fractions molaires des deux solvants,

ΔG^E est l'enthalpie libre d'excès du mélange des deux solvants,

A_2 est le coefficient du viriel mesuré dans chacun des solvants purs.

Les valeurs de ΔG^E pour les mélanges eau - dioxanne existent dans la littérature ⁽⁴⁴⁾ mais la valeur de A_2 dans le dioxanne ne peut être déterminée puisque le PLGA n'est pas soluble dans ce solvant. Le calcul théorique de b_1 n'est donc pas possible.

b - théorie de SHINDO

Dans le cas particulier des protéines, une théorie de mécanique statistique de la dénaturation par les solvants organiques a été proposée par SHINDO ⁽⁴⁵⁾. Cette théorie établit en particulier une relation qualitative entre l'adsorption préférentielle des solvants et la transition conformationnelle :

- (1) si $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} > 0$ la transition conformationnelle est rapide et a lieu à un pourcentage faible de solvant organique.
- (2) si $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} \sim 0$ la transition est rapide mais a lieu à un pourcentage élevé en solvant organique.
- (3) si $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} < 0$ on n'observe pas de transition nette mais une augmentation progressive de l'hélicité.

Cette théorie est illustrée par l'exemple de la β lactoglobuline dans les mélanges eau - chloroéthanol et eau - méthoxyéthanol (Figure V-7).

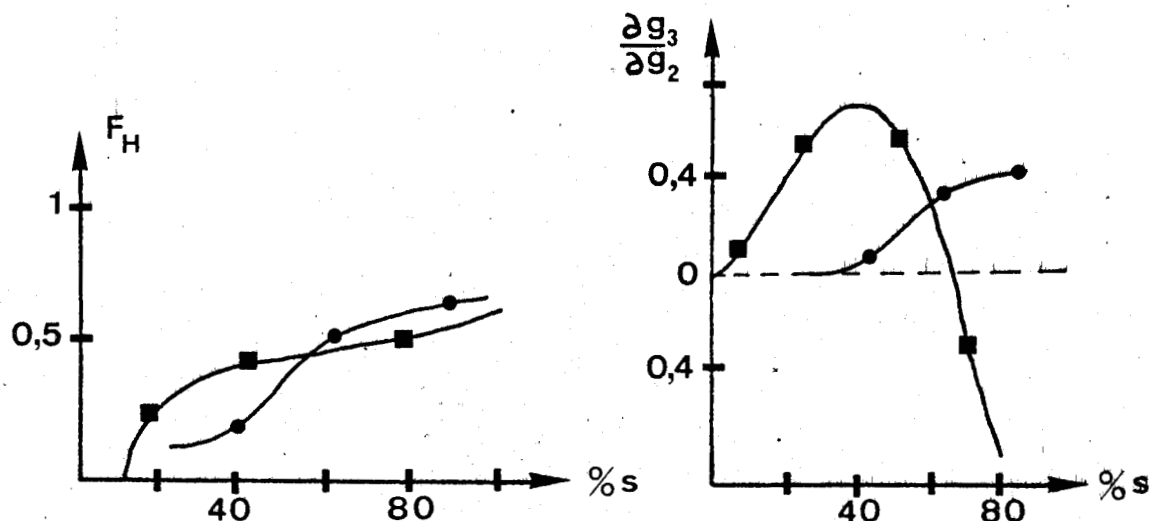


Figure V-7. Variation de l'hélicité F_H et du coefficient de solvation préférentielle $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu}$ (45)

- a) β Lactoglobuline - eau - 2 chloroéthanol. ■
- b) β Lactoglobuline - eau - méthoxyéthanol. ●

Dans le cas du PLGA, $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ est positif et on observe une transition nette vers 40 % de dioxanne (voir figure V-4). Ceci est compatible avec ce qui précède si on considère que le coefficient $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ au maximum est plus faible que dans le cas de la β lactoglobuline en mélange eau - chloroéthanol. (0,2 g/g contre 0,8 g/g).

Si l'on poursuit la comparaison entre ces deux systèmes, on constate que dans le cas du PLGA le maximum de solvation préférentielle par le solvant organique est situé à 10 % contre 40 % pour la β lactoglobuline dans le mélange eau - chloroéthanol et que l'hydratation préférentielle apparaît dès 22 % dans le premier cas et vers 65 % dans le second. Cela s'explique facilement si l'on considère que la β lactoglobuline ne contient que 40 % de groupes polaires tandis que le PLGA est constitué uniquement de tels groupes qui ont une affinité importante pour l'eau d'où un élargissement du domaine d'hydratation préférentielle. Ceci explique également le degré assez faible de solvation préférentielle par le dioxanne puisque le PLGA contient beaucoup moins de sites hydrophobes que les protéines. On est donc en présence d'un cas intermédiaire entre les cas (1) et (2).

3 - Loi de GLADSTONE-DALE

GLADSTONE et DALE ont proposé une relation simple reliant l'indice du polymère n , l'indice du solvant n_0 , le volume partiel spécifique du polymère v_2 ainsi que l'incrément d'indice de réfraction à concentration constante (avant dialyse) $\frac{\partial n}{\partial C}$

$$\frac{\partial n}{\partial C} = \overline{v}_2 (n - n_0) \quad (V-28)$$

Cette relation d'abord appliquée à des polymères en solution dans un seul solvant, exprime que pour un polymère donné l'incrément d'indice est fonction de l'indice du solvant. STRAZIELLE et BENOIT (7) ont montré que la validité de cette relation pouvait être étendue aux mélanges de solvants. Cette loi, une fois établie pour un polymère donné peut être utilisée pour évaluer avec une bonne précision l'incrément d'une solution de polymère connaissant l'indice du solvant.

La figure V-8 représente la loi de GLADSTONE-DALE pour le PLGA en milieu basique dans les mélanges eau - dioxanne et NaCl 0,2 M - dioxanne.

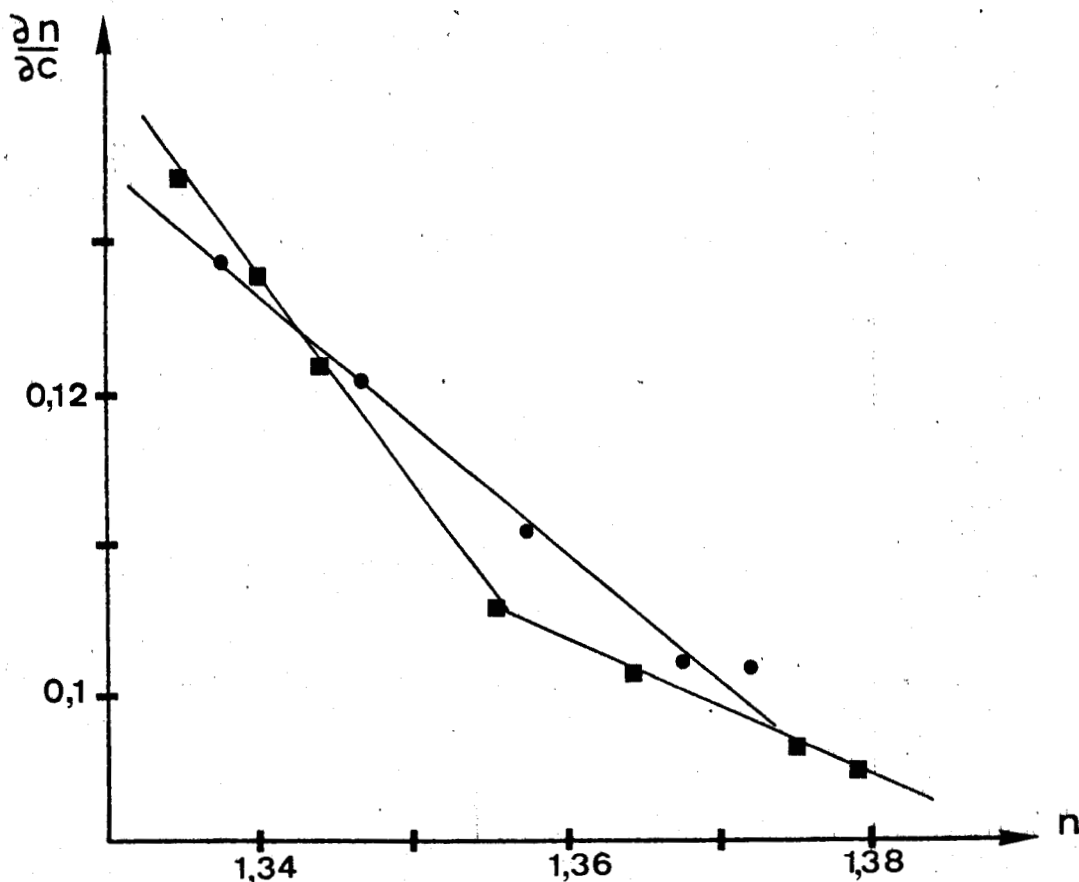


Figure V-8. Loi de GLADSTONE-DALE :

- PLGA dans le mélange eau - dioxanne
- PLGA dans le mélange NaCl 0,2 M - Dioxanne.

Dans le second cas on observe une variation linéaire de l'incrément d'indice avec l'indice du solvant dans le domaine de solubilité du polymère. Dans le premier cas, la courbe présente un changement de pente très net pour $n = 1,3565$ ce qui correspond à une composition de 22 % en dioxanne. Si on se reporte à la figure V-6 on constate que cette composition est celle pour laquelle a lieu l'inversion de solvatation préférentielle. L'absence de changement de pente dans le cas des mélanges NaCl 0,2 M - dioxanne est associé à la quasi inexistence d'un phénomène semblable avant le domaine de précipitation.

La pente de la courbe $\frac{\partial n}{\partial C} = f(n_0)$ est directement fonction du volume spécifique \bar{v}_2 du polymère. L'inversion de solvata-tion préférentielle serait donc associée à une variation importante du volume spécifique du PLGA.

4 - Estimation de la solvata-tion absolue . Corrélation avec la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le solvant.

Comme nous l'avons vu la relation :

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = A_3 - A_1 g_3$$

permet de passer de la solvata-tion préférentielle à la solvata-tion absolue par le solvant organique. Cela nécessite la connaissance ou l'évaluation :

- de la valeur de A_1 en absence de solvant organique
- de la variation de A_1 au cours de la transition provoquée par le changement de composition du solvant.

Dans un premier temps nous nous sommes fixé des valeurs de A_1 variant entre 6 et neuf molécules d'eau liées par résidu. Nous avons considéré cette valeur comme constante dans tout le domaine de composition en dioxanne étudié.

Dans un second temps nous avons fixé à huit la valeur de A_1 en milieu aqueux. Nous avons fait varier cette valeur de huit à six entre 0 et 50 % en dioxanne.

En supposant successivement six, sept, huit et neuf molécules d'eau par résidu on obtient les courbes représentées sur la figure V-9. donnant la variation de A_3 avec la composition du solvant. On remarque immédiatement que le choix de la valeur de A_1 n'est pas critique du moins en ce qui concerne l'allure de la courbe.

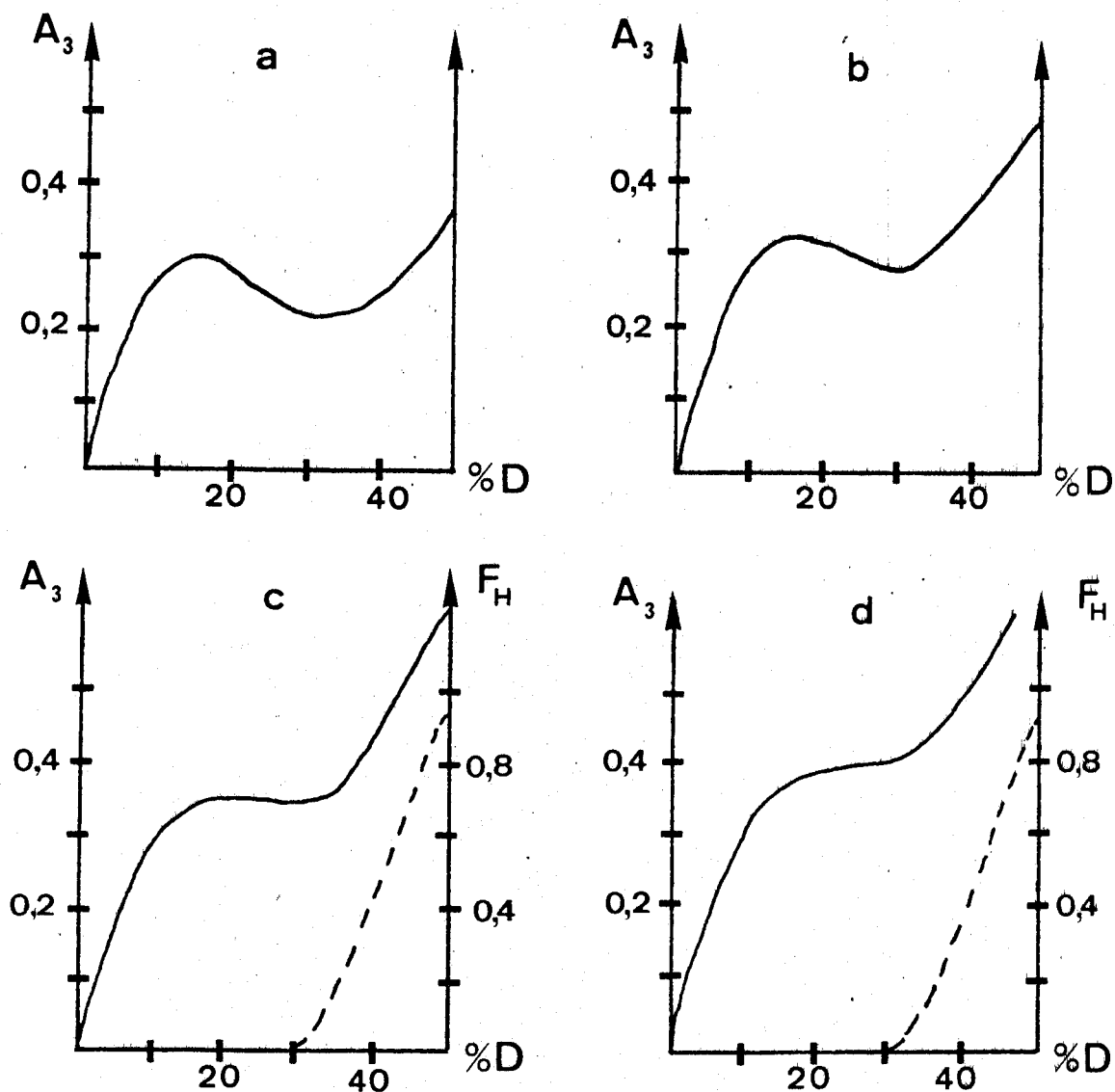


Figure V-9.

- Variation de la solvation absolue A_3 en fonction de la composition du mélange eau - dioxane en supposant six (a), sept (b), huit (c) et neuf (d) molécules d'eau par résidu de PLGA.
- Variation de l'hélicité F_H avec la composition du solvant.

Le tableau V-4 donne, dans le cas de huit molécules d'eau par résidu ($A_1 = 1,12$), les différentes valeurs de A_3 , la quantité totale de solvant adsorbé $A = A_1 + A_3$ ainsi que la composition de la couche de solvation A_3/A_1 .

Fraction en volume de dioxanne	g_3 g/g	$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}$ g/g	A_3 g/g	A g/g	$\frac{A_3}{A_1}$
0	0	0			
5	0,055	0,107	0,169	1,289	0,151
10	0,115	0,187	0,316	1,436	0,282
20	0,259	0,068	0,358	1,478	0,320
30	0,444	- 0,175	0,322	1,442	0,288
40	0,691	- 0,329	0,445	1,565	0,397
45	0,848	- 0,405	0,545	1,665	0,487

Tableau V-4. Paramètres de solvation du PLGA dans le mélange eau - dioxanne.

Les figures V-9 c et V-9 d représentent également la variation du degré d'hélicité F_H du polymère au cours de la transition, calculé à partir de la relation

$$F_H = \frac{4000 - [\theta]_{222}}{41\ 000}$$

où $[\theta]_{222}$ est l'ellipticité molaire à 222 nm.

La figure V-9 montre, quel que soit le nombre de molécules d'eau absorbées, une augmentation rapide de l'absorption absolue de dioxanne entre 0 et 15 % de dioxanne. Cela correspond au maximum de solvation préférentielle observé plus haut. On observe ensuite, dans le cas de 8 ou 9 molécules d'eau, un plateau entre 15 et 30 % de dioxanne.

Jusque 30 % de dioxanne, aucun changement de conformation n'a lieu ce qui signifie qu'il existe une adsorption non négligeable de dioxanne sur le PLGA sous la forme désordonnée

(chaîne). Cette adsorption est de l'ordre de 0,35 gramme par gramme de polymère ce qui équivaut à une mole de dioxanne pour deux résidus de PLGA.

Au delà de 30 % de dioxanne on observe une nouvelle augmentation du coefficient A_3 qui n'est pas terminée lorsqu'on atteint la limite du domaine de solubilité du polymère. Cette augmentation de l'adsorption absolue de dioxanne accompagne la transition chaîne \rightleftharpoons hélice qui a lieu entre 30 et 50 % de dioxanne.

Si l'on admet qu'il existe un plateau pour A_3 lorsque la transition est terminée après 50 % de dioxanne, ce plateau doit se situer vers $A_3 = 0,6$ à $0,65$ g/g. ce qui correspond à un peu moins d'une mole de dioxanne par résidu.

On peut donc considérer qu'il se fixe au total une mole environ de dioxanne par résidu dont une demi-mole avant la transition sous forme désordonnée et une demie au cours de la transition. Ce nombre est petit comparé aux deux à trois moles de solvant organique par groupe non polaire trouvées par INOUE et TIMASHEFF ⁽²⁴⁾ pour la β lactoglobuline dans les mélanges eau - chloroéthanol.

Dans notre cas la moitié environ du dioxanne adsorbé l'est sur la conformation désordonnée tandis que dans le cas de la β lactoglobuline, c'est 20 % seulement de la quantité totale de solvant organique qui est adsorbée sur la forme native. Ceci est normal si on considère que dans ce dernier cas, les groupes non polaires sont soustraits pour la plupart aux interactions avec le solvant.

La figure V-10 montre les résultats obtenus en supposant huit molécules d'eau d'hydratation à 0 % en dioxanne et six molécules d'eau après la transition vers 60 % en dioxanne. L'allure de la courbe est semblable à celle des courbes précédentes avec cependant une augmentation moins importante de la quantité de dioxanne adsorbée au cours de la transition.

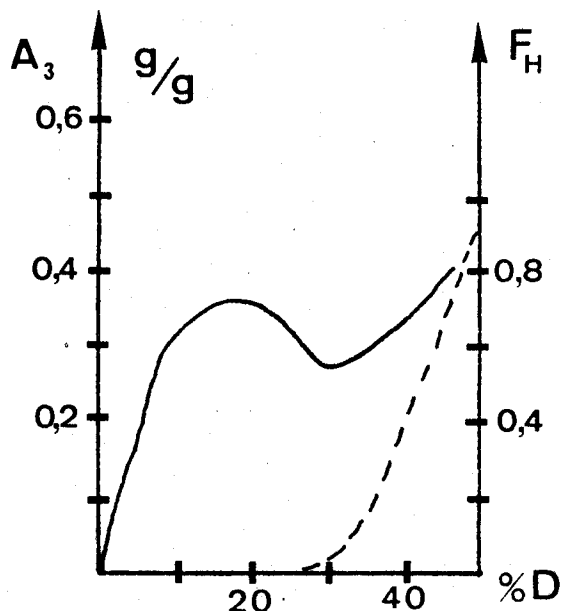


Figure V-10. - Variation de A_3 en supposant 8 moles d'eau par résidu avant la transition et six moles après la transition.

- Variation de l'hélicité F_H avec la composition du solvant.

Dans tous les cas la quantité de dioxanne adsorbée à la fin de la transition est de l'ordre de 0,7 à 1 mole par résidu ce qui est nettement supérieur à la quantité trouvée pour la poly (N^5 (3 hydroxypropyl) L glutamine) ⁽²⁵⁾ (environ 0,09 mole par résidu).

Cela suggère que le dioxanne s'adsorbe au niveau du groupement carboxylique ionisé pour favoriser la formation de paires d'ions et diminuer les répulsions électrostatiques. Le fait qu'une grande partie du dioxanne est adsorbée avant la transition est en bon accord avec les résultats de viscosité.

B - ETUDE EN MILIEU ACIDE.

En milieu acide, les mesures du degré de solvatisation préférentielle n'ont été faites qu'en présence de NaCl 0,2 M, car notre but était de comparer ces résultats à ceux obtenus par viscosité. C'est pourquoi également nous nous sommes limités au domaine 0 - 33 % en dioxanne.

Comme précédemment le coefficient d'adsorption préférentielle $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ a été calculé à partir de la relation V-17.

Les calculs de solvation absolue par le dioxanne ont été effectués en supposant successivement 3 à 6 moles d'eau par résidu. Ceci tient compte des résultats obtenus à la fois par RMN ⁽³⁵⁾ et par spectroscopie de proche infra rouge ⁽³⁹⁾. Nous avons considéré le degré d'hydratation comme constant dans le domaine étudié puisqu'on n'y observe aucune transition conformationnelle.

1 - Mesures à pH 4,5

Le tableau V-6 donne les valeurs des incréments d'indice de réfraction et du coefficient d'adsorption préférentielle pour le PLGA en fonction de la quantité de dioxanne à pH 4,5.

Fraction en volume de dioxanne	$(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{m_3}$ ml/g	$(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{\mu_3}$ ml/g	$(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{m_2}$ ml/g	$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ g/g
0	0,161		0,098	
10	0,120	0,137	0,099	0,190
20	0,117	0,135	0,098	0,227
30	0,110	0,133	0,098	0,329
33	0,085	0,129	0,097	0,663

Tableau V-5. Paramètres d'interaction du système PLGA - NaCl 0,2 M - Dioxanne à pH 4,5 (les valeurs de \bar{v}_3 utilisées pour les calculs sont celles données dans le tableau V-3).

A ce pH, la molécule est entièrement sous forme hélicoïdale. On constate que l'incrément d'indice à potentiel chimique constant est toujours supérieur à l'incrément d'indice à concentration

constante ce qui indique une solvatisation préférentielle de dioxanne. Figure V-11.

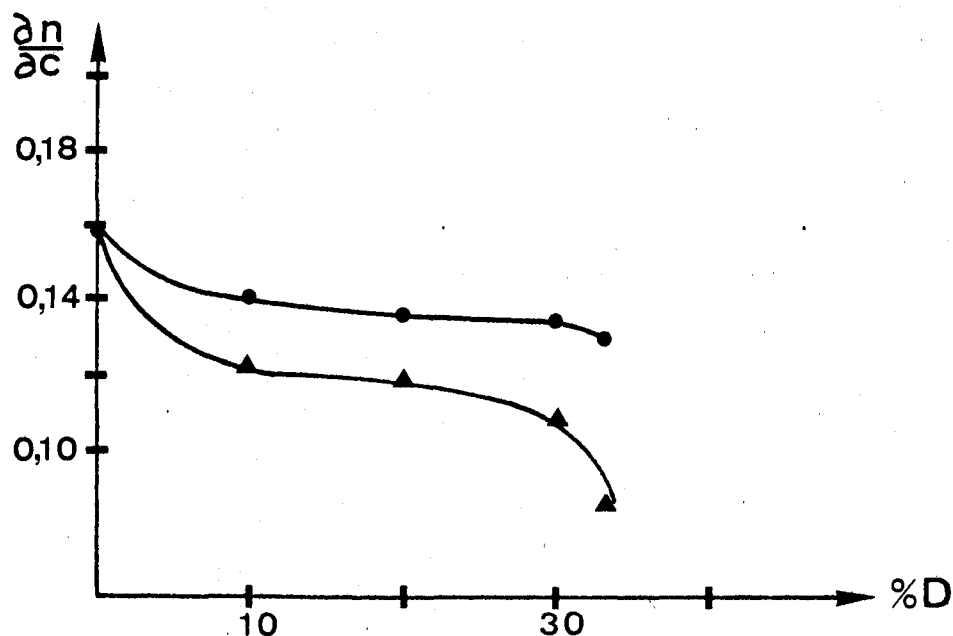


Figure V-11. Variation des incréments d'indice de réfraction du PLGA en milieu acide dans le mélange NaCl 0,2 M - dioxanne.

(▲) avant dialyse
(●) après dialyse.

Le tableau V-6 donne pour les mêmes conditions de solvant et de pH les valeurs de A_3 , A et A_3/A_1 (tels qu'ils ont été définis plus haut) en supposant trois à six molécules d'eau liées à chaque résidu sous forme acide.

Par rapport aux résultats obtenus en milieu basique on note un certain nombre de différences (Figure V-12) :

. alors qu'on observait après un maximum à 10 %, une diminution puis une inversion de solvatisation préférentielle, on constate ici une solvatisation préférentielle de dioxanne qui va croissant à mesure qu'on augmente la composition en dioxanne du solvant.

. la solvatisation absolue par le dioxanne exprimée par A_3 augmente rapidement dans le domaine considéré. A composition

Fraction en volume de dioxanne	$A_1 = 3$ moles/résidu = 0,42 g/g			$A_1 = 4$ moles/résidu = 0,56 g/g		
	A_3 g/g	A g/g	A_3/A_1	A_3 g/g	A g/g	A_3/A_1
0	0	0,42	0	0	0,56	0
10	0,24	0,66	0,57	0,25	0,81	0,45
20	0,34	0,76	0,81	0,37	0,93	0,66
30	0,52	0,94	1,24	0,58	1,14	1,04
33	0,88	1,30	2,10	0,95	1,51	1,70

Fraction en volume de dioxanne	$A_1 = 5$ moles/résidu = 0,70 g/g			$A_1 = 6$ moles/résidu = 0,84 g/g		
	A_3 g/g	A g/g	A_3/A_1	A_3 g/g	A g/g	A_3/A_1
0	0	0,70	0	0	0,84	0
10	0,27	0,97	0,39	0,28	1,12	0,33
20	0,40	1,10	0,57	0,44	1,28	0,52
30	0,64	1,34	0,91	0,70	1,54	0,83
33	1,03	2,03	1,47	1,10	1,94	1,31

Tableau V-6. Paramètres de solvation du PLGA en mélanges eau - dioxanne à pH 4,5.



identique du solvant, elle est de 1 à 2 fois plus importante qu'en milieu basique ce qui signifie que le dioxanne est un meilleur solvant de l'hélice que de la chaîne. La solvation par le dioxanne est peu sensible au nombre supposé de molécules d'eau d'hydratation.

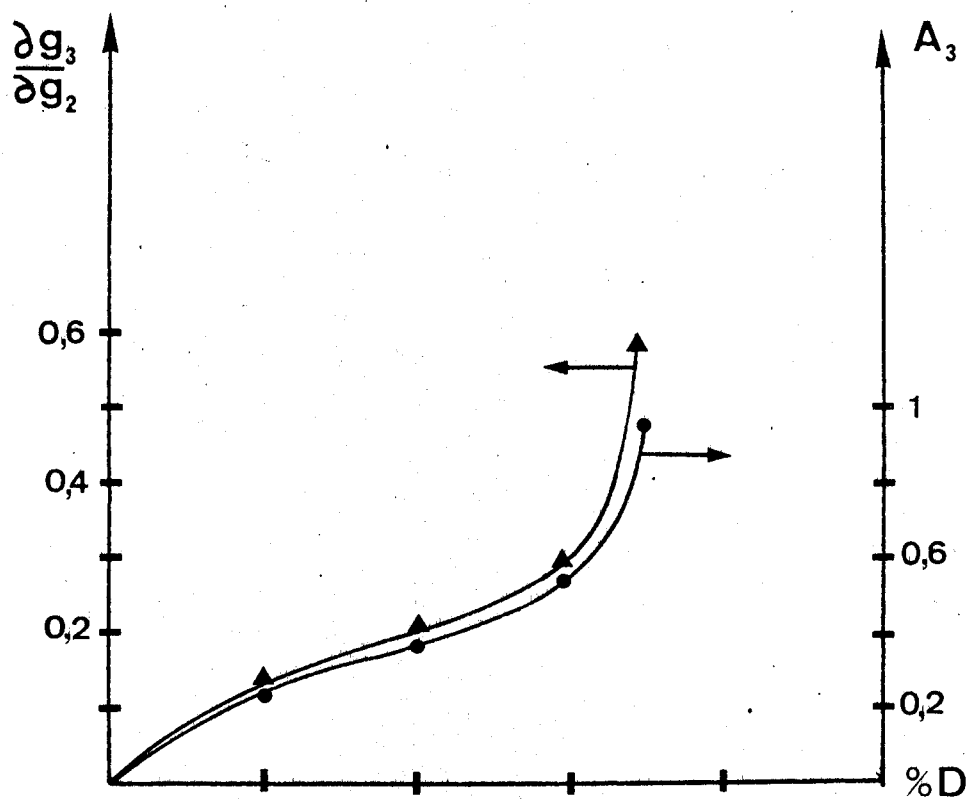


Figure V-12. Variation de A_3 et de $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_\mu$ pour le PLGA dans les mélanges NaCl 0,2 M - dioxanne en milieu acide pH 4,5.

2 - Mesures à pH variable

Un certain nombre de mesures ont été faites à différents pH afin de voir si l'adsorption préférentielle sur l'hélice de PLGA est sensible aux variations de pH. Ces mesures ont été faites aux pH 4,5 ; 4,8 et 5,15 pour une composition de 33 % en dioxanne. Les résultats obtenus apparaissent dans le tableau V-7.

pH	$(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{m_3}$	$(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{\mu_3}$	$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$
4,5	0,085	0,129	0,664
4,8	0,089	0,140	0,770
5,15	0,089	0,120	0,468

Tableau V-7. Paramètres d'interactions dans le système PLGA - eau - dioxanne à différents pH (mélange contenant 33 % en dioxanne).

Les calculs ont été effectués en utilisant les valeurs $\bar{v}_3 = 0,927$ ml/g et $(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{m_2} = 0,097$ ml/g

Les résultats obtenus montrent que le degré de solvatation préférentielle par le dioxanne est peu sensible au pH entre pH 4,5 et pH 5,15 c'est-à-dire dans le domaine où le PLGA est sous forme hélicoïdale. On trouve alors 1,2 à 1,8 moles de dioxanne et 5 à 6 moles d'eau par résidu dans la couche de solvatation du polymère.

COMPARAISON AVEC LE SYSTEME

POLY [N⁵ (3 HYDROXYPROPYL) L GLUTAMINE] EAU - DIOXANNE.

La comparaison avec les résultats obtenus par INOUE et IZUMI sur la poly [N⁵ (3 hydroxypropyl) L glutamine] (PHPG) (25) est intéressante car c'est avec le PLGA le seul homopolypeptide ayant fait l'objet d'une étude de solvatation en mélange eau - dioxanne.

Discussion

INOUE et IZUMI ont déterminé par réfractométrie le coefficient de solvatation préférentielle $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$. Ils ont d'autre part mesuré selon la méthode de KUNTZ par RMN la solvatation et l'hydratation absolues A_3 et A_1 . Nous avons vu que ces trois

coefficients sont liés par la relation V-22 :

$$\frac{\partial g_3}{\partial g_2} = A_3 - A_1 g_3$$

Les trois termes expérimentaux obtenus par deux méthodes différentes doivent donner des résultats cohérents.

Dans un premier temps nous avons calculé à partir des valeurs expérimentales de A_1 et de $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ la valeur de A_3 qui peut être comparée à la valeur expérimentale. Ce processus est celui qui a été utilisé par INOUE et TIMASHEFF (21-24) et par nous-même (46).

Dans un second temps nous avons calculé à partir des valeurs expérimentales de A_1 et A_3 la valeur de $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ qui peut être comparée à la valeur expérimentale.

Le résultat de ces calculs est donné dans les tableaux V-8 et V-9.

% v/v de dioxanne	g_3	A_1 exp.	$\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ exp.	A_3 calc.	A_3 exp.
0	0	0,35			
10	0,11	0,32	- 0,13	- 0,095	+ 0,023
20	0,25	0,28	- 0,57	- 0,500	+ 0,042
40	0,67	0,24	- 0,98	- 0,819	+ 0,037
52	1,09	0,26	- 1,40	- 1,117	+ 0,048
60	1,50	0,21	- 1,31	- 0,995	+ 0,040

Tableau V-8. Calcul de A_3 à partir des valeurs expérimentales de A_1 et $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$. Comparaison avec la valeur expérimentale.

% V/V de dioxanne	g_3	A_1 exp.	A_3 exp.	$\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ calc.	$\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ exp.
0	0	0,35			
10	0,11	0,32	0,023	- 0,012	- 0,130
20	0,25	0,28	0,042	- 0,028	- 0,570
40	0,67	0,24	0,037	- 0,124	- 0,980
52	1,09	0,26	0,048	- 0,235	- 1,400
60	1,50	0,21	0,040	- 0,275	- 1,310

Tableau V-9. Calcul de $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ à partir des valeurs expérimentales de A_1 et A_3 . Comparaison avec la valeur expérimentale.

L'examen du tableau V-9 montre que les valeurs calculées de $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ sont de cinq à vingt fois plus faibles que les valeurs expérimentales. Cependant le signe de $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ est toujours négatif ce qui confirme l'existence d'une hydratation préférentielle dans tout le domaine de composition en dioxanne étudié.

Par contre le tableau V-8. donne des valeurs de A_3 calculées qui sont négatives ce qui est impossible. Le terme $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ est négatif tandis que $A_1 g_3$ est positif. Si A_3 est négatif c'est que $\left| \frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right|$ est surestimé ou que $A_1 g_3$ c'est-à-dire A_1 est sous estimé. Les valeurs de $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ déterminées par réfractométrie différentielle sont, d'une manière générale en bon accord avec celles obtenues par diffusion de lumière. Elles paraissent donc dignes de confiance.

Il semble alors que les valeurs négatives de A_3 obtenues par le calcul soient dues à une valeur trop faible de A_1 . Cependant un calcul analogue aux précédents montre que pour qu'il y ait accord entre les valeurs de $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$, A_3 et A_1 il faut que A_1 soit compris entre 1 et 2 grammes d'eau par gramme de

polymère selon la composition du solvant. Cela correspond, dans le cas de la PHPG à 10 à 20 moles d'eau par résidu ce qui paraît excessif. La valeur trouvée par INOUE et IZUMI dans l'eau pure (0,35 g/g c'est-à-dire 3,5 moles d'eau par résidu) semble au contraire raisonnable si l'on tient compte des valeurs proposées plus haut : une à deux moles d'eau par groupe peptidique et une mole d'eau par groupe hydroxyle ⁽³⁵⁾. On obtient alors pour l'ensemble du résidu trois à cinq moles d'eau puisque la PHPG contient deux groupes peptidiques par résidu.

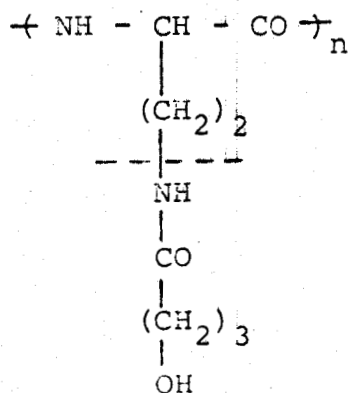
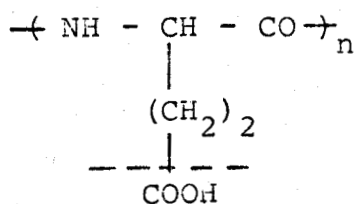
Il semble donc difficile d'expliquer la différence observée entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales.

Comparaison entre PHPG et PLGA dans le mélange eau/dioxanne.

Le système PHPG - eau-dioxanne s'apparente au système PLGA - eau - dioxanne en milieu basique car on observe dans les deux cas une transition chaîne hélice induite par le solvant. Il s'apparente aussi au système PLGA eau dioxanne en milieu acide dans la mesure où les deux polypeptides sont non ionisés. Cependant le PLGA ne subit alors aucune transition conformationnelle.

On note entre les deux systèmes certaines différences :

- La PHPG est préférentiellement hydratée dans tout le domaine de composition en dioxanne étudié tandis que le PLGA en milieu basique subit une inversion de solvation juste avant le début de la transition chaîne hélice. Le comportement de la PHPG est voisin de celui du PLGA en milieu acide à la différence près que c'est le dioxanne qui solvate préférentiellement le PLGA dans tout le domaine de composition étudié. Si l'on examine la structure chimique des deux polymères, on voit qu'ils diffèrent par le remplacement d'un groupe COOH par un groupe $\text{NH} - \text{CO} - (\text{CH}_2)_3 - \text{OH}$.



Le degré d'hydratation des groupes OH et COOH est respectivement de une mole ⁽³⁵⁾ et de deux à cinq moles selon les auteurs.

C'est donc l'introduction d'un groupe peptidique dans la chaîne latérale qui serait responsable de l'hydratation préférentielle observée dans le cas de la PHPG.

- La solvatisation absolue de la PHPG par le dioxanne augmente rapidement entre 0 et 20 % en dioxanne c'est-à-dire avant la transition puis reste approximativement constante entre 20 et 60 % en dioxanne au cours de celle-ci. Dans le cas du PLGA en milieu basique on observe également une augmentation de la solvatisation avant la transition mais il s'y ajoute un nouvel accroissement de celle-ci lors de la transformation en hélice.

De plus la solvatisation absolue de la PHPG par le dioxanne est très faible et ne dépasse par 0,1 mole par résidu de polymère tandis que dans le cas du PLGA elle atteint environ 1 mole par résidu.

Ces différences pourraient être interprétées en supposant que le dioxanne vient se fixer au niveau du groupement carboxylique chargé. Cela justifierait la faible solvatisation de la PHPG liée au fait qu'elle ne contient pas de groupe ionisé. Cependant si le dioxanne se fixe effectivement au niveau du groupement carboxylique ionisé, on comprend mal pourquoi la solvatisation par le dioxanne est aussi importante lorsque le PLGA est sous forme acide non ionisée. On est alors conduit à penser que la localisation du dioxanne sur le résidu est différente selon que le polymère est ionisé ou non. Il est probable que sous

la forme ionisée, le polymère est solvatoé essentiellement au niveau du groupe carboxylique tandis que sous sa forme non ionisée (conformation hélicoïdale) il est solvatoé essentiellement au niveau de la chaîne polypeptidique ce qui est en bon accord avec les résultats de l'étude viscosimétrique.

CONCLUSION

Les résultats ci dessus montrent qu'en milieu basique la solvatoation absolue par le dioxanne accompagne la transition chaîne \rightleftharpoons hélice induite par le solvant. Les valeurs numériques de la solvatoation par le dioxanne dépendent des hypothèses faites sur le degré d'hydratation du polymère. Cependant l'allure des courbes donnant la solvatoation absolue n'en dépend pas d'une manière critique que ce soit en milieu basique ou acide. Les hypothèses de base qui consistent à attribuer huit molécules d'eau d'hydratation pour un groupe carboxylique chargé et 3 à 6 moles pour un groupe carboxylique non chargé sont étayées par les résultats de RMN ⁽³⁵⁾ et de proche infra-rouge ⁽³⁹⁾. Seule est mal connue la manière dont évolue cette hydratation lorsque la composition du solvant est modifiée.

Pour préciser ce point et déterminer la solvatoation par le solvant organique la méthode par RMN proposée par KUNTZ ⁽³⁵⁾ et utilisée par INOUE et IZUMI ⁽²⁵⁾ paraît séduisante. Cependant, sur le plan pratique, son intérêt semble assez réduit car il est nécessaire que le solvant organique ait un point de fusion assez proche de celui de l'eau. De plus l'interprétation des résultats expérimentaux est délicate.

C O N C L U S I O N

CONCLUSION

La plupart des résultats obtenus dans ce travail peuvent être interprétés en tenant compte de la solvatation préférentielle du polypeptide, sous ses deux conformations, par l'un ou l'autre des constituants du mélange eau-dioxanne.

L'étude viscosimétrique montre que dans la conformation hélicoïdale, la rigidité de la molécule d'acide polyglutamique est augmentée par l'addition de dioxanne à la solution. Cela se traduit par l'augmentation du coefficient a de MARK-HOUWINK ou par l'augmentation de la longueur de persistance. Nous avons attribué cet effet à une augmentation du nombre de liaisons hydrogène intramoléculaires due à la présence du dioxanne au voisinage de la molécule.

Nous avons vu que les résultats de viscosité obtenus pour l'hélice de PLGA en solution dans le mélange NaCl 0,2 M - dioxanne (2/1) pouvaient être interprétés en attribuant à la molécule un diamètre hydrodynamique important de 20 à 25 Å. Les mesures de solvatation montrent que, dans ces conditions, la molécule est fortement solvatée. La couche de solvatation contient en effet 1,5 mole de dioxanne pour 5 moles d'eau. La constante diélectrique de la couche de solvatation est alors de 30 tandis que la constante diélectrique "externe" est de 53. Un diamètre hydrodynamique important est concevable si le dioxanne est localisé au niveau de la chaîne latérale. Or la comparaison des résultats obtenus en milieu acide et basique (forme hélice et forme désordonnée) suggèrent qu'en milieu acide, le dioxanne est localisé au niveau du groupe peptidique. Dans ce cas, le diamètre hydrodynamique doit être peu modifié, en raison de la longueur de la chaîne latérale.

L'étude de la solvatation du PLGA montre qu'il existe effectivement une solvatation préférentielle de dioxanne dans tout le domaine de composition en dioxanne que nous avons étudié.

De plus la solvataion préférentielle et la solvataion absolue par le dioxanne augmentent rapidement lorsque la solution est enrichie en dioxanne. Lorsque la composition du solvant passe de 30 à 33 % en dioxanne, le pourcentage de dioxanne dans la couche de solvataion grimpe de 46 à 58 %. Simultanément on observe dans ces conditions une brusque augmentation de la viscosité intrinsèque.

Lorsque la molécule adopte une conformation désordonnée, en milieu basique, l'addition de dioxanne entraîne une forte diminution de l'expansion du polymère. Nous avons expliqué cela par la formation de paires d'ions entre les groupes carboxyliques et les contre ions. Ceci est facilité par la diminution de la constante diélectrique du milieu. L'étude de la solvataion montre qu'il y a solvataion préférentielle par le dioxanne dans le domaine des faibles concentrations en dioxanne. De plus l'adsorption absolue de dioxanne sur le polymère est importante lorsque celui-ci est sous forme désordonnée.

Nous pouvons avancer que l'adsorption du dioxanne sur le PLGA ionisé se fait en deux temps. Tout d'abord, au début, le dioxanne se fixe au niveau des groupes carboxyliques chargés pour diminuer la constante diélectrique locale et également l'énergie électrostatique globale du système. Puis quand on continue d'ajouter le dioxanne, il s'adsorbe sur le reste du résidu glutamique et la transition induite par le solvant se produit. Les résultats obtenus indiquent que la localisation des molécules de solvant fixées dépend de la conformation du polypeptide.

L'étude potentiométrique montre que l'addition de dioxanne aux solutions aqueuses de PLGA se traduit par une augmentation de l'énergie libre de transition induite par le pH. Cela signifie une stabilité plus grande de l'hélice α en mélange eau - solvant organique. L'étude en fonction de la température montre que cette stabilisation a une origine entropique. Dans les milieux riches en dioxanne, l'entropie de transition est nulle et la dispersion optique rotatoire montre que la conformation du polymère est peu sensible à la température dans les mélanges eau - dioxanne et eau - 2 chloroéthanol. Il faut cependant

remarquer que l'entropie de transition déterminée par potentiométrie concerne la transition entre conformères non chargés tandis que la dispersion optique rotatoire met en évidence la transition entre conformations vraies et tient compte des effets électrostatiques.

En absence de sel, on observe une transition induite par le solvant qui se manifeste par une variation de l'énergie de transition ΔF^0 . Les mesures de solvation montrent qu'au cours de cette transition une demi-mole environ de dioxanne s'adsorbe sur un résidu. Cependant, une interprétation quantitative de ces résultats est très délicate et nous nous limiterons à cette corrélation qualitative entre les mesures d'énergie de transition et la solvation.

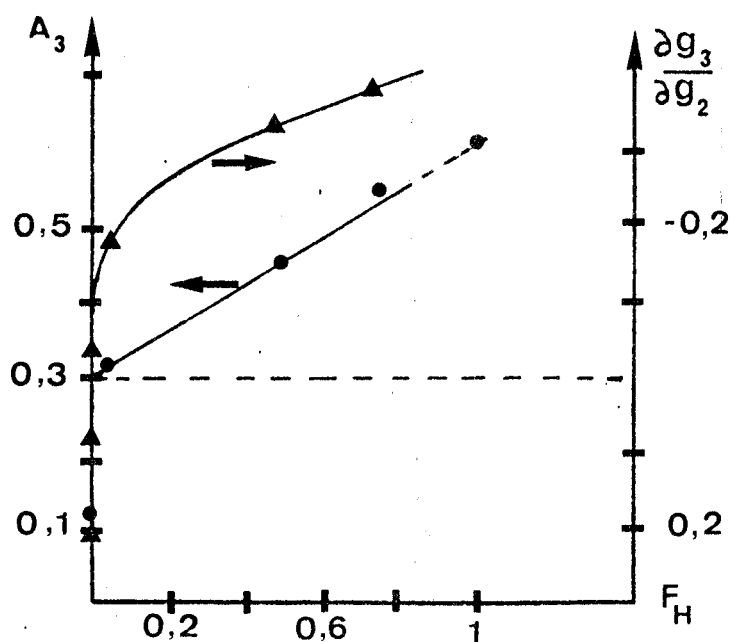
Dichroïsme circulaire.

Pour l'un de nos échantillons, la transition induite par le solvant a lieu à 40 % de dioxanne tandis que pour d'autres, elle se produit à 60 %. Nous n'avons pu trouver d'explication à cela. Seule une éventuelle différence de polydispersité pourrait justifier ces résultats. Une étude sur plusieurs échantillons de même masse moyenne mais de polydispersités différentes serait nécessaire pour résoudre ce problème.

La transition induite par le solvant se produit à des pourcentages en volume différents selon le solvant utilisé. Il est tentant de chercher à établir, à partir des mesures de solvation, une corrélation entre la transition et la constante diélectrique locale de la couche de solvation. On devrait dans ce cas obtenir une courbe de transition unique en traçant l'hélicité en fonction de la constante diélectrique de la couche de solvation.

Malheureusement l'échantillon pour lequel nous disposons de données sur la solvation se différencie des autres au point de vue transition induite par le solvant. De plus il faudrait disposer de données de solvation sur plusieurs systèmes eau - solvant organique. (Les mesures que nous avons faites sur le système PLGA - eau - chloroéthanol n'ont donné aucun résultat exploitable)

L'évolution des spectres dichroïques au cours du temps peut également être interprétée à partir des mesures de solvation préférentielle. La figure ci-dessous représente la variation du coefficient de solvation préférentielle $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ et de l'adsorption absolue de dioxanne A_3 en fonction de l'hélicité du polymère.



Variation du coefficient d'adsorption préférentielle $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ et de l'adsorption absolue A_3 en fonction de l'hélicité.

On distingue deux domaines dans lesquels le polymère est solvato préférentiellement par l'eau ou le dioxanne.

- Lorsque $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ est positif (solvation préférentielle par le dioxanne), la couche de solvation est plus riche en dioxanne. Si un phénomène de diffusion intervient, il va tendre à faire migrer le dioxanne vers le solvant et l'eau vers le polymère de manière à équilibrer les potentiels chimiques de chaque solvant dans les deux domaines. Nous avons vu que l'augmentation d'hélicité est associée à l'augmentation de la quantité de dioxanne dans la couche de solvation. Inversement une diminution

de la quantité de dioxanne dans cette couche doit tendre vers une diminution de l'hélicité. Comme le polymère est déjà sous forme entièrement désordonnée, la diffusion n'entraîne aucun changement de conformation. C'est pourquoi les spectres dichroïques correspondant aux solutions riches en eau (là où il y a solvation préférentielle par le dioxanne) ne présentent aucune évolution au cours du temps.

- Au point de solvation préférentielle nulle, aucune diffusion n'est possible puisque la couche de solvation et le solvant ont la même composition en dioxanne.

- Lorsque $\frac{\partial g_3}{\partial g_2}$ est négatif, le polymère est solvato préférentiellement par l'eau et ce, de plus en plus à mesure que la composition en dioxanne du solvant augmente. Comme la couche de solvation est plus riche en eau qu'en dioxanne, il va y avoir diffusion du dioxanne du solvant vers la couche de solvation. C'est la solvation préférentielle qui est à l'origine de la diffusion observée.

- La diffusion entraîne une augmentation de la quantité absolue de dioxanne présent dans la couche de solvation. Or la quantité absolue de dioxanne adsorbé sur le polymère est liée à la teneur en hélice de ce dernier.

Dans ces conditions la diffusion du dioxanne vers la couche de solvation doit s'accompagner d'une augmentation de l'hélicité au cours du temps ce qu'on observe effectivement par dichroïsme circulaire.

L'augmentation au cours du temps de l'hélicité des polypeptides dans des mélanges eau - solvant organique n'a été observée jusqu'à présent que dans le cas de polypeptides à chaîne latérale ionisable. Cette évolution peut simplement avoir pour origine l'existence d'un domaine d'hydratation préférentielle, mais elle peut également être due à l'existence des charges portées par le polymère. La réponse à cette question nécessite l'étude de la solvation de polypeptides non ionisables en mélanges eau - solvant organique. Cela permettrait également de

préciser le rôle de la force ionique. En effet, si la présence de sel modifie simplement la structure de l'eau, l'évolution de systèmes non ionisables devrait également être sensible à la force ionique. Au contraire si le sel modifie les interactions électrostatiques au niveau des groupes chargés, l'évolution de systèmes non ionisables devrait être insensible à la force ionique.

A N N E X E

P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

MESURES DE VISCOSITE.

Les solutions utilisées pour les mesures de viscosité ont été préparées de la manière suivante : Une quantité de polymère pesée exactement, est dissoute dans une solution de NaCl 0,2 M contenant de la soude en quantité nécessaire pour neutraliser les fonctions acides. Lorsque le PLGA sous forme acide est lyophilisé, nous avons vérifié par dosage avec une solution titrée de soude, qu'il n'y a pas de molécule d'eau de cristallisation. Dans le cas où le solvant est un mélange d'eau et de solvant organique, un volume connu de solvant organique est ajouté à la solution. Sa composition sera caractérisée par la fraction en volume de solvant organique. Le pH de la solution est ajusté à la valeur désirée. On complète ensuite avec du solvant. La concentration des solutions utilisées est dans tous les cas de 4 à 5 g/l. Le pH de la solution est alors vérifié.

Avant d'effectuer les mesures, les solutions sont filtrées sur filtre Millipore type Solvinert (diamètre de pore 0,25 μ) dans le cas des solutions purement aqueuses et Mitex (diamètre de pore 5 μ) dans le cas des solutions en mélanges de solvants. Le pH est à nouveau contrôlé après la filtration.

Les mesures de viscosité ont été effectuées à l'aide de viscosimètres de type Ubbelohde thermostatés à $25 \pm 0,01^\circ\text{C}$. A partir du temps d'écoulement du solvant t_0 et du temps d'écoulement t de différentes solutions de concentration C , on trace $\frac{\eta_{sp}}{C} = \frac{t - t_0}{t_0 C}$ où η_{sp} est la viscosité spécifique ou encore $\eta_i = \frac{1}{C} \text{Log} \frac{t}{t_0}$ où η_i est la viscosité inhérente en fonction de C . Dans les deux cas, l'extrapolation à concentration nulle fournit la viscosité intrinsèque $[\eta]$ de la solution.

MESURES DE DICHROISME CIRCULAIRE

DE DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE ET DE SPECTROMETRIE INFRA ROUGE.

A - DICHROISME CIRCULAIRE, DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE.

1 - Mesures en fonction du pH.

Dans ce cas, les solutions ont été préparées comme pour les mesures de viscosité. La concentration des solutions est de l'ordre de 1 g/l. pour le dichroïsme circulaire et de 5 à 7 g/l pour la D.O.R.

Lorsqu'on abaisse le pH à l'aide d'HCl 0,1 N la concentration est corrigée pour tenir compte de la dilution.

2 - Mesures en fonction de la composition du solvant.

Une quantité connue de PLGA est dissoute dans un léger excès de NaOH 0,1 N. Après dissolution complète, la solution est mise en dialyse pour enlever la soude en excès et les traces de sel restant. La solution est ensuite diluée à un volume connu de manière à connaître la concentration exacte qui est aussi de l'ordre de 1 g/l. pour le dichroïsme et de 5 à 7 g/l. pour la D.O.R.

Le copolymère acide glutamique - glutamate de nitro benzyle s'hydrolyse rapidement en présence de soude. Dans ce cas l'échantillon est dissous dans le minimum de NaHCO_3 0,05 N nécessaire pour neutraliser les fonctions acides. La solution obtenue est ensuite dialysée contre l'eau.

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés à l'aide d'un dichrographe Roussel Jouan III équipé d'une source au xénon. Nous avons utilisé des cuves de quartz d'une épaisseur de 0,01 cm, de manière à limiter l'absorption

due au solvant organique vers les courtes longueurs d'onde. Pour éviter l'absorption due au gaz carbonique l'appareil est balayé par un courant d'azote.

L'ellipticité molaire $[\theta]$ se calcule selon la formule suivante :

$$[\theta] = 3300 \frac{M}{Cd} (A_1 - A_r) s$$

où

M est la masse moléculaire du résidu

C est la concentration en g/litre

d est le trajet optique en cm.

$(A_1 - A_r)$ est l'amplitude du signal fourni par l'appareil en mm.

s est la sensibilité de l'appareil.

$[\theta]$ s'exprime ainsi en degrés.cm²/décimole.

Les mesures de dispersion optique rotatoire ont été effectuées à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer modèle 141 MC, en utilisant des cuves de 0,1 et 0,5 dm.

Dans le cas des mesures en fonction de la température, les cuves ont été thermostatées à $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

La mesure fournit l'angle de rotation α et permet de calculer

$$[m']_\lambda = \frac{3}{n^2 + 2} \frac{M_0}{100} \frac{\alpha}{lC}$$

où n est l'indice du solvant (dans le cas des mélanges, nous avons considéré que l'indice est une fonction linéaire de la composition).

M_0 est la masse du résidu

α est l'angle de rotation en degrés

l est le trajet optique en dm.

C est la concentration en g/cm³

B - SPECTRES INFRA ROUGE.

Les spectres I.R. ont été enregistrés à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer modèle 257. Nous avons utilisé comme cellule une cuve à épaisseur variable munie de fenêtres en bromure d'argent. L'échantillon de polymère initialement sous forme acide est dissous dans la soude puis dialysé contre de l'eau renouvelée. La solution obtenue est alors lyophilisée de manière à obtenir le polyglutamate de sodium. Celui-ci est dissous dans l'eau lourde de manière à obtenir une solution à 0,5 % environ utilisée pour enregistrer les spectres infra-rouge.

Pour enregistrer le spectre des précipités de PLGA obtenus dans certaines conditions de solvant, la solution est décantée et le précipité récupéré est lyophilisé. L'échantillon solide sous forme de pâte est alors déposé sur une pastille de bromure de potassium pour enregistrer le spectre.

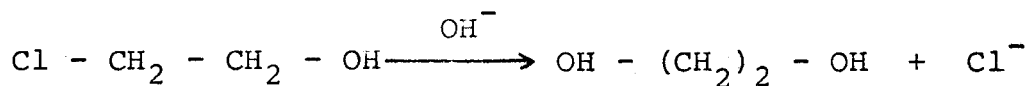
POTENTIOMETRIE

Pour les dosages potentiométriques, 40 mg environ d'échantillon de PLGA sont dissous dans 20 cm³ de solvant. Le solvant est constitué d'eau ou de NaCl 0,2 M éventuellement diluée par une quantité connue de solvant organique. La composition du solvant est alors définie par la fraction en volume de solvant organique dans le mélange. La solution contient de la soude en quantité requise pour neutraliser le PLGA sous forme acide. La solution est contenue dans un vase à titration dans lequel on fait arriver un courant d'azote de manière que le dosage soit fait en atmosphère inerte. La solution est alors dosée par une solution d'HCl 0,1 N dans le même mélange de

solvant, ajoutée grâce à une microburette graduée au 1/100 ml. On effectue également un dosage à blanc sur un volume égal de solvant.

Les mesures de pH ont été effectuées à l'aide d'un pHmètre Radiometer modèle pH M 26 avec expansion d'échelle : La mesure du pH est faite à $\pm 0,01$ unité de pH. Nous avons utilisé une électrode de verre de type G 202 C et une électrode au calomel de type K 101 (Radiometer). Le vase à titration est thermostaté à la température désirée à $\pm 0,1^\circ\text{C}$. L'appareil est standardisé avec des solutions tampons Radiometer de pH 7,00 et 4,01. Seuls ont été retenus les dosages au cours desquels la dérive sur la lecture du pH des tampons était négligeable. En ce qui concerne les mélanges de solvants, aucune correction n'a été faite pour tenir compte de l'activité des ions H^+ dans ces milieux. Les valeurs de pH sont donc des valeurs apparentes dépendant du type de mélange utilisé.

Dans le cas particulier des mélanges eau - chloroéthanol, la solution ne doit contenir aucune trace de soude en excès. En effet la soude hydrolyse le chloroéthanol pour former du glycol selon la réaction :



Dans ce cas, on prépare d'abord une solution aqueuse de PLGA, que l'on dialyse contre l'eau ou NaCl 0,2 M. Cette solution est ensuite diluée avec du chloroéthanol pour obtenir le mélange de composition voulue.

SOLVATATION PREFERENTIELLE

A - INDICES DE REFRACTION DES MELANGES DE SOLVANTS.

Les indices de réfraction des mélanges de solvants ont été mesurés à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe à la longueur d'onde de la raie D du sodium ($\lambda = 5460 \text{ \AA}$) à 20°C . Les indices sont obtenus à $\pm 2 \cdot 10^{-4}$ unités près.

L'indice de réfraction des mélanges eau - dioxanne ne varie pas de manière linéaire avec la composition (voir figure A 1 où Δn est la différence d'indice entre le mélange et l'eau).

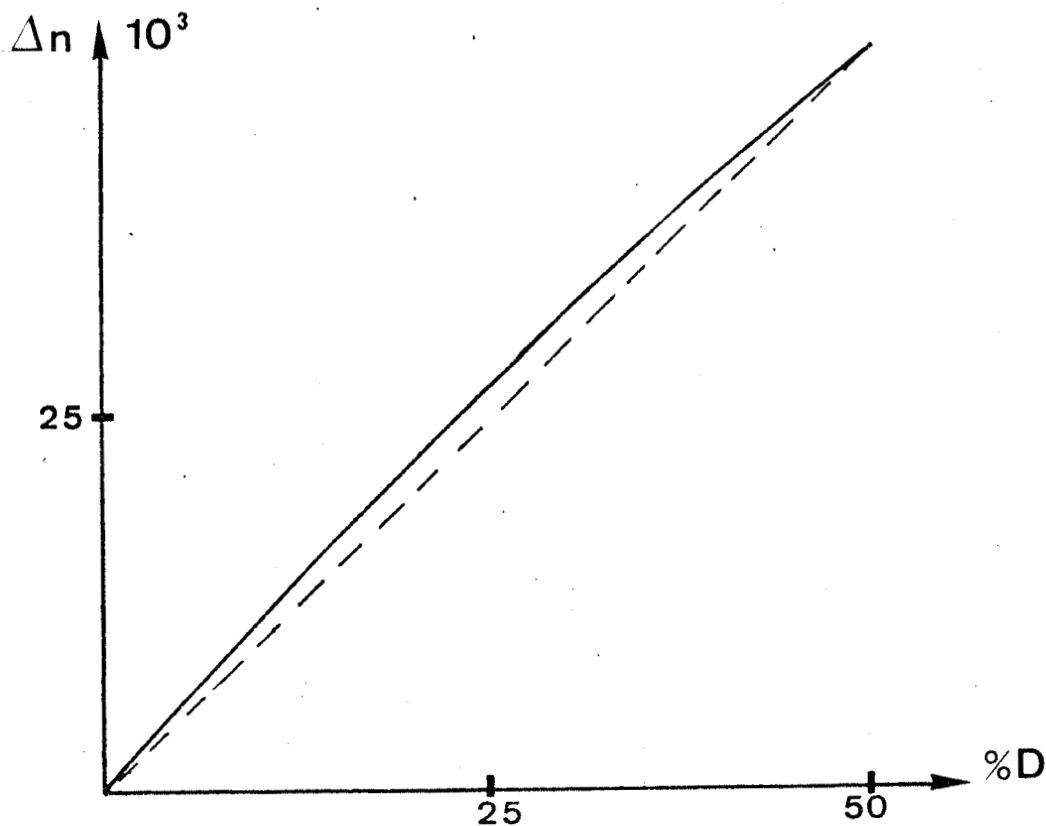


Figure A.1. Variation de l'indice des mélanges eau - dioxanne en fonction de la fraction en volume de dioxanne.

En tout point de la courbe, la pente donne la valeur de l'incrément d'indice de réfraction du mélange de solvant en l'absence de polymère. On suppose que cette valeur n'est pas modifiée par la présence de polymère dans le mélange de solvant. Ceci est justifié puisque les résultats d'adsorption préférentielle sont déterminés après extrapolation à concentration nulle en polymère.

Les valeurs obtenues sont données dans le tableau A 1. ϕ est la fraction en volume de dioxanne dans les mélanges avec l'eau ou NaCl 0,2 M, n_0 est l'indice du mélange de solvants, $\frac{\partial n}{\partial \phi_1}$ est l'incrément d'indice de réfraction du mélange de solvants.

ϕ	n_o	$\frac{\partial n}{\partial \phi}$	$(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{T,P,C_2}$
0	1,3365	0,101	0,098
0,05	1,3416	0,101	0,098
0,1	1,3465	0,104	0,101
0,15	1,3520	0,105	0,102
0,20	1,3571	0,101	0,098
0,25	1,3621	0,101	0,098
0,30	1,3672	0,101	0,098
0,333	1,3705	0,100	0,097

Tableau A.1.a. Valeurs de l'indice et de l'incrément d'indice des mélanges NaCl 0,2 M/Dioxanne en fonction de la fraction en volume de dioxanne.

ϕ	n_o	$\frac{\partial n}{\partial \phi}$	$(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{T,P,C_2}$
0	1,3345	0,101	0,098
0,05	1,3401	0,101	0,098
0,1	1,3445	0,103	0,100
0,2	1,3549	0,103	0,100
0,3	1,3646	0,100	0,097
0,4	1,3744	0,100	0,097
0,45	1,3791	0,095	0,092
0,50	1,3836	0,094	0,091

Tableau A.1.b. Valeurs de l'indice et de l'incrément d'indice des mélanges eau - dioxanne en fonction de la fraction en volume de dioxanne.

Les valeurs de $(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{T,P,C_2}$ qui est l'incrément d'indice du mélange de solvants lorsque la concentration est exprimée en grammes par millilitre de solution, sont également portées dans le tableau A.1.

$(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{T,P,C_2}$ et $(\frac{\partial n}{\partial \phi})$ sont liés par la relation :

$$(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{T,P,C_2} = \frac{1}{\rho} (\frac{\partial n}{\partial \phi}) \quad \text{car } C_3 = \phi \rho$$

Dans cette relation, ρ est la masse volumique du solvant organique. Pour le dioxanne $\rho = 1,0335$ à 20° d'où

$$(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{T,P,C_2} = 0,9676 (\frac{\partial n}{\partial \phi})$$

B - PREPARATION DES SOLUTIONS DE POLYMERE.

1 - Solutions non dialysées.

Une quantité pesée de polymère sous forme acide est dissoute dans la quantité de soude 0,1 N nécessaire pour salifier les fonctions acides. On ajoute ensuite la quantité nécessaire d'eau (ou de NaCl 0,2 M) ainsi que de dioxanne pour avoir à la fois la concentration désirée en polymère et la composition désirée du solvant.

Le polymère n'est pas soluble directement en milieu acide dans le mélange de solvants. Il faut donc procéder comme ci dessus puis abaisser le pH de la solution à la valeur désirée avec HCl 0,1 N.

Dans les deux cas nous avons utilisé des solutions mères dont la concentration est d'environ $6 \cdot 10^{-3}$ g/ml. Chaque solution mère est ensuite diluée avec le solvant de même composition de manière à obtenir cinq à six solutions dans le domaine de concentration de 1 à $6 \cdot 10^{-3}$ g/ml.

La mesure des incréments d'indice sur les solutions non dialysées fournit l'incrément d'indice de réfraction du polymère à molalité constante m_3 du solvant 3 (dioxanne) : $(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{T,P,m_3}$

2 - Solutions dialysées.

Les solutions destinées à être dialysées sont préparées comme ci dessus. On dispose alors de trois ou quatre solutions de polymère à des concentrations variables dans le même solvant. Ces solutions vont être dialysées contre le solvant de même composition.

Les dialyses sont effectuées de la manière suivante :

a - Conditionnement des membranes

On utilise comme sacs à dialyse des membranes semi-perméables (Union Carbide Co.). Les membranes sont conditionnées en les immergeant à l'avance dans le mélange de solvants qui sera utilisé pour la dialyse. Ce solvant est renouvelé plusieurs fois.

b - Dialyse

Les sacs à dialyse contenant les différentes solutions sont immergés dans un large excès du solvant de même composition. L'éprouvette contenant les sacs à dialyse et le solvant est hermétiquement fermée avec une membrane de Parafilm (Marathon Division, American Can Co) et du ruban adhésif. L'ensemble est mis sous agitation.

Afin que les mesures soient correctes, il faut s'assurer que la durée de la dialyse est suffisante pour atteindre l'équilibre du système considéré. Une étude de ce problème a été faite par TUZAR et KRATOCHVIL ⁽¹⁾. Le temps de dialyse nécessaire dépend en particulier de la nature du polymère et des solvants employés, du rapport entre le volume de solution et le volume du solvant, ainsi que du type de membrane utilisée. Ce temps peut varier de quelques heures à plusieurs jours selon les conditions expérimentales. Dans la pratique on mesure n en fonction du temps jusqu'à atteindre une valeur constante (voir figure A.2)

Dans notre cas l'équilibre est toujours atteint au bout de 12 h de dialyse.

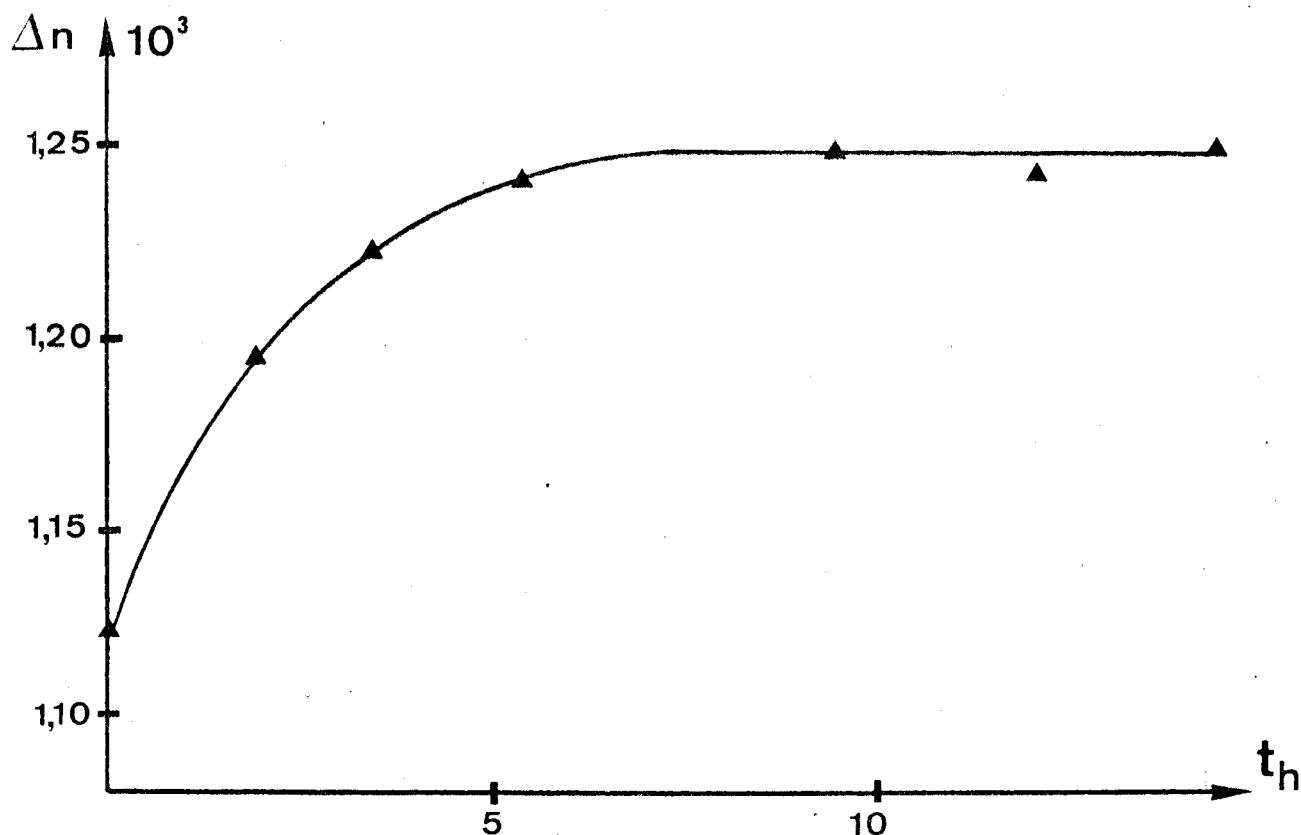


Figure A.2. Vitesse d'établissement de l'équilibre de dialyse :
Système PLGA/NaCl 0,2 M/Dioxanne (90/10).

C - MESURE DES INCREMENTS D'INDICES DE REFRACTION DES SOLUTIONS
DE POLYMERES.

Les incréments d'indices de réfraction des solutions de polymère ont été mesurés à l'aide d'un réfractomètre différentiel Brice-Phoenix BP 2000 ⁽²⁾. L'appareil est équipé d'une lampe à vapeur de mercure et d'un filtre vert qui sélectionne la longueur d'onde $\lambda = 5461 \text{ \AA}$.

La partie essentielle de l'appareil est une cuve thermostatée séparée en deux compartiments, l'un contenant la solution, l'autre contenant le solvant. Le principe de la mesure consiste à mesurer la déviation du faisceau lumineux provoquée par la différence d'indice de réfraction entre la solution et le solvant. Cette déviation Δd est liée à l'incrément d'indice Δn par la relation :

$$\Delta n = k \Delta d$$

où k est la constante de l'appareil.

Cette constante est déterminée en mesurant à la même température la déviation Δd pour des solutions dont l'incrément d'indice est parfaitement connu (Voir par exemple M.B. HUGLIN dans "Light Scattering from polymer solutions" pages 181 et 182)⁽³⁾

Dans notre cas l'appareil a été étalonné avec des solutions de chlorure de sodium. La constante k est égale à $0,983 \cdot 10^{-3}$.

Pour déterminer l'incrément d'indice du polymère $(\frac{\partial n}{\partial C})$ on mesure la quantité Δn pour différentes solutions de polymère de concentration variable. On trace ensuite Δn en fonction de C . En toute rigueur l'incrément d'indice doit être mesuré à concentration nulle. C'est donc la pente de la courbe à l'origine, pour $C = 0$: $(\frac{\partial n}{\partial C})_{C \rightarrow 0}$. Cependant comme le tracé de Δn en fonction de C est généralement une droite l'incrément d'indice est constant dans le domaine de concentration utilisé c'est-à-dire entre zéro et $6 \cdot 10^{-3}$ g/ml.

Mesures des incréments d'indice des solutions dialysées.

Lorsque l'équilibre de dialyse est atteint, l'éprouvette est ouverte, le solvant est prélevé à l'aide d'une seringue et introduit dans un des compartiments du réfractomètre. Le sac à dialyse est ouvert et la solution est transférée immédiatement dans le second compartiment pour éviter tout changement de composition. Les deux compartiments sont fermés de manière étanche par une pellicule de Parafilm et un bouchon de téflon. (figure A.3.).

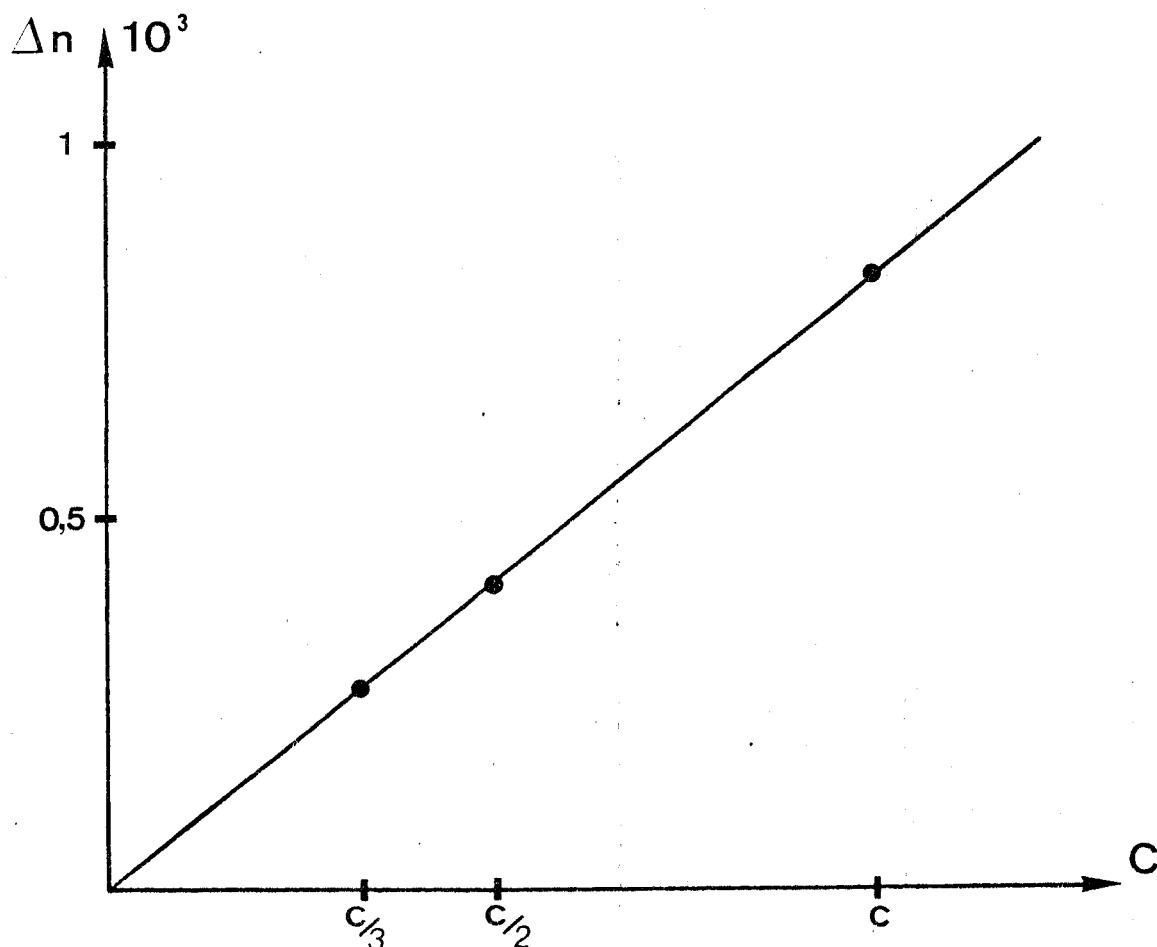


Figure A.3. Variation de l'indice de réfraction de solutions dialysées en fonction de la concentration. Système PLGA/NaCl 0,2 M/Dioxanne (67/33) pH 5,15.

La figure A₃ montre sur l'exemple du système PLGA - NaCl 0,2 M - Dioxanne (67 : 33 % en v/v) pH 5,15 que les points expérimentaux sont alignés ce qui confirme que l'équilibre de dialyse a été atteint pour chacune des solutions.

Les résultats expérimentaux fournissent alors la valeur de $(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{T,P,\mu_3}$ qui est l'incrément d'indice de réfraction de la solution de polymère à potentiel chimique constant du composant 3.

D - VOLUME SPECIFIQUE PARTIEL DU DIOXANNE DANS LES MELANGES EAU-DIOXANNE.

Pour déterminer les valeurs du volume spécifique partiel \bar{v}_3 du dioxanne, nous avons utilisé les résultats expérimentaux de MALCOLM et ROWLINSON (4).

La figure A.4. représente le volume molaire partiel d'excès de l'eau et du dioxanne en fonction de la fraction molaire de dioxanne.

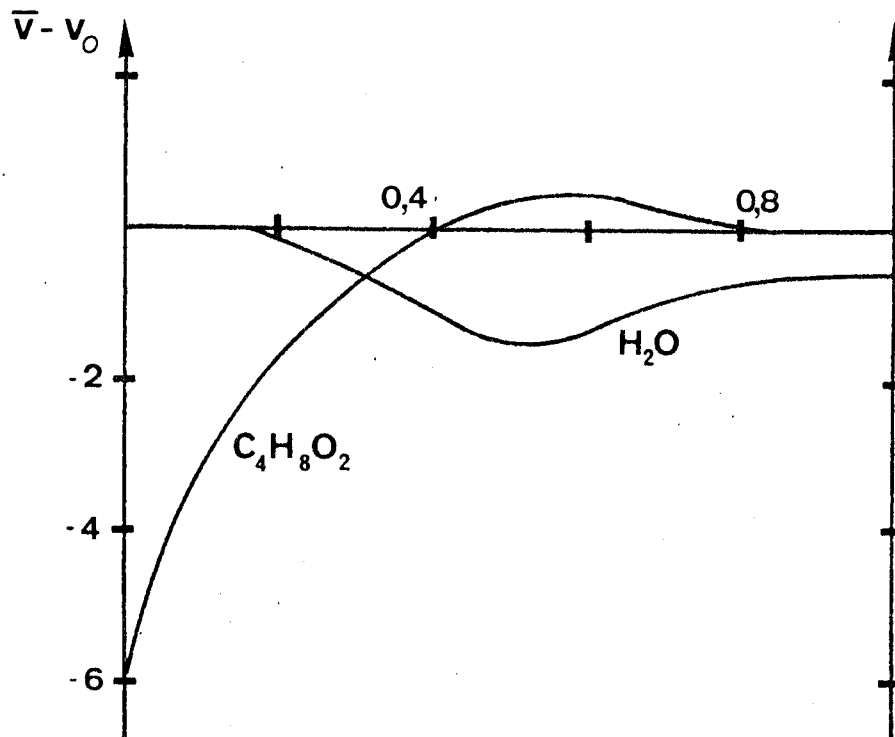


Figure A.4. Variation du volume d'excès du mélange eau - dioxanne d'après MALCOLM et ROWLINSON⁽⁴⁾.

Pour chaque solvant le volume partiel molaire d'excès est la différence entre le volume partiel pour une composition donnée du mélange et le volume molaire du solvant pur.

Le domaine de composition en dioxanne utilisé (de 0 à 50 % en volume) correspond à une fraction en mole variant entre 0 et 0,17. Entre ces deux valeurs la courbe de la figure A.4 est monotone.

Les valeurs de \bar{v}_3 sont données dans le tableau A.2.

Fraction en volume de dioxanne	Volume spécifique partiel du dioxanne \bar{v}_3 (en ml/g)
0	
5	0,909
10	0,911
15	0,914
20	0,917
30	0,925
40	0,931
45	0,936

Tableau A.2. Volume spécifique partiel du dioxanne en mélange
eau - dioxanne.



	Eau	Dioxanne	2 Chloroéthanol
Masse molaire	18	88	80,5
Indice de réfraction à 25° ($\lambda = 5461 \text{ \AA}$)	1,3340	1,4218	1,4419
Poids volumique à 25°C g/ml	0,997	1,028	1,1966
Constante diélectrique à 25°C	78,3	2,2	25,8
Volume molaire ml/mole	18,05	85,6	67,27
Volume spécifique ml/g	1,0028	0,9727	0,8357

Tableau A.3. Caractéristiques physiques des solvants utilisés.

