

**Experiment title:**Nanostructure et organisation colloïdale  
de nanoparticules de cyclodextrines amphiphiles**Experiment  
number:**

02-01-775

**Beamline:**

D2AM

**Date of experiment:**from: 15-03-2009 to: 17-09-2009  
02-09-2009 to: 04-09-2009**Date of report:**

10-11-2009

**Shifts:**

6

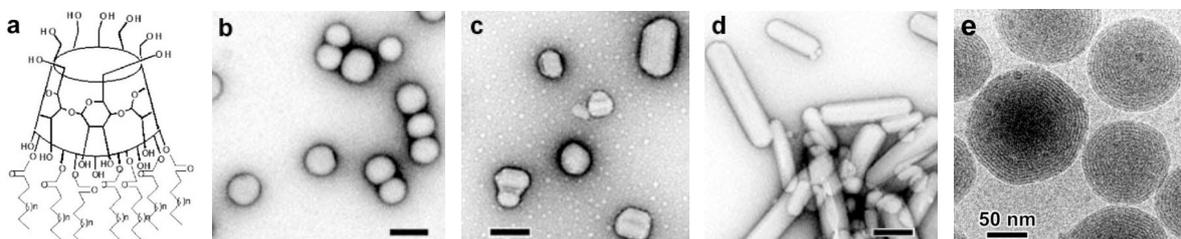
**Local contact(s):**

Cyrille ROCHAS

*Received at ESRF:***Names and affiliations of applicants (\* indicates experimentalists):**J.L. Putaux\*, Y. Nishiyama\*, B. Jean\* - Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, Grenoble  
A. Gèze\*, L. Choissard\*, D. Wouessidjewe\* - Département de Pharmacochimie Moléculaire, Grenoble

## 1. Contexte scientifique des expériences

Ces expériences font suite à celles réalisées durant une première session en Mai 2007 (voir rapport n°01-02-723). Il s'agit d'étudier l'organisation supramoléculaire de cyclodextrines amphiphiles (CDa, Fig. 1a) en suspension dans l'eau. Selon la nature chimique des CD et des chaînes alkyles substituées en face secondaire, les conditions de précipitation et la présence éventuelle d'additifs, ces CDa s'auto-assemblent pour former des nanoparticules aux formes variées (Figs. 1b-d). Ces particules, dont la structure a par ailleurs été étudiée par cryomicroscopie électronique (Fig. 1e), sont des outils intéressants pour la vectorisation de principes actifs.



**Figure 1.** a) Schéma d'une CD acylée en face secondaire; b-d) images de MET de nanoparticules colorées négativement; b)  $\gamma$ -CD-C10 (sphères); c)  $\beta$ -CD-C12 (particules facettées); d)  $\beta$ -CD-C10 avec phospholipides (bâtons). Barres d'échelle : 100 nm; e) image de cryo-MET de nanosphères multilamellaires de  $\beta$ -CD-C10.

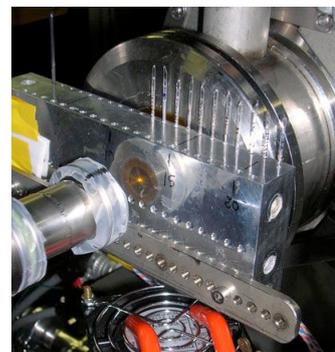
## 2. Méthode expérimentale

• **Echantillons** : Des cyclodextrines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités glycosyles) ont été acylées en face secondaire par voie enzymatique. Les échantillons à base d' $\alpha$ - et  $\gamma$ -CD ont été acylées avec des chaînes en C10. Une série de  $\beta$ -CD-Cn a été préparée avec  $n = 4, 6, 8, 10, 12$  et  $14$ . Les nanoparticules ont été formées par nanoprecipitation après injection dans une phase aqueuse d'une solution acétonique contenant la CD-Cn. Dans certains cas, des additifs (phospholipides, principes actifs, etc.) ont été introduits dans la formulation afin d'évaluer leur impact sur les nanostructures. Près d'une centaine de suspensions ont été préparées pour cette nouvelle série d'expériences. Nous avons aussi caractérisé plusieurs échantillons de poudre sèche de CD-Cn obtenus soit par reprécipitation dans l'acétonitrile soit après filtration sur colonne de silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ).

• **Diffusion des rayons X aux petits et grands angles (SAXS et WAXS)** : Les expériences ont été réalisées sur la ligne BM02 (D2AM) du CRG français. Des capillaires de verre (1,5 mm de diamètre en moyenne) contenant les suspensions colloïdales ou les poudres sèches ont été placés dans des passeurs automatiques. Pour les traitements thermiques, les capillaires ont été scellés à la flamme et placés dans un passeur chauffant (Fig. 2).

Les capillaires ont été chauffés par pas de 10°C, à une vitesse d'environ 3°C/min, depuis la température ambiante jusqu'à 180°C. Tous les 10°C, les spécimens ont été maintenus à température constante durant 10 min afin d'enregistrer les clichés de la série de capillaires.

Les clichés ont été enregistrés à une énergie de 8 keV ( $\lambda=1,5537 \text{ \AA}$ ) au moyen d'un détecteur CCD placé à une distance de 20-25 cm des spécimens, afin d'explorer des domaines de  $q$  correspondant à l'ultrastructure des nanoparticules. Des temps de pause de 50 et 300 s ont été utilisés pour les suspensions et 20 s pour les poudres sèches. Les clichés ont été calibrés au moyen de behenate d'argent.



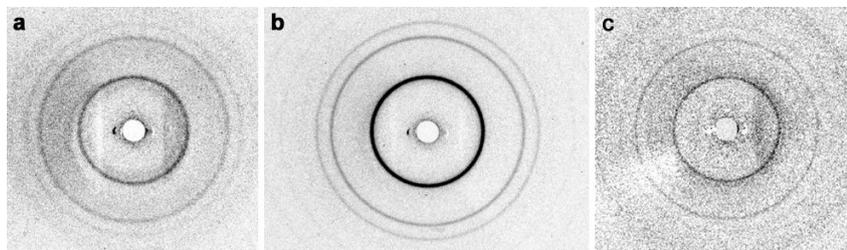
**Figure 2.** Passeur d'échantillons chauffant contenant des capillaires scellés.

### 3. Expériences à température ambiante

#### • CDa seules :

Dans le cas de  $\beta$ -CD-C<sub>n</sub>, les spectres de WAXS n'ont révélé d'organisation au sein des nanoparticules que pour les CD portant des chaînes alkyles de C8 à C14. Les meilleurs spectres contiennent jusqu'à 5 anneaux fins (Fig. 3b) et la série de rapports des diamètres des anneaux ( $1, \sqrt{3}, \sqrt{4}, \sqrt{7}, \sqrt{9}$ ) suggère une organisation hexagonale. Les nouvelles expériences ont permis de confirmer que le paramètre de la maille hexagonale  $a_{\text{hex}}$  calculé à partir de l'anneau 100 croissait linéairement avec le nombre de carbones des chaînes alkyles greffées.

Les spectres d'échantillons à base d' $\alpha$ -CD-C10 peuvent contenir jusqu'à 3 anneaux fins (Fig. 3a) suggérant aussi une phase hexagonale. Selon la formulation, les spécimens à base de  $\gamma$ -CD-C10 présentent différents spectres. Lorsque (rarement) 3 anneaux sont observés, la structure est hexagonale (Fig. 3c). Plus souvent, les spectres présentent 2 anneaux fins ou bien un anneau fin et l'autre diffus. Le rapport des diamètres (environ 1,15) n'a pas encore permis d'identifier la structure. Il est aussi possible que deux formes coexistent. Dans le cas des CDa avec des alkyles en C10, nous n'avons pas établi de relation claire pour décrire l'évolution du paramètre de maille avec la taille de la cyclodextrine ( $\alpha, \beta$  ou  $\gamma$ ).

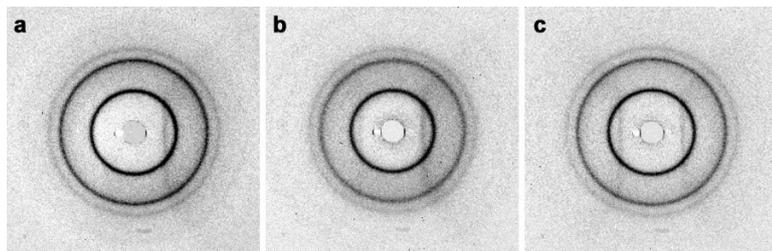


**Figure 3.** Clichés de diffraction des nanoparticules de CDa seules et paramètres de la maille hexagonale correspondante :

- a)  $\alpha$ -CD-C10 :  $a_{\text{hex}} = 4,51 \text{ nm}$  ;
- b)  $\beta$ -CD-C10 :  $a_{\text{hex}} = 4,39 \text{ nm}$  ;
- c)  $\gamma$ -CD-C10 :  $a_{\text{hex}} = 4,81 \text{ nm}$ .

#### • CDa avec phospholipides :

Les échantillons préparés en présence de phospholipides (PL) présentent tous un cliché à 3 anneaux. Les rapports des diamètres suggère encore une structure hexagonale. Les mailles correspondantes sont plus grandes que celles des nanoparticules de CDa seules (Fig. 4).



**Figure 4.** Clichés de diffraction des nanoparticules de CDa préparées en présence de phospholipides et paramètre de la maille hexagonale correspondante :

- a)  $\alpha$ -CD-C10+PL :  $a_{\text{hex}} = 5,77 \text{ nm}$  ;
- b)  $\beta$ -CD-C10+PL :  $a_{\text{hex}} = 5,88 \text{ nm}$  ;
- c)  $\gamma$ -CD-C10+PL :  $a_{\text{hex}} = 5,68 \text{ nm}$ .

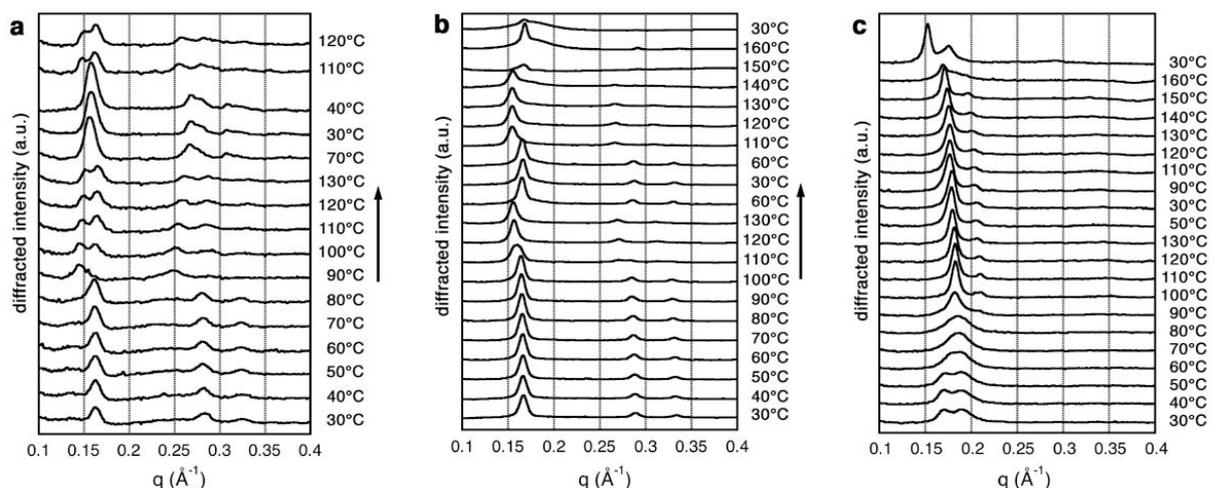
#### • CDa et autres additifs :

Si certains actifs empêchent la structuration des CDa (disparition du cliché avec le Montanox), d'autres semblent avoir une influence sur la structure des nanoparticules, si l'on en juge par la modification du cliché de WAXS, ce qui pourrait traduire leur association ou leur incorporation (Tefose, DZ, CTB64). Cependant, les résultats semblent très dépendants de la formulation et demandent à être approfondis.

#### 4. Traitements thermiques :

##### • CDa seules :

Les suspensions ont été chauffées jusqu'à 130°C, refroidies à température ambiante puis chauffées à nouveau jusqu'à 160°C. Les nanoparticules constituées de CDa seules ont montré une excellente stabilité thermique dans le domaine de température étudié. A titre d'exemple, le comportement de nanoparticules d' $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -CD-C10 est détaillé sur la Figure 5.



**Figure 5.** Evolution du profil WAXS de suspensions de nanoparticules à base d' $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -CD-C10 (resp. a, b et c) durant le traitement thermique. La flèche indique le sens de déroulement de l'expérience.

La maille de l'échantillon  $\alpha$ -CD-C10 se dilate très légèrement jusqu'à 80°C sans changement d'organisation structurale puis une nouvelle structure s'établit jusqu'à 130°C (Fig. 5a). Cette transition est réversible au refroidissement puis au second chauffage jusqu'à 120°C.

La maille de l'échantillon  $\beta$ -CD-C10 se dilate très légèrement jusqu'à 100°C (Fig. 5b). Une seconde phase apparaît à 110°C et devient prépondérante à 120°C. La maille reste hexagonale mais son paramètre  $a_{\text{hex}}$  est un peu plus grand. La transition est réversible au refroidissement puis au second chauffage qui permet de retrouver la phase haute température à 110°C. Un troisième profil apparaît au dessus de 140°C. Après un chauffage à 160°C, l'intensité des pics diminue fortement, traduisant peut-être une fusion de la structure ou une dégradation des molécules. On n'observe pas de nouvelle transition après retour à température ambiante.

Les deux pics présents dans le spectre initial de l'échantillon  $\gamma$ -CD-C10 semblent se fondre en un pic diffus jusqu'à 90°C (Fig. 5c). Un pic fin apparaît ensuite, accompagné d'un second pic moins intense. Cette structure est maintenue au refroidissement puis se dilate durant le nouveau chauffage. L'intensité diminue fortement à 160°C mais deux pics intenses apparaissent à nouveau après retour à l'ambiante. Des constatations similaires ont été faites lors d'un essai réalisé sur un second échantillon présentant initialement un spectre avec un anneau fin et un anneau diffus. Il faut noter que le rapport des diamètres des deux pics présents dans les spectres à différentes températures est toujours d'environ 1,15. Il reste à déterminer si ces pics correspondent à une seule structure ou à deux formes coexistantes.

##### • CDa avec phospholipides :

Les échantillons  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -CD-C10+PL ont une grande stabilité thermique jusqu'à 140°C. Aucun changement de phase n'a été observé. Étonnamment, le déplacement des pics au cours du chauffage traduit une contraction de la structure hexagonale. La maille se dilate à nouveau pendant le refroidissement. Le comportement est donc l'opposé de celui des nanoparticules de CDa seules dont la structure se dilate durant l'élévation de température.

$$\alpha\text{-CD-C10+PL} \rightarrow a_{\text{hex}} = 5,77 \text{ nm à } T_{\text{amb}} - a_{\text{hex}} = 5,52 \text{ nm à } 120^\circ\text{C}$$

$$\beta\text{-CD-C10+PL} \rightarrow a_{\text{hex}} = 5,88 \text{ nm à } T_{\text{amb}} - a_{\text{hex}} = 5,66 \text{ nm à } 120^\circ\text{C}$$

$$\gamma\text{-CD-C10+PL} \rightarrow a_{\text{hex}} = 5,68 \text{ nm à } T_{\text{amb}} - a_{\text{hex}} = 5,49 \text{ nm à } 120^\circ\text{C}$$

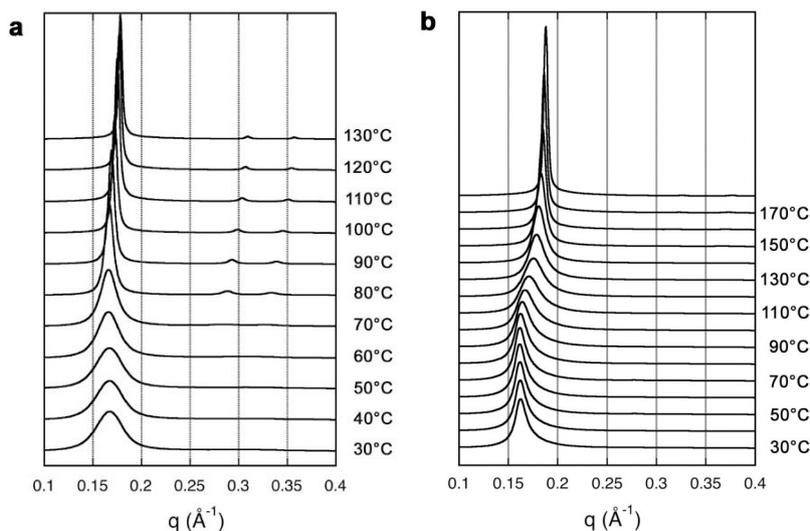
##### • Poudres sèches de CDa seules :

Dans la majorité des cas, le profil des poudres sèches présente initialement un unique anneau diffus dont le diamètre dépend de la nature chimique de la CDa. Les poudres sont donc amorphes. Dans le cas des  $\beta$ -CD-Cn, la distance intermoléculaire estimée à partir du diamètre de

l'anneau diffus croit à peu près linéairement avec le nombre de carbones de la chaîne alkyle. Cependant, comme dans le cas des nanoparticules en suspension, il n'y a pas de relation claire décrivant l'évolution de la distance intermoléculaire et la taille de la cyclodextrine ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ).

Différents comportements ont été observés au cours du chauffage selon les échantillons. Le cas de la poudre d' $\alpha$ -CD-C10 est présenté sur la Figure 6a. A partir de 80°C, la présence de 3 anneaux fins suggèrent une structuration en phase hexagonale. Jusqu'à 130°C, les pics se décalent vers les grands  $q$ , ce qui traduit une contraction de la structure. Pour la poudre de  $\beta$ -CD-C10 (Fig. 6b), le décalage de l'anneau diffus vers les grands  $q$  démarre vers 100°C et la structuration devient nette à partir de 140°C (3 anneaux fins) avec une contraction qui se poursuit jusqu'à 170°C. De manière surprenante, parmi les autres échantillons  $\beta$ -CD-Cn ( $n \neq 10$ ), seule la poudre de  $\beta$ -CD-C14 a montré une structuration à haute température. La poudre de  $\gamma$ -CD-C10 n'a pas montré de structuration, même à haute température (170°C). L'observation "post mortem" des capillaires a montré que les poudres avaient fondu sous forme de gouttelettes brunes.

**Figure 6.** Profils WAXS de poudres sèches d' $\alpha$ -CD-C10 (a) et de  $\beta$ -CD-C10 (b) chauffées. A droite, l'échelle choisie ne permet pas de visualiser deux pics très faibles apparaissant dans le spectre à partir de 140°C entre  $q=0.3$  et  $0.4 \text{ \AA}^{-1}$ .



## 5. Conclusion et perspectives

Ces nouvelles expériences ont tout d'abord permis d'étudier l'influence de paramètres de formulation sur l'organisation moléculaire au sein de nanoparticules de cyclodextrines amphiphiles. La tendance générale est l'établissement d'une structure hexagonale, le plus grand nombre d'anneaux de diffraction étant observé pour les produits à base de  $\beta$ -CD-Cn (en particulier avec  $n = 8$  et  $10$ ). Les expériences en température ont mis en évidence la très bonne stabilité thermique des nanoparticules. En particulier, les capillaires scellés ont été chauffés à des températures supérieures à 100°C, ce qui a permis d'observer plusieurs transitions structurales. Ces transitions sont généralement réversibles si la température ne dépasse pas 130°C et irréversible si l'on chauffe au-delà. En dehors des transitions, la structure des particules à base de CDa seules a tendance à se dilater durant le chauffage tandis que les spécimens préparés en présence de phospholipides se contractent.

La compréhension de l'ultrastructure de nanoparticules de CDa va se poursuivre en recueillant des données à partir des suspensions en utilisant des techniques complémentaires de caractérisation. Des observations par cryomicroscopie électronique ont déjà fourni des images en projection de la structure de certaines nanoparticules. Leur analyse devrait permettre de proposer des modèles. Il serait en particulier intéressant de comparer la morphologie et la structure de nanoparticules avant et après traitement thermique pour détecter l'influence de recuits. L'analyse par calorimétrie différentielle nous renseignera sur les transitions structurales et leur température sera comparée à celles recueillies à l'ESRF. De plus, il est important d'entreprendre un travail de modélisation moléculaire afin de déterminer la conformation des CDa en fonction de la nature des CD et de la longueur des chaînes alkyles greffées.

Du point de vue bibliographique, de fortes analogies sont attendues avec les phases cristalline lyotropes (hexosomes, cubosomes, etc.) de systèmes à base de phospholipides ou de monoglycérides.