

N° d'ordre : 4182

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par

**Christophe ANCLA**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : Chimie Physique

---

## **MICROGELS SENSIBLES AU GLUCOSE POUR LA DELIVRANCE D'INSULINE**

---

Soutenue le : 17 Décembre 2010

Devant la commission d'examen formée de :

M. ILIOPOULOS Ilias	Directeur de recherche, CNRS,	Président
Mme DAMGE Christiane	Directeur de recherche, CNRS,	Rapporteur
M. ELAISSARI Abdelhamid	Directeur de recherche, CNRS,	Rapporteur
M. KUHN Alexander	Professeur, IPB	Directeur de thèse
M. NICOLESCU-CATARGI Bogdan	Professeur, Université de Bordeaux 2,	Directeur de thèse
Mme RAVAINÉ Valérie	Maître de conférences, IPB	Examinateur







N° d'ordre : 4182

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par

**Christophe ANCLA**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : Chimie Physique

---

## **MICROGELS SENSIBLES AU GLUCOSE POUR LA DELIVRANCE D'INSULINE**

---

Soutenue le : 17 Décembre 2010

Devant la commission d'examen formée de :

M. ILIOPOULOS Ilias	Directeur de recherche, CNRS,	Président
Mme DAMGE Christiane	Directeur de recherche, CNRS,	Rapporteur
M. ELAISSARI Abdelhamid	Directeur de recherche, CNRS,	Rapporteur
M. KUHN Alexander	Professeur, IPB	Directeur de thèse
M. NICOLESCU-CATARGI Bogdan	Professeur, Université de Bordeaux 2,	Directeur de thèse
Mme RAVAINÉ Valérie	Maître de conférences, IPB	Examineur



## *Remerciements*

Le présent mémoire est l'aboutissement de trois années de doctorat qui se sont déroulées au sein de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM), dans le groupe Nanosystèmes Analytiques (NSYSA) de l'Université de Bordeaux I. Je remercie Philippe Garrigues, directeur de l'ISM, et plus particulièrement Alexander Kuhn, pour l'accueil dans le laboratoire et les bonnes conditions de travail dont j'ai pu bénéficier au long de cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement Valérie Ravaine, ma directrice de thèse, qui m'a encadré avec disponibilité, confiance et compétence. Je la remercie aussi pour m'avoir permis d'encadrer des travaux pratiques de colloïdes au sein de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie et de Physique de Bordeaux. Mes remerciements iront aussi à Bogdan Catargi, directeur de thèse, pour nos discussions et son enthousiasme au cours des réunions qui ont jalonné ce projet.

Pour avoir accepté de présider le jury de thèse, j'adresse ma gratitude à M. Ilias Iliopoulos, Directeur de recherche CNRS. Je tiens à remercier également M. Abdelhamid Elaïssari, Directeur de recherche CNRS et Mme Christiane Dange, Directeur de recherche INSERM, pour avoir accepté de juger mes travaux. Enfin, je remercie l'ensemble des membres du jury pour le soin avec lequel ils ont examiné ce manuscrit.

Sans le financement du Conseil régional d'Aquitaine et du programme de Fonds Européen de Développement Régional (FEDER), cette thèse n'aurait pu être menée dans d'aussi bonnes conditions. Je souhaite donc remercier chaleureusement Monsieur Alain Rousset, Président du Conseil régional d'Aquitaine pour m'avoir permis de conduire à bien cette thèse dans d'excellentes conditions.

Je souhaite également remercier Sanofi-Aventis, pour l'apport de leur expertise dans ce projet, Martine Renard, de la CIC-IT BIOMATERIAUX de Bordeaux, pour les évaluations de cytotoxicité et enfin Claude ROUX, du service commun des laboratoires de la DGCCRF, pour son efficacité, sa gentillesse et sa disponibilité.

Mes plus vifs remerciements iront à l'ensemble des membres permanents du groupe NSYSA et plus particulièrement à Véronique pour son aide, son soutien et sa disponibilité quotidienne,

à Patrick, pour sa bonne humeur et nos discussions sportives, Aline, pour sa gentillesse et son soutien et enfin Manu pour nos discussions en tous genres.

Mes pensées vont aussi à l'ensemble des étudiants que j'ai côtoyé au cours de ces trois ans. Ils ont su me conseiller, me soutenir et aussi m'accompagner. Les anciens : Marie-Laurence, Valérie, Emmanuela, Emilie, Emeline, Martina, Matthias, Manu, Marlène et Aurélien. Les contemporains : Léa, Yémima, Lisa, Matthias, Laurent et les petits nouveaux.

Plus largement, mes pensées vont aussi à l'ensemble du personnel de l'ENSCP et plus particulièrement à Didier, pour son aide.

Enfin, je souhaite remercier mes amis, pour leur soutien, même à distance, ma famille, sans qui je ne serais pas arrivé là et tout spécialement Magali, pour avoir toujours été là, pour sa patience, pour m'avoir soutenu et encouragé.

En espérant que cette contribution scientifique sera la première étape vers l'amélioration du confort de vie des patients diabétiques.

*En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche.*

*Jacques Rouxel, Les Shadoks*

*Quand on ne fait pas tout pour être le premier, le devenir ou le rester, on ne demeure pas le deuxième. On tombe fatalement le dernier.*

*Louis Hubert Lyautey*





## Sommaire

Liste des abréviations .....	5
Introduction générale.....	7
Chapitre I : Etat de l'art et rappels bibliographiques .....	11
Introduction au chapitre .....	13
I : Le diabète et ses enjeux .....	14
I.1 : Le diabète .....	14
I.2 : Traitement curatif .....	16
I.3 : Administration d'insuline en boucle fermée .....	17
II : Hydrogels stimulables : vers la reconnaissance moléculaire .....	19
II.1 : Définition d'un hydrogel et propriétés.....	19
II.2 : Théorie de gonflement des hydrogels.....	22
II.3 : Application de ces concepts à l'élaboration d'hydrogels biostimulables .....	26
III : Les hydrogels sensibles au glucose : état de l'art.....	32
III.1 : Les hydrogels modifiés par la Glucose Oxydase.....	33
III.2 : Hydrogels modifiés par la Con A.....	35
III.3 : Hydrogels modifiés par la Glucose Binding Protein (GBP) .....	38
III.4 : Hydrogels modifiés par l'acide phénylboronique.....	39
IV : Les microgels et les nanogels .....	53
IV.1 : Définition des microgels et des nanogels, intérêt.....	53
IV.2 : Propriétés des microgels.....	54
V : Autres types de travaux pour la délivrance rétrocontrôlée d'insuline utilisant l'acide phénylboronique .....	63
V.1 : Modification de l'insuline.....	63
V.2 : Modification de la structure du vecteur et libération contrôlée par la glycémie.....	64
V.3 : Matériau multi-réponses .....	68
VI : Description du projet et de ses enjeux .....	68
Chapitre II : Synthèse et caractérisation de microgels sensibles au glucose .....	71
Introduction au chapitre .....	73
I : Synthèse des microgels à base d'acide boronique : méthodologie .....	74
I.1 : Stratégie de synthèse .....	74
I.2 : Synthèse des microgels par polymérisation par précipitation.....	75
I.3 : Application à la synthèse des microgels fonctionnalisés par l'acide phénylboronique .....	77
I.4 : Méthodes de caractérisations .....	78
II : Résultats antérieurs.....	80
III : Synthèse de microgels sensibles au glucose à pH physiologique.....	83
III.1 : Synthèse d'un monomère sensible au glucose .....	83
III.2 : Protocole de la synthèse de DDOPBA .....	84

## Sommaire

III.3 : Synthèse et caractérisation des microgels contenant du DDOPBA .....	85
III.3. Comportement thermique des microgels à base de DDOPBA.....	88
IV : Synthèse de microgels sensibles au glucose à température physiologique .....	91
IV.1 : Microgels à base de NIPMAM .....	91
IV.2 : Microgels à base de NEMAM .....	95
IV.3 : Discussion.....	98
V : Sélectivité des microgels vis-à-vis du glucose .....	101
V.1 : Compétition avec les autres saccharides .....	101
V.2 : Compétition avec des diols du milieu : exemple du lactate .....	104
V.3 : Comportement des microgels dans des fluides biologiques .....	105
VI : Conclusion au chapitre synthèse de microgels sensibles au glucose .....	105
Chapitre III : Application à la délivrance d'insuline .....	107
I : Encapsulation d'insuline.....	110
I.1 : L'insuline.....	110
I.2 : Méthodologie .....	112
I.3 : Résultats .....	116
II : Etude de la libération d'insuline-FITC.....	120
II.1 : Libération d'insuline à partir d'une pâte de microgels .....	123
II.2 : Libération d'insuline à partir de microgels dispersés.....	130
III : Etude de la libération d'un analogue rapide de l'insuline.....	144
III.1 : Dosage par spectroscopie d'absorption UV-Vis .....	144
III.2 : Dosage par voie électrochimique.....	145
IV : Conclusion au chapitre encapsulation libération.....	146
Chapitre IV : Développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose – nouvelle route vers la biocompatibilité .....	147
Introduction au chapitre .....	149
I : Microgels de structure interne contrôlée .....	149
I.1 : Microgels cœur-écorce.....	149
I.2 : Nanocapsules d'hydrogel .....	154
I.3 : Utilisation des microgels de structure interne contrôlée pour l'encapsulation et la délivrance d'insuline .....	159
II : Microgels glycosilés sensibles au glucose .....	162
II.1 : Développement de nouveaux matériaux.....	162
II.2. Application des microgels glycosilés à l'encapsulation et la délivrance d'insuline.....	169
II.3 : Biocompatibilité des matériaux.....	170
III : Conclusion au chapitre développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose – nouvelle route vers la biocompatibilité .....	174

## Sommaire

Chapitre V : Développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose par contraction - nouvelle route vers l'élaboration de capteurs .....	177
I : Introduction au chapitre et rappel sur le principe de la contraction .....	179
I.1 : Contraction par effet de densité de réticulation et sélectivité .....	179
II : Stratégie de contraction, influence du réticulant .....	182
II.1 : Comportement des microgels en présence de glucose à différents pH .....	182
II.2 : Influence de la composition du microgel .....	183
II.3 : Influence de la concentration en DDOPBA.....	185
II.4 : Mise en évidence de la sélectivité.....	186
III : Stratégie de contraction autour de la diminution du pKa du récepteur.....	186
III.1 : Incorporation d'allylamine dans les microgels.....	187
III.2 : Influence de la nature du réticulant sur la contraction.....	191
III.3 : Influence de la concentration en Allylamine.....	192
III.4 : Mécanisme de contraction et sélectivité .....	193
IV : Développement de capteurs fluorescents et libération par contraction .....	196
IV.1 : Etat de l'art des capteurs fluorescents.....	196
IV.2 : Développement de microgels fluorescents .....	198
V : Conclusion au chapitre contraction .....	202
Conclusion générale .....	203
Références bibliographiques .....	207



## Liste des abréviations

### Abréviations et symboles

CMC	Concentration micellaire critique
LBL	Layer by layer
LCST	Lower critical solution temperature
$\chi_{12}$	Paramètre d'interaction de Flory entre le solvant et le polymère.
$\pi$	Pression de gonflement
u.a.	Unité arbitraire
$v_i$	Volume molaire du solvant i
VPTT	Volume phase transition temperature

### Composés chimiques

AECPBA	Acide 4-[(2-aminoéthyl)carbamoyl] phénylboronique
EDTA	Acide éthylènediamine tétra-acétique
PBA	Acide phénylboronique et ses dérivés
PAA	Acide polyacrylique
SA	Acide sialique
AM ou AA	Acrylamide
AGA	Acrylamide-2-deoxyglucose
APBA ou AAPBA	3-(acrylamido)phénylboronique
ALL	Allylamine
MTT	Bromure de 3-(4-5 diméthylthiasol-2-yl)diphényl tétrazolium
BAAm	Butylacrylamide
CaM	Calmodulin
Con A	Concanavalin A
DEAEM	N,N-diethylaminoethylmethacrylate
DMAAm	N,N-diméthylacrylamide
DMAPAA	N,N-diméthylaminopropylacrylamide
DMAEA	2-(diméthylamino) ethylacrylate
DMAEMA	2-(diméthylamino) ethylmethacrylate
DMPA	N,N-(diméthylamino) propylacrylamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGDMA	Ethylèneglycol diméthacrylate
NEMAM	N-éthylméthacrylamide
FITC	Fluoresceine IsoThioCyanate
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GBP	Glucose binding protein
GOx ou GOD	Glucose oxydase
GEMA	Glucosyloxyethyl methacrylate
HPMA	Hydroxypropylmethacrylate
NIPAM	N-isopropylacrylamide
NIPMAM	N-isopropylméthacrylamide
RITC ou RhB	Méthacryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B
MPS	Méthacryloxypropyltriméthoxysilane
BIS	N,N-Méthylènebisacrylamide

## Liste des abréviations

KPS	Persulfate de potassium $K_2S_2O_8$
PNT	Phenothiazine
PBS	Phosphate buffered saline
PAH	Poly(allylamine) hydrochloride
poly(DVB)	Poly(divinylbenzene)
PEG	Poly(éthylène glycol)
PCCA	Polymerized Colloidal Crystal Array
PVA	Poly(vinylalcohol)
CdS QDs	Quantum dots CdTe/ZnS
ARS	Rouge Alizarine
RN	Rouge neutre
Si-RNA	Small interfering RNA
SDS	Sodium DodécylSulfate
THF	Tétrahydrofurane
TeOs	Tétraethoxysilane
Trp	Tryptophan

## Termes de techniques de caractérisations

$d_H$	Diamètre hydrodynamique
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
PDI	Indice de polydispersité
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
$\mu$	Mobilité électrophorétique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SSC	Signal de diffusion à $90^\circ$
FSC	Signal de diffusion vers l'avant

## **Introduction générale**



Ce travail de thèse, qui porte sur les microgels sensibles au glucose pour la délivrance d'insuline, s'inscrit dans la perspective d'amélioration du traitement du diabète de type I, tant sur le plan de la qualité de vie des patients en allégeant les contraintes liées au contrôle de glycémie et aux injections pluriquotidiennes d'insuline, que sur le plan thérapeutique, avec un contrôle plus précis de la glycémie. La prise en charge de la population des patients atteints de cette insuffisance partielle ou totale en insuline représente un enjeu majeur et un défi de la médecine pour le siècle à venir alors que les projections placent cette maladie au quatrième rang des pandémies mondiales.

Cette étude s'inscrit dans un programme de recherches baptisé « Délivrance In Vivo Régulée et Rétrocontrôlée (DELIVRER) ». Mutualisant les compétences et les innovations dans plusieurs domaines (chimie, électronique, pharmacie, technologies biomédicales, etc.), il consiste à trouver des modes de délivrance de l'insuline « *in vivo* » en boucle fermée. L'une des solutions envisagées réside en une nouvelle forme injectable d'insuline, qui serait délivrée à partir d'un « vecteur intelligent » permettant une libération fluctuante et autocontrôlée d'insuline en fonction du taux de sucre chez le patient.

La voie de recherche que nous avons choisie s'appuie sur les propriétés de délivrance des microgels en fonction des variations du taux de glycémie. Les microgels sont des particules colloïdales d'hydrogel, c'est-à-dire des réseaux de polymères gonflés en solution aqueuse. Plus proche de nos intérêts, les hydrogels peuvent être appréhendés comme des édifices polymériques, tridimensionnels, réticulés et non solubles qui présentent la particularité de gonfler et de pouvoir absorber de larges quantités d'eau ou de fluides biologiques (de 10% à plusieurs milliers de fois leur masse sèche). Leur taux de gonflement dépendra des conditions environnementales. Ainsi, un changement de l'environnement du gel peut induire une variation brutale de ses propriétés de gonflement à l'origine d'un changement de ses propriétés physiques. De fait, ces objets sont qualifiés de « stimulables » ou « intelligents ». De nombreux microgels sont connus pour leur sensibilité à la température, au pH, à un champ électrique ou magnétique ou encore à la lumière. Plus récemment, sont apparus des hydrogels ou microgels « bioinspirés », qui réagissent par un changement de volume à la reconnaissance moléculaire d'une espèce en solution, à l'instar de nombreux processus biologiques. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux microgels sensibles au glucose, qui présentent un intérêt dans le cadre du traitement du diabète, soit en tant que capteur du glucose, soit en tant que vecteur de l'insuline. En effet, du fait de leur porosité, les microgels peuvent servir de vecteurs pour un principe actif, servant à la fois de réservoir de stockage et de transporteur. Il est alors espéré que l'application d'un stimulus pourra contrôler la sortie du

composé actif. La délivrance d'insuline contrôlée par le taux de glucose *in vivo* permettrait alors une régulation de la glycémie en boucle fermée, sans intervention du patient.

Au fil de ce manuscrit nous nous intéresserons à la synthèse et la caractérisation de microgels rendus sensibles au glucose grâce à l'utilisation d'un récepteur synthétique du glucose, l'acide phénylboronique. Conçus comme des objets modèles -leur devenir *in vivo* n'a pas été un critère de sélection ici-, nous avons évalué leur potentiel en tant que capteur du glucose et vecteur pour la libération d'insuline.

La premier chapitre de ce manuscrit présente un état de l'art sur les hydrogels et les microgels, en positionnant le contexte général dans lequel s'inscrivent ces objets jusqu'à leurs applications et plus spécialement celles qui ont attiré à la sensibilité au glucose et à la libération d'insuline. Les différents chapitres qui suivent présentent le cœur de notre étude à travers la synthèse et la caractérisation des microgels sensibles au glucose dans des conditions physiologiques (chapitre II), leur potentiel pour l'encapsulation et la libération d'insuline (chapitre III), leur amélioration tant sur les plans de leur structure que de leur composition pour répondre aux exigences des applications (chapitre IV) et enfin la mise au point d'une nouvelle classe de microgels sélectifs du glucose et leur application en tant que capteur (chapitre V).

## **Chapitre I : Etat de l'art et rappels bibliographiques**



## **Introduction au chapitre**

L'objectif de ce chapitre est de dresser un état des lieux, d'une part des enjeux posés par la mise au point d'un système de délivrance de l'insuline en boucle fermée, et d'autre part des connaissances sur les hydrogels et les microgels qui constituent les objets choisis pour délivrer l'insuline. Ainsi, nous donnerons des éléments pour situer la maladie du diabète et les enjeux thérapeutiques que représentent la mise au point d'une nouvelle stratégie à base d'hydrogels. Avant de présenter l'état de l'art sur les matériaux sensibles au glucose, il sera nécessaire d'introduire les hydrogels stimulables, c'est-à-dire les hydrogels dont le taux de gonflement varie en réponse à un changement des conditions environnementales. Nous ne prétendons pas dresser ici un bilan exhaustif des travaux effectués dans ce domaine, mais uniquement présenter les principes physico-chimiques à l'origine de leurs propriétés stimulables. Ainsi, les grandes lignes de la théorie du gonflement des hydrogels seront présentées et illustrées par les exemples des deux grandes familles d'hydrogels qui ont fait l'objet de nombreuses études de recherche, à savoir les hydrogels thermosensibles et les hydrogels sensibles au pH. Nous verrons ensuite comment la théorie du gonflement des hydrogels s'applique au développement d'hydrogels biostimulables, c'est-à-dire ceux qui répondent à la présence d'une espèce biologique dans le milieu. L'espèce la plus exploitée jusqu'à présent est le glucose. La littérature abonde d'exemples d'hydrogels sensibles au glucose. A nouveau sans prétention d'exhaustivité, nous tenterons de situer le contexte de notre étude à travers une revue bibliographique des travaux effectués dans le domaine des hydrogels sensibles au glucose, champ disciplinaire actif depuis une vingtaine d'années. Nous proposerons une classification des hydrogels sensibles au glucose selon leur mode de reconnaissance et une partie plus détaillée sera consacrée aux hydrogels fonctionnalisés par l'acide phénylboronique, à l'instar de ceux que nous étudierons dans ce mémoire. Enfin, notre étude portant sur des nano/microgels plutôt que des macrogels, nous mentionnerons les propriétés spécifiques de ces particules par rapport à leurs homologues macroscopiques. Nous décrirons plus particulièrement leur synthèse, le contrôle de leur structure et de leur stabilité, en rappelant les travaux relatifs aux nano/microgels sensibles au glucose. Afin de compléter le panorama des matériaux sensibles au glucose pour la délivrance d'insuline, nous dresserons un état de l'art des systèmes concurrents aux hydrogels, souvent développés plus récemment, dans un secteur très actif.

## **I : Le diabète et ses enjeux**

Le diabète est un désordre de la régulation du glucose qui se caractérise par une accumulation de ce dernier dans le sang. Cette inhabilité à réguler la glycémie dans la physiologie normale (entre 0,8 et 1,1 g.L<sup>-1</sup>) peut être attribuée à l'incapacité du pancréas à sécréter de l'insuline ou à l'incapacité du corps à utiliser de manière correcte l'insuline. L'insuline est une hormone hypoglycémiante qui permet au sucre, apporté par l'alimentation et véhiculé par le sang, d'être stocké ou utilisé par les organes du corps humain. Dans le cas du diabète de type 1, l'insuline sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas subissent une réaction auto-immune qui conduit à leur destruction. Le diabète de type 2 provient de désordres liés à la sécrétion<sup>1, 2</sup> et à la résistance à l'insuline. Les traitements actuels pour ce dernier type consistent en une prise orale de médicaments pour réduire la glycémie, alors que de fréquentes et quotidiennes injections d'insuline sont requises pour le diabète de type 1. Ce dernier traitement représente un lourd fardeau pour les patients et peut être source de complications chroniques si la dose d'insuline injectée est mal contrôlée car le taux de glucose peut baisser dramatiquement en dehors des limites d'une glycémie normale et plonger le patient en état d'hypoglycémie.

### *1.1 : Le diabète*

Le diabète est une maladie qui traduit un problème de régulation de la glycémie ou du taux de glucose dans le sang. Ce désordre du métabolisme du patient à stocker et utiliser le glucose dans des normes physiologiques est une maladie chronique qui est désormais considérée comme un problème majeur de santé publique. Elle touche déjà une proportion significative de la population mondiale et devrait connaître une réelle progression au cours des prochaines décennies. L'épidémie du diabète représente d'énormes enjeux sur le plan sociétal, économique et politique pour ce XXI<sup>ème</sup> siècle. Ce problème de la régulation du glucose touche près de 249 millions de personnes à travers le monde alors qu'il ne touchait que 30 millions de patients il y a 20 ans. Selon la Fédération Mondiale du Diabète, le nombre de cas devrait atteindre 360 millions en 2030<sup>3</sup>, avec une forte progression dans les pays en pleine expansion comme la Chine ou l'Inde. Aujourd'hui le diabète est la quatrième cause de mortalité à travers le monde. Il existe deux types de diabète qui traduisent un manque total ou partiel d'insuline, respectivement diabète de type 1 ou diabète de type 2. Il subsiste de nombreux facteurs qui peuvent expliquer cette progression mais la plupart des médecins et des experts s'accordent à dire que les changements dans les habitudes sociétales et

alimentaires, qui conduisent à une prise de poids, peuvent amener à développer un diabète de type 2 qui est la forme la plus courante de cette maladie. L'autre forme, type 1 ou insulino dépendant, qui concerne seulement entre 5 et 10 % des cas de diabète n'est pas associée à un problème comportemental mais est plutôt associée à des facteurs génétiques. Cette maladie peut amener à de sévères complications médicales allant de simples épisodes d'hyperglycémie, à la cécité, à l'amputation voire même à la mort. En effet, un taux trop important de glucose dans le sang aura pour conséquence une accumulation de glucose et une obturation progressive des vaisseaux sanguins de plus petites dimensions (extrémités des membres supérieurs ou inférieurs, réseaux de vascularisation oculaire).

Le traitement usuel pour le diabète de type 1 consiste en de nombreux contrôles quotidiens de la glycémie suivis par des injections d'insuline par voie sous cutanée. Le diabète de type 2, à son début est soigné par la prise orale de médicaments anti-diabète. Mais un traitement plus lourd peut être nécessaire quand l'insuffisance en insuline est trop importante et que la glycémie ne peut plus être maintenue dans des normes physiologiques par le traitement médicamenteux <sup>4</sup>.

Il existe plusieurs types de formes injectables de l'insuline. La forme lente, dite basale, administrée le soir permet de réguler le niveau bas de l'insuline (tracé bleu). La forme rapide, administrée au moment des repas, qui permet de compenser l'apport de sucre provenant de l'alimentation avec une cinétique rapide (tracé rouge). La combinaison des ces deux analogues d'insulines mime de manière plus précise l'activité pancréatique en rapport à l'insuline humaine basale (tracé vert) (Figure 1.1).

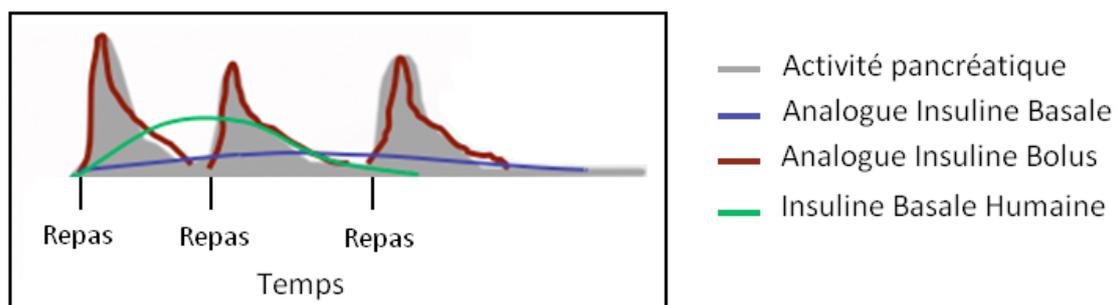


Figure 1.1 : Combinaison d'insulines et mime de l'activité pancréatique.

Les besoins quotidiens en insuline dépendent de l'exercice quotidien et de la prise alimentaire. Le patient doit donc décider des doses d'insuline et prévoir cet apport soit par des injections, par la voie parentérale, par le biais de seringues, de stylos injecteurs (rechargeables ou non) soit par une pompe externe. Toutefois, cette source d'auto médication reste désagréable, douloureuse et est la source d'un excès inverse : des épisodes d'hyperglycémie

suite à une trop grande quantité d'insuline injectée. En 1993, les résultats d'une étude d'une durée de 10 ans par la « Diabetes Control and Complications Trial » (DCCT) ont été publiés <sup>5</sup>.

Il ressort de cette étude deux tendances marquées :

- premièrement, le maintien strict de la glycémie dans des normes physiologiques amène une réduction significative des amputations des membres inférieurs, de la cécité ou d'insuffisance rénale,
- deuxièmement, le contrôle strict amène l'effet inverse par l'apparition d'épisode d'hypoglycémie.

Enfin récemment, les études ont montré que les patients les mieux régulés passaient moins de 30% de leur temps quotidien dans les limites physiologiques de la normo glycémie et tout particulièrement pendant la nuit où les épisodes d'hypoglycémie peuvent être les plus tragiques en terme de conséquence (malaise ou coma). Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles solutions.

### *1.2 : Traitement curatif*

Aujourd'hui, les patients diabétiques de type 1 ou insulino dépendants sont bien pris en charge et les moyens de contrôler les épisodes hyperglycémiques sont bien connus. Cependant, comme nous l'avons décrit précédemment, la maîtrise d'un taux de glucose dans les niveaux physiologiques repose pour l'essentiel sur les patients eux-mêmes.

Pour tendre vers un contrôle optimal du métabolisme tout en évitant les épisodes hypoglycémiques, le meilleur moyen reste d'avoir recours à une thérapie curative en substituant les cellules bêta pancréatiques détruites par un pancréas fonctionnel ou une transplantation d'îlots de Langerhans. Cependant, il faut alors trouver un donneur compatible, éviter les rejets du greffon et le taux de succès de cette technique est encore trop faible (1/3) pour être étendue et appliquée à l'ensemble des patients. Aussi la transplantation doit être couplée à un traitement immunosuppresseur lourd qui peut aussi s'accompagner de nombreux effets secondaires. Tout ceci pourrait être amélioré en encapsulant les îlots dans une membrane semi perméable pour protéger les greffons de l'action du système immunitaire <sup>6-8</sup>. Enfin, même avec les progrès de la biologie moléculaire sur le développement de cellules sécrétrices d'insuline, ces dernières peinent à mimer le comportement des cellules bêta du pancréas en réponse aux variations de la glycémie. L'utilisation des cellules souches embryonnaires qui pourrait faciliter leur développement représente toujours un défi majeur revêtant une dimension éthique.

En définitive, en l'absence d'un traitement curatif, le « Graal » serait un système artificiel en boucle fermée capable de mimer l'activité du pancréas. Un tel système opérerait continuellement et automatiquement de façon à apporter une réponse à un changement de la glycémie. Une telle thérapie ne serait pas curative mais améliorerait le maintien de la glycémie dans des limites physiologiques (ce à quoi ne peut prétendre aucune technologie précédemment décrite), éviterait l'incidence des effets secondaires des traitements employés et les complications directement liées au diabète.

### *I.3 : Administration d'insuline en boucle fermée*

#### *I.3.1 : Mise au point d'un système auto-asservi*

Pour constituer un système en boucle fermée, il faut pouvoir réunir un sous système de prise de l'information, un sous système de délivrance d'insuline et asservir l'ensemble de façon à créer un système automatisé. De tels systèmes sont à l'étude sous la forme d'une pompe à insuline, de capteurs continus et d'algorithmes d'asservissement.

Depuis près de 20 ans des boucles ouvertes comme les pompes à insuline sont sur le marché. Cependant les premiers capteurs continus de monitoring au glucose - Medtronic's REAL-Time ou DexCom's STS- qui peuvent renseigner le patient en temps réel sur la glycémie, sont seulement disponibles depuis 2006. Même si le système Medtronic permet l'affichage de la glycémie sur la pompe à insuline, ces deux technologies restent peu compatibles dans le sens où un algorithme adéquat est nécessaire pour fermer la boucle. Ce dernier joue un rôle important car il doit prendre en compte le délai entre l'augmentation de la glycémie dans le réseau sanguin et l'augmentation de la glycémie dans les tissus sous-cutanés où est prise l'information sur le taux de glucose.

En principe ces systèmes devraient être opérationnels. Les derniers progrès technologiques dans le domaine des capteurs continus au glucose <sup>9</sup> ont mené à des prototypes de boucles fermées basés sur la combinaison des trois éléments constitutifs <sup>10, 11</sup>. La faisabilité reste encore à confirmer.

Par ailleurs, malgré les progrès dans la miniaturisation des dispositifs tant sur le plan des capteurs que des pompes de délivrance, ces dispositifs restent encore gênants dans les activités quotidiennes et le système reste invasif ce qui peut amener le système immunitaire à l'obturer progressivement voire même à le rejeter.

*1.3.2 : Solutions alternatives*

Dans ce contexte, un système intelligent de délivrance d'insuline, capable de détecter les variations de glycémie directement dans la circulation sanguine et capable de délivrer l'insuline en rapport avec ces variations, semble être une solution compétitive. Le vecteur idéal serait donc capable de délivrer de l'insuline d'une manière auto-régulée tout en ayant une durée d'action assez longue. En effet, la délivrance auto-régulée d'insuline éviterait au patient d'avoir recours à un dispositif externe de contrôle de la glycémie. Le long temps d'action permettrait au patient d'éviter les injections multiples et quotidiennes d'insuline pour diminuer la fréquence d'intervention (idéalement une fois par semaine).

Deux stratégies ont reçu une attention particulière en se positionnant comme des systèmes alternatifs aux systèmes décrits précédemment.

La première consiste dans la mise au point de nouveaux analogues d'insuline dont la pharmacocinétique serait modulée par la glycémie. Basé sur une modification chimique de l'insuline par des groupes sensibles au glucose, ce nouveau type d'analogue d'insuline a été développé. Nous en détaillerons le mécanisme au paragraphe V <sup>12, 13</sup>. Ce domaine de recherche en est à ses balbutiements et un travail important devra être mis en œuvre pour que cette technologie soit applicable.

La deuxième stratégie consiste à développer des conteneurs capables de délivrer de l'insuline en regard de la concentration en glucose. Les hydrogels sensibles au glucose ont été identifiés comme des candidats à fort potentiel pour ce genre d'application. En effet, ces polymères réticulés peuvent gonfler ou se contracter réversiblement en fonction du glucose, ce qui a pour effet de moduler leur porosité en fonction du glucose. Ce type de matériaux pourrait alors intervenir dans un processus de libération d'insuline sous différentes formes. Les hydrogels pourraient être édifiés sous forme de membranes ou de valves pour contrôler le flux d'insuline libéré d'un réservoir (Figure 1.2 Schéma a), ou sous forme de réservoir lui-même car ces matériaux poreux peuvent encapsuler l'insuline (Figure 1.2 Schéma b). Dans les deux situations, la perméabilité de l'hydrogel permet le contrôle de la libération d'insuline.

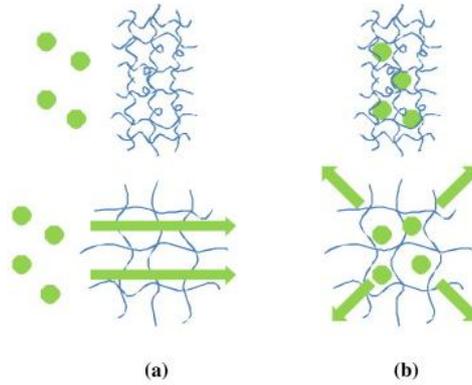


Figure 1.2 : Illustration des mécanismes de libération de l'insuline par un hydrogel sensible au glucose. a) Hydrogel membrane, b) Hydrogel réservoir.

Ces matériaux ont fait l'objet de nombreuses recherches durant ces dernières années. Avant de présenter un état de l'art de cette recherche, nous présenterons le contexte de l'étude de cette classe particulière d'hydrogels stimulables, après avoir introduit quelques notions essentielles sur la physico-chimie de ces matériaux.

## II : Hydrogels stimulables : vers la reconnaissance moléculaire

### II.1 : Définition d'un hydrogel et propriétés

Avant de donner les clés théoriques permettant de comprendre les paramètres qui gouvernent le gonflement et l'origine de l'aspect stimuable des hydrogels, nous allons rappeler quelques définitions, afin de présenter clairement les matériaux qui feront l'objet de cette étude.

#### II.1.1 : Définition

Intrinsèquement, un gel résulte de l'association de deux constituants : un réseau et un solvant<sup>14-16</sup>. Le réseau est un ensemble tridimensionnel d'entités microscopiques connectées par des nœuds de réticulation, les unités de base pouvant être des chaînes de polymères ou des objets colloïdaux. Dans le cas des réseaux de polymères, qui nous intéressent dans le cadre de ce mémoire, un gel se forme si le polymère présente une affinité pour le solvant. En effet, dans ce cas, les molécules de solvant vont solvater les chaînes et gonfler le réseau, qui reste insoluble grâce à la présence d'une réticulation. L'ensemble réseau / solvant porte le nom de gel. Si le solvant est de l'eau ou une solution aqueuse, il s'agit d'hydrogel.

Plusieurs classes d'hydrogels peuvent être répertoriées, selon la nature du réseau et du réticulant. Ainsi, les chaînes peuvent être neutres ou chargées. Si elles sont chargées, le gel est

qualifié de gel de polyélectrolyte. La réticulation peut avoir plusieurs origines. Elle peut provenir d'un enchevêtrement des chaînes, comme dans le cas des polymères fondus ou de solutions de polymères concentrées. Ces réseaux sont transitoires. La réticulation peut également être qualifiée de physique quand elle met en jeu des liaisons de faible énergie, comme des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes ou de Van der Waals<sup>17-19</sup>. Certains systèmes biologiques peuvent également s'associer par la formation d'hélices. Ces liaisons peuvent se dissocier et la formation du réseau est réversible. La dernière classe d'hydrogels est qualifiée d'hydrogels chimiques<sup>20</sup>. Dans ce cas, le réseau est constitué de liaisons covalentes entre les chaînes et forme une macromolécule géante de masse moléculaire infinie. Ainsi, un gel chimique est constitué d'un réseau permanent et la densité de réticulation ne dépend pas de facteurs externes.

### *II.1.2 : Structure*

La structure générale d'un gel chimique est illustrée ci-dessous (Figure 1.3). Un réseau chimique est caractérisé par la fonctionnalité des nœuds de réticulation ( $f$ ), qui traduit le nombre de chaînes connectées à un nœud, et par la masse moyenne des chaînes entre deux nœuds consécutifs,  $M_c$ . Ce paramètre peut également être exprimé en nombre moyen d'unités monomères ( $N$ ).  $N$  et  $M_c$  sont reliées entre elles par la masse moléculaire d'une unité monomère. Pour un réseau idéal, ces deux paramètres sont constants sur tout le réseau et les chaînes ne sont reliées entre elles que par des liens chimiques<sup>21</sup>. De plus, chaque bout de chaîne est connecté à un nœud de réticulation et chaque chaîne contribue de manière équivalente à l'élasticité du réseau<sup>22</sup>.

En réalité, les réseaux présentent de nombreux défauts liés à la synthèse des gels<sup>23, 24</sup> (Figure 1.3). Ainsi, on distingue la présence de points d'enchevêtrements, qui créent ainsi des nœuds de réticulation supplémentaires, ou encore des chaînes pendantes, connectées uniquement à l'une de leurs extrémités au réseau. Ces chaînes ne contribuent pas à l'élasticité du réseau. A l'inverse, nous pouvons également discerner des boucles, c'est-à-dire une même chaîne connectée à un seul nœud de réseau. Ces typologies sont généralement inactives. Une autre source d'écart au réseau idéal provient également de la largeur de la distribution des masses molaires des chaînes, liée au processus de polymérisation<sup>23</sup>.

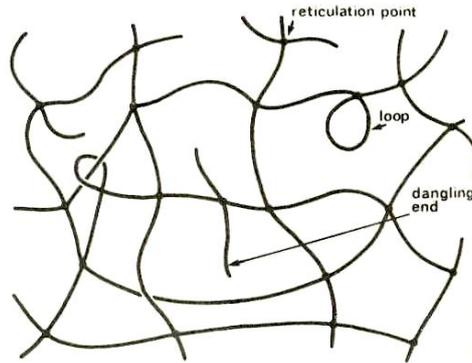


Figure 1.3 : Description de la structure générale d'un gel chimique.

Macroscopiquement, un hydrogel est un matériau mou, capable de conserver sa forme, malgré la tension de son propre poids. Comme son module d'Young est faible, il peut subir de grandes déformations non linéaires sous faible contrainte. Un gel est également résilient, c'est-à-dire qu'après déformation, il retrouve sa forme initiale. D'un point de vue mécanique, les gels sont traités comme des solides élastiques. Cependant, d'un point de vue thermodynamique, ils seront plutôt traités comme des polymères en solution. Ainsi, ces objets sont considérés comme un état intermédiaire entre le solide et le liquide.

### II.1.3 : Hydrogels stimulables

Comme nous l'avons souligné, le gonflement est une des caractéristiques les plus intrigantes des gels. Ainsi, non seulement ils peuvent absorber des quantités énormes de solvant, mais ils peuvent également changer leur volume de façon contrôlée, selon les propriétés physico-chimiques du gel et de son environnement. Cette dernière propriété a été largement exploitée pour le développement d'hydrogels stimulables, c'est-à-dire des hydrogels dont le taux de gonflement varie en réponse à une variation des conditions environnementales (Figure 1.4). De nombreux stimuli ont ainsi été utilisés comme la température, le pH, un champ électromagnétique (lumière, champ électrique et magnétique).

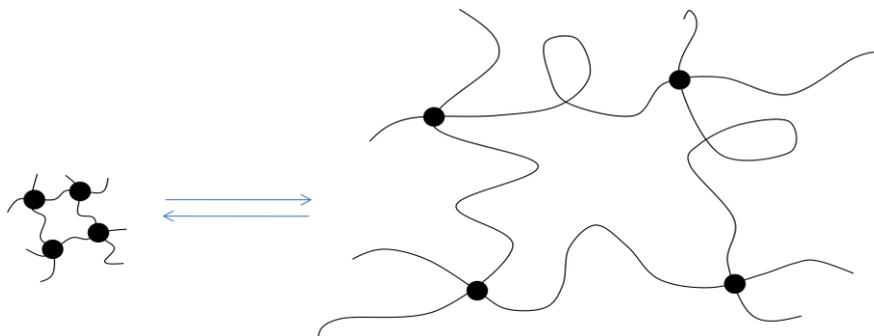


Figure 1.4 : Schéma 2D illustrant le maillage d'un hydrogel qui gonfle sous l'action d'un stimulus.

Le gonflement d'un hydrogel peut en particulier être modulé selon la solubilité de la chaîne de polymère dans le solvant considéré. C'est ainsi que les polymères dont la solubilité varie avec la température ont été utilisés comme entités de base pour obtenir des hydrogels thermosensibles. Les polymères à UCST (Upper Critical Solution Temperature), solubles à une température au-dessus de la température critique, se distinguent des polymères à LCST – Lower Critical Solution Temperature, qui deviennent insolubles et précipitent au-dessus de cette température critique. La plupart des polymères thermosensibles présentent une LCST. Le plus étudié d'entre eux est le poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM), dont la LCST est de 32°C. Lorsque ces polymères sont réticulés ils donnent lieu à des hydrogels thermosensibles, gonflés à basse température, lorsque le polymère est en bon solvant, et qui se contractent lorsqu'ils sont chauffés à une température supérieure à la LCST. Le passage en mauvais solvant exclut l'eau de l'environnement de la chaîne de polymère et le réseau s'effondre sur lui-même. La température caractéristique de cette transition de phase pour le gel est appelée VPTT pour *Volume Phase Transition Temperature*. Ainsi, l'évolution de la solubilité du polymère est l'un des leviers permettant de générer des hydrogels stimulables. Afin de décrire les différentes possibilités d'engendrer des transitions de gonflement dans les hydrogels, nous allons donner un aperçu de la théorie du gonflement des hydrogels, en soulignant les paramètres qui régissent leur état de gonflement à l'équilibre.

## *II.2 : Théorie de gonflement des hydrogels*

Un réseau immergé dans un bon solvant aura tendance à se disperser le plus loin possible afin de réduire son énergie libre, comme font les molécules non-réticulées. Or les réseaux sont limités dans leur possibilité de se disperser à cause des liaisons permanentes entre les chaînes. Il s'en suit une compétition entre les forces qui tendent à disperser les chaînes et les forces qui tendent à ramener la conformation moyenne des chaînes dans leur état d'équilibre, c'est-à-dire sans étirage.

### *II.2.1 : Cas des hydrogels neutres*

Le gonflement des gels neutres a été décrit par la théorie de Flory en 1969 dont nous reprenons ici les grandes lignes. Le gonflement d'un hydrogel est conditionné par un ensemble de contributions indépendantes et coordonnées de ses deux parties constitutives à savoir son réseau et le solvant. L'équilibre de gonflement des hydrogels dépend alors de la densité de réticulation et du caractère hydrophile des chaînes polymères. Le gonflement d'un

gel est décrit par la pression de gonflement  $\pi$ , elle-même composée d'une partie osmotique  $\pi_{osm}$  et d'une partie élastique  $\pi_{el}$  de telle sorte que<sup>25, 26</sup> :

$$\pi = \pi_{osm} + \pi_{el}$$

Selon la théorie de Flory, un hydrogel tend à maximiser les interactions entre sa chaîne polymère et le milieu extérieur en respectant l'équilibre des potentiels chimiques entre l'intérieur et l'extérieur de l'édifice. Cette première force est modulée selon l'affinité des chaînes polymères avec le solvant où  $\pi_{osm}$  peut aussi être notée  $\pi_{mel}$ . Ainsi, un réseau immergé dans un bon solvant aura tendance à se disperser le plus loin possible afin de réduire son énergie libre, comme font les molécules non-réticulées. Or, les réseaux sont limités dans leur possibilité de se disperser à cause des liaisons permanentes entre les chaînes. La réaction élastique est exprimée par  $\pi_{el}$ , et elle agit contre le gonflement. Il va s'ensuivre une compétition entre l'énergie qui tend à disperser les chaînes et l'énergie qui tend à ramener la conformation moyenne des chaînes dans leur état d'équilibre, c'est-à-dire sans étirage. Ainsi, le degré de réticulation de l'hydrogel contient le gonflement de l'hydrogel jusqu'à l'équilibre des forces élastiques du système et des forces osmotiques, c'est-à-dire lorsque la pression est nulle.

D'un point de vue thermodynamique, le gonflement d'un gel peut être vu comme le mélange d'un réseau dans un solvant. Pour mettre en œuvre sa théorie, Flory a utilisé ce postulat et a adapté la théorie générale des polymères en solution (enthalpie libre de mélange des polymères en solution) aux réseaux, en ajoutant un terme d'énergie libre élastique pour tenir compte des effets de la réticulation.

Dans le cas d'un réseau neutre donc, la variation d'enthalpie libre de mélange du système est exprimée selon

$$\Delta G_{mel} = \Delta H_{mel} - T\Delta S_{mel}$$

$$\text{où } \Delta H_{mel} = k_B T \chi_{12} n_1 \varphi_2 \text{ et } \Delta S_{mel} = -k_B \{n_1 \ln(1 - \varphi_2) + n_2 \ln(\varphi_2)\}$$

$$\text{Avec } \varphi_2 = \frac{n_2 v_2}{\sum_i n_i v_i}, \varphi_1 = \frac{n_1 v_1}{\sum_i n_i v_i}$$

Les indices 1 et 2 font références respectivement au solvant et au polymère.

$v_1$  rappelle le volume molaire du solvant et  $v_2$  le volume molaire de l'espèce 2.

$\chi_{12}$  symbolise le paramètre d'interaction de Flory entre le solvant et le polymère.

Lorsque les chaînes gonflent, elles s'étirent, ce qui engendre une force élastique de rétraction.

En faisant l'hypothèse que la distribution de chaîne est gaussienne et que la déformation due

au gonflement est affine, la variation d'énergie libre liée à l'étirement des chaînes, la variation d'enthalpie libre élastique du système est notée

$$\Delta G_{el} = -T\Delta S_{el}$$

$$\Delta G_{el} = \frac{k_B T v_e}{2} (3\alpha^2 - 3 + \ln\alpha^3)$$

Où  $v_e$  est le nombre effectif de chaînes dans le réseau et  $\alpha$  un facteur d'expansion relatif à l'état de référence du réseau dans son état contracté ( $V_0$ ) et,  $\alpha^3 = V/V_0$ .

La variation d'énergie totale est la somme des deux contributions, mélange et élastique. Le gonflement du réseau à l'équilibre correspond à la situation où  $\pi = 0$ .

Sachant que  $\pi = -\frac{N_{AV}}{v_1} \frac{\partial(\Delta G)}{\partial n_1}$ , la fraction volumique en polymère  $\varphi_2$  à l'équilibre (Flory 1953) prend la forme : (1)

$$\varphi_2 = \left\{ \frac{X v_1}{V_c \left( \frac{1}{2} - \chi_{12} \right)} \right\}^{\frac{3}{5}}$$

où  $X$  représente le nombre de point de réticulation présent dans le volume du réseau à l'état contracté.

Le terme  $\frac{X}{V_c}$  fait référence à la densité moyenne de réticulant au sein d'un hydrogel contracté.

De fait il apparaît clairement que la fraction volumique du réseau dépend de la composition de ce dernier mais aussi de sa solvation dans le milieu considéré. La fraction augmentera (l'hydrogel se contractera) si la densité de réticulation augmente ou si la solvation devient plus faible ( $v_{12} = \left( \frac{1}{2} - \chi_{12} \right)$  diminue). (Adapté de <sup>27</sup>)

La valeur du paramètre de Flory joue donc un rôle important :

- s'il est supérieur à 1/2, la pression osmotique diminue, le polymère est plus difficile à dissoudre et il est en régime mauvais solvant.

- s'il est inférieur à 1/2, la pression osmotique augmente et c'est l'inverse : le solvant dissout bien le polymère et le régime est qualifié de bon solvant.

- la valeur limite  $\chi_{12} = 0,5$  correspond à un état de solvation nommé solvant  $\theta$  (thêta).

Ce principe de gonflement s'applique par exemple aux hydrogels thermosensibles, constitués de polymères à LCST. Ces polymères passent de bon à mauvais solvant par augmentation de la température. En effet, dans le cas du pNIPAM, l'eau est un bon solvant du polymère grâce aux liaisons hydrogènes développées avec les groupes amides. L'augmentation de la température a pour effet de rompre les liaisons hydrogènes, ce qui provoque le passage en

mauvais solvant. Les interactions polymère/polymère (liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires et interactions hydrophobes) deviennent prédominantes, ce qui entraîne la précipitation des chaînes.

### II.2.2 : Cas des hydrogels chargés

Dans le cas où le réseau est chargé, le gonflement ne peut directement être interprété par la théorie décrite ci-dessus. En effet, pour ces hydrogels de polyélectrolytes, la présence de groupements chargés le long de la chaîne s'accompagne de contre-ions mobiles, qui assurent l'électroneutralité. La pression osmotique qu'ils exercent, ainsi que les répulsions électrostatiques entre les chaînes de polymères, conduisent les gels de polyélectrolytes à des taux de gonflement largement supérieurs à leurs homologues neutres allant jusqu'à plusieurs centaines de fois leur propre poids en solvant. Ces capacités d'absorption ont été largement exploitées dans des applications telles que l'hygiène, les applications médicales, les fertilisants de sol ou encore les produits anti-inondation. En outre, ces matériaux sont susceptibles de réagir à de nombreux stimuli.

Les hydrogels sensibles au pH, qui ont été largement étudiés, appartiennent à cette classe. Le levier pour une réponse à une variation de pH provient des groupements ionisables sur la chaîne de polymère, dont l'état d'ionisation dépend du pH. Les groupements, du type acide ou base faible, tels que des fonctions acides ou amines, permettent d'obtenir des hydrogels sensibles au pH<sup>28-33</sup>. Dans le cas des hydrogels comportant des fonctions acides carboxyliques, le gonflement va augmenter en fonction du pH. Ainsi, pour des pH inférieurs au pKa, les groupements acides sont dans leur état protoné, et donc à l'état neutre. Lorsque le pH est supérieur au pKa, la forme dominante est la forme déprotonée, donc chargée. Ainsi, l'hydrogel passe d'un hydrogel neutre à un hydrogel de polyélectrolyte en fonction du pH. A pH élevé, la présence de groupes ionisés va engendrer la présence de contre-ions mobiles à l'intérieur du gel. Cet excès d'ions mobiles entre le milieu intérieur et extérieur, gouverné par l'équilibre de Donnan, entraînera alors un gonflement de l'hydrogel. On note également que la présence de charges sur la chaîne de polymère implique des répulsions électrostatiques entre les chaînes qui tendent à les étirer<sup>34,35</sup>.

La théorie des gels neutres peut être complétée par des termes supplémentaires  $\pi_{ion}$  et  $\pi_{coul}$ , chacune de ces contributions agissant en faveur d'un gonflement du réseau.

$$\Pi = \pi_{osm} + \pi_{el} + \pi_{ion} + \pi_{coul}$$

Pour les réseaux faiblement chargés, la contribution électrostatique est négligeable comparée à la pression osmotique des ions. Elle est donc souvent négligée <sup>36</sup>.

$$\Delta G_{ion} = \frac{k_B T}{v_1} \{m\varphi_2 \ln(m\varphi_2)\}$$

$$\pi_{ion} = \frac{RT}{v_1} m\varphi_2 \text{ où } m \text{ est le degré d'ionisation du réseau.}$$

On comprend donc l'influence d'un gel très chargé et la contribution des charges sur l'état d'équilibre. En régime bon solvant,  $m\varphi_2$  apporte une contribution positive et un gonflement supplémentaire par rapport à un gel non chargé ( $m=0$ ). En mauvais solvant maintenant ( $\chi_{12} > 0,5$ ), les gels ioniques se caractérisent par une importante « résistance entropique » au dégonflement. Le confinement des contre-ions est très défavorable et cela se traduit par le maintien d'un gonflement élevé jusqu'à des valeurs très importantes de  $\chi_{12}$ . Néanmoins, la balance des forces en présence ne peut être maintenue indéfiniment et, à partir d'une valeur critique du paramètre  $\chi_{12}$ , le gel dégonfle de manière discontinue pour rejoindre un état dégonflé proche de celui du gel neutre de référence.

### *II.3 : Application de ces concepts à l'élaboration d'hydrogels biostimulables*

Dans la partie précédente, nous venons de montrer quels étaient les leviers physico-chimiques permettant de moduler l'état de gonflement d'un hydrogel. Ainsi, nous avons pu expliquer comment le pH et la température pouvaient agir sur l'état de gonflement des hydrogels. Cependant, d'autres stimuli de types physiques comme la lumière <sup>37</sup>, le champ magnétique <sup>38</sup> ou électrique <sup>39, 40</sup> ou de types chimiques : espèce ionique <sup>41-43</sup> ou biologique <sup>44</sup> peuvent également provoquer des transitions volumiques.

Ce dernier type de stimulus, basé sur la reconnaissance d'espèces biologiques, représente un intérêt grandissant auprès de la communauté scientifique notamment pour des applications dans le domaine biomédical. Il est alors question d'hydrogels biostimulables. Dans cette partie, nous nous attacherons à montrer comment la reconnaissance moléculaire d'une espèce en solution peut être à l'origine d'une variation du gonflement en utilisant les propriétés décrites ci-dessus. Nos propos seront illustrés par des exemples de la littérature montrant des transitions de phases volumiques réversibles en réponse à un biostimulus. Les réponses de type transition sol-gel ou les hydrogels qui se dégradent sous l'effet d'une reconnaissance biologique seront exclus de notre étude. Notons également que certains hydrogels ont la capacité de reconnaître une espèce sans que celle-ci n'engendre de transition de phase,

comme par exemple ceux dont la structure est conditionnée pour reconnaître une empreinte moléculaire<sup>45-47</sup>. Ces systèmes ne font pas partie de notre étude.

Comme nous l'avons souligné dans le paragraphe précédent, il existe trois façons d'induire une transition de phase volumique au sein d'un hydrogel :

- un changement de l'affinité polymère solvant,
- un changement de la densité de réticulation,
- un changement de la densité de charge.

Ainsi, la reconnaissance moléculaire d'une espèce en solution devra être à l'origine de l'un de ces changements pour obtenir un hydrogel biostimulable.

### *II.3.1 Changement de l'affinité polymère solvant*

Comme nous l'avons décrit plus haut, le paramètre d'interaction  $\chi_{12}$ , qui traduit l'affinité des chaînes polymères du réseau pour le solvant, affecte l'état de gonflement de l'hydrogel. Certains hydrogels présentent la particularité de passer de bon à mauvais solvant en présence d'une espèce en solution.

Ainsi, un hydrogel comportant un motif uracile a été synthétisé. Il permet la reconnaissance spécifique de sa base complémentaire, l'adénine. Cet hydrogel gonfle, en présence d'une séquence nucléique (l'adénosine) contenant l'adénine grâce à un changement de la solubilité du polymère<sup>48</sup>. En effet, le copolymère est insoluble dans l'eau de part la formation de complexes entre les unités uraciles. Mais en présence de la base complémentaire, l'adénine, le copolymère est plus soluble de part l'édification des paires A/U. En outre ce changement de solubilité n'est pas marqué en présence d'une base non complémentaire (G). Le copolymère synthétisé est donc un polymère sensible aux bases nucléotidiques et ce concept de changement de solubilité en réponse aux espèces complémentaires peut être utilisé dans l'élaboration d'un hydrogel sensible.

Cette même équipe a aussi réussi à développer une reconnaissance biologique entre deux espèces chirales au sein d'un hydrogel constitué d'un copolymère optiquement actif<sup>49</sup>. Les interactions stéréospécifiques entre le copolymère et l'espèce optiquement active associée entraînent la formation d'un complexe et un changement de la LCST<sup>50</sup>. Il faut noter que le changement de la LCST est différent d'une espèce optiquement active à son énantiomère. Il s'agit d'un copolymère thermosensible composé de *N*-(*S*)-*sec*-butylacrylamide ((*S*)-*sec*-BAAm) et de *N*-isopropylacrylamide (NIPAM). La LCST du copolymère (23,1°C) en présence de *D* tryptophan (*D*-Trp) et de *L* tryptophan (*L*-Trp) est respectivement déplacée à

28,7°C et 34,5°C. Le déplacement peut être attribué aux interactions stéréospécifiques entre les groupements (S)-sec-BAAM dans le copolymère et le L-Trp. Ce résultat mène au concept de polymère sensible à des espèces énantiomériques. Le copolymère développé pourrait être utile pour développer des systèmes sensibles à une espèce optiquement active.

### II.3.2 Changement de densité de réticulation

La densité de réticulation est un deuxième levier pour moduler l'état de gonflement de l'hydrogel. Ce concept a été illustré par Miyata et al. qui a synthétisé un hydrogel à base d'acrylamide copolymérisé avec un monomère, auquel est attaché un antigène (rabbit IgG). Lorsqu'il est en présence d'anticorps (anti-rabbit IgG), des nœuds de réticulation supplémentaires se forment car l'anticorps peut se lier à deux antigènes de chaînes différentes. L'ajout d'antigène libre déplace l'équilibre de complexation : les nœuds de réticulation anticorps-antigène se disloquent, entraînant le gonflement de l'hydrogel <sup>51</sup>. Par la suite, la même équipe a développé un hydrogel semi-interpénétré, dans lequel l'anticorps est lui-même attaché à un polymère. Cette deuxième voie a permis d'assurer la réversibilité du processus de gonflement/dégonflement <sup>52</sup> (Figure 1.5).

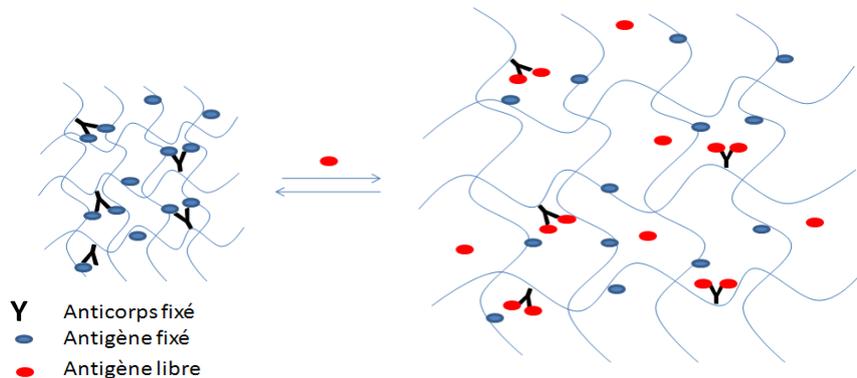


Figure 1.5 : Schéma du principe de gonflement par reconnaissance d'un antigène.

Selon le même mode de changement de densité de réticulation, l'équipe de Lyon à Georgiatech a développé des microlentilles à base d'hydrogel biosensible en utilisant les interactions protéine-ligand <sup>53</sup>.

Ici un hydrogel a été fonctionnalisé par de la biotine. De manière réversible, l'addition d'avidine, une molécule qui possède 4 sites de fixations pour l'antigène (Cas C) ou de l'anticorps de la biotine, l'anti-biotine (Cas D), modifie l'état de réticulation du réseau (Figure 1.6). Les chaînes deviennent plus réticulées proportionnellement à l'addition des molécules cibles.

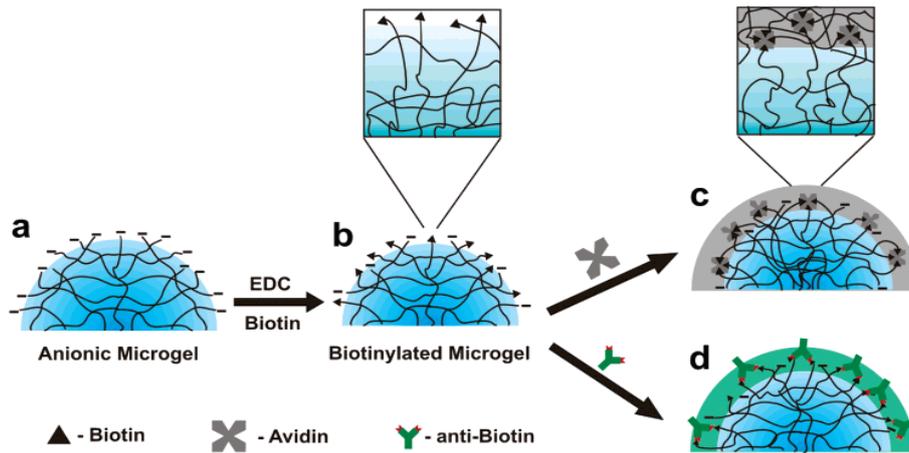


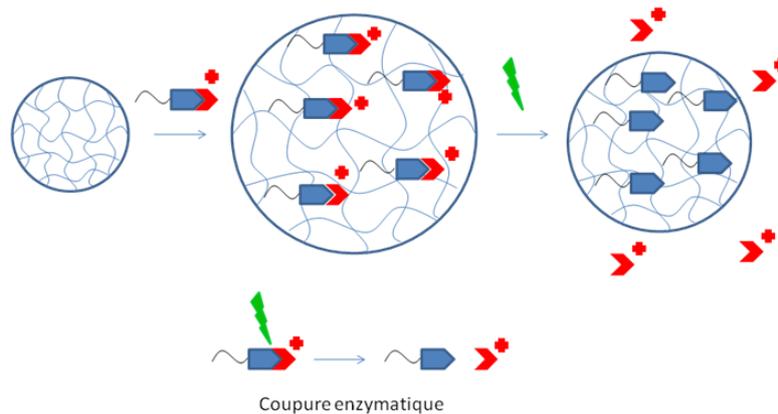
Figure 1.6 : Changement de densité de réticulation de microlentilles de microgels biotinylés par addition d'avidine ou d'anti-biotine. Extrait de <sup>53</sup>.

Enfin, un dernier type de matériau sensible à une espèce biologique peut être cité dans cette catégorie. La sensibilité du matériau est désormais réversible et proportionnelle à la quantité d'ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu. Le concept repose sur une matrice d'hydrogel réticulée par une interaction spécifique ligand-protéine. Daunert et al. <sup>54</sup> ont créé des hydrogels de polyacrylamide dans lesquels une partie des nœuds de réticulation sont des liaisons non covalentes entre la calmodulin (CaM) et son ligand, la phenothiazine (PNT), les deux étant liées de façon covalente au réseau de polymère. L'ajout de chlorpromazine, un autre ligand de la calmodulin, soluble, introduit une compétition des interactions avec la CaM, ce qui entraîne le gonflement de l'hydrogel. De plus, les interactions entre le CaM et la phenythiazine sont dépendantes de la présence de calcium. Lorsque le calcium est masqué par l'addition d'un de ses chélateurs, l'EDTA, les nœuds de réticulation CaM-phenothiazine se dissocient ce qui entraîne le gonflement de l'hydrogel. Un hydrogel sensible au calcium est ainsi obtenu. La réversibilité de tous ces phénomènes a été démontrée.

### II.3.3 : Changement de densité de charge

Enfin la variation de la densité de charges permet de moduler l'état de gonflement de l'hydrogel. Pour illustrer ce mode de comportement, nous retiendrons les travaux de l'équipe d'Uljin. Son équipe s'intéresse tout particulièrement à la classe des hydrogels sensibles à la présence d'enzymes. L'hydrogel est construit de manière élégante autour d'un squelette d'alkylacrylamide réticulé par des chaînes polyéthylène glycol (PEG) et qui porte d'autres chaînes pendantes de types PEG terminées par une séquence peptidique comportant certains acides aminés, dont un acide aminé cationique (fonction arginine).

Ces fonctions terminales peuvent être clivées de façon spécifique sous l'action de certaines protéases. L'action de la protéase a pour effet de couper l'entité cationique. L'hydrogel initialement cationique devient alors neutre. La densité de charge diminuant, son état de gonflement diminue (Figure 1.7) <sup>55</sup>. Dans un autre exemple, la séquence peptidique est zwitterionique. Elle devient chargée sous l'action de la protéase et l'hydrogel gonfle par augmentation de la densité de charge <sup>56</sup>. Il convient de souligner qu'aucun de ces processus n'est réversible, puisqu'ils sont fondés sur une dégradation de peptide par une enzyme.



*Figure 1.7 : Contraction d'un microgel fonctionnalisé par une séquence peptidique terminée par une fonction arginine. Sous l'action d'une protéase, la fonction arginine est coupée. Le microgel passe d'un état chargé à neutre, ce qui induit une réduction de son état de gonflement.*

Toujours pour illustrer un changement d'état de gonflement via un changement de la densité de charge, nous pouvons citer les travaux d'Asher qui a synthétisé des capteurs colorimétriques pour le plomb, en utilisant des hydrogels garnis d'un réseau de cristaux colloïdaux. Nous reviendrons ultérieurement sur cette méthode de détection.

Les hydrogels sensibles aux ions métalliques, notamment les ions divalents, ont été obtenus en copolymérisant un acrylamide avec un co-monomère porteur d'une fonction éther couronne. Ces dernières sont connues pour leur capacité de complexation des ions divalents, dont, entre autres, les ions  $Pb^{2+}$  <sup>57, 58</sup>. L'introduction des ions  $Pb^{2+}$  dans le réseau provoque la complexation des ions par les motifs éther couronne, ce qui provoque une augmentation de la densité de charge de la matrice hydrogel. La variation de la densité de charge provoque alors un gonflement de l'hydrogel.

#### *II.3.4 : Autres facteurs*

Enfin le changement de conformation d'un polymère et plus précisément d'une protéine peut aussi être utilisé pour construire une nouvelle classe d'hydrogels biostimulables. Le

repliement des protéines s'opère par des interactions non covalentes pour former des structures hiérarchiques organisées telles que des plans  $\beta$ , des hélices  $\alpha$  ou encore des pelotes. De plus, les protéines changent de conformation en réponse à différents stimuli physicochimiques ou biochimiques tels que la lumière, la présence d'ions, ou encore les interactions avec un ligand. Certains auteurs ont exploité ces capacités pour les relier à des transitions volumiques dans des hydrogels.

L'exemple de la calmodulin développé précédemment a été repris par Murphy et al.<sup>59</sup>. Ces auteurs ont utilisé la protéine CaM comme agent réticulant dans un hydrogel à base de poly(éthylène glycol). En effet, la CaM subit un changement de conformation en présence de trifluoperazine. Ainsi, l'addition de ce composé sur le gel conduit à une contraction de l'hydrogel. Ce travail constitue la première preuve d'un changement de conformation induisant une réduction de taille de l'ordre de quelques nanomètres, qui se répercute sur le comportement macroscopique de l'hydrogel (Figure 1.8).

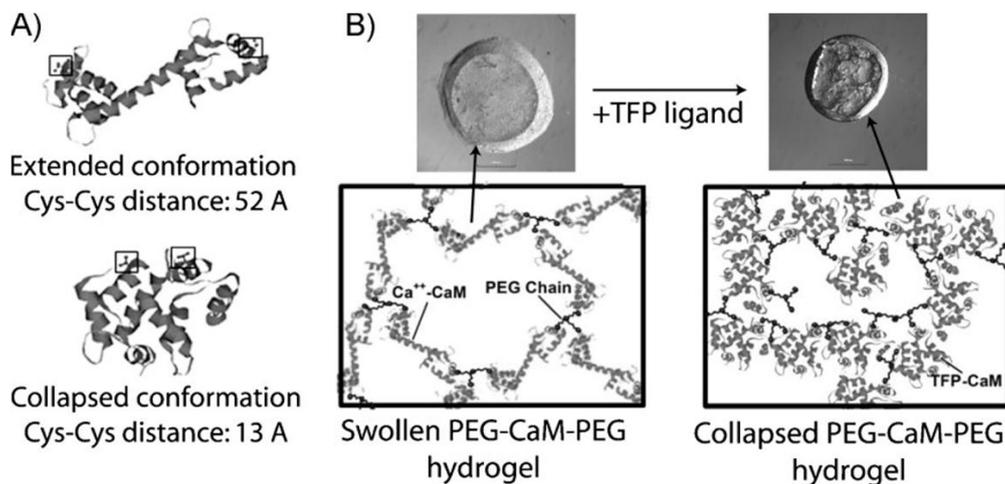


Figure 1.8 : A) Illustrations schématiques des changements conformationnels de la protéine de CaM en présence de TFP ; B) Clichés microscopiques et illustrations schématiques des changements d'état de gonflement d'un hydrogel réticulé par la CaM.

Certains hydrogels ont été conçus pour présenter une variation du taux de gonflement en réponse à l'addition d'un brin complémentaire d'ADN ou d'ARN<sup>60, 61</sup>. En fonction de la configuration spatiale du premier brin d'ADN, qui sert de pont de réticulation entre les chaînes de l'hydrogel, l'addition du brin complémentaire permet à l'hydrogel de gonfler ou de se contracter. En effet un brin linéaire aura tendance à former une double hélice de taille plus petite engendrant une contraction de l'hydrogel (Figure 1.9.A). En revanche un brin d'ADN en forme de boucle, après addition du brin complémentaire, verra sa longueur spatiale augmenter et l'hydrogel verra de fait sa taille augmenter (Figure 1.9.B).

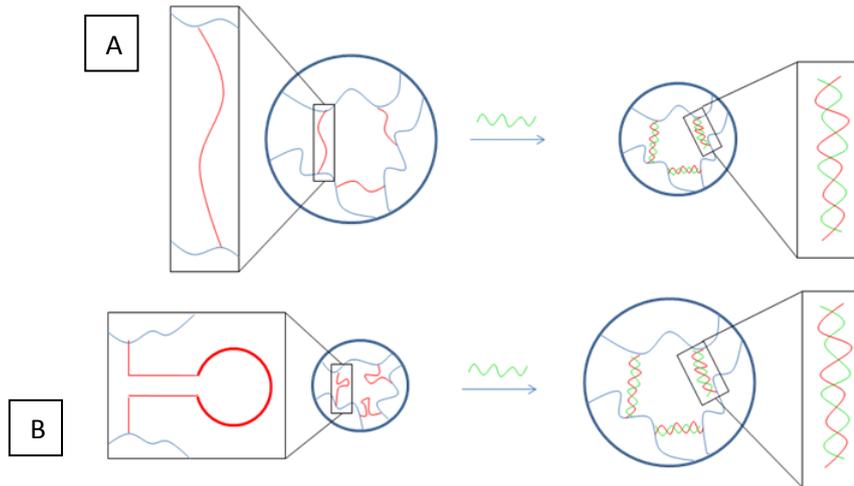


Figure 1.9 : Changement d'état de gonflement d'un hydrogel par addition d'un brin complémentaire d'ADN.

De façon similaire, les mêmes principes de changement de densité de charge, de réticulant ou d'affinité peuvent être utilisés pour développer des hydrogels sensibles à la présence de glucose. Cette approche fera l'objet d'une étude décrite dans le paragraphe suivant (§ III).

### III : Les hydrogels sensibles au glucose : état de l'art

Depuis une vingtaine d'années, la recherche dans le champ des hydrogels sensibles au glucose a été très active, compte tenu de leur potentialité comme solution alternative pour le traitement du diabète en boucle fermée. Ce paragraphe vise à présenter l'état de l'art dans ce domaine. En particulier, nous nous attacherons à distinguer les différentes catégories d'hydrogels sensibles au glucose élaborés jusqu'à présent, en expliquant le principe de réponse au glucose et les limitations de chaque système.

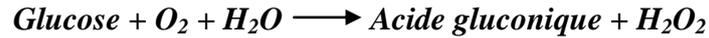
Comme nous l'avons dit précédemment la conception d'un hydrogel sensible à la présence d'une biomolécule nécessite l'introduction d'un récepteur moléculaire dans la structure de l'hydrogel. Ce récepteur doit être lié de façon covalente à la structure de façon à ce que la réponse soit réversible. Nous ne traiterons donc dans nos exemples que des comportements réversibles de sensibilité au glucose. Pour la détection du glucose, quatre familles de récepteurs peuvent être utilisées :

- la glucose oxydase (GOD),
- la concanavalin A (Con A),
- les protéines liant au glucose (GPB),
- l'acide phénylboronique et ses dérivés (PBA).

### *III.1 : Les hydrogels modifiés par la Glucose Oxydase*

#### *III.1.1 : La GOD*

La glucose oxydase (GOx ou GOD) est une enzyme oxydoréductase qui catalyse l'oxydation du glucose en peroxyde d'hydrogène et en D-glucono- $\delta$ -lactone ou acide gluconique selon le mécanisme suivant :



Dans les cellules elle participe à « digérer » les sucres (oses) en métabolites. La glucose oxydase se lie spécifiquement au  $\beta$ -D-glucopyranose (forme hémiacétal du glucose). Elle n'agit pas sur l' $\alpha$ -D-glucose, mais est capable d'agir sur le glucose, car en solution le glucose est sous forme cyclique (à pH 7 : 63,6 % de  $\beta$ -D-glucose et 36,4 % de  $\alpha$ -D-glucose, 0,5% sous forme linéaire) et l'oxydation déplace l'équilibre vers le  $\beta$ -D-glucose.

Cette enzyme a été le premier récepteur à glucose utilisé dans les hydrogels et couplé avec un microgel sensible au pH. En effet, lorsque le glucose est converti en acide gluconique sous l'action de la GOD, le pH à l'intérieur du gel est diminué. Lorsque la GOD est fixée sur un gel pH-sensible, cette modification du pH entraîne alors une modification de la structure de l'édifice soit par gonflement, soit par contraction, selon le type de polymère associé.

#### *III.1.2 : Libération d'insuline par gonflement d'hydrogels modifiés par la GOD*

Les premiers travaux utilisant cette voie décrivent la perméation d'insuline à travers une membrane sensible au glucose qui est elle-même constituée de l'association de deux membranes :

- une membrane pH sensible, formée de N,N-diéthylaminoéthylmethacrylate (DEAEM) et de 2-hydroxypropylmethacrylate (HPMA),
- une seconde membrane, couplée à la première, formée d'un polyacrylamide fonctionnalisé par la GOD.

L'action enzymatique de cette dernière module la perméation de la première en abaissant le pH au sein de la membrane. En effet, l'acide gluconique produit par la réaction entre le glucose et la GOD entraîne une diminution du pH. Les amines tertiaires de la première membrane se protonent et la membrane gonfle (Figure 1.10). La perméation est donc augmentée et l'insuline libérée de manière réversible<sup>62</sup>. Plus tard, cette double membrane a été structurée sous forme de capsules, qui, regroupées dans une colonne, ont montré les mêmes phénomènes de libération et de réversibilité de l'insuline<sup>63</sup>.

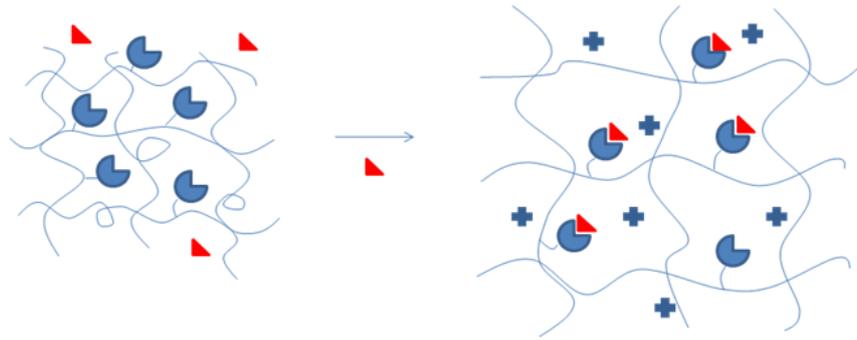


Figure 1.10 : Changement d'état de gonflement d'un hydrogel fonctionnalisé par la GOD sous addition de glucose.

Cependant la réaction de catalyse du glucose par la GOD est limitée par la présence de l'oxygène dissous dans le milieu et qui doit être à proximité de la GOD. D'autres études ont mis en évidence cet aspect lors de la mise au point d'une membrane macroporeuse destinée à libérer de manière plus efficace l'insuline <sup>64</sup>. Bien que d'une meilleure porosité, ce matériau ne présentait pas une bonne sensibilité au glucose. Il a été montré <sup>65</sup> que la faible disponibilité de l'oxygène dans l'environnement immédiat de la GOD était un frein à la réaction enzymatique et donc à la modification structurale de la membrane.

Différentes stratégies de synthèse ont alors cherché à augmenter la disponibilité de l'oxygène via la présence de catalase <sup>66-68</sup>. La catalase est en effet connue pour réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour donner de l'oxygène. Les résultats expérimentaux de ces recherches ont montré une meilleure sensibilité de la membrane en présence de glucose via la présence accrue d'oxygène, un comportement réversible de l'hydrogel et une libération d'insuline en présence de glucose <sup>69</sup>.

Si les études précédemment décrites portent sur la libération d'insuline et sur l'augmentation de la taille de l'hydrogel, d'autres études se sont concentrées sur la contraction d'hydrogels modifiés par GOD en présence de glucose.

### III.1.3 : Libération par contraction

C'est notamment le cas de l'équipe de Peppas <sup>70, 71</sup> qui a étudié des hydrogels qui se contractent sous une diminution du pH en partant de l'hypothèse que la contraction de l'hydrogel permettait une libération plus rapide par son expulsion brutale alors que le gonflement de l'hydrogel conduit à une augmentation du coefficient de diffusion.

Pour cela, cette équipe a mis au point un hydrogel de poly(acide méthacrylique) couplé à des chaînes de poly(éthylène glycol). Dans ce cas, l'abaissement du pH par la glucose oxydase

favorise la contraction du gel car le polymère passe d'un état ionisé (au-dessus de son pKa) à un état neutre. Cependant les études sont restées à l'état de modèle et la libération d'insuline n'a pas été constatée expérimentalement <sup>72</sup>.

Sur le même principe, certaines recherches se sont concentrées sur la libération d'insuline par des membranes à perméabilité réversible. Le gonflement est alors utilisé pour fermer des pores alors que la contraction permet d'ouvrir les pores et à l'insuline d'être libérée (Figure 1.11).

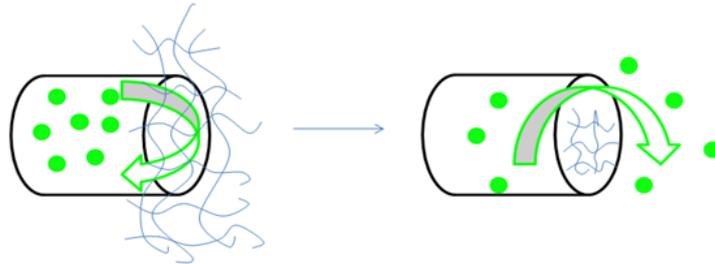


Figure 1.11 : Schéma de libération d'insuline contenue dans un pore obstrué par un hydrogel.

Les polymères qui présentent des fonctions carboxyliques ont été utilisés pour réaliser ce concept dans la mesure où ils se contractent sous diminution de pH, c'est-à-dire sous une production d'acide gluconique <sup>73, 74</sup>. Cependant le fonctionnement en conditions physiologiques est loin d'être acquis encore.

Même si ces différentes technologies d'hydrogels fonctionnalisés à la GOD sont élégantes, elles souffrent de plusieurs limitations qui gênent leur fonctionnement dans le temps. L'activité enzymatique de la GOD a tendance à se dégrader au cours du temps. De plus, en conditions physiologiques de concentration en glucose, la chute de pH associée à la variation de concentration en glucose n'est pas très sensible.

### *III.2 : Hydrogels modifiés par la Con A*

#### *III.2.1 : Les lectines*

Les lectines représentent une famille de protéines qui se lient spécifiquement et de manière réversible à certaines structures de type sucres (Figure 1.12), qu'ils soient des carbohydrates solubles <sup>75</sup> ou liés à d'autres macromolécules comme les glycoprotéines ou glycolipides. Ces protéines interviennent dans de nombreux processus biologiques et notamment au niveau de la reconnaissance cellulaire. Elles se retrouvent en forte concentration dans les graines de légumineuses sèches (lentilles, fèves et pois). La plus étudiée et la première à être disponible de manière commerciale est la Concanavalin A (Con A) dont la structure est bien décrite et

qui présente quatre sites de reconnaissance <sup>76</sup>. La Con A libre est toutefois considérée comme toxique <sup>77</sup>.

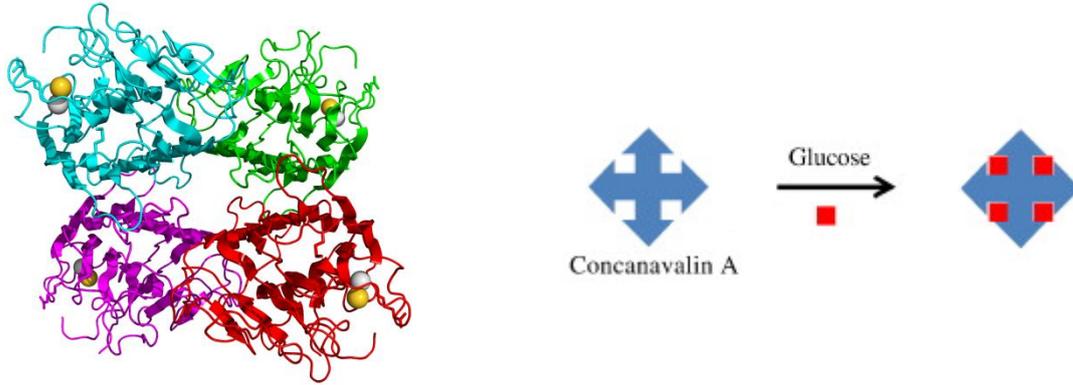


Figure 1.12 : Structure cristalline du tétramère de la concanavalin A et schématisation de la reconnaissance du glucose (Or : Calcium, Gris : Manganèse).

Cette affinité ouvre la voie à l'élaboration de systèmes qui seraient sensibles à la présence de glucose. En effet, la présence de quatre sites de reconnaissance des sucres sur la Con A permet d'envisager son couplage avec un hydrogel pour modifier ses propriétés de gonflement. Dans ce cas, la Con A est utilisée comme un agent réticulant de l'hydrogel. La présence de glucose aura pour effet d'induire une compétition qui aura pour effet de moduler la densité de réticulation du réseau.

### III.2.2 : Hydrogel sensible au glucose modifié par la Con A

Ce concept a été proposé par Hoffman <sup>78</sup>. Un hydrogel, dont les monomères constitutifs sont constitués de motifs saccharidiques ou fonctionnalisés par des motifs saccharidiques, a été préparé et réticulé par la Con A. Quand du glucose libre est additionné au milieu, la Con A ne joue alors plus son rôle de réticulant et l'hydrogel gonfle (Figure 1.13)

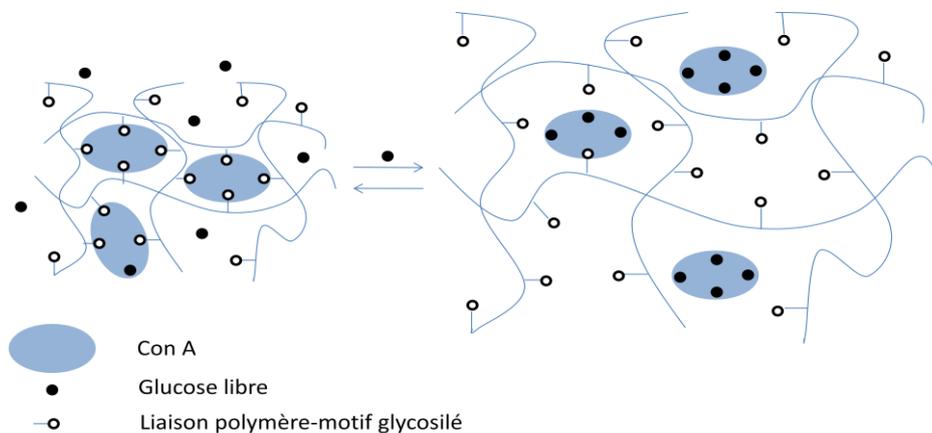


Figure 1.13 : Schéma du mécanisme de gonflement d'un hydrogel réticulé par de la Con A.

Cependant ce système souffre d'une perte progressive d'activité, due aussi à la perte des entités con A dans le matériau qui ne sont pas fixées de manière covalente au réseau. La conséquence directe de cette migration de la Con A vers le milieu extérieur pose alors un problème de toxicité et de perte de réversibilité du système.

Une solution a été trouvée par la même équipe en fixant la Con A de manière permanente à l'hydrogel <sup>79</sup> via des groupes vinyliques. L'hydrogel synthétisé résulte de la copolymérisation de glucosyloxyethyl methacrylate (GEMA), une chaîne polymère comportant des groupes glycosylés et une lectine modifiée. Les conclusions de cette étude montrent une meilleure réversibilité et une immobilisation totale de la Con A ce qui en fait des systèmes plus adaptés pour la délivrance d'insuline dans la mesure où la réversibilité du système est bien meilleure que lorsque la Con A n'est pas fixée.

D'autres équipes ont repris ce concept et sont même allées plus loin dans les études de libération d'insuline.

Hubble <sup>80</sup> a pour sa part développé des membranes d'hydrogels sensibles au glucose qui sont construites sur la copolymérisation de dextran et de Con A modifiés par un groupement polymérisable. La réticulation de l'hydrogel repose d'abord sur le principe de copolymérisation qui assure un squelette non dégradable mais aussi sur les interactions réticulantes réversibles entre la Con A et les groupements glucose du dextran. La perméabilité de l'hydrogel est donc augmentée sélectivement en présence de D-glucose par la diminution de la réticulation du réseau.

Sawicka <sup>81</sup> a pour sa part copolymérisé du dextran et de la Con A modifiée par des groupements acides acryliques. Là encore la réticulation de l'hydrogel peut être modifiée de manière réversible par ajout de glucose. D'un point de vue rhéologique, il a montré que l'augmentation de la concentration de glucose dans le milieu diminuait les modules élastiques et visqueux, prouvant que le nombre de points de réticulation diminuait réversiblement en fonction de la présence de glucose. En outre des études de libération à 37°C ont montré une bonne libération d'insuline.

Bien qu'innovantes, ces technologies souffrent de la toxicité avérée de la Con A à haute concentration. Aussi même si ces systèmes sont prometteurs, d'autres pistes de recherches doivent être poursuivies.

### III.3 : Hydrogels modifiés par la Glucose Binding Protein (GBP)

Cette classe d'hydrogel est apparue très récemment. Elle repose sur la combinaison d'un hydrogel et d'une protéine qui se lie spécifiquement à une molécule de glucose, la Glucose Binding Protein (GBP) découverte vers la fin des années 70. La GBP est une protéine constituée de deux domaines connectés par une charnière. Sa structure a été déterminée à la fois dans l'état lié au glucose et non lié<sup>82, 83</sup>. Lorsqu'il y a interaction avec le glucose, les deux domaines de la protéine subissent une rotation de 31° l'un par rapport à l'autre pour former une structure repliée (Figure 1.14). Le glucose est incorporé dans une cavité, avec une constante de dissociation de  $0,2 \cdot 10^{-6}$  M pour le D-glucose.

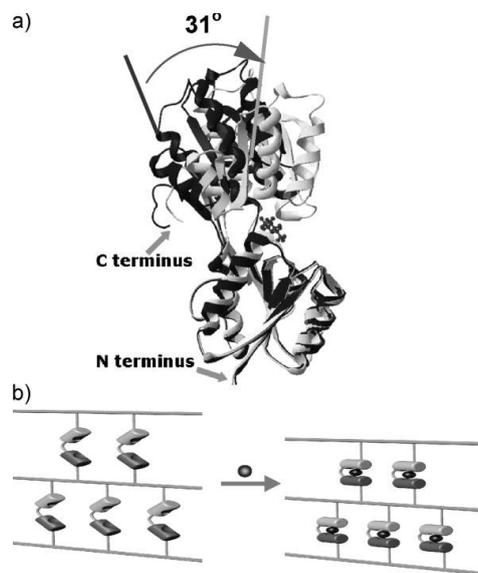


Figure 1.14 : Variation angulaire de la conformation de la protéine GBP et adaptation du concept à l'élaboration d'hydrogel sensible au glucose.

L'équipe de Daunert a donc entrepris de coupler cette entité particulière de reconnaissance moléculaire à la technologie des hydrogels<sup>84</sup>.

Le principe de gonflement des hydrogels utilise la variation conformationnelle lors de la reconnaissance du glucose. En effet, la GBP joue le rôle de réticulant dans un hydrogel d'acrylamide. En présence d'une molécule de glucose (ou de galactose), la GBP se replie. Le réseau est donc plus dense et la taille globale de l'hydrogel plus petite.

Cette contraction sous l'effet de la reconnaissance du glucose a été appliquée à l'élaboration d'une membrane séparant deux milieux. En présence de glucose la membrane est moins perméable et les deux milieux alors en contact peuvent diffuser librement l'un dans l'autre.

Des études ont été menées avec une gamme de protéines de poids moléculaires variables, montrant que la diffusion d'une espèce était (en présence de glucose) inversement

proportionnelle à son poids moléculaire. En outre, il a été montré que la diffusion de BSA marquée était plus rapide en absence qu'en présence de glucose. Ces résultats sont à rapprocher de la taille des pores de l'hydrogel qui diminue en présence de glucose. Cependant, pour être appliqué à la délivrance d'insuline, il serait nécessaire de provoquer un gonflement de l'hydrogel plutôt que sa contraction.

#### *III.4 : Hydrogels modifiés par l'acide phénylboronique*

Comme nous l'avons montré dans les trois derniers paragraphes, les matériaux sensibles au glucose peuvent être développés grâce à la combinaison d'une matrice hydrogel et d'un récepteur naturel sensible au glucose comme la GOD, la Con A ou encore une GBP. Une méthode très différente a vu le jour sous l'impulsion de l'équipe du Professeur Kataoka qui a été le premier à développer des édifices fonctionnalisés par un récepteur synthétique, l'acide phénylboronique (PBA) <sup>85</sup>.

##### *III.4.1 : L'acide phénylboronique comme récepteur au glucose*

L'acide phénylboronique et ses dérivés sont connus et bien décrits dans la littérature pour leur faculté à former des esters cycliques avec les espèces de type polyol <sup>86-89</sup>, l'une des interactions les plus fortes parmi les paires simples et réversibles en milieu aqueux. Or le glucose est effectivement un polyol. De tels systèmes sont donc de bons candidats pour leur sensibilité au glucose. Détaillons un peu plus le phénomène de reconnaissance moléculaire mis en jeu par l'acide phénylboronique.

Les acides boroniques réagissent avec les diols 1,2 ou les 1,3 pour former des esters cycliques à 5 ou 6 membres en solution aqueuse. La complexation des diols par les acides boroniques met en jeu un processus compliqué par les différentes formes que peuvent prendre les espèces en solution (Figure 1.15).

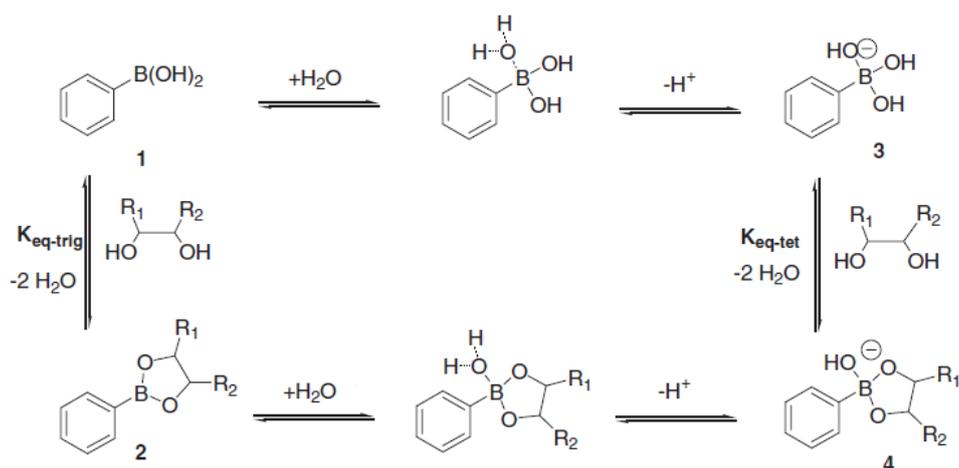


Figure 1.15 : Mécanisme de complexation des diols par les acides boroniques.

Les acides boroniques sont caractérisés par l'équilibre entre leur forme neutre (acide) et leur forme chargée (basique). Une quantité équivalente de chacune des formes est obtenue pour un pH égal au pKa de cette espèce. Lorsque le pH est inférieur au pKa, la forme neutre de l'acide boronique (**1**) sera majoritaire. Une molécule d'eau est liée à cette espèce de configuration  $sp^2$ . A pH plus élevé, l'eau se déprotone et s'y associe pour former un boronate chargé (**3**). Une fois cette liaison faite, l'environnement électronique de l'atome de bore passe du niveau  $sp^2$  au niveau  $sp^3$ , ce qui traduit une modification géométrique de la configuration spatiale de trigonal plan à tétraédrique. La configuration de la forme chargée favorise la formation d'un complexe avec le groupement diol des saccharides en position cis selon une réaction de condensation <sup>90</sup>. En effet, en configuration  $sp^2$ , les acides boroniques présentent un angle de  $120^\circ$  qui est réduit à  $108^\circ$  lors de la formation de l'ester. Cette compression de l'angle favorise la déprotonation pour adopter une configuration  $sp^3$ . Ainsi, la formation d'un ester par complexation d'un diol rend le bore plus acide, ce qui diminue le pKa du système. Selon le schéma de la figure 1.16,  $K_{\text{trig}}$ , qui décrit l'équilibre entre les deux espèces boroniques (**1** et **2**), est négligeable comparé à  $K_{\text{tet}}$ , qui décrit l'équilibre entre les deux boronates (**3** et **4**). L'équilibre total entre les formes non complexées et complexées s'écrit  $K_{\text{eq}}$  (Figure 1.16).

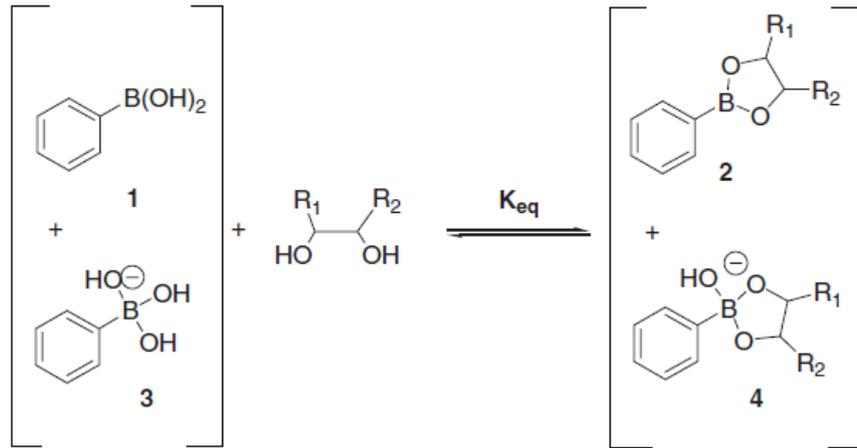


Figure 1.16 : Equilibre entre les différentes formes d'acide phénylboronique.

Ainsi, l'équilibre de complexation entre l'acide phénylboronique et le glucose se résume sous la forme suivante (Figure 1.17) :

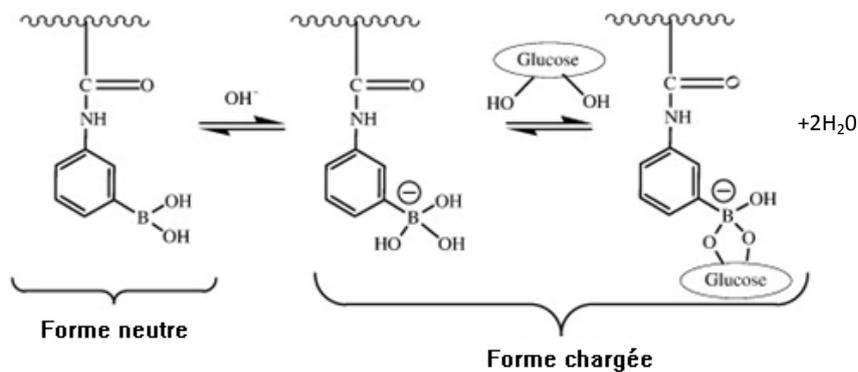


Figure 1.17 : Equilibre de complexation entre l'acide phénylboronique et le glucose.

Pour un pH voisin du pKa de l'acide phénylboronique, l'ajout de glucose va déplacer l'équilibre vers la forme chargée de l'ester. C'est ce phénomène qui est mis à profit pour la préparation d'hydrogels sensibles au glucose.

### III.4.2 : Les hydrogels sensibles au glucose, stratégies de développement

#### Hydrogels à LCST

Kataoka et son équipe ont été des pionniers dans ce domaine. En 1994<sup>91</sup>, ils ont créé le premier polymère « intelligent », dérivé de l'acide phénylboronique, sensible au glucose. Ils ont synthétisé un copolymère constitué de N,N-diméthylacrylamide contenant 15% en mole d'acide 3-(acrylamido)phénylboronique (APBA ou AAPBA) qui présente une LCST dépendant de la concentration en glucose. De nature hydrophobe, l'introduction de PBA abaisse la LCST de copolymère comparativement à un homopolymère de N,N-diméthacrylamide (toujours soluble dans l'eau quelle que soit la température). L'addition de

glucose à un pH inférieur ou égal au pKa du dérivé boronique, favorise la forme chargée de l'ester. L'hydrophilie du polymère augmente simultanément, ce qui se traduit par une augmentation de la LCST. Ainsi, l'introduction de PBA modifie la LCST du polymère en fonction de la concentration en PBA mais aussi en fonction de la concentration en glucose. Plus d'unités PBA seront présentes, plus la LCST du polymère sera basse mais plus elle sera augmentée en présence de glucose.

Forts de ces résultats, Kataoka et son équipe ont exploité cette propriété pour développer des hydrogels sensibles au glucose. C'est ainsi qu'en 1998, cette équipe a développé un hydrogel basé sur la copolymérisation d'APBA, de NIPAM et de N,N-méthylènebisacrylamide (BIS)<sup>92</sup>. Un hydrogel sensible au glucose dont le taux de gonflement est proportionnel à la teneur en glucose du milieu a ainsi été obtenu. Le NIPAM joue le rôle de monomère alkylacrylamide, le PBA de récepteur au glucose et le BIS de réticulant du réseau. La majeure partie de l'hydrogel est constituée du monomère alkylacrylamide (environ 90%) alors que le récepteur n'entre dans la composition qu'à hauteur de 10%. Les études ont démontré une sensibilité au glucose dans des conditions de pH basique (pH 9) et en présence de NaCl (0,15 M). Plus tard la même équipe a modifié la structure de son récepteur pour atteindre un bon fonctionnement en conditions de pH physiologique. En effet, comme nous l'avons souligné, le gonflement de l'hydrogel s'opère s'il y a un déplacement de l'équilibre des espèces vers la forme chargée, de telle sorte que l'hydrophilie augmente. Ceci ne peut donc avoir lieu que pour un pH voisin ou légèrement inférieur au pKa du dérivé phénylboronique. Or, le pKa du récepteur initialement utilisé était de 8,2 et l'hydrogel était sensible au glucose à pH 9. La synthèse d'un nouveau monomère dont le pKa est de 7,8 permet un meilleur fonctionnement de l'hydrogel à pH 7,4<sup>93, 94</sup>. Ce n'est que très récemment que l'équipe a encore amélioré son système pour qu'il puisse opérer dans les conditions physiologiques de salinité, de température et de pH ce qui place cette technologie comme un candidat potentiel à la libération d'insuline<sup>95</sup>.

#### *Hydrogels de polyélectrolytes*

Une autre voie pour obtenir un hydrogel dérivé de l'acide phénylboronique susceptible de gonfler en présence de glucose consiste à utiliser la variation de densité de charge comme levier pour modifier le taux de gonflement. En effet, comme nous l'avons souligné, pour un pH proche du pKa, l'équilibre des espèces est déplacé vers la forme chargée lors de l'addition de glucose. Ainsi, la densité de charge du squelette de polymère augmente. La pression osmotique des ions mobiles doit elle aussi augmenter et provoquer un gonflement de l'hydrogel. Cette technologie est applicable à des hydrogels très hydrophobes c'est-à-dire qui

ne présentent pas de LCST. Elle a été adoptée par l'équipe d'Asher, qui a copolymérisé de l'acrylamide avec de l'APBA <sup>96</sup>. En milieu désionisé, l'addition de glucose provoque le gonflement de l'hydrogel par augmentation de la densité de charges. Cependant, ce gonflement est extrêmement réduit dans des milieux de force ionique modérée, compte tenu du faible différentiel de concentration en contre-ions dans les milieux interne et externe.

#### *Applications des hydrogels sensibles au glucose*

Depuis les travaux pionniers menés par l'équipe de Kataoka, un fort engouement s'est développé autour des hydrogels sensibles au glucose à base de dérivés PBA. De nombreux exemples ont été reportés dans la littérature. Bien que l'origine du gonflement des systèmes étudiés soit identique aux deux méthodes décrites ci-dessus, l'originalité des travaux réside dans les diverses applications développées à partir de ces systèmes, principalement dans le domaine de la délivrance d'insuline et le développement de capteurs.

#### *Libération d'insuline*

Concernant la libération d'insuline, Kataoka a imaginé deux stratégies différentes.

Dans la première <sup>97</sup>, l'insuline est modifiée par des groupements glycosylés. Cette insuline modifiée présente de bonnes dispositions à se lier aux complexes PBA et à être libérée en présence de glucose libre dans le milieu par un mécanisme de compétition entre l'équilibre de complexation PBA/insuline, PBA/glucose (Figure 1.18). De part la nature du PBA utilisé ( $pK_a=8,6$ ), ce mécanisme de libération de l'insuline ne peut avoir lieu qu'à un pH proche du  $pK_a$  du PBA. Kataoka a modifié la structure de l'hydrogel pour diminuer le  $pK_a$  du PBA. Le mécanisme de libération a été rendu compatible dans les conditions de pH physiologique.

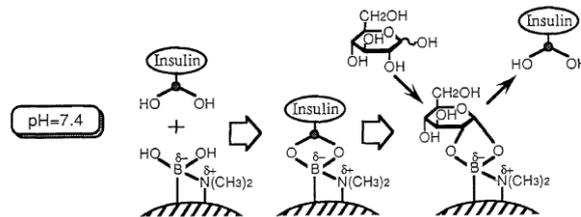


Figure 1.18 : Mécanisme de libération de l'insuline glycosylée par compétition.

Les résultats des études montrent alors une délivrance contrôlée et réversible de l'insuline en fonction de la concentration en glucose. Il convient de noter que ce mécanisme de compétition n'utilise pas les propriétés de gonflement de l'hydrogel.

D'une autre manière Kataoka <sup>92</sup> a étudié la libération d'insuline par des hydrogels de pNIPAM-co PBA. Même si le pH de travail n'est que de 9 à cause du  $pK_a$  élevé du PBA,

cette technologie présente la particularité de délivrer de l'insuline selon un mécanisme on-off régulé par la présence de glucose. Ce processus est réversible (Figure 1.19).

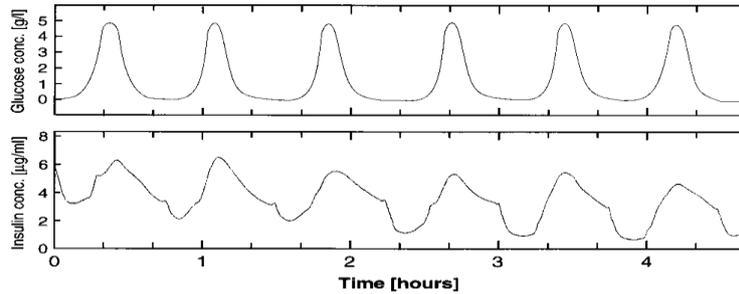


Figure 1.19 : Libération d'insuline en réponse aux variations de glucose d'un hydrogel de pNIPAM-co PBA. Extrait de <sup>92</sup>.

#### *Travaux pour les applications en tant que détecteurs*

Si les hydrogels permettent de libérer de l'insuline, ils peuvent être aussi utilisés pour détecter des espèces en présence dans un milieu considéré et revêtir la fonction de capteurs. Dans ce cas, la transition de phase volumique génère un signal détectable. Nous classerons ces exemples selon le mode de détection utilisé.

Détection électrochimique : Les capteurs électrochimiques au glucose, pour la plupart ceux-là mêmes qui sont commercialisés pour les patients diabétiques, sont basés sur l'utilisation de la GOD comme récepteur.

L'acide phénylboronique associé à un hydrogel peut également conduire à une détection électrochimique, bien que son principe soit différent. Ainsi, l'équipe de Katoka <sup>98</sup> a élaboré une électrode recouverte par une membrane constituée d'un hydrogel à base de N,N-Diméthylacrylamide (DMAAm) et de N,N-diméthylaminopropylacrylamide (DMAPAA), modifié par un récepteur PBA, elle-même couverte de poly(vinylalcool) (PVA) présentant des fonctions OH libres qui se couplent avec les PBA. En présence de glucose, la membrane gonfle sélectivement par dissociation du PVA. L'augmentation de la taille des pores permet une augmentation de la mobilité des ions à proximité de la surface de l'électrode. Une augmentation de la concentration en glucose amène alors une augmentation du courant de manière proportionnelle et réversible.

Détection optique : Afin de traduire la variation de volume d'un hydrogel en signal optique, différentes équipes ont eu l'idée similaire de suivre ces variations grâce au couplage de l'hydrogel à un réseau périodique diffractant la lumière visible. Le réseau cristallin étant asservi à l'hydrogel, la périodicité du réseau varie en fonction de son taux de gonflement et

donc la longueur d'onde diffractée varie de manière similaire. Trois voies permettent d'obtenir un tel système :

- L'inclusion d'un cristal colloïdal dans le gel <sup>96, 99-102</sup>
- Un arrangement de cavités dans le gel ou opale inverse <sup>103-107</sup>
- Le gel lui-même forme un motif périodique sous forme d'hologramme <sup>108-112</sup>.

Dans chaque cas, la sensibilité au glucose induit une réponse de la part de l'hydrogel. Le pas du réseau qui diffracte la lumière change de taille caractéristique, modifiant la longueur d'onde diffractée, de manière proportionnelle à la concentration en saccharide du milieu.

Asher a été le premier à ouvrir cette voie, initialement pour des hydrogels sensibles à la température et au pH, et également sensibles aux ions <sup>99</sup>. Ce n'est qu'en 2003 que le principe sera appliqué à la détection du glucose <sup>102</sup>. Cette équipe a eu l'idée d'incorporer un réseau périodique de nanoparticules de latex dans la matrice d'hydrogel. Ces systèmes portent le nom de *Polymerized Colloidal Crystal Array* (PCCA). Ainsi, lors des variations de gonflement de la matrice, les écarts entre particules varient. Ceci a pour effet de modifier le pas du réseau et donc la longueur d'onde diffractée (Figure 1.20). Ces matériaux sont obtenus en polymérisant les différents comonomères en présence du réseau ordonné de particules. Seules des matrices neutres peuvent être utilisées car l'ordre du réseau n'existe que lorsque les interactions électrostatiques sont à longue portée (milieu désionisé).

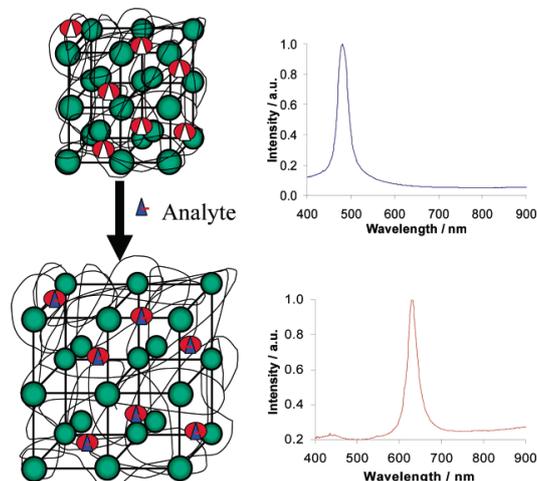


Figure 1.20 : Principe de fonctionnement d'un PCCA et diffraction de la lumière. Extrait de <sup>96</sup>.

Au lieu d'inclusion de particules, l'introduction d'un réseau de cavités peut permettre la même approche. Ce type de matériau porte le nom d'opale inverse. De surcroît, ce type de construction permet une diminution du temps de réponse de l'édifice qui résulte de la meilleure diffusion à travers les espaces vides. Dans cet objectif, Kataoka et al. <sup>106</sup> ont obtenu une opale inverse d'hydrogel sensible au glucose. L'opale directe a été obtenue par dépôt d'un

cristal colloïdal de particules de silice. L'hydrogel a ensuite été polymérisé dans les interstices. Le réseau de particules a finalement été dissous pour obtenir l'opale inverse (Figure 1.21). Des résultats similaires ont été obtenus par l'équipe de Braun et al. en utilisant des particules de polystyrène au lieu de la silice <sup>107</sup>. La réponse de ce système est bien limitée par la diffusion.

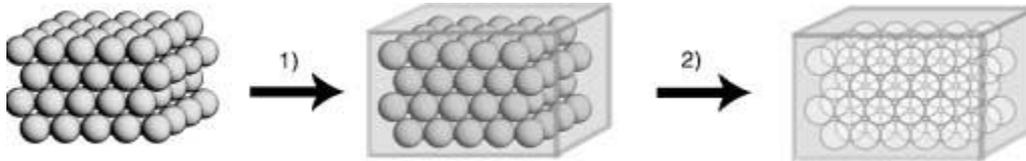


Figure 1.21 : Description de la construction d'une opale inverse d'hydrogel.

Toujours dans le même esprit, un capteur optique peut être obtenu en combinant une opale inverse non sensible au glucose mais remplie de nanoparticules de gel sensibles au glucose <sup>113</sup>. Pour ce faire, un cristal photonique de billes de silice est élaboré. Puis du styrène est incorporé au cristal et polymérisé jouant ainsi le rôle de matrice. Enfin, l'édifice est plongé dans une solution de HF et les espaces ainsi obtenus sont alors remplis de nanoparticules de gel sensibles au glucose. La variation de gonflement de ces dernières crée une variation d'indice optique. La position du pic de Bragg ne varie pas mais l'intensité du signal change. Ainsi, on détecte la présence de glucose par une diminution de l'intensité du pic de Bragg car le réseau d'hydrogel gonfle.

Une dernière façon de créer un réseau périodique est d'organiser l'hydrogel sous forme d'un réseau holographique. Ces travaux ont été réalisés par Kibilan et collaborateurs <sup>109-112, 114</sup>. Un film mince d'hydrogel sensible au glucose est polymérisé. Des sels d'argent sont introduits par diffusion dans l'hydrogel. Lors de l'exposition à des franges d'interférences, seules les parties exposées à la lumière vont être transformées en nanoparticules d'argent AgO. Elles forment alors un réseau holographique, qui va diffracter la lumière. La diffraction dépendra de l'état de gonflement de l'hydrogel.

Détection de la pression : D'autres capteurs sont basés sur une détection et un changement de pression. L'équipe de Siegel <sup>115</sup> a reporté la construction et la caractérisation d'un nouveau capteur au glucose implantable basé sur la technologie des hydrogels.

Cet outil repose sur un système capacitif résonnant couplé à un hydrogel sensible confiné entre deux membranes nanoporeuses rigides et un mince diaphragme de verre flexible. Quand les molécules de glucose passent à travers la membrane nanoporeuse, l'hydrogel gonfle et modifie la courbure du diaphragme de verre qui correspond au plat de système capacitif. Le

changement de fréquence de résonance du système peut donc être détecté. L'équipe a étudié le comportement d'un hydrogel sensible au glucose par le biais de récepteurs PBA dans des conditions de pH physiologiques sur une gamme en concentration allant de 0 à 20 mM. Le changement d'état de gonflement se fait sur une durée de 90 minutes ce qui est encore trop long pour renseigner en continu le patient sur sa glycémie. Néanmoins le système actuel qui est déjà implantable en sous cutané ( $5 \times 5 \times 0,8 \text{ mm}^3$ ) peut être diminué de taille pour que sa cinétique de gonflement soit plus grande (hydrogel et membrane poreuse de plus petite taille).

Détection par effet transistor : Le transistor à effet de champ est un dispositif dont la particularité est d'utiliser un champ électrique pour contrôler la forme et donc la conductivité d'un interstice dans un matériau semi-conducteur. L'équipe de Kataoka <sup>116</sup> s'est inspirée de cette technique pour développer un transistor où le canal serait remplacé par un hydrogel sensible au glucose. Aussi, ce n'est plus un stimulus électrique mais un stimulus chimique qui contrôle l'effet transistor. Les changements de signaux du transistor à effet de champ au cours de la transition d'état de gonflement sont dus aux changements de permittivité du gel en réponse à la modification de l'état de gonflement de l'hydrogel. La largeur de l'interstice est donc contrôlée de manière réversible par le gonflement de l'hydrogel et donc par la concentration en glucose dans le milieu.

*III.4.3 : Quelques difficultés rencontrées avec l'acide phénylboronique comme récepteur*

*pH de travail*

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le point clé pour obtenir un gel sensible au glucose à partir d'un dérivé boronique est de se placer à un pH voisin du pKa du récepteur, afin d'assurer le passage de la forme neutre à la forme chargée lors de la reconnaissance du glucose. Certaines équipes ont donc pris la voie de la synthèse organique pour développer un ensemble de dérivés dont les pKa peuvent varier entre 4 et 9 pour couvrir une large gamme de pH à commencer par le pH physiologique <sup>117</sup>. D'un point de vue pratique, la modulation du pKa de l'acide phénylboronique se fait par la présence de groupements électro-attracteurs ou électro-donneurs autour du motif boronique. Les groupes électro-attracteurs ont tendance à diminuer le pKa, tandis que les groupes électro-donneurs augmentent le pKa. L'équipe de Kataoka a utilisé cette méthode pour préparer un monomère dont le pKa est abaissé à 7,8 <sup>93</sup> et ainsi, développer l'hydrogel correspondant, sensible au glucose à pH physiologique. Une autre approche consiste à utiliser la présence d'atomes d'azote au voisinage du bore. La

création d'une liaison acide-base de Lewis entre un bore, pauvre en électrons, et l'azote, riche en électrons, permet d'augmenter l'acidité du bore, ce qui abaisse le pKa du dérivé boronique et protège le complexe PBA-glucose de l'hydrolyse à des pH relativement bas <sup>118</sup>. C'est ainsi que des groupes amines ont été introduits dans différents systèmes polymériques à base de PBA, comme des monomères tels que le *N,N*-(diméthylamino) propylacrylamide (DMPA) <sup>97</sup>, le 2-(diméthylamino) ethylmethacrylate (DMAEMA), ou le 2-(diméthylamino) ethylacrylate (DMAEA) <sup>119, 120</sup> ou encore le greffage covalent de poly(L-lysine) <sup>121</sup>.

#### *Détection du glucose et sélectivité vis-à-vis des autres saccharides*

Jusqu'à présent, nous avons expliqué le principe de détection du glucose en se basant sur la détection des diols en général. Mais qu'en est-il de la sélectivité vis-à-vis des autres diols et en particulier, des autres saccharides ? Pour aborder le sujet, nous devons nous pencher sur les constantes de complexation des diols par l'acide boronique. En 1959, Lorand et Edwards <sup>122</sup> ont été les premiers à établir la sélectivité de l'acide phénylboronique vis-à-vis des monosaccharides, en mesurant la diminution du pH provoquée par l'addition d'un diol à une solution d'acide boronique. Cette méthode suppose que tout l'ester formé est sous forme boronate. Cette hypothèse simplificatrice induit quelques discordances dans les valeurs obtenues par rapport à celles déterminées par d'autres méthodes ultérieurement (Tableau 1.1). Cependant, ces valeurs tiennent lieu de référence dans beaucoup de travaux sur l'acide boronique, d'autant que la sélectivité mesurée a pu être confirmée par la suite.

*Tableau 1.1 : Constantes d'associations de diols avec un acide phénylboronique. Extrait de <sup>123</sup>.*

Diols	Association constants	
	a ( $K_{tet}$ )	b ( $K_{ec}$ )
1,3-propanediol	0.88	
ethylene glycol	2.8	
phenyl-1,2-ethanediol	9.90	
glucose	110	4.6
fructose	4370	160
catechol	17500	830
sorbitol		370
mannitol	2275	120
galactose	276	15

Le changement de pKa peut également être déterminé par RMN du bore <sup>124-126</sup>. Cela permet une mesure directe de  $K_{tet}$ . Cette méthode est toutefois peu sensible et ne peut être adoptée pour l'ensemble des constantes de complexation. D'autres méthodes spectroscopiques ont été développées dans le cas où les acides boroniques ont une signature spectroscopique <sup>127</sup>. Par exemple, le changement d'absorbance peut être mesuré entre la forme trigonale et la forme tétraédrique à une longueur d'onde en fonction du pH, ce qui permet de déterminer le pKa de

l'espèce. Cependant, une méthode plus générale et sensible, utilisant un rapporteur fluorescent, le rouge Alizarine (ARS), a été développée plus récemment par Sprinsteen et al.<sup>87, 128</sup>, pour déterminer les constantes de complexation entre les acides boroniques et les diols. L'ARS est une molécule non fluorescente qui devient fluorescente lorsqu'elle est liée à un dérivé d'acide boronique. L'addition de glucose va entrer en compétition avec l'ARS pour se lier au dérivé d'acide boronique et ainsi diminuer l'intensité de fluorescence (Figure 1.22).

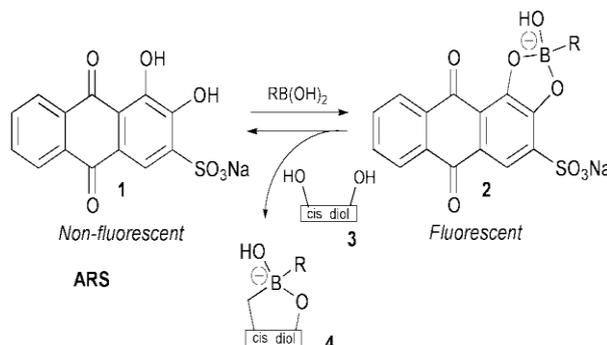


Figure 1.22 : Schéma de principe de la détermination des constantes de complexation.

Les constantes de complexation ont été à nouveau déterminées en 2002. Elles sont comparées aux premières dans le tableau 1.1. Les valeurs respectent le même ordre mais elles sont plus faibles que les premières, ce qui est expliqué en partie par des effets liés au choix du tampon. Les valeurs de complexation obtenues aux différents pH (tableau 1.2) permettent bien de vérifier que les constantes de complexation sont d'autant plus élevées que la forme tétraédrique est majoritaire, c'est-à-dire à pH plus élevé que le pK<sub>a</sub> (8,8 dans l'exemple de l'acide phénylboronique).

Tableau 1.2 : Constante de complexation de différents sucres avec un dérivé d'acide phénylboronique.

Extrait de<sup>87</sup>.

pH	$K_{eq} (M^{-1})$ of the complex with PBA					
	Fructose	Catechol	Glucose	Galactose	Sorbitol	ARS
4.6						190
5.8	4.6	31				990
6.5	29	150	0.84	2.1	47	1200
6.6	35	160				1500
7.0	92	500	2.0	8.4	160	1500
7.4	160	830	4.6		370	1300
7.5	210			17		1100
8.0	310	2900	7.2	38	840	670
8.5	560	3300	11	80	1000	450

La sélectivité mesurée avec l'acide phénylboronique semble être respectée quel que soit l'acide monoboronique considéré. Il a été constaté que les cis-diols adjacents et rigides des saccharides forment plus facilement des esters cycliques que les diols simples non cycliques comme l'éthylène glycol. Dans le cas des saccharides, la formation de l'ester cyclique est

compliquée par leur possibilité d'isomérisation entre les formes pyranose et furanose. Il apparaît également que, parmi les monosaccharides, le fructose est généralement bien mieux complexé que le glucose. Une forte compétition avec le galactose est aussi mesurée.

La sélectivité à l'échelle moléculaire a été vérifiée sur des polymères à base de PBA. Ainsi, Mattiasson a travaillé sur la reconnaissance de monosaccharides et de glycoprotéines en s'intéressant à la question de la sélectivité. En copolymérisant un monomère de NIPAM avec un dérivé de PBA, des polymères à LCST ont été obtenus. Là encore, la transition de phase est déplacée vers des valeurs plus importantes en présence de monosaccharides ou de glycoprotéines. Le saut de LCST est d'autant plus important que l'affinité pour le saccharide considéré est grande. L'ordre des affinités respecte celui obtenu pour les petites molécules.<sup>129,</sup>

130

Si ce manque de sélectivité peut se révéler critique pour certaines applications *in vivo*, il a été mis à profit pour des applications dans le cadre de la détection de cellules. En effet, les cellules ou les bactéries sont recouvertes en surface de motifs saccharidiques, provenant par exemple de glycoprotéines. Des surfaces recouvertes de motifs PBA, sous forme moléculaire ou de brosse de polymère, peuvent promouvoir l'adhésion cellulaire ou bactérienne par affinité.

L'équipe de Mattiasson<sup>131, 132</sup> a construit des surfaces optiques transparentes de silice fonctionnalisée par des récepteurs au glucose de type PBA. En présence de certaines cellules cancéreuses mammifères ou de cellules de levures, ont été notés des changements d'indice optique entre les marqueurs des cellules et les composés PBA. Ces changements sont à relier à la liaison entre les molécules PBA et les molécules d'intérêt. Ce phénomène est réversible et les cellules isolées peuvent être désorbées de la surface par un rinçage par une solution de fructose dont la constante de complexation est grande en rapport à la constante de complexation du couple PBA/Cellule. Cette étude montre l'intérêt de ces surfaces pour la séparation cellulaire par affinité, avec une possibilité de récupération.

Notons également que les acides phénylboroniques ont une affinité particulière pour l'acide *N*-acétylneuraminique (acide sialique) et ses dérivés dans des conditions physiologiques. La constante d'affinité est environ 3 à 5 fois plus grande que celle des autres monosaccharides tels que le glucose et le galactose<sup>133</sup> pour un pH inférieur au pKa de l'acide boronique. Ainsi les résidus d'acide sialique (SA), qui sont présents dans certaines glycoprotéines et gangliosides exprimés sur la surface membranaire des lymphocytes, peuvent être reconnus de façon spécifique dans les conditions physiologiques. Grâce à ce mécanisme, certains

polymères à base de PBA ont ainsi provoqué la prolifération de lymphocytes et particulièrement des cellules tueuses en stimulant l'expression de gènes récepteurs des cellules d'interleukine (<sup>134, 135</sup>). Plus récemment, l'acide sialique a été détecté par transistor à effet de champ en utilisant une surface d'or modifiée par une monocouche d'acide phénylboronique. Cette technique présente un intérêt pour le diagnostic du diabète ou du cancer. En effet, cette molécule est surexprimée à la surface des cellules dans certains types de cancer, alors que son expression à la surface des érythrocytes diminue chez les patients diabétiques. L'acide sialique a pu être mesuré par cette technique directement à la surface des érythrocytes <sup>136</sup>.

*III.4.4 : Mise en œuvre d'hydrogels sélectifs du glucose (variation du gonflement par contraction)*

Dans tous les exemples précédents, nous avons parlé d'un phénomène de complexation 1 : 1 engageant une unité saccharidique pour une unité PBA. Or une autre stœchiométrie de complexe existe entre le glucose et l'acide phénylboronique : le complexe bis-bidentate glucose-acide boronique, noté complexe 2 : 1, représenté ci-dessous (Figure 1.23). Comparée à la forme précédente, cette complexation est sélective du glucose car le glucose est un des rares saccharides à posséder deux groupements cis diol pouvant former un tel édifice.

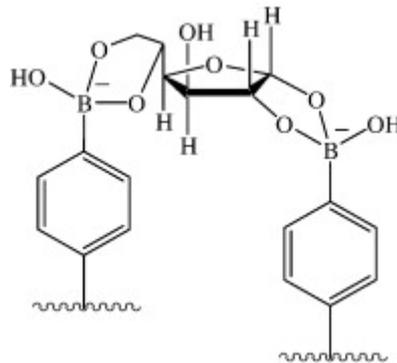


Figure 1.23 : Mécanisme 2 : 1 de reconnaissance du glucose par un motif PBA.

Le premier à utiliser cette spécificité dans le cas des hydrogels a été Asher <sup>102</sup> dans des PCCA à base d'hydrogel d'acrylamide, de polyéthylène glycol (PEG) pendant et d'un dérivé PBA. Lors de l'ajout de glucose, les motifs PBA forment des complexes 2 : 1 avec le glucose. Ainsi, les récepteurs au glucose qui sont engagés dans un complexe rendent le réseau plus réticulé et une contraction de l'hydrogel est observée. Dans le cas d'un PCCA, la contraction de l'hydrogel diminue le pas du réseau et la longueur d'onde diffractée diminue. Asher a prouvé que cette contraction était spécifique du glucose par rapport au fructose, au mannose ou encore au galactose.

Cette première étude ne présente cependant qu'une contraction à un pH de 8,5 ou de 9,5, c'est-à-dire à des pH de valeurs supérieures ou égales au pKa du récepteur PBA de l'hydrogel. En effet en dessous du pKa, le PBA est dans sa forme neutre et la réaction de reconnaissance avec le glucose ne peut avoir lieu. Un autre dérivé du PBA, de pKa plus bas, a été synthétisé. Il a permis le développement d'hydrogels pour la détection du glucose dans des conditions physiologiques. Ces PCCA ont été incorporés à des lentilles pour la détection des niveaux de glucose de manière non invasive <sup>137</sup>. La même équipe a continué d'améliorer les formulations des hydrogels pour en améliorer la dynamique de réponse <sup>138</sup> et détecter des concentrations élevées en glucose <sup>139</sup>.

Suite à ces premiers travaux d'Asher, de nombreuses autres équipes ont développé des formules de gels basés sur une contraction sélective. L'équipe de Strongin a développé un gel dont la contraction est sélective en milieu sanguin <sup>140</sup>. Ici la stabilisation de l'atome de bore n'est pas due à la salinité sanguine mais à la présence de groupements amines, qui abaissent le pKa de l'acide boronique tout en réduisant la répulsion électrostatique.

L'équipe de Stokke a développé un hydrogel sélectif en conditions physiologiques stabilisé également par un comonomère cationique qui joue le rôle de stabilisateur. Sans, la contraction n'est pas possible. L'hydrogel est fabriqué en incorporant un récepteur APBA (pKa=8,5), un comonomère cationique dans une matrice acrylamide. Le mode de détection repose sur le fait que le gel forme une calotte hémisphérique à l'extrémité d'une fibre optique comme une cavité de Fabry Perot. La lumière incidente est partiellement réfléchi aux interfaces fibre/gel et gel/solution. La longueur optique, qui peut être déduite du signal d'interférence, varie en fonction du gonflement du gel <sup>141, 142</sup>.

Enfin une autre équipe a développé un système micro électromécanique où une micropoutre est prisonnière d'une solution de polymère concentrée <sup>143</sup>. Les variations de viscosité de la solution sont détectées par le « cantilever ». Le copolymère composé d'acrylamide et de PBA forme une solution visqueuse, qui devient un hydrogel lorsque du glucose est ajouté à la solution, dû aux interactions multiples PBA-Glucose. Ainsi, le fluide voit son nombre de nœuds de réseau augmenter. La viscosité change et la micropoutre ressent ce changement. Il est alors possible d'assurer une détection en continu du glucose.

Si tous ces systèmes représentent des capteurs intéressants, la contraction des hydrogels a aussi été utilisée dans le but de délivrer de l'insuline. Siegel a en effet imaginé une libération d'insuline par le biais d'une valve. Les hydrogels sensibles au glucose sont disposés dans des

édifices microfluidiques de type microvalve. Dans l'état gonflé, l'hydrogel occupe la totalité de l'interstice ou des orifices. Si le gel se contracte en présence de glucose, l'orifice n'est alors plus bouché et l'insuline peut s'échapper de manière proportionnelle à la concentration en glucose. Pour l'heure, le dispositif microfluidique a été conçu mais n'a pu être mis en œuvre dans des conditions physiologiques. En effet, les hydrogels utilisés par cette équipe n'ont la faculté de se contracter que dans des conditions de pH basique<sup>90, 144</sup>.

#### **IV : Les microgels et les nanogels**

##### *IV.1 : Définition des microgels et des nanogels, intérêt*

En introduction, nous avons défini les hydrogels comme des édifices polymériques tridimensionnels qui peuvent être divisés selon divers critères (cohésion structurale, réponse aux stimuli) mais les hydrogels peuvent aussi être classés en fonction de leur taille, selon la nomenclature IUPAC :

- les macrogels dont l'ordre de grandeur est de l'ordre du millimètre ou plus,
- les microgels dont la taille varie entre 100 nm et 100  $\mu\text{m}$ ,
- les nanogels dont la taille varie entre 1 nm et 100 nm.

Un microgel, de même qu'un nanogel est défini comme une particule de latex réticulée gonflée par un bon solvant<sup>27</sup>. Nous pouvons également le définir comme une phase dispersée, constituée de particules discrètes de gel de polymère. Les microgels sont donc dans des états intermédiaires entre des polymères branchés et des systèmes macroscopiques réticulés<sup>145</sup>. Les microgels possèdent de nombreuses propriétés communes avec leurs homologues macroscopiques mais leur structure finale dépend également de leur voie de synthèse. Leur dynamique est également très différente de celle des macrogels. En effet, les variations de volume d'un hydrogel lors de l'application d'un stimulus mettent en jeu des phénomènes cinétiques qui dépendent de la diffusion du solvant à travers le réseau mais aussi de la dynamique de relaxation du réseau (diffusion collective). Or il a été montré par Tanaka<sup>146, 147</sup> que le temps caractéristique de relaxation du réseau était proportionnel au carré de sa longueur caractéristique. Ainsi, les petits hydrogels et en particulier les microgels auront une réponse bien plus rapide. En outre, plus la dimension du gel sera petite, plus la surface totale de l'ensemble des particules sera grande. Il est ainsi possible de tirer partie de cette grande surface spécifique, notamment pour des applications dans le domaine biomédical. Les premiers microgels ont été synthétisés par Staudinger et Husemann dans les années 30. Il

s'agissait de réseaux de poly(divinylbenzene) (DVB) préparés de manière très diluée en solvant organique. Le terme de microgel n'a été introduit qu'en 1949 par Baker<sup>148</sup>.

La recherche concernant les microgels et en particulier, ceux à base d'acrylamide, s'est intensifiée après la publication en 1986 par Pelton et Chibante<sup>149</sup> de la synthèse de microgel de poly(NIPAM) ouvrant la voie aux microgels aqueux subissant une transition de phase à une température proche de celle corporelle. Les microgels ont alors suscité beaucoup d'intérêt à la fois comme particules colloïdales modèles, mais aussi pour leurs applications potentielles, notamment dans la délivrance de médicaments, l'élaboration de biomatériaux, de matériaux optiques, etc. Actuellement la littérature propose une très grande variété de microgels et de nanogels qui répondent à de nombreux stimuli.

#### *IV.2 : Propriétés des microgels*

Nous allons dresser un état des connaissances sur les microgels et les nanogels centré sur les notions utiles à ce manuscrit. Nous ne commenterons pas les différentes méthodes de synthèse de ces objets mais resterons focalisés sur la synthèse des micro/nanogels aqueux à base de polymères à LCST. Nous détaillerons leurs propriétés, leur structure et les applications biomédicales qui en découlent.

##### *IV.2.1 : Découverte, synthèse des microgels thermosensibles par précipitation, contrôle de la taille*

Le procédé le plus couramment utilisé, en particulier pour synthétiser des microgels thermosensibles, est la polymérisation par précipitation. Notons que ce procédé a été baptisé « polymérisation en émulsion sans tensioactif » lors de sa découverte pour les microgels thermosensibles en 1986<sup>149</sup>. Ce terme reste parfois utilisé mais prête à confusion. Il s'agit d'une polymérisation en dispersion, pour laquelle le milieu est homogène avant le début de la polymérisation (monomère et amorceur sont solubles dans la phase continue, contrairement à une polymérisation en émulsion classique) mais devient inhomogène car le polymère formé est insoluble et précipite pour former des particules. La présence de tensioactif n'est pas nécessaire pour stabiliser les particules formées mais il peut cependant être ajouté pour contrôler la taille des objets formés.

Au contraire de la polymérisation en émulsion aqueuse qui jouit d'une large gamme de monomères hydrophobes, la polymérisation en dispersion aqueuse est adaptée à peu de monomères puisque ces derniers sont peu nombreux à être hydrosolubles tout en donnant des polymères hydrophobes. La très grande majorité des publications traitant de la polymérisation

radicalaire en dispersion aqueuse est axée sur la synthèse de microgels thermosensibles, principalement de poly(N-isopropylacrylamide) (pNiPAM) <sup>149</sup> mais aussi d'autres polyacrylamides comme le poly(N-isopropylméthacrylamide) <sup>150</sup> ou le poly(Néthylméthacrylamide) <sup>151</sup>.

En 1986, Pelton et Chibante <sup>149</sup> posent les bases de la synthèse de microgel thermosensible de pNIPAM. L'objectif de ces premières recherches était de préparer, avec un rendement de polymérisation élevé, diverses formulations de microgel uniformes en taille avec des tailles et des degrés de réticulation variés. Pour cela la synthèse s'est appuyée sur la copolymérisation de NIPAM, d'un monomère tétrafonctionnel jouant le rôle de réticulant, le N,N'-methylenebisacrylamide (BIS) et d'acrylamide (AM), ce qui permet de moduler la LCST des copolymères. La réaction est amorcée dans l'eau par le persulfate de potassium. Tous les paramètres de la réaction de copolymérisation ont été étudiés (température, concentration en amorceur, en réticulant, en AM). L'obtention de latex bien définis n'est alors possible que pour des taux de solide n'excédant pas 1%. D'un point de vue mécanistique, la synthèse est menée à une température supérieure à la LCST. En début de polymérisation, l'ensemble des monomères ou des homopolymères constitutifs du microgel sont solubles dans la phase aqueuse. Sous l'effet de la chaleur, l'amorceur génère des radicaux libres. Des oligoradicaux se forment et croissent jusqu'à atteindre un degré critique de solubilité dans les conditions de température. Ils précipitent pour former des nucléi. Ceux-ci vont continuer de réagir avec le monomère ou entre eux pour donner une population uniforme, dont la taille est précisément contrôlée en ajustant la concentration d'agent stabilisant (tensioactif) ou d'agent réticulant. Concernant la réticulation, il a été montré que plus la concentration en réticulant était grande, plus la taille des matériaux était petite. L'ajout d'une trop grande quantité de réticulant conduit également à des particules de taille hétérogène. La présence de tensioactif anionique, comme le dodécyl sulfate de sodium, permet d'abaisser la taille des microgels synthétisés. En effet, le tensioactif s'adsorbe sur les particules de polymère en croissance. Ces particules acquièrent alors une charge de surface. Leur stabilité colloïdale est atteinte pour des tailles plus petites qu'en l'absence de tensioactif, où seuls les résidus sulfates provenant de l'amorceur confèrent une charge aux particules. Ainsi, comme l'a montré McPhee et al <sup>152</sup>, la présence de faibles concentrations en Sodium DodécylSulfate (SDS), jusqu'à 4 mmol.l<sup>-1</sup>, en-dessous de la concentration micellaire critique (CMC), permet de réduire la taille d'un facteur 10 (Figure 1.24).

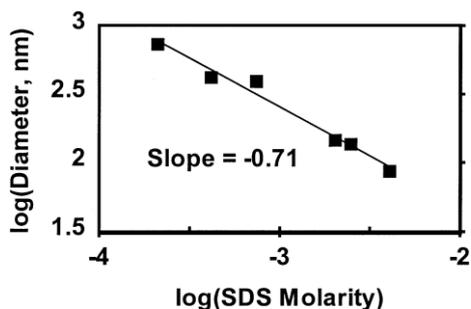


Figure 1.24 : Variation du diamètre des microgels en fonction de la concentration en SDS.

Afin de moduler les propriétés stimulables des microgels, il est possible d'introduire un comonomère. C'est l'idée originale du travail de Pelton et Chibante <sup>149</sup> qui ont introduit l'acrylamide comme comonomère du NIPAM, dans le but de moduler la LCST du polymère synthétisé. L'étude a montré que 10% maximum d'acrylamide pouvaient être incorporés car il est nécessaire que le polymère résultant soit insoluble dans l'eau dans les conditions de synthèse pour respecter le principe de polymérisation par précipitation. D'autres comonomères ont été incorporés avec succès comme le *N*-acryloylglycine <sup>153</sup>, l'acide acrylique <sup>154</sup>, ou le 2-aminoethylmethacrylate hydrochloride <sup>155</sup>.

Il est à noter que l'amorceur n'est pas nécessairement du persulfate de sodium ou de potassium mais peut aussi être un amorceur cationique comme le 2,29-azobis-2-amidiopropane dihydrochloride. Le choix de la nature de l'amorceur sera conditionné par les applications ou par la présence d'un comonomère de charge identique.

#### IV.2.2 : Contrôle de la structure

##### *Structure des microgels réalisés par procédé batch*

La plupart des microgels synthétisés dans ces conditions utilisent un processus « batch », c'est-à-dire avec une introduction simultanée de tous les ingrédients.

Dans ces conditions, des études plus poussées ont été menées pour connaître la répartition de l'amorceur au sein de chaque microgel. Les premières études ont été menées par Pelton et Mc Phee <sup>156</sup>. Ces auteurs ont mesuré les taux de conversion du NIPAM et du réticulant, le BIS. De toute évidence (Figure 1.25), le réticulant réagit beaucoup plus rapidement que le NIPAM. Il est donc raisonnable de penser que le réticulant sera plus concentré au cœur des microgels qu'en périphérie.

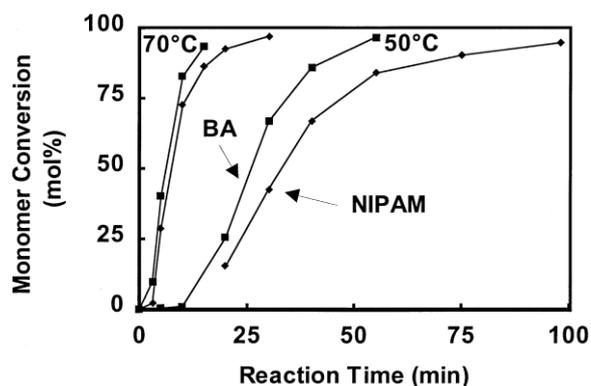


Figure 1.25 : Conversion de monomères constitutifs d'un microgel en fonction du temps de réaction et de la température du milieu. Extrait de <sup>156</sup>.

Cette hypothèse fut vérifiée par la suite grâce à des études de diffusion de lumière <sup>157</sup>, de diffusion de neutrons aux petits angles menées par Richtering et al <sup>158</sup> ou encore par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en étudiant la relaxation transverse des protons <sup>159</sup>.

Cependant, lorsque la polymérisation a lieu en présence d'importantes quantités de tensioactifs, la répartition en réticulant semble beaucoup plus homogène <sup>160, 161</sup>.

De manière analogue au réticulant, il est possible de copolymériser une espèce avec le NIPAM. Ce comonomère peut apporter des fonctionnalités différentes, comme par exemple rendre le microgel sensible à un second stimulus. La famille des microgels sensibles au pH est réalisée principalement par cette méthode, en introduisant un comonomère porteur d'une fonction acide carboxylique ou d'une fonction amine secondaire ou tertiaire. Cependant, l'incorporation du comonomère à la structure de microgels n'est permise que dans une certaine gamme de rapport de réactivité. Or, les propriétés finales des microgels dépendent à la fois du nombre de fonctionnalités incorporées mais aussi de leur distribution au sein du microgel. En effet, la VPTT sera affectée par la présence d'unités chargées au sein du microgel plutôt qu'en périphérie. L'accessibilité à certaines fonctions chimiques, primordiales dans certaines applications, sera moindre si les fonctions sont enfouies dans le microgel plutôt que si elles sont à la surface. Ainsi, il est capital de connaître la répartition des fonctions dans le microgel. Celle-ci est généralement estimée par des mesures de cinétiques de polymérisation (mesure des taux de conversion). Une étude complète de la répartition des motifs carboxyliques a par exemple été menée par Pelton <sup>162-164</sup> en comparant l'incorporation de divers comonomères porteurs de cette fonction (acide acrylique, méthacrylique, vinylacétique, maléique, fumarique ou acrylamide comme précurseur d'un groupe carboxylique). Ces auteurs ont montré que de multiples types de distributions étaient

réalisables avec cette série de composés. Par exemple, l'acrylamide, l'acide acrylique et l'acide méthacrylamide réagissent par des réactions de propagation radicalaires standards, mais l'acrylamide polymérise de façon aléatoire avec le NIPAM <sup>165</sup>, créant ainsi une distribution uniforme. L'acide acrylique se propage plus lentement <sup>166</sup> ce qui donne lieu à des structures cœur-écorce où l'écorce est riche en acides carboxyliques, alors que l'acide méthacrylique réagit plus vite que le NIPAM <sup>31</sup>, créant la structure opposée. L'acide vinylacétique réagit par un transfert de chaîne lent, il s'incorpore donc à la façon de chaînes pendantes en surface des microgels <sup>162</sup>. Cependant, si la fonction acide carboxylique peut se décliner en différents monomères permettant d'en contrôler la répartition, l'introduction d'autres fonctions reste liée à la structure chimique du comonomère et donc à sa réactivité. Pour pallier ce manque de contrôle de la structure, certains groupes ont mis en place une stratégie de synthèse en deux étapes pour obtenir des particules cœur-écorce, afin de pouvoir introduire sélectivement la fonction visée dans l'écorce ou dans le cœur.

#### *Microgels cœur-écorce synthétisés en deux étapes*

Les premières études sur les matériaux cœur-écorce, ont été menées par l'équipe de Lyon <sup>167-171</sup> et bientôt renforcées par les travaux de Richtering <sup>172-176</sup>. Ces deux équipes ont d'abord cherché à caractériser le comportement en termes de transition de phase volumique de ces microgels, en s'appuyant sur des combinaisons chimiques différentes, cœurs-écorces thermosensible / pH sensible pour Lyon, cœur-écorce constitués des deux polymères thermosensibles présentant des LCST différentes pour Richtering. La nature de l'écorce et du cœur est inversée à chaque fois. Les transitions de phases volumiques de ces matériaux ont été étudiées pour comprendre l'influence de l'arrangement des couches. Ils ont montré que la réponse aux stimuli environnementaux dépend fortement de la localisation d'un type d'hydrogel par rapport à l'autre. Il a ainsi été établi que les transitions volumiques de l'écorce et du cœur étaient influencées par la juxtaposition d'une autre couche. Par exemple, on note l'influence de la compression de l'écorce sur le gonflement du cœur <sup>170-172</sup>. Le cœur est contraint de rester contracté tant que l'écorce ne gonfle pas, dans des conditions où le cœur serait gonflé s'il était seul. Il y a donc un effet mécanique de l'écorce qui perturbe l'équilibre de gonflement thermodynamique du cœur. Ceci a été prouvé ultérieurement par diffusion de neutrons aux petits angles <sup>174, 176</sup> et analyse thermique différentielle <sup>175</sup>.

En guise d'application, notons que ce procédé en deux étapes permet d'introduire sélectivement certains groupes fonctionnels. Ainsi, dans le but d'améliorer la furtivité des matériaux pour des applications in vivo, l'équipe de LYON a réalisé un microgel cœur-écorce

de pNIPAM@pNIPAM-co EG de façon à minimiser l'adsorption de protéines sur la surface rendue plus hydrophile par la présence de PEG. Les résultats montrent effectivement une diminution de l'adsorption de BSA quand la concentration en PEG dans l'écorce augmente <sup>177</sup>.

### *Capsules*

L'édification des microgels s'est enfin orientée vers la construction de capsules de microgels. Pour cela, la construction doit passer par deux à trois étapes :

- synthèse d'un cœur dégradable ou utilisation d'un cœur existant dégradable,
- synthèse d'une écorce non dégradable,
- dissolution du cœur.

Différentes équipes ont utilisé ce schéma pour bâtir des capsules de pNIPAM réticulées. Différents cœurs sacrificiels ont été utilisés avec succès : un cœur d'hydrogel réticulé par un réticulant susceptible d'être oxydé par du periodate de sodium <sup>178</sup>, un cœur de polystyrène dissous par du Tétrahydrofurane (THF) <sup>179</sup>, un cœur en silice dissous par de l'acide fluorhydrique <sup>180</sup>, ou encore un cœur d'or dissous par du Cyanure de potassium (KCN) <sup>181</sup>.

### *Stabilité colloïdale*

Les microgels sont des colloïdes et en tant que tels, présentent les mêmes problèmes de stabilité colloïdale que d'autres types de particules. Classiquement, les objets en suspension présentent des interactions répulsives par le biais d'interactions de type électrostatique ou stérique. Cependant, les microgels se distinguent des particules « pleines » en ce qui concerne les interactions attractives liées aux forces de Van der Waals. En effet, lorsque les microgels sont à l'état gonflé, la constante de Hamaker de la particule est très proche de celle du solvant. Ainsi, les interactions de Van der Waals sont négligeables et la suspension est intrinsèquement stable. Ce n'est que lorsque les microgels passent à l'état contracté que l'on retrouve le comportement habituel des particules pleines. Il convient alors d'introduire des interactions répulsives pour maintenir la stabilité colloïdale. Celle-ci peut provenir de charges de surface (tensioactif adsorbé, résidus d'amorceur, comonomère chargé) ou encore de chaînes de polymère pendantes en bon solvant, qui assurent une répulsion stérique. Lorsque les interactions sont de natures purement électrostatiques, l'ajout de sel dans le milieu peut conduire à une agrégation (Figure 1.26).

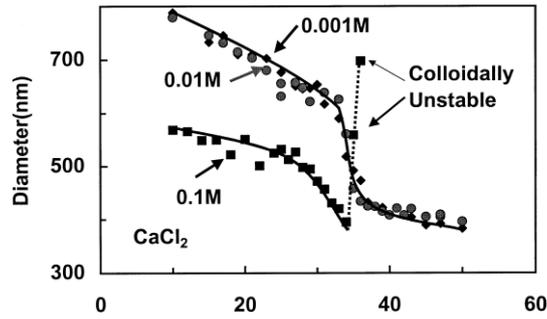


Figure 1.26: Le diamètre des particules diminue avec la température. A faible concentration en sel, les microgels restent dispersés quelle que soit la température. Ils s'agrègent au dessus de la LCST lorsque la concentration en  $\text{CaCl}_2$  est de 0.1M. Extrait de <sup>182</sup>.

### Quelques applications

Les microgels, comme les hydrogels, peuvent servir à des applications de capteurs ou de délivrance d'actif. Nous allons brièvement montrer leur potentiel pour des applications autres que dans le cadre du diabète.

En ce qui concerne les capteurs, l'équipe de Lyon a montré que l'on pouvait organiser les microgels sous forme d'un réseau ordonné de microlentilles. Les microgels sont adsorbés sur une surface transparente. Ils se déforment en lentilles plano-convexes. La partie plane reste au contact du substrat, tandis que l'interface convexe, libre, est mobile sous l'action d'un stimulus. Ces réseaux de lentilles permettent de focaliser des images dans l'eau et dans l'air <sup>183</sup>. Lors de l'application d'un stimulus, le changement de l'indice de réfraction entraîne un changement des propriétés de focalisation. Ainsi, toute variation de gonflement est détectable à l'aide d'un microscope. Le principe a été mis en évidence en utilisant le pH comme levier <sup>184</sup>, puis la température et les photons <sup>185</sup> puis appliqué à la détection d'anticorps <sup>53</sup>.

Mais les microgels sont aussi un formidable outil pour délivrer des actifs. En effet, grâce à leur structure poreuse, ces objets permettent d'encapsuler un actif. Dans le cadre de la recherche contre le cancer, les nanoparticules ont fait leurs preuves. Elles permettent de délivrer de manière plus précise les drogues pour combattre cette maladie. Le principal problème des traitements actuels étant que les drogues sont soit dégradées, soit ne sont pas délivrées dans l'environnement proche de la tumeur. Aussi les microgels présentent l'avantage de protéger leur contenu et de pouvoir délivrer au bon endroit les drogues.

L'équipe de LYON a travaillé sur des microgels décorés par l'acide folique pour cibler les cellules cancéreuses <sup>186</sup>. En effet les cellules cancéreuses ont besoin d'acide folique, un ligand pour les récepteurs à folate, pour se développer et proliférer. Cette étude a montré une endocytose sélective des microgels qui sont conjugués à l'acide folique, leur présence dans le

cytosol montrant leur faculté de s'échapper de l'endosome. Ces microgels semblent toutefois être cytotoxiques pour une température au-delà de la LCST ce qui est le cas dans les conditions d'études à 37°C. Des microgels à LCST supérieure à 37°C devront être utilisés par la suite.

C'est pourquoi la même équipe a utilisé un microgel de LCST de 45°C, décoré en surface par des peptides qui ciblent les cellules cancéreuses ovariennes<sup>187</sup>. Des Si-RNA encapsulées dans les microgels ont ainsi été vectorisées, avec une libération de près de 40% du contenu des microgels sur les 24 premières heures, tout en présentant une absence de toxicité. Le mécanisme de libération n'est pas vraiment connu mais il est supposé que les microgels pénètrent par voie endosomale la cellule et permettent la délivrance des Si-RNA dans le cytosol.

L'équipe de Kumacheva a également produit un travail élégant sur ce thème<sup>188</sup>. Des microgels pH sensibles (pNIPAM-co-AA), de taille de 150 nm, i.e. proche de la taille des virus en conditions physiologiques, conjugués en surface avec un récepteur spécifique des cellules tumorales, la transferrine, ont permis de délivrer de la doxorubicine à des cellules cancéreuses par un mécanisme d'endocytose. La drogue de charge positive a pu être complexée avec le microgel chargé négativement.

#### *Les microgels sensibles au glucose*

La synthèse de microgels sensibles au glucose, utilisant l'acide phénylboronique comme récepteur du glucose, a été décrite pour la première fois en 2006, par trois équipes indépendantes dont la nôtre, suivis en 2007 par une quatrième équipe. Toutes les formules développées utilisent le principe déjà décrit dans ce chapitre à propos des hydrogels à LCST, à savoir un changement de la température de transition de phase en présence de glucose. Deux façons de concevoir les microgels sensibles au glucose ont ainsi été décrites. Une première voie de synthèse dite par copolymérisation où tout le microgel sensible au glucose est construit en une seule étape. Une seconde voie de synthèse par greffage, où le récepteur au glucose est couplé de façon covalente à un microgel déjà existant. Bien que différentes, les deux voies de synthèse conduisent à des microgels sensibles au glucose dont les grands aspects comportementaux sont les mêmes.

Par copolymérisation, Ravaine et al.<sup>189</sup> présente la synthèse de microgels de pNIPAM-co-PBA et étudie leur réponse en fonction du glucose, du pH, de la salinité mais aussi de la composition chimique. L'équipe montre une bonne sensibilité au glucose dans les conditions

de salinité physiologique. Cependant en conditions physiologiques de pH et de température le microgel ne présente que peu ou pas de sensibilité au glucose.

Selon la même méthode et la même année, Zhang décrit la libération modulée d'ARS en fonction de la température d'un microgel de pNIPAM-co-PBA <sup>190</sup>. A faible température, l'hydrogel est gonflé et l'ARS est lié au récepteur PBA. De fait la solution est orange. Mais progressivement et jusqu'à la VPTT, lorsque la température est augmentée, la solution vire vers une couleur de plus en plus rosée, montrant la décomplexation d'ARS avec l'hydrogel. Au-delà de la VPTT, la couleur ne change plus. Ceci est expliqué par le fait que lorsque l'hydrogel se contracte, l'ARS ne se fixe plus au récepteur de glucose et est expulsée de l'intérieur de l'hydrogel et c'est seulement la forme libre qui donne la couleur de la solution.

Selon la deuxième voie de synthèse, l'équipe de Zhou <sup>191</sup> construit un microgel en deux temps. D'abord une base pNIPAM-co-AA est synthétisée puis le PBA est greffé par la suite sur le microgel existant, par couplage peptidique. Le microgel est alors à la fois sensible au pH et à la concentration en glucose dans le milieu. Le comportement du microgel est étudié selon le pH, selon la concentration en glucose et selon la teneur en récepteur au glucose. Une bonne sensibilité est vérifiée pour un pH proche du pKa du récepteur (8,6) et pour une teneur forte en récepteur. Cependant ce pH optimal de travail est encore loin de la gamme physiologique.

L'année suivante, Pelton décrit le même mode de fabrication de ces matériaux et en étudie les transitions de phase en fonction de la composition. Comme pour tous les autres microgels précédemment décrits, la sensibilité au glucose est réversible et la quantité de récepteur modifie l'état de gonflement de la particule <sup>192</sup>. Notons que l'équipe de Pichot a synthétisé des microgels thermosensibles fonctionnalisés par l'acide boronique en 2002 <sup>193</sup> bien avant les travaux rapportés ici. Toutefois les propriétés de gonflement en réponse au glucose n'ont pas été étudiées ici.

C'est dans cet état de connaissances que le présent travail de thèse a démarré. Nous reviendrons plus en détails sur ces travaux, qui ont constitué le socle des orientations prises au cours de ces trois années. Enfin, pour finir cette étude bibliographique, nous allons mentionner d'autres travaux entrepris dans le domaine de la délivrance d'insuline en boucle fermée, utilisant des technologies différentes des hydrogels ou nanogels.

## V : Autres types de travaux pour la délivrance rétrocontrôlée d'insuline utilisant l'acide phénylboronique

En marge des stratégies de libération par les hydrogels ou les microgels qui constituent le cœur de ce manuscrit, d'autres modes de libération concurrentiels sont envisagés pour libérer de l'insuline. Les voies de recherche s'intéressent aussi bien à la molécule d'insuline, sous la stratégie d'une modification chimique ou structurale de cette dernière, ou à la mise en place de nouveaux vecteurs ou modes de vectorisation sensibles au glucose pour la délivrance d'insuline.

### V.1 : Modification de l'insuline

Une action autocontrôlée de l'insuline a vu le jour sous l'impulsion de Hoeg Jensen <sup>12, 13</sup>. Ces auteurs ont utilisé un récepteur au glucose comme partie intégrante de la molécule d'insuline. L'insuline a été modifiée par un dérivé d'acide phénylboronique. Leur idée était de modifier la pharmacocinétique de l'insuline en fonction de la concentration en glucose. Il est en effet connu que la cinétique d'action des analogues de l'insuline est fortement dépendante de la forme de la dose injectée car elle est proportionnelle à son temps de demi-vie :

- l'insuline à action rapide, monomérique, à un  $t_{1/2}$  qui est proche de l'heure,
- l'insuline hexamérique a un  $t_{1/2}$  compris entre 2 h et 4 h,
- enfin les insulines à long temps d'action ( $t_{1/2} > 10$  h) obtenues en les liant à des protéines de hauts poids moléculaires ou à des complexes solubles de grande masse molaire.

Aussi, Hoeg Jensen a développé l'idée que le poids moléculaire d'insulines fonctionnalisées par des récepteurs au glucose et auto-assemblées pourrait être contrôlé par la concentration en glucose <sup>12, 13</sup>. L'insuline a donc été modifiée par une paire conjuguée de boronate et de carbohydrate pour obtenir la formation d'assemblages d'hexamères et leur désassemblage en présence de carbohydrate (Figure 1.27).

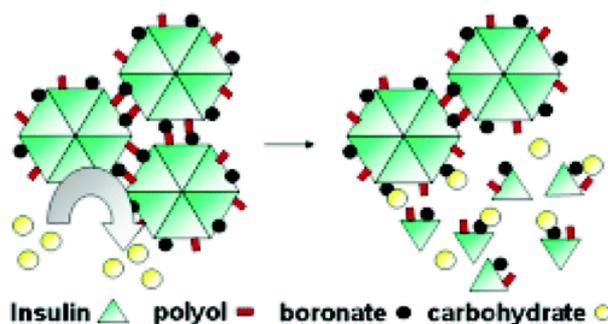


Figure 1.27 : Formation de complexes hexamériques d'insuline et désassemblage sous addition de glucose.

Ce concept a pu être illustré dans des conditions particulières. L'auto-assemblage des hexamères ne peut être obtenu que lorsque l'azote terminal de la chaîne B de l'insuline était en forme d'hélice alpha, c'est-à-dire en présence de phénol. L'addition de D-sorbitol casse le complexe de façon dose dépendante en moins de cinq minutes alors que l'effet du D-glucose était beaucoup moins prononcé.

Dans une autre approche similaire, les mêmes auteurs ont synthétisé une série de nouvelles insulines en utilisant des dérivés sulfonamides de phenylboronate compatibles dans les conditions physiologiques de pH. Ces insulines ont été immobilisées sur une surface modèle de polyéthylène glycol polyacrylamide dérivée par du glucamine. La libération d'insuline en rapport avec la dose de glucose a été obtenue. En formulant l'insuline dans sa forme traditionnelle (hexamère de Zn (II)) une meilleure sensibilité au glucose et un meilleur profil de libération ont été obtenus en comparaison de la formulation monomérique de l'insuline. A notre connaissance, ces travaux n'ont pas eu de suite sous forme de publication ou de brevet.

#### *V.2 : Modification de la structure du vecteur et libération contrôlée par la glycémie*

D'autres équipes ont préféré porter une attention particulière à la structuration du vecteur par lequel serait libérée l'insuline. En marge de la structuration des hydrogels sous forme de microgels, certaines voies de recherche s'intéressent à la délivrance par des capsules, des films, des micelles auto-assemblées ou encore des vésicules.

Détaillons chacune de ces structurations particulières :

##### *V.2.1 : Les capsules*

La littérature regorge d'exemples de capsules destinées à la vectorisation. En particulier, un fort engouement est apparu pour les capsules constituées de polymères auto-assemblés par la technique layer-by-layer (LBL). La technique LBL permet une édification facile et peu coûteuse de capsules. Les capsules sont traditionnellement fabriquées autour d'un cœur sacrificiel et d'une membrane extérieure qui est progressivement déposée selon la technique LBL. Brièvement cette technique est basée sur l'adsorption alternative de couches de polymère linéaire. Le plus souvent, il s'agit de polyélectrolytes de charges opposées qui s'assemblent par des interactions électrostatiques. Mais d'autres types d'interactions peuvent également permettre l'auto-assemblage. Une fois que le cœur sacrificiel est détruit la capsule est obtenue.

Deux études ont permis d'obtenir des capsules sensibles au glucose<sup>194, 195</sup>. Dans les deux cas l'élément sensible au glucose est un dérivé d'acide phénylboronique.

Dans le premier cas, <sup>194</sup> l'élaboration de la membrane de la capsule résulte d'une alternance d'une couche B chargée négativement (poly(styrène sulfonate)) et d'une couche A chargée positivement poly(diméthylaminoéthylacrylate (DMAEA)) et fonctionnalisée par des récepteurs de type PBA (Acide aminophénylboronique (APBA)) (Figure 1.28).

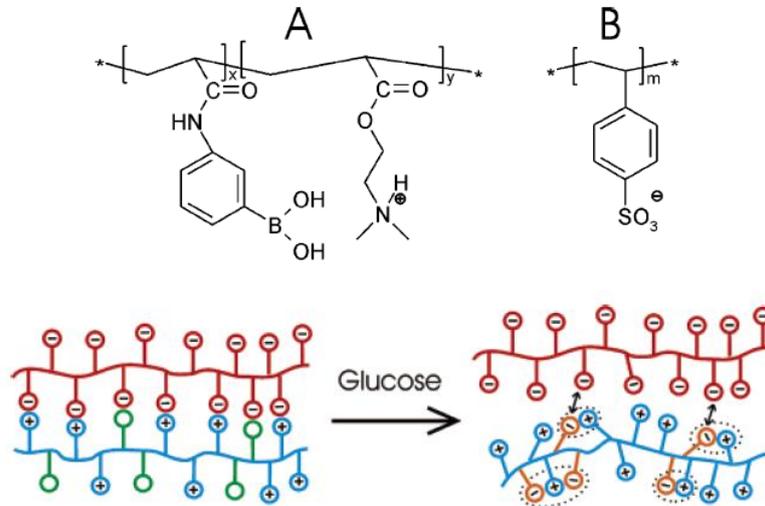


Figure 1.28 : Représentation schématique des mécanismes d'autoassemblage par interaction électrostatique entre un polycation dérivé par un acide phénylboronique (A) et un polyanion (B). L'addition de glucose modifie l'état de charge du polymère A, ce qui entraîne le désassemblage par répulsion entre les chaînes A et B. Extrait de <sup>194</sup>.

Lors de l'addition de glucose, le récepteur PBA passe d'un état neutre à chargé comme décrit dans les paragraphes ci-dessus. Il résulte donc une double conséquence :

- une répulsion électrostatique entre les charges négatives de la chaîne A et la chaîne B,
- l'élaboration de paires par un mécanisme d'attraction électrostatique au sein de la chaîne B entre les groupes chargés positivement et des groupes chargés négativement de la molécule de PBA.

Cette double conséquence permet alors à la capsule de se dissoudre progressivement et de libérer le contenu intérieur vers le milieu extérieur.

Dans le deuxième cas, <sup>195</sup> l'alternance des couches se fait par une chaîne d'acide polyacrylique (PAA) fonctionnalisée par un récepteur au glucose (Acide aminophénylboronique) et une chaîne de polysaccharides (mannane) sur un cœur sacrificiel de  $\text{CaCO}_3$ . Cette fois, l'assemblage repose sur des interactions supramoléculaires : les PBA et les diols du mannan forment un ester boronique (Figure 1.29).

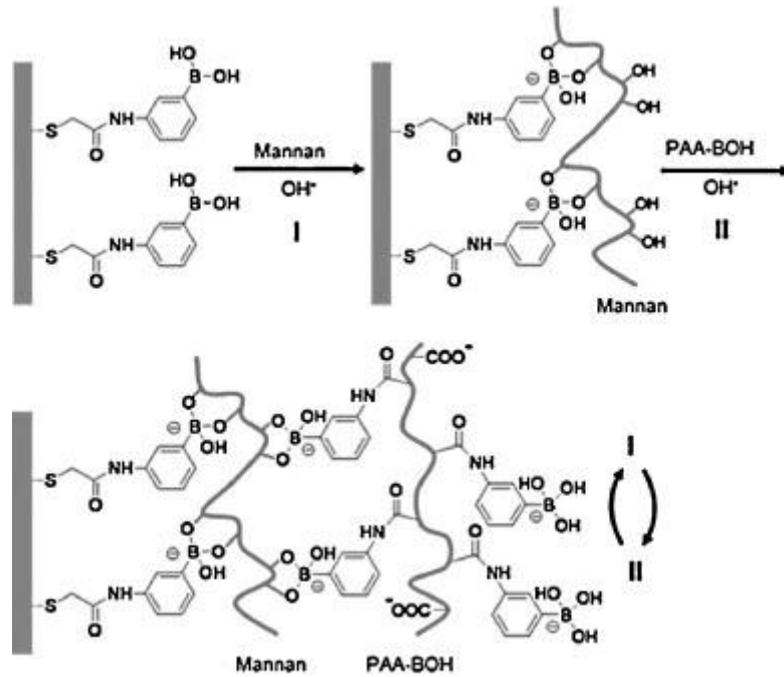


Figure 1.29 : Schématisation de l'assemblage successif de couches de polysaccharides et de polymères porteurs de récepteurs au glucose. Extrait de <sup>195</sup>.

Là encore la stabilité de l'assemblage est diminuée par la présence de saccharide libre dans le milieu qui décomplexe les diols de la chaîne de mannane des récepteurs au glucose de la chaîne de PAA. Dès l'ajout d'une concentration limitée en saccharide, les objets libèrent leur contenu.

Bien que très intéressantes ces approches présentent le désavantage de ne pouvoir être réversibles. Une fois les couches désassemblées, la cohésion de l'édifice n'est plus maintenue, l'objet est détruit de manière irréversible et son contenu libéré sans contrôle de la quantité ou de la cinétique. En outre les études sont menées à des pH élevés ( $\text{pH} > 9$ ), loin des valeurs physiologiques espérées pour pouvoir fonctionner dans le corps humain.

### V.2.2 : Les films

Si la technologie LBL est utilisée pour créer des capsules, certaines équipes préfèrent former des films et étudier la libération de principe actif. Toujours de la même façon, des substrats plans sont recouverts d'une alternance de couches complémentaires. Là encore le récepteur au glucose est un récepteur de type PBA dont les liaisons cohésives entre les couches complémentaires seront cassées par l'addition de glucose libre dans le milieu ce qui rompt la cohésion du film.

Ainsi, l'équipe de Zhou a travaillé sur des films d'alcool polyvinylique (PVA) couplés à des couches de polyacrylamide fonctionnalisées par du PBA <sup>191, 196</sup>. Le désassemblage du film est

plus important en présence de glucose qu'en absence menant à une destruction de près de 70% en 50h. Le PBA se fixe préférentiellement aux sucres par rapport aux chaînes PVA, ce qui amène une diminution de la cohésion du film. Les observations ont montré que le principe fonctionnait dans les conditions physiologiques alors que le pKa du récepteur était de l'ordre de 8,6. Ceci provient de la stabilisation de l'atome de bore chargé par les groupements amides portés par le récepteur PBA.

L'équipe a également montré la libération d'actif par des films <sup>197</sup>. En faisant une analogie entre l'affinité de l'ARS et les insulines glycosylées pour les récepteurs PBA, ils ont montré là encore que la libération d'ARS était meilleure à pH physiologique qu'à pH=8,5 en présence de glucose et ouvert la voie à une libération d'insuline modifiée par le biais de films sensibles au glucose.

### *V.2.3 : Les micelles auto assemblées*

Ces systèmes reposent également sur le concept d'auto assemblage dans un milieu aqueux, mais cette fois-ci de molécules amphiphiles. Lorsque leur concentration est supérieure à la CMC, ces molécules s'assemblent sous forme de micelles. Comme la technologie des microgels, ces édifices peuvent être stimulables par le biais de la température, du pH ou de stimuli biologiques. En principe, l'application d'un stimulus détruit l'assemblage. Les copolymères à bloc consistent en un regroupement de différents blocs aux propriétés physiques ou chimiques différentes liés de manière covalente. Un copolymère à bloc, pour répondre au critère de la micellisation, est composé d'une partie plus hydrophile et d'une autre partie au caractère plus hydrophobe. Le copolymère est alors décrit comme amphiphile et s'arrange alors en forme de micelle pour minimiser les interactions du milieu avec une de ses moitiés et les maximiser avec son autre moitié.

Certaines équipes ont donc repris ce mode de fonctionnement pour libérer de l'insuline sous l'action de glucose. Pour cela, les équipes suivantes <sup>198-200</sup> ont synthétisé des copolymères amphiphiles dont une partie est fonctionnalisée par des récepteurs au glucose de type PBA (partie hydrophobe en absence de glucose) et une autre partie de type PEG ou sucre. Le point commun à ces recherches réside dans le fait que le PBA devient plus soluble dans l'eau en présence de glucose. Le changement de solubilité provoque alors le gonflement de la micelle qui peut alors libérer l'insuline de manière proportionnelle à la quantité de glucose.

*V.3 : Matériau multi-réponses*

Certains édifices ont poussé le concept de délivrance à une double délivrance. Le but de la double délivrance est de libérer deux molécules différentes pour obtenir plus d'effet qu'une simple libération.

Ceci est le cas des nanoparticules de silice mésoporeuse (MSN pour mesoporous silica nanoparticle) <sup>201</sup> qui servent de vecteurs de délivrance pour de l'insuline modifiée mais aussi pour de l'adénosine monophosphate (AMP). Dans le cas présent, l'AMP est libérée en vue de favoriser la sécrétion d'insuline en agissant sur les canaux calciques des cellules pancréatiques. La libération des deux molécules est modulée par la présence de glucose. L'insuline fonctionnalisée par des acides gluconiques est fixée à la surface de la MSN par le biais de récepteurs au glucose de type PBA. Les mésopores contiennent les molécules d'AMP. Lors de l'addition de glucose libre dans le milieu, l'insuline est libérée par un mécanisme de compétition entre le glucose libre et le motif carbohydrate fixée à l'insuline. Les pores du MNP sont donc moins obstrués et l'AMP peut à son tour être libérée.

Cette étude revendique une avancée significative mais on peut se demander quelle est sa validité sur le plan physiologique. En effet, dans le cas du diabète de type 1, les cellules bêta étant défectueuses, il est peu probable que l'AMP présente l'effet escompté.

**VI : Description du projet et de ses enjeux**

Tout au long de ce chapitre, nous avons vu que la technologie des hydrogels ou des microgels sensibles au glucose était en place conceptuellement et pouvait ainsi répondre aux attentes des patients diabétiques pour permettre la délivrance d'insuline en boucle fermée. Quelques stratégies concurrentielles ont été testées ou sont en cours d'évaluation mais ne sont pas a priori satisfaisantes. En particulier, les efforts entrepris dans le domaine des vecteurs obtenus par auto-assemblage semblent présenter le défaut majeur du manque de réversibilité de leur réponse au glucose. Ainsi, notre choix de focaliser notre attention sur les hydrogels reste pertinent. En outre, cette étude bibliographique a montré que les récepteurs au glucose étaient variés. Nous allons donc justifier les choix qui ont été les nôtres en termes de récepteurs et de structure des vecteurs visés.

Comme nous l'avons indiqué, le moteur de ce travail est la quête d'un vecteur de l'insuline qui serait capable de la délivrer de manière auto-régulée, modulée et sur un long temps d'action. Le cahier des charges pour un tel vecteur est le suivant :

- sélectivité et sensibilité à l'égard du glucose pour seulement répondre à ces variations dans la gamme physiologique,
- une pharmacocinétique similaire à l'activité pancréatique,
- facilité d'administration et un nombre minimal d'injection pour un long temps d'action,
- biocompatible, sans aucune toxicité in vivo sur le long terme.

En ce qui concerne la structure des édifices, notre choix s'est porté sur les micro/nanogels sensibles au glucose. Comme nous l'avons déjà mentionné, la réversibilité du processus de réponse au glucose est un élément essentiel pour prétendre délivrer plusieurs fois de l'insuline et ainsi, répondre au critère de durée d'action de la formule.

De plus, la taille de ces objets permet de répondre à plusieurs autres critères : d'une part, lorsque les microgels sont en suspension en milieu aqueux, la suspension est le plus souvent liquide, c'est-à-dire sous forme injectable, contrairement aux macrogels qui sont des solides élastiques qui nécessiteraient une implantation. La taille est aussi pertinente pour la capacité des micro/nanogels à pouvoir être véhiculés dans la circulation sanguine. En effet, il est important que les vecteurs-détecteurs puissent être au contact de la circulation sanguine pour pouvoir détecter la concentration en glucose et agir sur elle sans délai, contrairement à ce qui se passerait si la détection se faisait dans les tissus. Il faudra bien entendu veiller à ce qu'ils puissent rester suffisamment longtemps dans la circulation sans être phagocytés, de façon à ce que leur action se prolonge sur plusieurs jours. Grâce à leur petite taille, nous pouvons également espérer que les micro/nanogels soient capables de rejoindre la circulation sanguine après une simple injection sous-cutanée, comme c'est le cas pour certains liposomes <sup>202</sup>. Un dernier avantage de choisir de petits objets est la possibilité d'obtenir des cinétiques de délivrance rapides. Notre intérêt se portera donc sur les microgels.

En ce qui concerne le choix du détecteur, comme nous l'avons présenté dans les parties précédentes, il existe quatre types de récepteurs qui peuvent être utilisés. Il est généralement admis que les récepteurs naturels comme les protéines reconnaissent spécifiquement des molécules cibles. Cependant ce jugement doit être reconsidéré dans le domaine de la sensibilité au glucose.

Dans la famille des récepteurs naturels au glucose, seule la GOD reconnaît le D-glucose alors que les lectines et la GPB ne sont pas des récepteurs spécifiques de cette forme. Cependant

l'activité enzymatique de la GOD n'est pas assurée sur le long terme. De plus, il existe un risque avéré de toxicité en utilisant les récepteurs de la famille des lectines.

Les récepteurs artificiels comme la famille des dérivés d'acide phénylboronique sont capables de former des complexes 1 : 1 ou 2 : 1 avec les groupes 1-2 diols des carbohydrates. La complexation 2 : 1 permet de reconnaître sélectivement le glucose alors que la complexation 1 :1 est meilleure pour le fructose que pour le glucose. Cependant, la concentration physiologique en glucose est 100 fois supérieure à celle du fructose. Il est possible de considérer que la compétition entre les deux espèces ne constituera pas un obstacle majeur à la mise en œuvre *in vivo* de ces matériaux.

Ainsi, au cours de ce travail, nous allons nous attacher à synthétiser différents microgels sensibles au glucose, fonctionnalisés par des dérivés boroniques, en vue de montrer leur potentialité d'utilisation pour des fonctions de détection et de délivrance d'insuline. Le critère de biocompatibilité des vecteurs idéaux ne sera pas considéré prioritairement au cours de ce travail, afin de laisser plus de latitude dans le choix de la chimie des objets.

**Chapitre II : Synthèse et caractérisation de microgels**  
**sensibles au glucose**



## Introduction au chapitre

Le contexte général de notre étude vise à montrer les potentialités d'utilisation des microgels sensibles au glucose pour la délivrance d'insuline en boucle fermée. L'objectif de ce chapitre consiste donc à décrire l'élaboration et la caractérisation de microgels sensibles au glucose dans les conditions physiologiques afin d'étudier ultérieurement leur potentiel en termes de délivrance d'insuline en réponse à la concentration en glucose (Chapitre III).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, un hydrogel sensible au glucose peut être obtenu en introduisant un récepteur moléculaire au glucose à un hydrogel. Dans le cadre de cette thèse, nous souhaitons développer des microgels sensibles au glucose. Ainsi, il nous faut donc choisir une voie d'incorporation et un récepteur du glucose à introduire dans un microgel.

En ce qui concerne le récepteur, notre choix s'est porté sur les dérivés de l'acide phénylboronique qui offrent une bonne stabilité, contrairement à ses homologues naturels, et qui potentiellement présentent une faible toxicité *in vivo*<sup>203</sup>. De surcroît, cette famille de récepteurs synthétiques permet l'accès à une modulation de leur structure par le biais de la synthèse organique.

Nous avons choisi d'incorporer ce type de récepteurs à des microgels de tailles et de structures contrôlées. La famille des microgels thermosensibles, comme ceux constitués de pNIPAM, s'est imposée comme une référence de par l'abondance des études menées sur ces matériaux, et également pour sa simplicité de synthèse, permettant d'obtenir des objets de taille contrôlée et homogène. Ainsi, notre choix s'est orienté vers l'utilisation de microgels thermosensibles que nous souhaitons fonctionnaliser avec un récepteur du glucose. Notons que l'aspect thermosensible des microgels n'a pas, a priori, d'utilité pour la mise en œuvre de la sensibilité au glucose.

Pour mettre en application ce concept, nous avons utilisé la stratégie de la copolymérisation, au cours de laquelle un monomère alkylacrylamide, précurseur d'un polymère thermosensible sera combiné avec un monomère porteur de la fonction boronique. La réussite de cette méthode a été montrée en 2006<sup>204</sup> et a abouti à la fabrication de microgels sensibles au glucose à un pH non physiologique mais à une salinité physiologique. L'objectif de ce chapitre est maintenant d'aller plus loin pour construire des microgels sensibles au glucose dans des conditions totalement physiologiques, c'est-à-dire à la fois en termes de pH, salinité et température. Pour cela, nous allons utiliser les méthodes mise en place originellement et les transposer afin d'atteindre ces conditions.

## I : Synthèse des microgels à base d'acide boronique : méthodologie

### I.1 : Stratégie de synthèse

La voie que nous avons choisie au laboratoire est celle de la copolymérisation car elle présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et aussi de simplifier la composition chimique des microgels à un nombre limité de composants. En effet, pour ce type de synthèse, la solution de monomères comporte trois sortes d'entités : le monomère principal, de type alkylacrylamide, qui constituera l'essentiel du squelette, le réticulant et le monomère sensible au glucose (Figure 2.1). Le comportement du microgel qui résulte de ce mode de synthèse dépendra de la composition en chacune de ses trois parties constitutives.

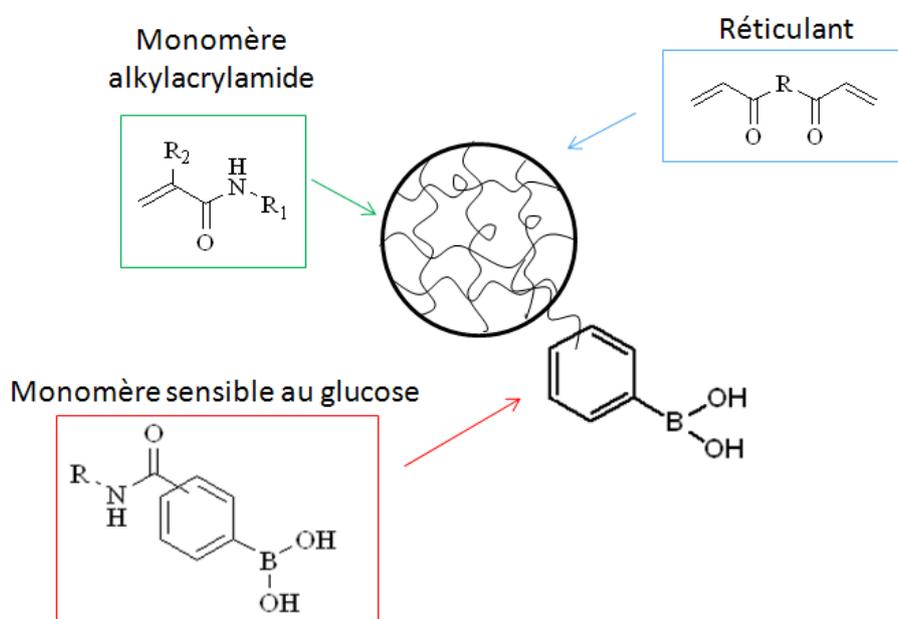


Figure 2.1 : Schéma général d'un microgel et de ses éléments constitutifs.

Cette méthode est à comparer avec la stratégie développée parallèlement à la nôtre par les équipes de Pelton<sup>192</sup> et de Zhou<sup>191</sup>. Elle consiste en une post-fonctionnalisation de microgels préexistants pour obtenir des microgels sensibles au glucose. La plateforme de départ est un microgel obtenu par copolymérisation entre le NIPAM et l'acide acrylique (AA). Les groupes carboxyliques sont fonctionnalisables par des fonctions amines. Ainsi, le pNIPAM-co-AA va être modifié de façon covalente par l'acide 3-aminophénylboronique via un couplage peptidique. Le désavantage de cette méthode tient au fait que seule une partie des fonctions carboxyliques (COOH) est modifiée car seules celles qui sont situées le plus à la périphérie du microgel sont accessibles. Les fonctions COOH enfouies dans le microgel ne sont en effet pas toujours accessibles pour des raisons de diffusion du réactif et en conséquence, les microgels

qui en résultent comportent des fonctions carboxyliques en sus des fonctions boroniques. L'interprétation des transitions de phase est alors compliquée par cette structure multisensible.

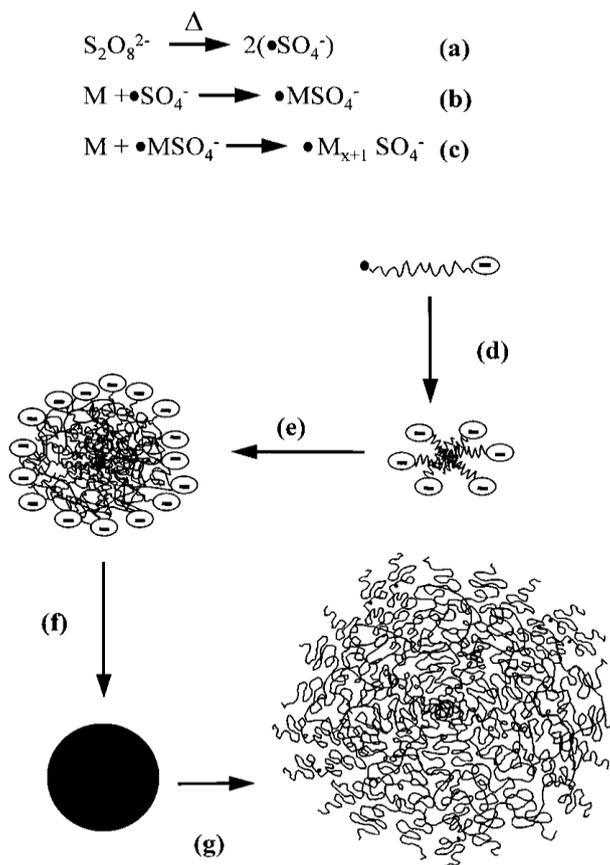
En définitive, l'avantage dans le cas d'une copolymérisation tient dans le fait que seules les fonctions boroniques viendront s'ajouter au squelette de pNIPAM lors de sa fonctionnalisation. Cependant la question de leur répartition se pose alors naturellement et fera l'objet d'une discussion ultérieure.

### *1.2 : Synthèse des microgels par polymérisation par précipitation*

Notre démarche repose sur le fait que la synthèse des microgels thermosensibles, notamment des polymères à LCST, conduit à des particules uniformes en taille qui peut être contrôlée par ajustement des conditions de synthèse. Nous allons rappeler les mécanismes de la synthèse de ces microgels thermosensibles, décrite en particulier pour les microgels de pNIPAM. Ce mode de synthèse est appelé « polymérisation par précipitation »<sup>149</sup>.

La phase continue et les monomères doivent avoir bonne affinité de façon à ce que les monomères soient solubles dans la phase considérée. Le choix de l'amorceur dépend de sa solubilité et de la nature des comonomères. Dans le cas du NIPAM, le persulfate de potassium (KPS) ou de sodium sont fréquemment utilisés (respectivement  $K_2S_2O_8$  et  $Na_2S_2O_8$ ). Si un comonomère est ajouté au milieu, il faudra veiller à ce que la charge de l'amorceur soit identique à celle du comonomère.

La polymérisation est menée à une température supérieure à la LCST du polymère, c'est-à-dire entre 60 et 80°C pour le pNIPAM. Le choix de cette température permet également de générer les radicaux libres par la décomposition de l'amorceur. Le point clé de cette méthode de polymérisation réside dans la durée de la période de nucléation qui est très courte et qui assure une distribution de taille étroite.



- (a) : Décomposition de l'amorceur
- (b) : Initiation
- (c) : Propagation
- (d) : Nucléation des particules
- (e) : Agrégation des particules
- (f) et (g) état des particules en mauvais et bon solvant

Figure 2.2 : Mécanisme de synthèse d'un microgel de pNIPAM par polymérisation par précipitation, amorcée par le  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Extrait de <sup>27</sup>.

Cette technique permet la formation de particules de la taille du micromètre avec une faible dispersion. Dans ce procédé, la plupart des ingrédients dont les monomères et les initiateurs sont solubles dans la phase continue aqueuse. Au début, la polymérisation a lieu dans ce mélange homogène. Cependant, les chaînes en croissance deviennent insolubles au-delà d'une longueur critique et forment alors des nucléi. Ceux-ci deviennent alors les centres réactionnels qui vont croître, soit par la capture d'oligoradicaux et la propagation avec d'autres monomères, soit par hétérocoagulation de précurseurs instables, jusqu'à former une suspension de particules stables d'un point de vue colloïdal. Leur stabilité colloïdale est assurée par la présence de charges de surface. En l'absence de tensioactif, ces charges proviennent de la décomposition de l'amorceur présent en bout de chaînes (groupes sulfates

dans l'exemple développé). Si du tensioactif chargé est ajouté, comme par exemple le dodécylsulfate de sodium (SDS), celui-ci peut s'adsorber à la surface des particules de pNIPAM en croissance, qui à cette température, sont hydrophobes. Leur charge de surface augmente alors. Il s'ensuit que des particules de plus petite taille seront donc stabilisées. En effet, comme leur surface est plus grande, la charge nécessaire à la stabilisation électrostatique du système est plus grande. Ainsi, l'ajout de tensioactif tel que le SDS a pour rôle de contrôler la taille des objets lors de leur fabrication. Il convient de souligner que la quantité de SDS additionnée reste inférieure à la concentration micellaire critique. Aucune micelle n'est donc présente dans le milieu.

Il faut noter également que le rendement de la réaction n'est jamais total et qu'en fin de réaction, si la présence de microgel est majoritaire, nous observons aussi la présence de résidus monomériques ou d'oligomères solubles sous forme de chaînes dont la croissance n'est pas encore finie et qui n'ont pas atteint la longueur critique pour précipiter.

Aussi, nous avons décidé d'adapter cette méthode afin d'incorporer un comonomère dérivé de l'acide phénylboronique. Avant de présenter la structure de ces dérivés, nous allons décrire le mode opératoire utilisé pour cette copolymérisation.

### *1.3 : Application à la synthèse des microgels fonctionnalisés par l'acide phénylboronique*

L'incorporation du dérivé d'acide phénylboronique se fait via la copolymérisation du monomère boronique avec un dérivé d'alkylacrylamide tel que le NIPAM, en présence d'un réticulant. La polymérisation s'effectue dans un ballon tricol de 250 mL. La concentration totale en monomère est tenue constante et égale à 70 mM pour un ratio du type (97,5-X : 2,5 : X) (respectivement pourcentage en monomère alkylacrylamide, réticulant et récepteur au glucose) et pour un volume constant égal à 50 mL. Le monomère alkylacrylamide (au préalable recristallisé dans de l'hexane) et le réticulant sont dissous dans un volume d'eau de 37,5 mL, le SDS (1 mM) dans 10 mL d'eau, le KPS (1,5 mM) dans 2,5 mL d'eau. Le récepteur au glucose doit être solubilisé dans un minimum de méthanol (1,5 mL) car il n'est pas soluble directement dans l'eau. Après dilution de cette solution dans le mélange aqueux final, il reste toutefois soluble. Les solutions de monomère/réticulant et de tensioactif sont filtrées respectivement 2 fois et 1 fois à travers une membrane millipore de 200 µm. L'ensemble des solutions est rassemblé dans le ballon tricol, sous agitation modérée et bullage d'argon, et est chauffé à 70°C pendant 2 heures. Après cette période, l'initiation de la

polymérisation s'effectue par l'ajout des 2,5 mL de KPS ( $K_2S_2O_8$ ) préalablement purgés à l'argon pendant 10 minutes. La réaction se poursuit pendant 6 heures minimum sous les mêmes conditions d'agitation, de dégazage et de température. Le succès de la réaction se traduit par un changement de l'aspect de la solution qui passe de limpide à turbide à cause de l'insolubilité des chaînes de polymère.

A l'issue de la polymérisation la suspension est purifiée à l'aide d'une membrane de dialyse (Masse molaire de coupure à  $10000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). L'eau est changée deux fois par jour pendant une semaine. Ensuite, la suspension est centrifugée (21255 g) et redispersée trois fois dans de l'eau. Ces étapes de purification sont utiles pour éliminer les oligomères solubles dans l'eau de façon à obtenir une population de microgels sans aucune impureté.

Selon l'utilisation voulue (Chapitre III), les microgels peuvent être lyophilisés pour que le réseau soit dépourvu d'eau. La lyophilisation est la dessiccation d'un produit préalablement congelé par sublimation. Dans notre cas, ce procédé consiste à ôter l'eau des microgels sans effondrement de leur structure. L'eau est sublimée sous pression réduite à froid, après congélation de la suspension dans l'azote liquide.

#### *1.4 : Méthodes de caractérisations*

Tous les microgels synthétisés ont été contrôlés par une ou plusieurs des techniques ci-dessous :

- Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS), où le diamètre hydrodynamique des microgels, comme l'indice de polydispersité (PDI) qui caractérise la largeur de la distribution de la formulation synthétisée, sont mesurés. Le schéma de principe de cette technique est détaillé ci-dessous (Figure 2.3). Un laser illumine un échantillon d'une solution de microgels. Les fluctuations de la lumière diffusée, recueillie par une photodiode placée à  $90^\circ$  de la source, sont mesurées. Une fonction d'autocorrélation permet de relier les fluctuations dans le temps de la lumière diffusée à la vitesse de diffusion ( $D$ ) des particules dans le solvant. En considérant que les microgels ont un mouvement Brownien, le diamètre hydrodynamique peut être calculé selon l'équation de Stokes-Einstein :

$$D_H = \frac{k_B T}{6 \pi \eta D}$$

avec  $k_B$  la constante de Boltzman,  $T$  température en Kelvin et  $\eta$  la viscosité du solvant.

Le diamètre hydrodynamique moyen est généralement donné par la méthode des cumulants, qui consiste à donner le temps caractéristique à partir du logarithme de la fonction de corrélation. Si les objets avaient une taille unique, nous aurions une droite parfaite. Comme il s'agit d'une distribution de tailles, l'écart à la linéarité traduit la largeur de la distribution. C'est cet écart qui sert à établir le PDI.

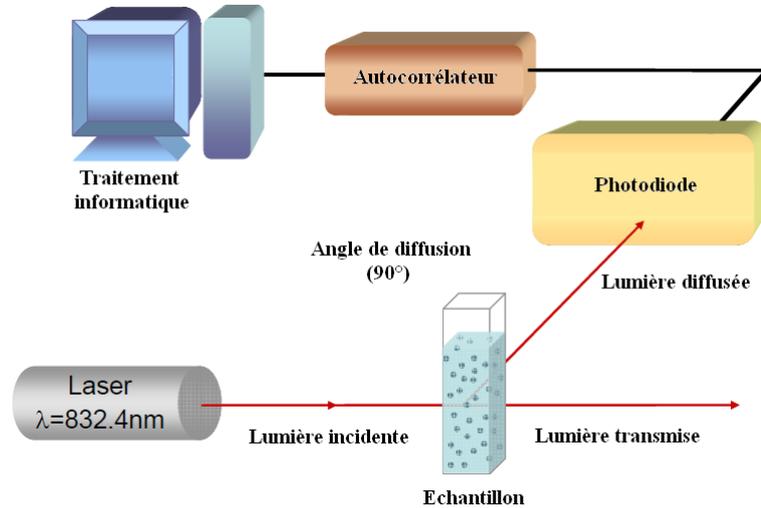


Figure 2.3 : Schématisation de la technique de DLS.

- Zétamétrie où les mesures de la mobilité électrophorétique nous permettent d'accéder à la charge portée par les microgels. Cette technique permet en outre de nous renseigner sur l'introduction de groupements ioniques incorporés lors de la copolymérisation. Cependant, nous ne pouvons pas nous intéresser seulement au potentiel zêta, défini comme le potentiel électrostatique dans le plan de friction d'une particule qui joue un rôle majeur dans l'électrophorèse des sphères dures qui ont une surface bien définie. Dans le cas des objets mous comme les microgels gonflés, le potentiel zêta n'est pas défini car l'interface entre l'eau et la particule n'est pas bien déterminée. Ainsi, la mobilité électrophorétique dépend à la fois de la charge des particules mais aussi de leur état de gonflement<sup>205</sup>. En pratique, pour un même microgel, la mobilité est beaucoup plus forte (en valeur absolue) lorsqu'ils sont contractés car la densité de charge de surface est également beaucoup plus élevée.
- Microscopie optique, Microscopie Electronique à Balayage (MEB) ou Microscopie Electronique à Transmission (MET) : La gamme de grossissement proposée par l'association de ces techniques de microscopie, nous permet de caractériser les microgels dans son ensemble ou individuellement en s'intéressant à la structure des

objets. Le MEB et le MET diffèrent de la microscopie optique par l'utilisation d'un faisceau d'électrons. Entre ces deux dernières, la principale différence réside dans la place du détecteur par rapport à celle de l'échantillon. Le MEB s'intéresse en effet à détecter des électrons secondaires émis par l'échantillon alors que le MET détecte des électrons du faisceau primaire qui passent à travers l'échantillon sans être absorbés ou diffusés. Le MEB donnera donc des informations sur la surface des particules alors que le MET donnera aussi des renseignements sur la structure interne de l'échantillon. La visualisation au MET nécessite l'addition d'un agent de contraste électronique pour marquer les particules, l'acétate d'uranyle. Ces techniques sont intéressantes pour leur résolution supérieure à celle de la microscopie optique mais elles souffrent cependant de la nécessité de déshydrater l'échantillon. Nous ne pouvons donc pas suivre le comportement *in situ* de ces objets par ces méthodes.

L'ensemble de ces techniques nous permet donc de caractériser aussi bien le comportement des microgels en présence de glucose que leur état de dispersion mais aussi de renseigner sur la structure de ces composés.

## II : Résultats antérieurs

Comme nous l'avons déjà mentionné, la faisabilité de la synthèse par copolymérisation a été montrée avant le début du travail présenté dans ce mémoire. Pour ces premiers travaux concernant la copolymérisation, la polymérisation des microgels de pNIPAM a été choisie comme référence, avec l'idée de substituer une partie du NIPAM par un comonomère porteur de la fonction boronique. L'acide 3-acrylamidophénylboronique (AAPBA) (Figure 2.4) a été sélectionné car sa synthèse ne nécessite qu'une étape. Ainsi, la triade de monomères contient le NIPAM comme monomère alkylacrylamide, le N,N'-méthylènebisacrylamide (BIS) comme agent réticulant et le AAPBA comme récepteur du glucose (Figure 2.4).

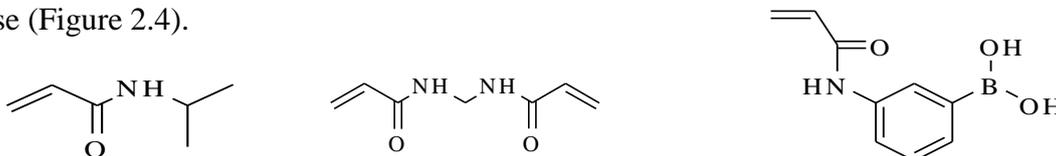


Figure 2.4 : Structures chimiques du NIPAM, du BIS et de l'AAPBA.

En substituant jusqu'à 20% de NIPAM dans le milieu réactionnel, des microgels monodisperses en taille sont alors obtenus. Leur taille est comprise entre 500 nm (état le plus

gonflé) et 200 nm (état contracté). Tout comme les microgels de pNIPAM, ces microgels sont thermosensibles. Cet aspect sera expliqué ultérieurement.

Dans l'immédiat, nous allons rappeler les résultats principaux concernant leur réponse au glucose et leur mécanisme d'action. La figure 2.4 représente leur comportement en fonction de la concentration en glucose à une température donnée. L'étude a été réalisée à différents pH. Ainsi, on observe que les microgels peuvent gonfler en présence de glucose, lorsque le pH est de 8,5. Ceci s'explique par le fait que ce pH est proche du pKa de l'AAPBA ( $pK_a=8,2$ <sup>94</sup>). Ainsi, à ce pH, les formes neutres et chargées de l'acide boronique sont en équilibre. En présence de glucose, les boronates forment un ester avec le glucose. Etant donné que la forme neutre du complexe est peu stable (elle s'hydrolyse rapidement<sup>122</sup>), la présence de glucose induit un déplacement d'équilibre vers la forme chargée du complexe (Figure 2.5).

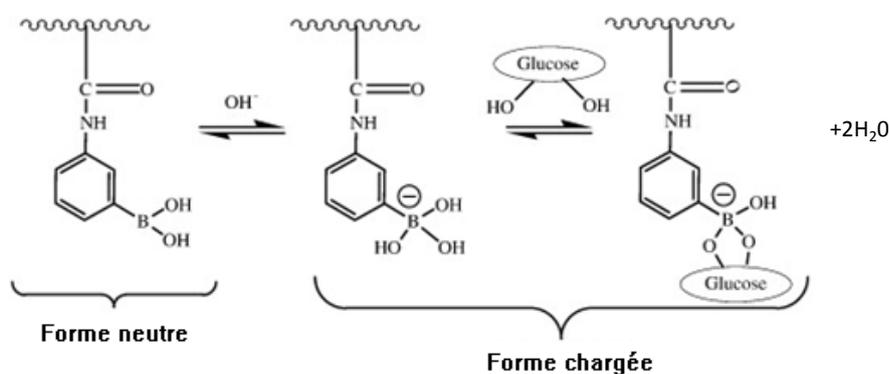


Figure 2.5 : Equilibre de complexation entre l'acide phénylboronique et le glucose.

Il s'ensuit que la densité de charges sur la chaîne de polymère augmente lors de l'ajout de glucose. Les microgels peuvent alors gonfler sous l'effet de l'augmentation de la pression osmotique liée aux contre-ions mobiles présents dans un réseau de polyélectrolyte. Ce phénomène ne peut se produire que pour un pH proche du pKa. C'est ce que nous vérifions sur la figure 2.6. A un pH de 7,4, les microgels ne gonflent pas. Ceci est attendu car la forme boronique du récepteur est prédominante et sa complexation avec le glucose est faible. Les microgels ne changent donc pas d'état. A un pH de 9,5, aucun changement d'état n'est observé. Dans ce cas, les microgels sont dans un état gonflé quelle que soit la concentration en glucose. Ceci peut s'expliquer par le fait que la forme chargée du récepteur est la forme prédominante. A ce pH, même en l'absence de glucose, la chaîne de polymère est chargée car la forme boronate domine. Lors de l'ajout de glucose, l'ester se forme mais ne fait pas varier la densité de charge des polymères. Ainsi, l'état de gonflement reste maximal et constant.

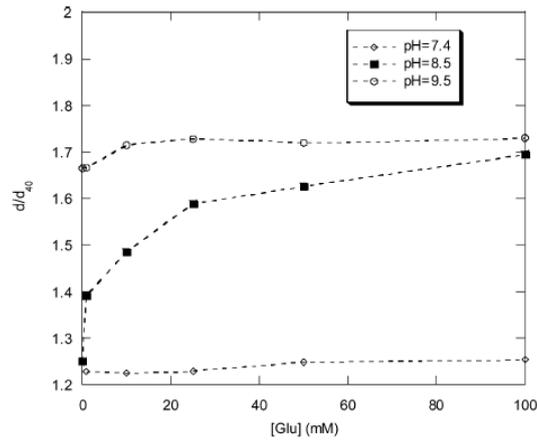


Figure 2.6 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel de NIPAM, BIS, 10% AAPBA en fonction de la concentration en glucose, à différents pH ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ).

Ces explications sont confortées par des mesures de mobilité électrophorétique qui donnent la charge nette des microgels (Figure 2.7). Ainsi, nous pouvons remarquer que la charge des microgels provient de la présence de l'acide boronique. La charge augmente quand on augmente le pH au-delà du pKa. En présence de glucose, on observe une augmentation de la charge nette plus importante à un pH plus bas. L'écart des mobilités électrophorétiques avec et sans glucose à un pH de 8,5 est significatif. Il traduit l'abaissement du pKa de l'acide boronique en présence de glucose.

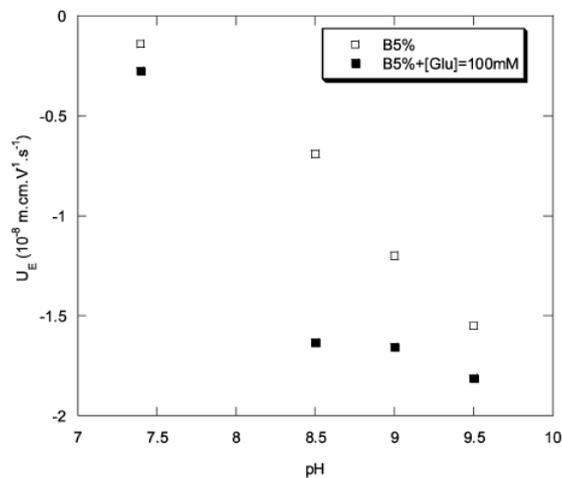


Figure 2.7 : Evolution de la mobilité électrophorétique d'un microgel de NIPAM, BIS, 5% DDOPBA en fonction de la concentration en glucose et du pH. Tampon TRIS (2mM),  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

Compte tenu de ces résultats, il apparaît clairement que le pKa du récepteur est un élément-clé pour déterminer le pH d'action des microgels synthétisés. Ainsi, la construction de microgels sensibles au glucose dans des conditions physiologiques passe par la mise au point nécessaire d'un récepteur dont le pKa sera plus proche du pH physiologique.

### III : Synthèse de microgels sensibles au glucose à pH physiologique

#### III.1 : Synthèse d'un monomère sensible au glucose

Pour poursuivre le développement de microgels sensibles au glucose à pH physiologique, nous nous sommes appuyés sur les travaux de l'équipe de Kataoka<sup>94</sup>. Cette dernière a mis au point la synthèse d'un monomère dont le pKa est plus proche du pH physiologique que celui de l'AAPBA. Pour cela, la structure du récepteur dérivé de l'acide phénylboronique a été modifiée de sorte à augmenter l'acidité du bore. En effet, une corrélation peut être établie entre le pKa des structures boroniques et le caractère électro-attracteur des substituants du noyau aromatique. La synthèse de ces résultats est représentée sur le graphe de la figure 2.8. Nous notons que les groupes électro-attracteurs ont en effet tendance à diminuer le pKa alors que les groupements électro-donneurs augmentent le pKa.

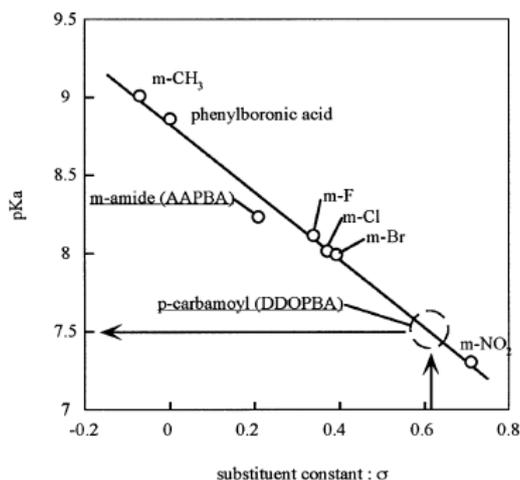


Figure 2.8 : Evolution du pKa de récepteur PBA en fonction de l'effet électro-donneur de différents substituants.

Ainsi, pour abaisser le pKa du monomère, il est indispensable de réviser la structure utilisée initialement. A ces fins, l'équipe de Kataoka a décrit la synthèse d'un monomère dont le pKa est abaissé à 7,8<sup>94</sup> et qui peut être réalisée en trois étapes seulement. Cette synthèse conduit à l'obtention du 4-(1,6-dioxo-2,5-diaza-7-oxamyl) acide phénylboronique, appelé **DDOPBA** (Figure 2.9) :

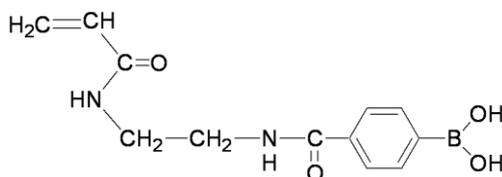


Figure 2.9 : Structure chimique du DDOPBA.

Le pKa de ce composé est abaissé à 7,8<sup>93</sup>. En effet la présence de groupements électro-attracteurs comme le groupement carbonyle en para, diminue la densité électronique de l'atome de Bore qui devient plus acide<sup>93,94</sup> par rapport à l'AAPBA dont le pKa est proche de 8,2.

### III.2 : Protocole de la synthèse de DDOPBA

Cette synthèse (Figure 2.10) consiste tout d'abord à faire réagir l'acide phénylboronique avec le chlorure de thionyle pour obtenir le chlorure d'acide correspondant. Ce composé est ensuite ajouté en solution dans du THF à de l'éthylène diamine en excès, en présence de triéthylamine pour obtenir l'acide 4-[(2-aminoéthyl)carbamoyl] phénylboronique (AECPBA), intermédiaire réactionnel. Pour former un monomère, l'AECPBA est ensuite couplé au chlorure d'acryloyl.

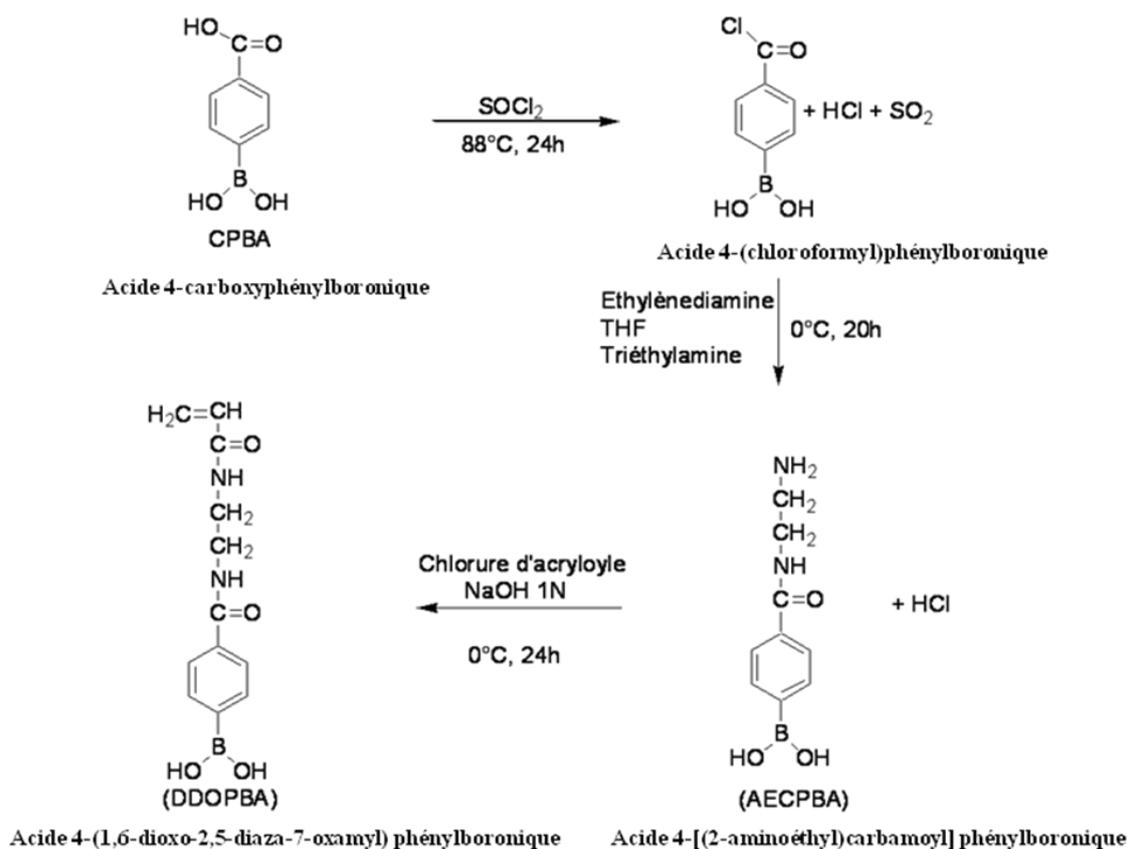


Figure 2.10 : Stratégie de synthèse de l'acide 4-(1,6-dioxo-2,5-diaza-7-oxamyl) phénylboronique (DDOPBA).

En pratique, l'acide 4-carboxyphénylboronique (CPBA) a d'abord été séché sous vide durant une nuit. 75 mL de chlorure de thionyle sont additionnés au CPBA (5,0 mg soit 30,16 mmol) sous chauffage à reflux ( $T=88^\circ\text{C}$ ) et sous balayage d'Argon. La réaction est laissée une nuit. Après élimination du  $\text{SOCl}_2$  restant par évaporation par trompe à eau, le chlorure d'acide obtenu est ensuite dissous dans une solution de THF sec (30 mL). Cette solution est mélangée

à froid, sous argon, pendant 24 h dans une solution d'éthylène diamine (100 mL, 1,5 mol) et de triéthylamine (5 mL, 35,95 mmol). La triéthylamine sert à neutraliser l'acide chlorhydrique formé par la réaction. Après évaporation de la triéthylamine et de l'éthylène diamine sous trompe à eau, 50 mL d'eau mQ sont ajoutés et le pH est ramené à 4 à l'aide d'acide chlorhydrique concentré. On obtient un précipité formé principalement du dimère obtenu par disubstitution de la diamine lors de l'addition du chlorure sur l'éthylène diamine que l'on élimine par filtration. Le filtrat est concentré et réfrigéré à 4°C pendant 12h. Le précipité formé est filtré puis lavé à l'eau froide. A ce stade, nous obtenons 4,2 g d'AACPBA avec un rendement de 67%.

Ce produit est ensuite dissous dans 160 mL d'une solution de NaOH 1N en maintenant une température basse par un bain de glace. Le chlorure d'acryloyle (5,5 mL) est ensuite ajouté lentement à l'aide d'une seringue. Après 24 heures et sous Argon, une partie de la phase aqueuse est évaporée et le pH est ramené aux alentours de 4. Le précipité est filtré et recristallisé par deux fois dans l'eau. Le DDOPBA est alors obtenu avec un rendement global de 41% soit 3,2 g de DDOPBA.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO) :  $\delta$  3.3 (4H, br,  $-\text{NHCH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 5.58 (1H, dd,  $J = 2$  et 10 Hz,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 6.08 (1H, dd,  $J = 2$  et 17 Hz,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 6.2 (1H, dd,  $J = 10$  et 17 Hz,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 7.78 (1H, d,  $J = 8$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.84 (1H, d,  $J = 8$  Hz,  $H_{\text{arom}}$ ), 8.16 (2H, s, OH), 8.23 (1H, t,  $J = 5$  Hz, NHCO), 8.53 (1H, t,  $J = 5$  Hz, NHCO).

### III.3 : Synthèse et caractérisation des microgels contenant du DDOPBA

La synthèse des microgels a été réalisée selon la même procédure que celle utilisée avec l'AACPBA. Ainsi, le NIPAM, le BIS et le DDOPBA sont copolymérisés (Figure 2.11).

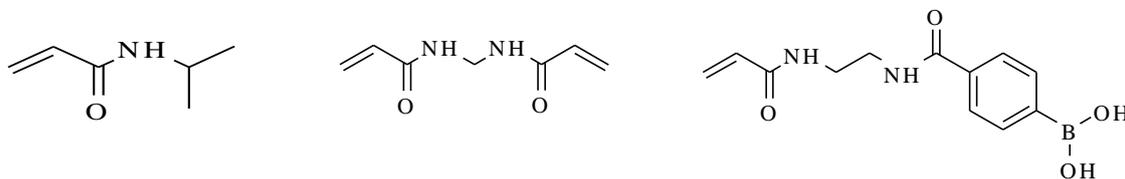


Figure 2.11 : Structures chimiques du NIPAM, du BIS et du DDOPBA.

Les compositions du mélange en monomères sont reportées dans le tableau 2.1, qui regroupe l'ensemble des microgels de NIPAM synthétisés pour ce sous chapitre. Une fraction du NIPAM variant de 5 à 15% est substituée par du DDOPBA. A l'issue de la réaction, le milieu est constitué d'un reste de réactifs en solution, de polymères hydrosolubles et de microgels.

Les microgels sont purifiés par centrifugation. Le taux de polymères hydrosolubles est estimé en réalisant un extrait sec du surnageant obtenu après ultracentrifugation. Ce taux reste faible, inférieur à 15% de la fraction de polymères.

Après purification, les microgels sont caractérisés d'un point de vue granulométrique (Tableau 2.1) et morphologique (Figure 2.12). La mesure de leur diamètre hydrodynamique par DLS montre que leur taille est uniforme. En effet, l'indice de polydispersité est faible, inférieur à 0,05 dans tous les cas. Ceci est confirmé par les clichés de microscopie électronique en transmission, qui montre des particules de taille uniforme. Notons qu'on ne peut pas mesurer le diamètre réel des microgels par cette méthode car les études sont réalisées à l'état sec. La structure des microgels s'est donc effondrée sur la grille en séchant. Ces mesures peuvent toutefois nous renseigner sur une éventuelle structure interne des microgels. Dans le cas de ces échantillons, les microgels apparaissent lisses et uniformes.

En ce qui concerne le diamètre hydrodynamique des microgels, nous constatons qu'il est différent à basse température ( $T=15^{\circ}\text{C}$ ) mais qu'il est sensiblement le même à haute température (supérieure à la VPTT), quel que soit le taux de DDOPBA incorporé. Cela indique que la taille des objets est bien fixée par les conditions de polymérisation par précipitation. La concentration en SDS étant la même pour toutes les synthèses, nous obtenons le même diamètre. Ce constat est intéressant car il permet d'anticiper que les conditions de polymérisation permettront de contrôler la taille des particules, indépendamment des récepteurs présents dans le milieu.

Tableau 2.1 : Caractérisations des microgels à base de NIPAM

Nom	Monomère alkylacrylamide	Réticulant (% mol)	Récepteur au glucose (% mol)	bore %mol. <sup>a</sup>	Polymère soluble (%mt.) <sup>b</sup>	$d_H$ (nm) $T=15^{\circ}\text{C}$ , pH 7,4 (PDI)	$d_H$ (nm) $T>VPTT$ pH 7,4 (PDI)
<b>NiBPBA5</b>	NIPAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (5%)	3.0	17	353 (0,014)	198 (0,043)
<b>NiBPBA10</b>	NIPAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (10%)	9.8	10	326 (0,041)	205 (0,031)
<b>NiBPBA15</b>	NIPAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (15%)	17.3	5	265 (0,05)	203 (0,013)

a : Taux de bore dans le microgel, mesuré par analyse élémentaire.

b : Taux de polymère soluble, obtenu après ultracentrifugation (50 000 rpm, 30 min).

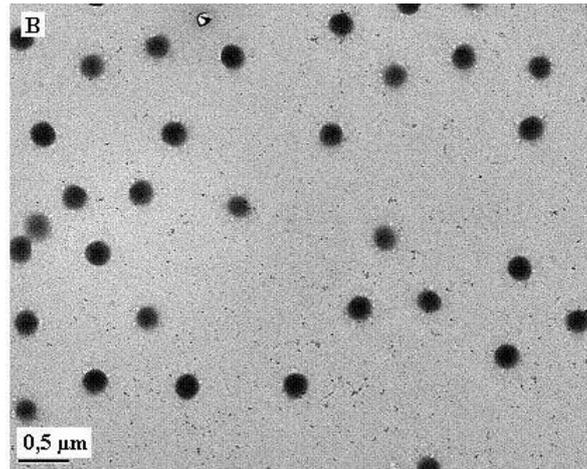


Figure 2.12 : Clichés MET d'un microgel de NIPAM, BIS, 10% DDOPBA.

Avant de se lancer dans l'étude du gonflement de ces microgels, nous avons d'abord étudié l'évolution de leur mobilité électrophorétique en fonction du pH, avec et sans glucose, afin de comparer leur comportement avec les microgels contenant de l'AAPBA (Figure 2.13).

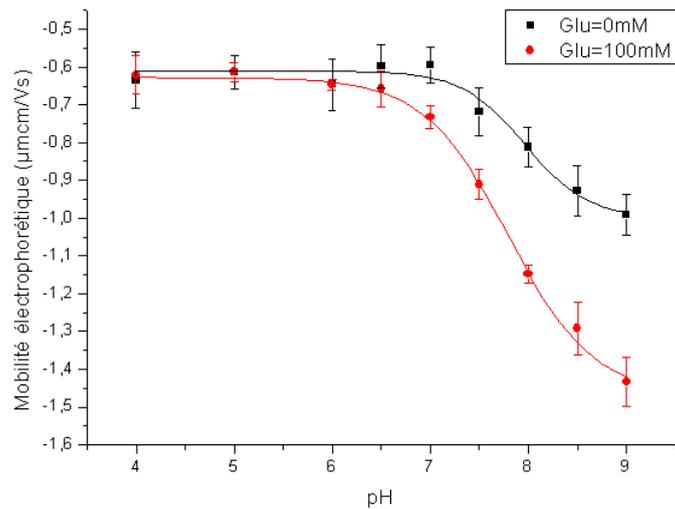


Figure 2.13 : Evolution de la mobilité électrophorétique d'un microgel au DDOPBA (10%) en fonction du pH et de la présence de glucose.

Comme le souligne le graphe de la figure 2.12, l'état de charge de la particule augmente pour une gamme de pH allant de 7 à 9. Le point d'inflexion de cette courbe se situe vers 8, ce qui est proche du pKa (7,8) du récepteur. Ce résultat indique clairement que le récepteur a bien été introduit. Lors de l'addition de glucose, la courbe présente la même allure mais l'augmentation de la charge commence à un pH plus bas. Ainsi, ce décalage semble traduire l'abaissement du pKa lié à la formation de l'ester boronique avec le glucose. Il est intéressant de noter que la valeur de la mobilité est très différente en absence et en présence de glucose

pour le pH physiologique. Ceci traduit une variation de densité de charge du polymère. On peut donc s'attendre à un gonflement potentiel des microgels à ce pH.

Nous poursuivons donc la caractérisation de ces microgels par l'étude de leur aspect stimuable. Pour cela, nous allons mesurer l'évolution de leur taux de gonflement dans différentes conditions.

### *III.3. Comportement thermique des microgels à base de DDOPBA*

Maintenant que nous avons montré que le DDOPBA a été correctement incorporé, nous allons étudier les transitions thermiques des microgels. Nous choisissons de nous placer à un pH constant égal à 7,4, afin d'anticiper les futures conditions physiologiques de pH. Toutefois, le tampon choisi ne contient que 2 mM d'électrolyte, loin des conditions de salinité physiologiques pour lesquelles la force ionique est de 150 mM.

L'évolution du diamètre hydrodynamique en fonction de la température pour l'ensemble des microgels synthétisés est présentée sur la figure 2.14, comparativement au comportement des microgels de pNIPAM de référence. Afin de pouvoir comparer plus facilement ce comportement, nous reportons le taux de gonflement des microgels, c'est-à-dire leur volume normalisé par le volume à l'état contracté. Ainsi, il apparaît clairement que :

- la température de transition de phase volumique (VPTT) des microgels est diminuée par rapport à la VPTT d'un microgel de NIPAM pur (approximativement 32°C),
- la VPTT décroît lorsque le taux de DDOPBA augmente, alors que le taux de gonflement diminue.

Ces résultats indiquent clairement que l'incorporation du DDOPBA induit un caractère hydrophobe marqué, qui décroît l'affinité du réseau pour l'eau. A un pH de 7,4, cette entité est majoritairement dans sa forme neutre (le pH est inférieur au pKa). Ce caractère hydrophobe peut être expliqué par la présence du noyau aromatique.

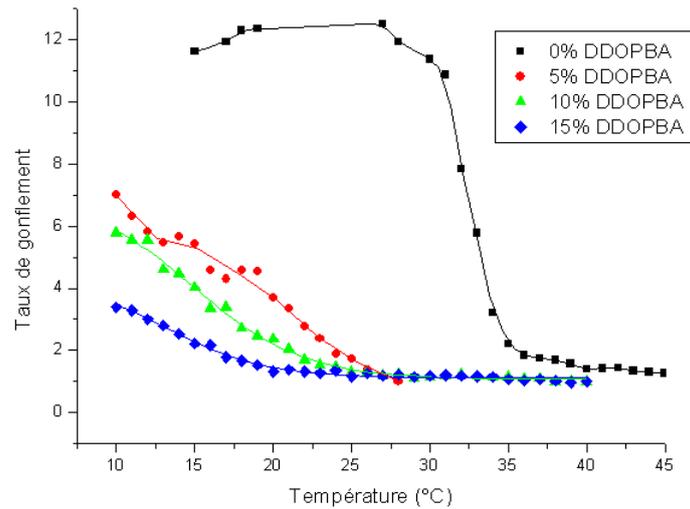


Figure 2.14 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NIPAM, BIS, DDOPBA en fonction de la température et de la teneur en DDOPBA. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4).

Voyons maintenant quelle est l'incidence du glucose sur le comportement thermique des microgels. Nous présentons le comportement d'un microgel de composition médiane avec 10% de DDOPBA, en absence et en présence de glucose. Afin d'exalter les différences entre ces deux états, nous choisissons une concentration en glucose très élevée, bien supérieure au domaine de concentration physiologique. Les résultats sont donnés sur la figure 2.15.

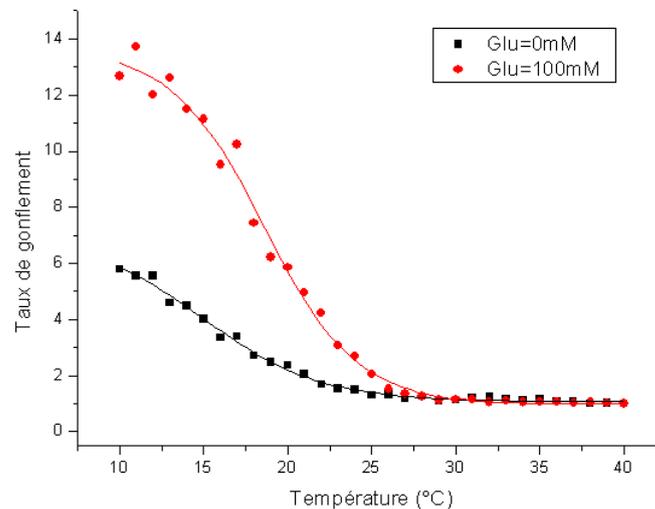


Figure 2.15 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NIPAM, BIS, 10 % DDOPBA en fonction de la température et de la présence de glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4).

Le premier constat est une différence marquée entre les deux situations. En présence de glucose, la VPTT des microgels est décalée vers les plus hautes températures. Ceci s'explique par le fait que la complexation du glucose induit une augmentation de l'état de charge des microgels et un passage d'un réseau peu chargé à un réseau de polyélectrolyte. De surcroît, le

caractère hydrophobe du dérivé boronique à l'état neutre devient hydrophile lors du changement de charge. La solubilité du polymère s'en trouve également accrue, ce qui se manifeste par une augmentation de la VPTT pour le microgel. Ce résultat avait déjà été obtenu par Kataoka lors de l'étude des hydrogels <sup>92</sup>.

D'un point de vue pratique, on constate que la sensibilité au glucose du microgel étudié n'est effective que pour des températures inférieures à 25°C. Ainsi, nous avons mesuré à basse température ( $T=10^{\circ}\text{C}$ ), l'évolution du gonflement des microgels en fonction de la concentration en glucose (Figure 2.16). Afin de pouvoir ultérieurement comparer la réponse de différents microgels, nous tracerons l'évolution du taux de gonflement au glucose, défini comme le rapport entre le volume du microgel à une concentration donnée en glucose et son volume sans glucose.

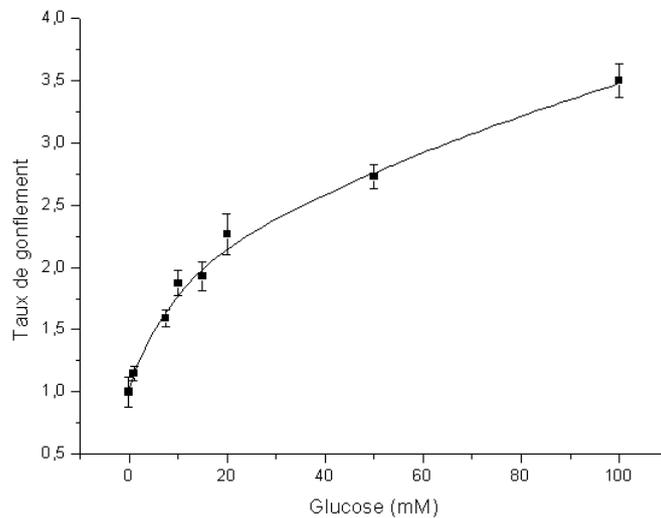


Figure 2.16 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NIPAM, BIS, 10 % DDOPBA. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4, T=10°C).

Le taux de gonflement évolue de façon proportionnelle à la concentration en glucose. Cette évolution n'est pas linéaire, ce qui peut s'expliquer par une combinaison des contributions de changement d'hydrophilie et d'augmentation de la densité de charge. De manière satisfaisante, les nouveaux microgels développés à base de DDOPBA, présentent une bonne sensibilité au glucose dans des conditions de pH physiologique. Cependant nous avons montré que la sensibilité n'est effective que pour une température inférieure à la VPTT. La partie suivante va donc présenter les efforts qui ont été faits pour remédier à ce problème.

#### IV : Synthèse de microgels sensibles au glucose à température physiologique

De façon à augmenter la température de travail vers les températures physiologiques, nous avons donc décidé de synthétiser de nouveaux microgels en remplaçant le NIPAM par un monomère dont l'homopolymère présente une LCST plus élevée. Nous avons également pris garde à ce que la structure de ces composés soit semblable, afin de retrouver une réactivité voisine. Ainsi, nous avons testé deux autres monomères, le N-isopropylméthacrylamide (NIPMAM) et le N-éthylméthacrylamide (NEMAM) (Figure 2.17), qui conduisent respectivement à des homopolymères dont la LCST est de 45°C<sup>150, 206</sup> et 65°C<sup>151</sup>.



Figure 2.17 : Structures du NIPMAM et du NEMAM.

##### IV.1 : Microgels à base de NIPMAM

Dans un premier temps, notre choix s'est porté sur le NIPMAM, car la LCST correspondante de 45°C semble bien indiquée pour obtenir un microgel sensible au glucose à température physiologique. L'utilisation de ce monomère pour former des microgels a déjà été montrée par Duracher et al.<sup>150, 206</sup>. Dans ce cas, la procédure de synthèse reste la même car la température de synthèse reste supérieure à la LCST, ce qui permet une polymérisation par précipitation. Des latex monodisperses ont ainsi été obtenus. Cependant, le succès de la synthèse des microgels sensibles au glucose n'est pas garanti car la réactivité de ce monomère est différente, ce qui peut remettre en question la bonne incorporation de la fonction acide boronique par copolymérisation. La réactivité du NIPMAM a déjà été discutée par Duracher et ses collaborateurs, qui ont été les premiers à étudier la synthèse de microgels à base de pNIPMAM, en utilisant le N,N'-méthylènebisacrylamide comme réticulant. Ces travaux ont permis de montrer que l'écart de réactivité entre le monomère alkylacrylamide et le réticulant était encore plus grand que dans le cas du NIPAM. En effet, il est connu que le taux de propagation des alkylacrylamides est plus élevé que celui des alkylmethacrylamides<sup>206</sup> (par exemple, à 25°C,  $k_p$  est de l'ordre de 18000 L.mol<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> pour l'acrylamide contre seulement 800 pour le methacrylamide). Ainsi, comme nous l'avons déjà discuté pour les microgels à base de pNIPAM, le réticulant est plus concentré au centre du microgel qu'en périphérie. Cet

effet est accentué pour les microgels à base de pNIPMAM. De plus, lorsque la quantité de réticulant est trop faible, cette différence de réactivité se traduit par une augmentation du taux de polymères hydrosolubles, c'est-à-dire, des polymères non liés aux microgels. Ceux-ci peuvent apparaître également si la quantité d'amorceur est trop importante, ce qui conduit à une diminution du degré moyen de polymérisation. Les chaînes trop courtes ont statistiquement moins de chances d'être reliées aux particules réticulées. La température a moins d'influence sur ce phénomène.

Partant de ces données, nous avons donc transposé le protocole mis en œuvre pour la copolymérisation du DDOPBA avec le NIPAM. La concentration en amorceur étant faible dans ce protocole, nous avons gardé les mêmes conditions expérimentales. Le taux de réticulant n'a pas non plus été modifié, partant de l'idée que l'on souhaite garder un maximum d'amplitude dans le facteur de gonflement pour augmenter la sensibilité au glucose. Un microgel trop réticulé pourrait présenter des variations de gonflement trop faibles. La composition du microgel synthétisé ainsi que ses premières caractéristiques sont détaillées dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Caractérisation d'un microgel à base de NIPMAM

Nom	Monomère alkylacrylamide	Réticulant (% mol)	Récepteur au glucose (% mol)	bore %mol <sup>a</sup>	Polymère soluble (% mt.) <sup>b</sup>	d <sub>H</sub> (nm) T=15°C pH 7,4 (PDI)	d <sub>H</sub> (nm) T>VPTT pH 7,4 (PDI)
<b>NmBPBA10</b>	NIPMAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (10%)	8,1	51	502 (0,023)	251 (0,117)

a : Taux de bore dans le microgel, mesuré par analyse élémentaire.

b : Taux de polymère soluble, obtenu après ultracentrifugation (50 000 rpm, 30 min).

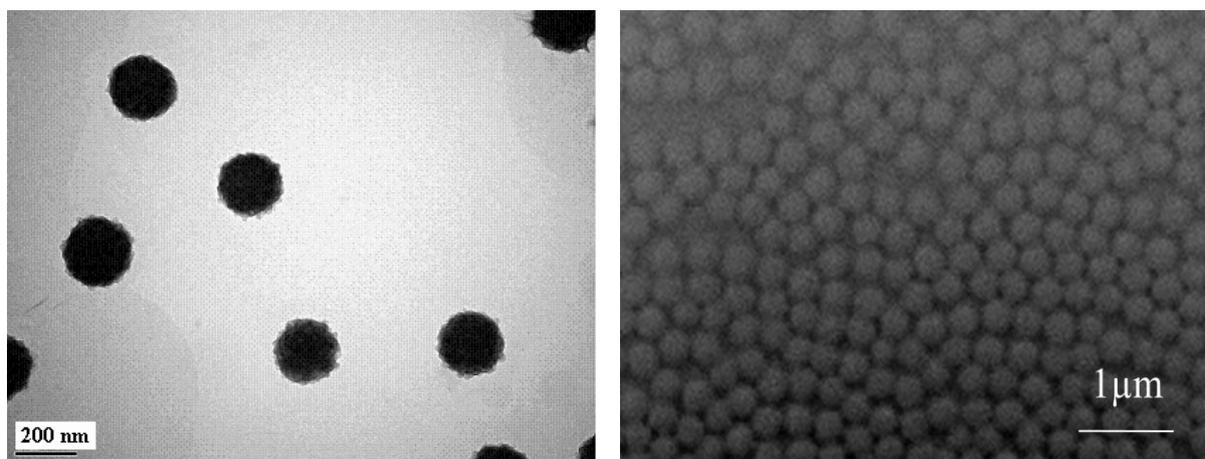


Figure 2.18 : Cliche MET et MEB du microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA.

En remplaçant le NIPAM par le NIPMAM, nous constatons que nous obtenons à nouveau des microgels uniformes en taille, comme le montrent à la fois les mesures de DLS et l'analyse

des clichés de microscopie électronique (Figure 2.18). Le diamètre hydrodynamique dans l'état contracté (état lors de la synthèse) est légèrement supérieur aux microgels à base de pNIPAM. Nous constatons une augmentation significative du taux de polymères hydrosolubles. Ceci est en accord avec les résultats de DURACHER et coll.<sup>206</sup>. Ce paramètre pourrait être amélioré en augmentant la concentration en réticulant. Nous avons fait le choix de mettre la priorité sur la sensibilité future des microgels en termes de gonflement. Ce paramètre n'a donc pas été modifié en pratique.

Détaillons maintenant les caractéristiques principales en termes de thermosensibilité (Figure 2.19) et de sensibilité au glucose (Figure 2.20) de ce microgel. L'évolution du taux de gonflement en fonction de la température a été reportée sur la figure 2.19, pour le composé synthétisé en présence de 10% de DDOPBA. En absence de glucose, la température de transition de phase a été nettement décalée vers les hautes températures comparée au même microgel constitué de pNIPAM. On note un écart de plus de 10°C vers le haut. L'état de contraction total du microgel démarre à peu près à la même température avec et sans glucose, soit vers 36°C. En-dessous de cette température, ce microgel est sensible au glucose, avec une amplitude dépendant de la température, l'optimum étant d'environ 25°C à un pH de 7,4 pour ce microgel.

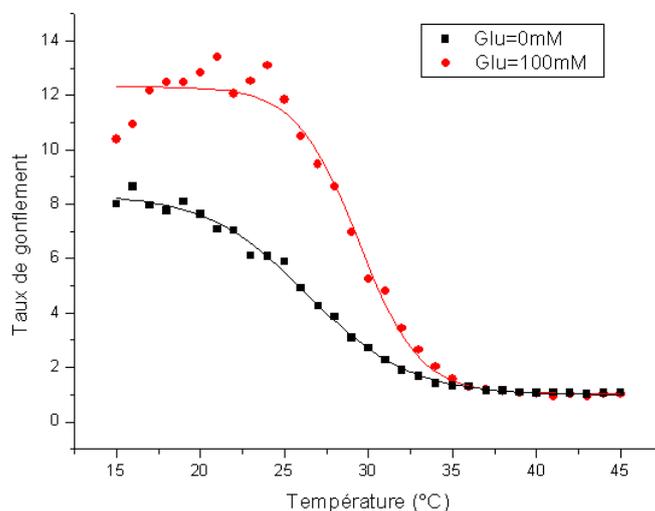


Figure 2.19 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NIPMAM, BIS, 10 % DDOPBA en fonction de la température et de la présence de glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4).

Sa sensibilité au glucose a donc été étudiée à 25°C, dans deux conditions de salinité (Figure 2.20).

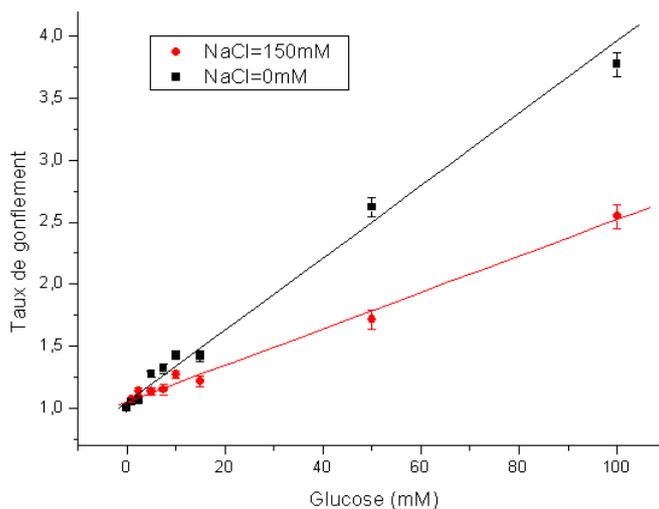


Figure 2.20 : Evolution du diamètre hydrodynamique d'un microgel NIPMAM, BIS, 10 % DDOPBA en fonction de la concentration en glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=25°C.

Ce travail permet de mettre en évidence que la sensibilité au glucose perdure en milieu de salinité physiologique. Ce point n'était pas évident a priori et peut être expliqué de la façon suivante : non seulement la complexation permet de changer l'état de charge du PBA mais elle augmente également son hydrophilie. En effet, le PBA sous forme neutre a tendance à être hydrophobe du fait de son caractère aromatique, tandis qu'il devient hydrophile quand il est chargé. La chaîne de polymère peut donc passer d'un état hydrophobe (l'eau est un mauvais solvant) à hydrophile (l'eau est un bon solvant). Ainsi, le gonflement lié à la variation d'affinité pour le solvant est prépondérant par rapport à l'effet de la variation de charge, ce qui rend le phénomène moins sensible à la présence de sel dans le milieu. Un gonflement d'origine purement électrostatique aurait été mis en défaut en milieu physiologique.

Les résultats présentés ci-dessus sont encourageants pour montrer la possibilité de transposer la sensibilité au glucose à différentes températures en changeant la nature du monomère alkylacrylamide. Néanmoins la sensibilité à 37°C n'est toujours pas atteinte. Une piste pour augmenter la température de transition de phase consisterait à diminuer la concentration en récepteurs au glucose. Cependant ce pourrait être au détriment de la sensibilité. Aussi, afin de construire un microgel dont la VPTT serait supérieure à 37°C, tout en conservant un taux raisonnable de récepteurs au glucose (au moins 10%), il s'avère nécessaire d'introduire de nouveaux monomères alkylacrylamides. Nous avons donc fait le choix d'orienter nos synthèses en utilisant un autre composé de la famille des N-alkyl(meth)acrylamides, dont les homopolymères présentent une LCST supérieure à celle du pNIPAM. Notre choix se porte

maintenant pour le N-éthyl(méth)acrylamide (NEMAM). La LCST de son homologue est égale à 65°C<sup>151</sup>.

#### *IV.2 : Microgels à base de NEMAM*

Comme nous l'avons avancé précédemment, le NEMAM dont la structure chimique est détaillée ci-dessus (Figure 2.17), possède une LCST proche des 65°C. Ainsi, dans l'hypothèse de sa combinaison avec le DDOPBA, dont nous connaissons le caractère hydrophobe et sa tendance à abaisser la LCST, nous pouvons raisonnablement supposer que la VPTT du microgel sera encore au dessus des 37°C.

Cependant même si la structure du NEMAM est proche de celle du NIPAM ou du NIPMAM, sa réactivité est très différente. Nous avons dû revoir notre protocole de synthèse des microgels en nous appuyant sur les travaux de Hazot et al. qui ont été les premiers à mettre au point la synthèse de microgels à base de pNEMAM<sup>207, 208</sup>. En particulier ces auteurs se sont heurtés à la difficulté d'obtenir des microgels monodisperses réticulés par du BIS du fait de la trop grande réactivité de BIS par rapport au NEMAM. En effet comme celui-ci est consommé trop rapidement au départ de la réaction, il conduit à la présence de précurseurs hautement réticulés et de polymères non réticulés, ce qui entraîne la polydispersité des particules formées. Aussi, afin de diminuer la disponibilité du réticulant dans le milieu, le BIS a été remplacé par d'autres monomères difonctionnels moins solubles. L'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA), peu soluble dans l'eau, s'est révélé le réticulant le plus approprié pour le NEMAM car la copolymérisation de ces deux derniers monomères mène à une population de microgels monodisperses et des taux de polymères solubles plus faibles en comparaison des autres réticulants utilisés. Néanmoins, pour être précis, la copolymérisation est un couplage entre une polymérisation par précipitation et une polymérisation en émulsion<sup>207</sup>. Nous avons donc synthétisé des microgels à partir de la triade NEMAM DDOPBA EGDMA. Afin de minimiser le taux de polymères hydrosolubles tout en préservant une bonne capacité de gonflement, nous avons choisi d'incorporer 10% molaire de réticulant. Enfin, étant donné que la LCST du pNEMAM est de l'ordre de 65°C, il nous faut augmenter notre température de synthèse au-delà de 70°C. Nous avons décidé de fixer 80°C comme condition expérimentale de synthèse.

Le tableau ci-dessous reprend les formulations synthétisées et leurs principales caractéristiques.

Tableau 2.3 : Caractérisation de microgels à base de NEMAM

Nom	Monomère alkylacrylamide	Réticulant (% mol)	Récepteur au glucose (% mol)	bore %mol. <sup>a</sup>	Polymère soluble (%mt.) <sup>b</sup>	$d_H$ (nm) T=15°C pH 7,4 (PDI)	$d_H$ (nm) T>VPTT pH 7,4 (PDI)
<b>NeEPBA10</b>	NEMAM	EGDMA (10%)	DDOPBA (10%)	7,6	49	410 (0,017)	234 (0,167)
<b>NeEPBA15</b>	NEMAM	EGDMA (10%)	DDOPBA (15%)	10,6	57	361 (0,124)	224 (0,068)

a : Taux de Bore dans le microgel, mesuré par analyse élémentaire.

b : Taux de polymère soluble, obtenu après ultracentrifugation (50 000 rpm, 30 min).

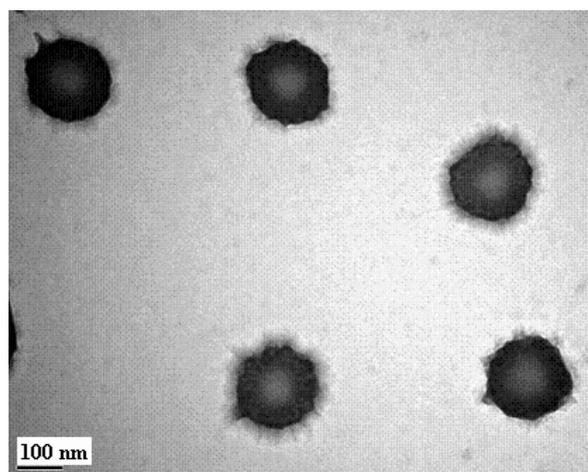


Figure 2.21 : Cliché de MET du microgel NEMAM, EGDMA, 10% DDOPBA.

Tout comme pour les cas précédents (NIPAM et NIPMAM), nous obtenons des particules de distribution de taille étroite, comme en attestent les expériences de DLS et de MET (Figure 2.21). Leur taille à l'état contracté est du même ordre de grandeur que celle des autres microgels sensibles au glucose. Le taux de polymères hydrosolubles est élevé, proche de 50% malgré la plus forte teneur en réticulant qui devrait minimiser leur présence.

A nouveau, nous avons étudié la réponse thermique des microgels en absence et en présence de glucose. Nous constatons que la température de transition volumique est enfin supérieure à 37°C, même pour des compositions de 10 à 15% de DDOPBA. Ainsi, à 37°C, le taux de gonflement augmente en présence de glucose (Figure 2.22).

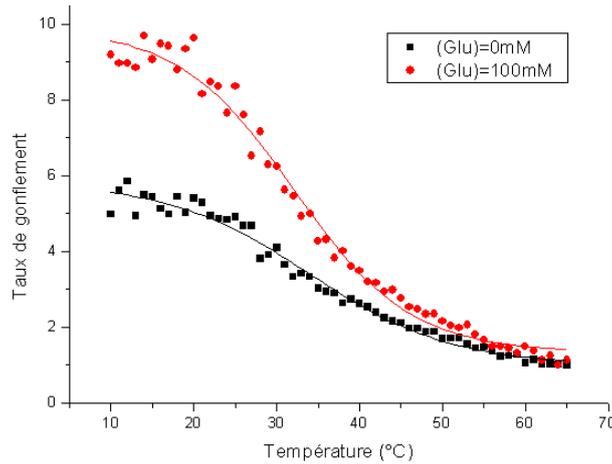


Figure 2.22 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NEMAM, EGDMA, 10 % DDOPBA en fonction de la température.  
Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4).

A ce stade, le comportement des microgels en réponse au glucose a été évalué en mesurant l'évolution de leur taille en fonction de la concentration en glucose à une température donnée. Tous les microgels, de par leur fonctionnalisation au DDOPBA, sont désormais sensibles au glucose dans les conditions physiologiques de pH et de salinité (150 mM) (Figures 2.20 et 2.22). Cependant seules les formulations au NEMAM peuvent présenter une réponse à température corporelle. L'évolution de leur taux de gonflement en fonction de la concentration en glucose, dans les conditions physiologiques est présentée ci-dessous pour la formule incorporant 10% de DDOPBA. Les mesures ont été réalisées dans des tampons phosphates contenant 150mM de NaCl mais aussi dans un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) qui est de même force ionique mais contient d'autres sels inorganiques que le NaCl et se rapproche un peu plus des conditions physiologiques (Figure 2.23).

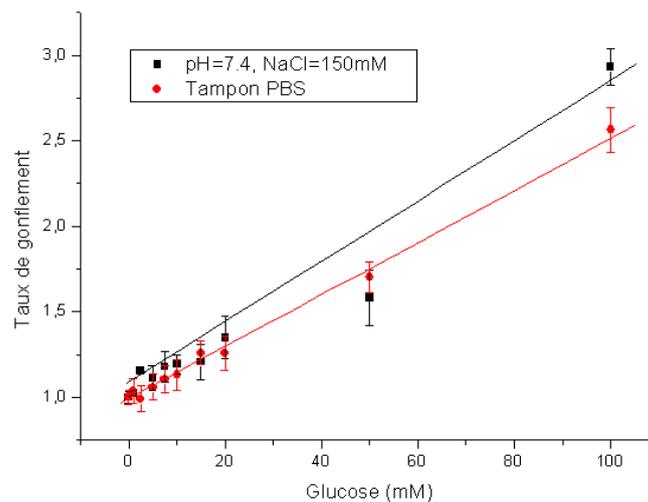


Figure 2.23 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NEMAM, EGDMA, 10 % DDOPBA en fonction de la concentration en glucose.  
Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4, [NaCl]=150 mM) ou tampon PBS, T=37°C.

Les deux réponses sont très similaires avec une évolution linéaire en fonction de la concentration en glucose. Les tailles des microgels à 37°C varient entre 250 nm et 350 nm quand la concentration varie entre 0 et 100mM. En termes de taux de gonflement, il atteint la valeur de 2,6. Dans la gamme physiopathologique, qui correspond à la glycémie des patients atteints de la pathologie du diabète, le taux de gonflement est de 1,3 à 20 mM en glucose. Cette réponse peut être améliorée en incorporant plus de DDOPBA dans le microgel. En effet, nous avons réussi à incorporer davantage de monomère sensible au glucose (15%) tout en conservant la sensibilité à 37°C. Le taux de gonflement est désormais de 1,5 pour la formule de NEMAM, EGDMA, 15% DDOPBA dans les mêmes conditions de mesure (Figure 2.24).

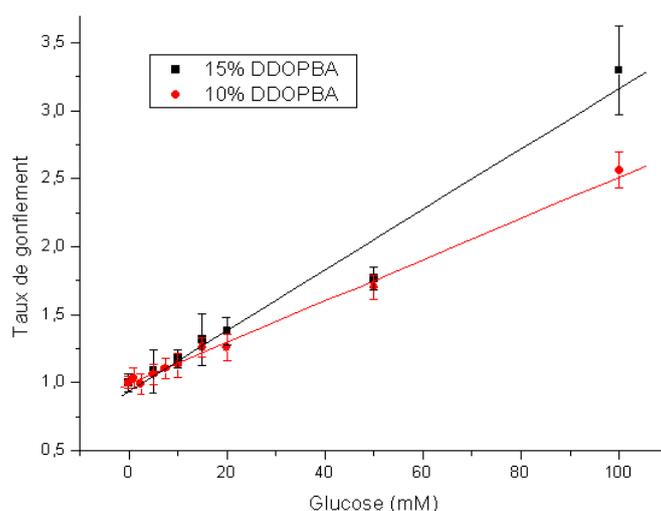


Figure 2.24 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NEMAM, EGDMA, DDOPBA en fonction de la teneur en DDOPBA et de la concentration en glucose. Tampon PBS,  $T=37^{\circ}\text{C}$ .

#### IV.3 : Discussion

Le remplacement du monomère alkylacrylamide de départ a conduit à des microgels sensibles au glucose en conditions physiologiques de pH, salinité et température. Cependant, les changements de réactivité des monomères conduisent à une modification de la structure des microgels que nous allons maintenant commenter.

La modification de la réactivité se traduit par la présence d'une grande quantité de polymères hydrosolubles. Si nous regardons la teneur en bore dans les microgels, nous constatons que celui-ci est plus faible que le taux théorique attendu pour les microgels à base de NEMAM et de NIPMAM. Nous pouvons avancer l'hypothèse que le DDOPBA se répartit entre les microgels et les polymères hydrosolubles, avec une préférence pour les parties solubles. Ceci

pourrait s'expliquer par le fait que le DDOPBA réagit plus lentement que le N-alkyl-méthacrylamide. En effet, dans cette hypothèse, le DDOPBA serait principalement incorporé en fin de polymérisation, au moment où le réticulant est déjà consommé. Faute de posséder une grande quantité de DDOPBA, nous n'avons pas pu mener d'études cinétiques donnant le taux de conversion du DDOPBA.

D'un point de vue pratique, même si la synthèse des microgels à base de NIPMAM ou de NEMAM fonctionnalisés par le PBA présente quelques défauts comme un rendement non optimal, il reste satisfaisant de constater que leurs propriétés peuvent être modulées. En particulier, le taux de bore mesuré dans les microgels augmente quand le taux de DDOPBA augmente et les taux incorporés restent suffisants pour une bonne sensibilité.

Nous avons tout de même tenté d'améliorer la synthèse des microgels à base de NIPMAM, en utilisant l'EGDMA comme réticulant, à hauteur de 10% molaire, afin de diminuer l'écart de réactivité entre le réticulant et le monomère alkylacrylamide et ainsi diminuer le taux d'hydrosolubles. Les résultats sont consignés dans le tableau 2.4 :

Tableau 2.4 : Caractérisations d'un microgel de NIPMAM réticulé par de l'EGDMA

Nom	Monomère alkylacrylamide	Réticulant (% mol)	Récepteur au glucose (% mol)	bore %mol. <sup>a</sup>	Polymère soluble (% mt.) <sup>b</sup>	d <sub>H</sub> (nm) T=15°C pH 7,4 (PDI)	d <sub>H</sub> (nm) T>VPTT pH 7,4 (PDI)
<b>NmEPBA10</b>	NIPMAM	EGDMA (10%)	DDOPBA (10%)	8,6	49	515 (0,054)	309 (0,002)

a : Taux de Bore dans le microgel, mesuré par analyse élémentaire.

b : Taux de polymère soluble, obtenu après ultracentrifugation (50 000 rpm, 30 min).

Nous constatons que le changement de réticulant n'a pas amélioré la quantité de polymères hydrosolubles. Les transitions thermiques des trois composés sont reportées sur la figure 2.25. Elles montrent que la température de transition de phase volumique n'est pas affectée par la nature du réticulant dans le cas des microgels à base de NIPMAM. Seulement, l'EGDMA a été utilisé à hauteur de 10%. Les taux de gonflement du microgel correspondant sont donc plus faibles que ceux de son homologue réticulé au BIS.

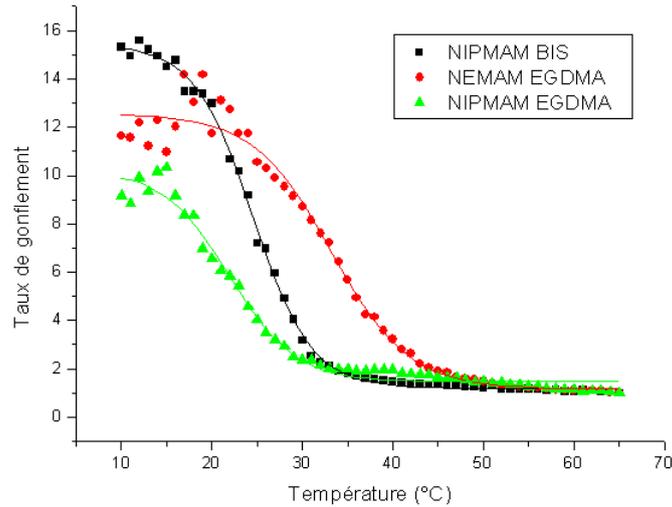


Figure 2.25 : Evolution du taux de gonflement en fonction de la température et de la nature des comonomères utilisés. Eau Ultrapure (pH=5,4).

Nous avons tout de même étudié la structure interne de tous ces composés par MET (Figure 2.26 cliché B et Figure 2.18). Nous constatons que la morphologie dépend principalement du type de réticulant. Ainsi, en absence de glucose, lorsque le réticulant est du BIS, les microgels ont une allure compacte, présentant une surface granuleuse. Lorsque le réticulant est l'EGDMA, la structure est de type cœur-écorce avec une écorce granuleuse également (Figure 2.27 cliché B et Figure 2.21). La granulosité de surface pourrait provenir de microgels ayant nucléés dans un deuxième temps, puis qui se lie avec les particules déjà en croissance. Si le monomère qui contient le PBA est moins réactif que les deux autres, on pourrait avoir ce type de structure. Ces molécules devraient gonfler en présence de glucose. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la structure des microgels lorsque le séchage a lieu en présence de glucose (100 mM). Les clichés sont montrés sur les figures 2.26 cliché A et 2.27 cliché A :

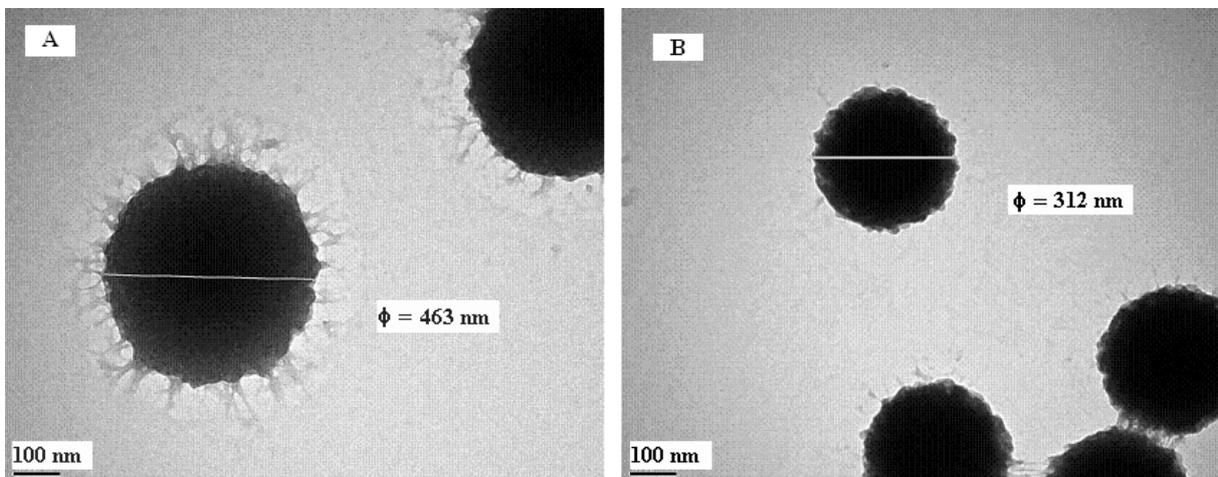


Figure 2.26 : Clichés MET : NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%), Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4)

A : [Glucose]=100 mM ; B : [Glucose]=0 mM.

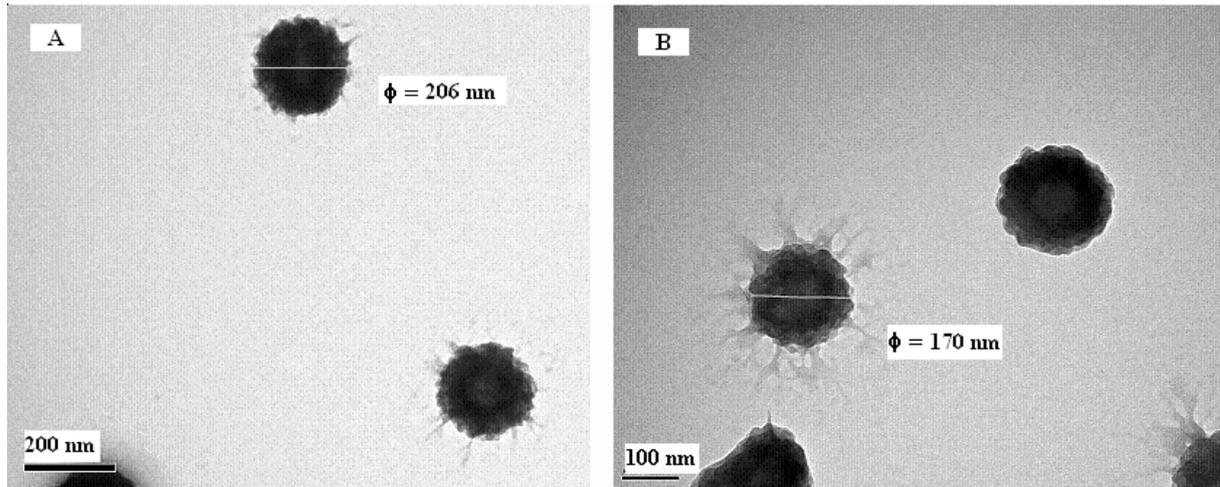


Figure 2.27 : Clichés MET : NIPMAM, EGDMA, DDOPBA (10%),  
Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4)  
A : [Glucose]=100 mM ; B : [Glucose]=0 mM.

Dans le cas du microgel réticulé avec le BIS, le microgel, même séché marque une différence de taille entre le milieu riche en glucose et le milieu tampon. Cette différence de taille est moins marquée dans le cas du microgel synthétisé à l'EGDMA, probablement car celui-ci est plus réticulé.

Notons que nous avons évalué la cinétique de gonflement des microgels en comparant les valeurs des diamètres hydrodynamiques sur des temps long (5 à 15 minutes) et sur des temps courts (moins de 1 minute) par le biais de la DLS. Il apparaît qu'en présence d'une variation de glucose dans le milieu, les microgels gonflent et atteignent leur nouvel état de gonflement en moins de 1 minute.

### V : Sélectivité des microgels vis-à-vis du glucose

Le mécanisme de gonflement des microgels dans lequel est engagé le glucose est sujet à une compétition de la part des autres formes de saccharides et plus globalement de différentes espèces *in vivo* qui présentent des diols. Les lactates font donc également partie des interférents qui pourraient engendrer un gonflement.

#### V.1 : Compétition avec les autres saccharides

Les différents saccharides présents *in vivo* peuvent se rencontrer à l'état de monosaccharides, de disaccharides comme le lactose (association de glucose et de galactose) ou de saccharides liés sous la forme de glycoprotéine (protéines sériques à l'exception de

l'albumine, protéines membranaires ou glycolipides). Les principaux monosaccharides, sous leur forme pyranose, sont détaillés sur la figure 2.28.

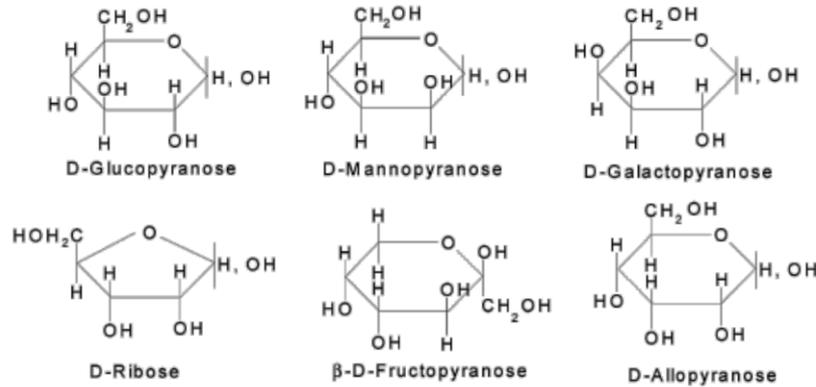


Figure 2.28 : Représentation schématique des principales formes de monosaccharides.

Nous nous sommes alors intéressés à la réponse de nos microgels en fonction des principaux saccharides que sont le fructose et le galactose (Figure 2.29). Le NIPMAM-BIS-DDOPBA 10% sera pris en référence.

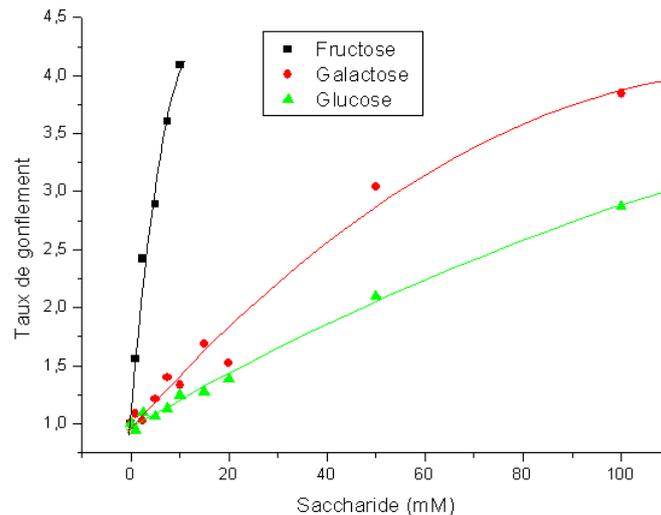


Figure 2.29 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA en fonction de la concentration en saccharide.

Tampon phosphate (2 mM, pH=7.4, [NaCl]=150 mM), T=25°C.

Comme nous pouvons le supposer, nos microgels gonflent et d'autant plus que la constante de complexation entre les saccharides et le récepteur PBA est grande. Le fructose est connu pour avoir une constante d'association avec les récepteurs PBA bien plus grande que celle du glucose ou du galactose (cf tableaux 1.1 et 1.2 chapitre I §.III). Nous nous sommes alors intéressés de plus près à la concentration de ces espèces dans les conditions physiologiques.

Les différentes études de la littérature, qui concernent le fructose, énoncent que sa concentration est inférieure à  $20 \mu\text{M}$ <sup>209</sup> ou encore qu'elle est égale à  $50 \mu\text{M}$ <sup>210</sup> voire que sa teneur est inférieure à  $10 \mu\text{M}$ <sup>211, 212</sup> et que ce taux serait plus élevé chez les patients diabétiques. De loin les résultats de cette dernière étude semblent les plus aboutis et montrent que la concentration en fructose sur une population saine est de  $8,1 \mu\text{M}$  et de  $12,0 \mu\text{M}$  pour des patients diabétiques. En ce qui concerne le galactose, sa concentration a été déterminée à  $30 \mu\text{M}$  sous sa forme libre<sup>213</sup>.

De façon à mettre en évidence l'influence des interférents dans les concentrations les plus élevées décrites ci-dessus, nous avons suivi l'évolution du gonflement du microgel en fonction de la concentration en glucose en présence de  $50 \mu\text{M}$  de fructose et  $50 \mu\text{M}$  de galactose (Figure 2.30).

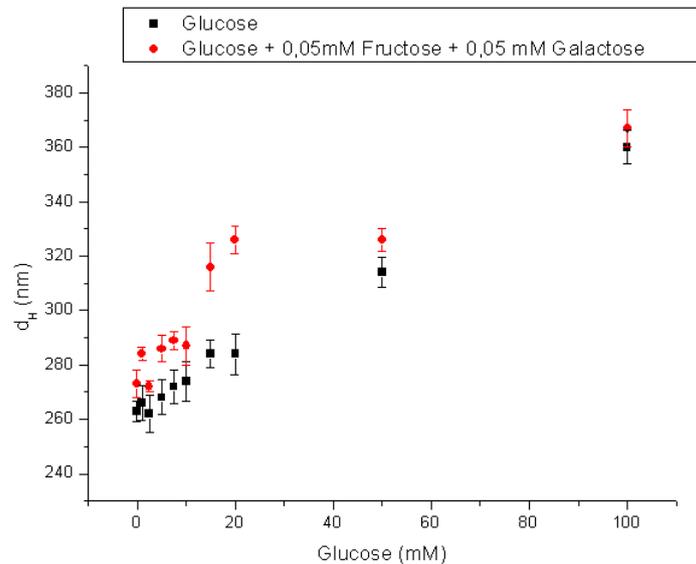


Figure 2.30 : Influence de la présence de saccharides interférents sur le gonflement d'un microgel

*NEMAM, EGDMA, 10% DDOPBA.*

*Tampon PBS,  $T=37^\circ\text{C}$ .*

Le gonflement de ce dernier est modifié par la présence de ces sucres interférents (Figure 2.30). Si le graphique est tracé en taux de gonflement, les deux allures sont confondues. Tracé selon l'évolution de la taille, nous remarquons qu'elles sont augmentées de  $20 \text{ nm}$  en moyenne en présence d'interférents. Ainsi, les microgels restent sensibles à la présence de glucose. Cependant, le risque est que les variations de concentration en fructose génèrent un gonflement supplémentaire.

Nous avons donc étudié (sur un lot différent de microgel de même nature chimique) l'évolution du diamètre hydrodynamique, à concentration fixe en glucose mais avec une variation de la concentration d'interférent.

Tableau 2.5 : Evolution du diamètre hydrodynamique d'un microgel de NEMAM en fonction de la concentration en interférants. Microgel NEMAM, EGDMA, 10% DDOPBA

[Glucose] (mM)	[Fructose] (mM)	[Galactose] (mM)	$d_H$ (nm) $T=37^\circ\text{C}$ (PDI)
10	-	-	293 (0,038)
10	0,05	0,05	309 (0,036)
10	0,1	0,05	309 (0,046)

Nous remarquons que les variations de concentration en fructose, dans la gamme physiologique, n'entraînent pas de variation supplémentaire du diamètre hydrodynamique.

#### V.2 : Compétition avec des diols du milieu : exemple du lactate

Le lactate est un sel de l'acide lactique qui présente un diol. L'acide lactique peut être amené par le biais de l'alimentation ou de l'effort musculaire. Aussi en condition normale, sa concentration est de 1 mM<sup>214-217</sup> et peut monter au cours d'un exercice physique<sup>218</sup>. Nous avons donc cherché à mettre en évidence de manière ponctuelle l'influence de la présence de lactate sur la réponse de nos microgels au NEMAM dans un tampon PBS dans les conditions physiologiques mais aussi l'influence de la variation de sa concentration (Tableau 2.6).

Tableau 2.6 : Influence de la présence d'interférent sur le diamètre hydrodynamique du microgel de NEMAM, EGDMA, 10% DDOPBA

[Glucose] (mM)	[Lactate] (mM)	$d_H$ (nm) $T=37^\circ\text{C}$ (PDI)	Ecart-type (nm)
10	-	293 (0,038)	5,6
10	1	314 (0,045)	3,13
10	5	309 (0,069)	3,93

L'introduction de lactate modifie légèrement le diamètre hydrodynamique du microgel qui augmente en moyenne de 20 nm, comme nous l'avons constaté pour la présence de fructose et de galactose (Tableau 2.5). Malgré la variation de la concentration en lactate, le diamètre hydrodynamique ne varie pas. Comme l'étude précédente, cette dernière souligne la

compétition du lactate avec le glucose et nous renseigne sur l'absence de variation du gonflement d'un microgel en fonction de la variation de la concentration d'interférents.

### V.3 : Comportement des microgels dans des fluides biologiques

Pour finir, nous avons évalué le comportement de nos microgels dans un milieu de culture de type DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) pour vérifier la sensibilité au glucose dans un milieu contenant des acides aminés, des sels inorganiques et des vitamines (Figure 2.31).

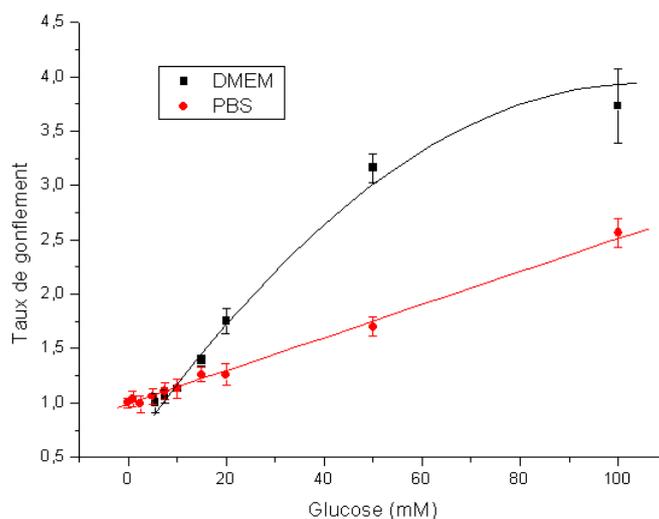


Figure 2.31 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NEMAM, EGDMA, 10% DDOPBA en fonction de la concentration en glucose et de la nature du milieu.

La sensibilité au glucose est conservée mais exaltée. Cependant pour les valeurs physiologiques (concentration en glucose inférieure à 20mM), les variations sont relativement proches. La présence d'interférents supplémentaires amène là aussi un gonflement supplémentaire sans toutefois modifier le comportement du microgel.

## VI : Conclusion au chapitre synthèse de microgels sensibles au glucose

Au terme de la synthèse d'une série de microgels fonctionnalisés par l'acide phénylboronique et d'une construction rationnelle par copolymérisation articulée autour des monomères constitutifs, nous avons élaboré une nouvelle classe de microgels. La particularité de ces réseaux réside dans leur sensibilité au glucose dans les conditions physiologiques et plus particulièrement encore dans les conditions physiopathologiques.

La relative simplicité pour synthétiser ces microgels nous permet d'entrevoir des axes d'améliorations que nous détaillerons dans les chapitres suivants. Tant sur le plan structurel que sur le plan de la sensibilité au glucose, nous pouvons envisager de construire des microgels dont le comportement en réponse à la concentration en glucose serait le plus optimal dans les conditions physiologiques. (Chapitres IV et V)

Nous disposons surtout dans l'état actuel des recherches d'un panel suffisant de synthèses de microgels pour envisager d'illustrer notre concept de libération d'insuline par des microgels sensibles au glucose et de comprendre le comportement de libération de l'insuline en fonction de la concentration en glucose dans des conditions expérimentales de laboratoire voire des conditions physiologiques ce qui fera l'objet d'une étude au travers du chapitre suivant (Chapitre III).

## **Chapitre III : Application à la délivrance d'insuline**



Au-delà de la construction de microgels sensibles au glucose dans les conditions physiologiques, notre second objectif s'intéresse à la délivrance auto-régulée d'insuline par des microgels. L'objet de ce chapitre consiste donc à étudier le potentiel des microgels synthétisés précédemment en termes de libération de principes actifs et dans notre cas d'insuline. Il s'agit en particulier d'établir si le concept de délivrance auto-régulée d'insuline est valide, à savoir que la quantité d'insuline libérée dépend de la concentration en glucose, et ce, de manière réversible (Figure 3.1). Le deuxième objectif est de déterminer les cinétiques de libération afin de voir si elles sont compatibles avec les besoins cliniques. Enfin, nous espérons établir l'impact de la structure des microgels sur la libération, afin de guider le design de futurs vecteurs administrables *in vivo*.

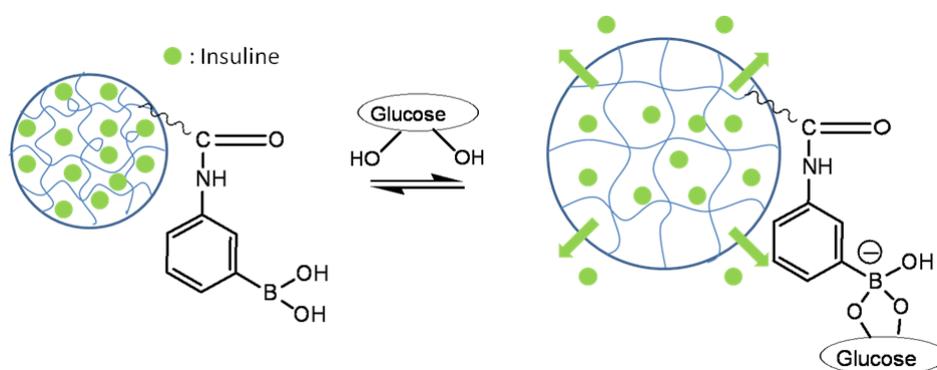


Figure 3.1 : Principe de la libération auto-régulée d'insuline. A faible concentration en glucose, le microgel est contracté et il retient l'insuline. A plus forte concentration en glucose, le microgel gonfle.

La porosité du microgel augmente et l'insuline est libérée. Sa libération entraîne la chute de la concentration en glucose *in vivo* et donc une boucle de rétroaction.

Katoaka et al. ont été les premiers à concrétiser partiellement ce concept, en utilisant des hydrogels sensibles au glucose basés sur la copolymérisation de NIPAM avec un monomère de type PBA<sup>91, 92</sup>. Ces auteurs ont montré une libération on-off asservie à la présence de glucose, dans des conditions non physiologiques de pH et de température. Ces travaux semblent indiquer que l'insuline est libérée quand l'hydrogel gonfle. Ceci est en accord avec les travaux de Peppas utilisant un hydrogel<sup>219</sup> constitué d'acide méthacrylique et d'éthylène glycol, qui délivre l'insuline quand le pH est neutre, tandis qu'elle n'est pas libérée à pH acide<sup>220, 221</sup>. A contrario, dans le domaine des microgels, l'équipe de Lyon a utilisé des microgels thermosensibles<sup>222</sup> et a montré que la libération pouvait être accélérée par la contraction des microgels. Plus récemment (après le début de ce travail de thèse) la libération d'insuline en fonction de la concentration en glucose a été étudiée<sup>198, 223</sup>. Il convient de noter que les travaux de Pelton font intervenir un mécanisme différent de celui visé ici puisqu'il s'agit d'un

effet électrostatique. Dans ce cas, l'insuline est adsorbée sur une matrice de charge opposée et elle est libérée lorsque la matrice change de signe et prend une charge de même signe que l'insuline.

La libération que nous souhaitons étudier dépend a priori de la diffusion à travers un réseau plus ou moins étiré. Elle repose sur l'idée que la perméation d'un soluté à travers un réseau d'hydrogel dépend de sa porosité et de la taille du soluté. La porosité est elle-même définie par la taille des pores, sa distribution, et leur agencement via notamment leurs connections. Ces paramètres dépendent intimement de la composition de l'hydrogel et de sa densité de réticulation, tout en sachant que ceux-ci ne sont pas homogènes à l'échelle des microgels car ils sont la conséquence de la réactivité des monomères comme nous l'avons vu au chapitre II. Nous allons donc sonder comment la structure des microgels précédemment synthétisés influence d'une part l'encapsulation de l'insuline et d'autre part sa libération en présence de concentrations variables en glucose. Pour obtenir ces informations, nous avons dû mettre en place des méthodes expérimentales nous permettant d'incorporer l'insuline dans les microgels, puis nous permettant de suivre sa libération au cours du temps.

## I : Encapsulation d'insuline

### I.1 : L'insuline

L'insuline est une hormone hypoglycémiant sécrétée par les îlots de Langerhans (cellules pancréatiques) qui permet au sucre, apporté par l'alimentation et véhiculé par le sang, d'être stocké ou utilisé par les organes du corps humain. Elle est composée de 51 acides aminés assemblés sous forme de deux chaînes peptidiques (A et B) associées par des ponts disulfures (Figure 3.2).

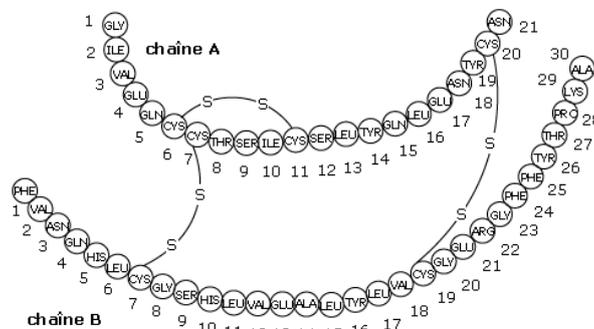


Figure 3.2 : Représentation schématique de la structure de l'insuline.

D'un point de vue structural, l'insuline peut être rencontrée dans son état primaire (enchaînement brut de ces acides aminés), ou sous des états dits secondaires (où certaines parties de la chaîne d'acides aminés se replient pour former de courtes hélices alpha stabilisées par des liaisons hydrogène (par exemple sur chaîne B : Ser 9 à Cys 19) ou s'orientent pour former des feuillets bêta). L'insuline est donc faite d'hélices alpha et de feuillets bêta reliés par des segments qui n'ont pas de structure secondaire particulière. La forme finale de la chaîne d'acides aminés, c'est à dire la structure tridimensionnelle finale qu'adopte la chaîne d'acides aminés, constitue la structure tertiaire de la protéine. Enfin dans l'état quaternaire, l'insuline peut s'associer sous forme de dimère voire d'hexamère en présence de zinc. La formation de précipités amorphes ou cristallins de solutions d'insuline peut aussi venir des changements du pH. On parle de précipitation isoélectrique. Pour l'insuline la valeur du point isoélectrique a été déterminée aux alentours de 5,5 par Jensen et Wintersteiner dans les années 1930.

D'un point de vue thérapeutique, les premiers traitements pour les patients diabétiques ont consisté en un apport par injection sous cutané d'insuline d'origine animale. L'insuline porcine est celle qui présente le plus de similitudes avec l'insuline humaine. Les séquences primaires des acides aminés de l'insuline bovine et porcine diffèrent respectivement de celle de l'insuline de l'homme par 3 et 1 acides aminés. Cette grande différence entre l'insuline bovine et humaine expliquerait pourquoi l'insuline bovine est plus allergénique pour l'homme que celle d'origine porcine <sup>224</sup>. Mais avec les progrès des techniques de biosynthèses, les chercheurs ont réussi à changer légèrement la structure de l'insuline et ont abouti à un panel d'insulines modifiées dont l'auto-assemblage variable permet de moduler les temps d'action de l'insuline. On parle alors d'analogues d'insuline. Les analogues diffèrent de l'insuline physiologique via la modification d'un acide aminé (qui empêche l'auto assemblage) ou par l'ajout d'agents comme la protamine qui en revanche forcent l'assemblage. Plus l'assemblage sera grand, plus le temps d'action de l'insuline sera grand. Il est alors question d'analogues rapide ou lent d'insuline. Pour la suite du chapitre, il est donc important de noter que la taille de l'insuline dépendra de son état d'agrégation. L'insuline humaine non agrégée a un rayon de 1,34 nm pour une masse molaire de 5,7 kDa <sup>225</sup>.

## 1.2 : Méthodologie

### 1.2.1 : Choix de l'insuline

Pour suivre la libération d'insuline nous avons décidé d'utiliser une insuline d'origine bovine marquée par une molécule fluorescente : la Fluoresceine IsoThioCyanate (FITC, Figure 3.3). Les propriétés de fluorescence de cette insuline marquée nous permettent en effet de pouvoir détecter l'insuline avec une très bonne sensibilité. Chaque molécule d'insuline d'origine bovine est marquée par une molécule de FITC couplée de manière covalente au groupement alpha-amino de l'insuline.

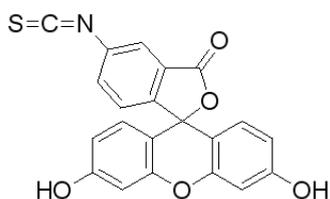


Figure 3.3 : Structure de la molécule de FITC.

Les principales caractéristiques de ce fluorophore sont une longueur d'onde d'excitation à 492 nm et une longueur d'onde d'émission à 518 nm.

### 1.2.2 : Méthode d'encapsulation

Pour encapsuler et libérer l'insuline, nous allons utiliser le gonflement. Nous partons du principe que l'insuline pénètre mieux dans le réseau lorsque le microgel est gonflé ; de même, elle ressortira mieux du réseau dans la même configuration. Ainsi, nous avons utilisé le fait que les microgels soient multisensibles pour utiliser deux leviers indépendants, l'un pour incorporer l'insuline, l'autre pour la libérer. La température sera utilisée pour incorporer l'insuline, qui sera introduite à froid (état A et B). L'utilisation du microgel se fera à une température plus élevée, pour laquelle l'état sans glucose est plus contracté. L'état sans glucose devrait alors retenir l'insuline (état C), tandis que l'ajout de glucose devrait provoquer sa libération (état D) (voir figure 3.4 exemplifiée pour un microgel de NIPMAM).

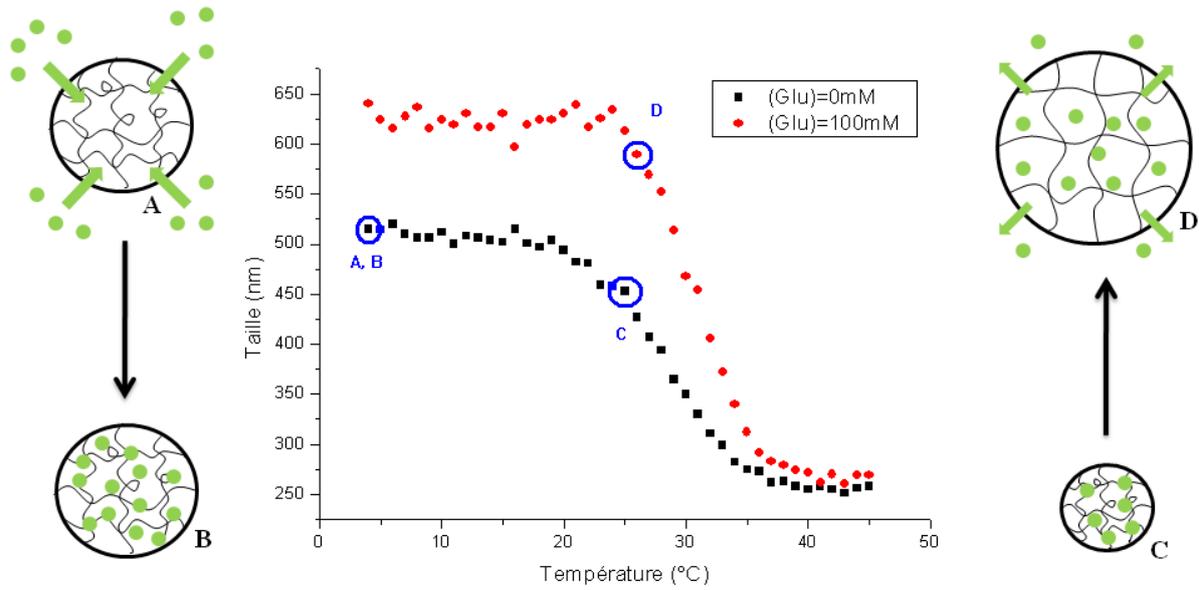


Figure 3.4 : Représentation des différents états d'encapsulation et de libération, et leurs diamètres hydrodynamiques respectifs : A :  $T=4^{\circ}\text{C}$ , pas de glucose, avant incorporation d'insuline, B :  $T=4^{\circ}\text{C}$ , pas de glucose, insuline incorporée, C :  $T=25^{\circ}\text{C}$ , pas de glucose, insuline incorporée et D :  $T=25^{\circ}\text{C}$ , glucose, insuline libérée.

Cette insuline FITC a été incorporée dans les microgels en utilisant la technique dite d'imprégnation, qui consiste à immerger une quantité de microgels à l'état sec, c'est-à-dire lyophilisés, dans une solution d'insuline, dans les conditions où le microgel est dans un état de gonflement le plus grand possible. En effet, il a été rapporté que cette procédure permettait d'incorporer une plus grande quantité de peptide dans les microgels comparée à un simple équilibre de partition <sup>226</sup>.

#### Encapsulation d'insuline

Dans notre cas, 3 mg de microgels lyophilisés sont mis en présence de 1mL de solution d'insuline-FITC (0,1 mg/mL ou 1 mg/mL), à pH physiologique (tampon phosphate 2 mM à pH=7,4) et à une température de  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 24 h, afin que les microgels soient dans l'état le plus gonflé possible (état A). Après cette étape (état B), les microgels sont ramenés à température ambiante (état C). Plus contractés, il est espéré que l'insuline encapsulée reste piégée. Ils sont ensuite centrifugés et le surnageant est remplacé par du tampon phosphate. En moyenne cette opération est renouvelée 5 fois de façon à ce que la fluorescence du surnageant soit négligeable (Figure 3.5).

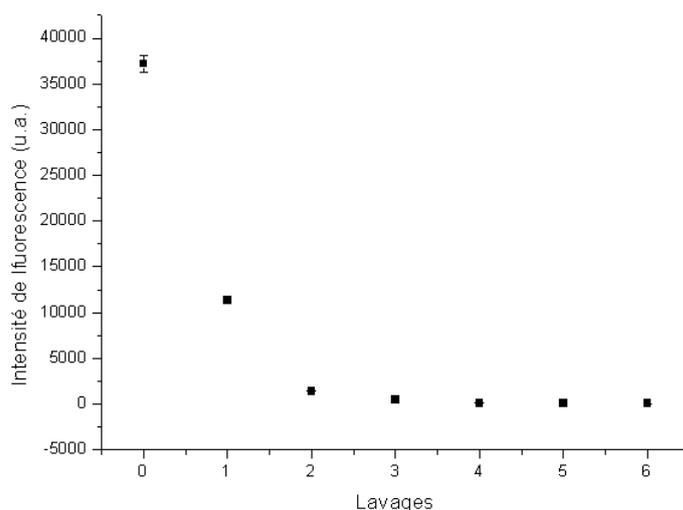


Figure 3.5 : Evolution de l'intensité de fluorescence du surnageant au cours des lavages.

L'incorporation d'insuline et le suivi de sa libération nécessitent la synthèse de microgels « sur mesure ». Nous souhaitons en particulier comprendre le rôle de la composition du microgel, mais aussi de sa structure. Ainsi, nous synthétisons les analogues des microgels précédents avec une taille plus grande. Pour cela, la polymérisation a lieu en absence de tensioactif. De plus, pour distinguer les microgels de l'insuline-FITC par fluorescence, nous avons choisi de marquer certains microgels par de la rhodamine B. Pour cela, nous nous sommes procurés un monomère rhodaminé, le methacryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B, qui sera copolymérisé à hauteur de 0,1% mol avec les autres monomères lors de la synthèse des particules (Figure 3.6). Un autre microgel nécessitera l'introduction de FITC.

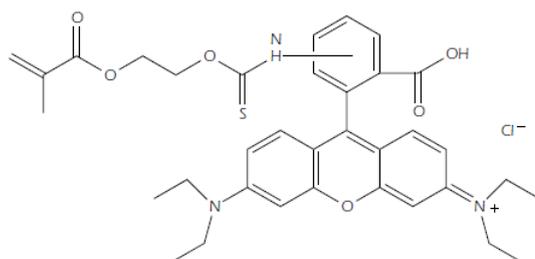


Figure 3.6 : Structure du monomère de methacryloxyethylthiocarbamoyl rhodamine B.

Le tableau 3.1 récapitule les caractéristiques des nouveaux objets synthétisés.

Tableau 3.1 : Caractéristiques de microgels de compositions variées

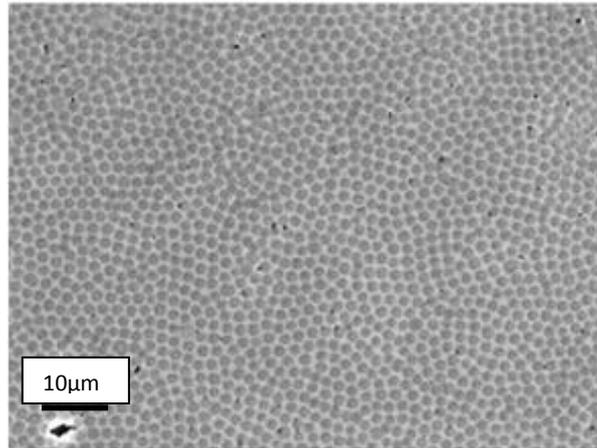
Nom	Monomère alkylacrylamide	Réticulant (% mol)	Récepteur au glucose (% mol)	bore %mol. <sup>a</sup>	Polymère soluble (% mt.) <sup>b</sup>	$d_H$ (nm) T=15°C pH 7,4 (PDI)	$d_H$ (nm) T>VPTT pH 7,4 (PDI)
<b>NmBPBA10</b>	NIPMAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (10%)	8,1	51	502 (0,023)	251 (0,117)
<b>NmBPBA10 Sans SDS</b>	NIPMAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (10%)	7,8	52	755 (0,068)	393 (0,07)
<b>NmBPBA10 RITC Sans SDS</b>	NIPMAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (10%)	6,4	34	1190 (0,092)	590 (0,107)
<b>NMPBA10 FITC Sans SDS</b>	NIPMAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (10%)	7,2	14	711 (0,041)	327 (0,193)
<b>NeEPBA10</b>	NEMAM	EGDMA (10%)	DDOPBA (10%)	7,6	49	410 (0,017)	234 (0,167)
<b>NeEPBA10 RITC</b>	NEMAM	EGDMA (10%)	DDOPBA (10%)	7,5	47	395 (0,048)	242 (0,073)
<b>NeEPBA10 RITC Sans SDS</b>	NEMAM	EGDMA (10%)	DDOPBA (10%)	5,7	51	860 (0,108)	337 (0,269)
<b>NmEPBA10 RITC Sans SDS</b>	NIPMAM	EGDMA (10%)	DDOPBA (10%)	8,3	32	460 (0,108)	289 (0,060)

a : Taux de Bore dans le microgel, mesuré par analyse élémentaire.

b : Taux de polymère soluble, obtenu après ultracentrifugation (50 000 rpm, 30 min).

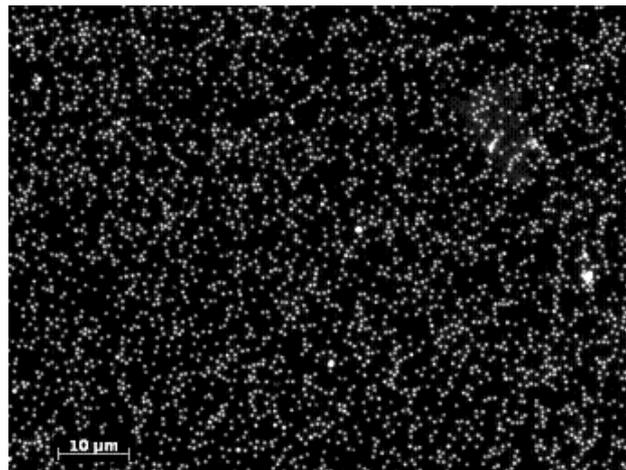
Pour les microgels synthétisés sans SDS, les tailles observées sont plus grandes mais leur répartition est toujours aussi étroite. L'introduction d'une très petite quantité de monomère fluorophore ne change pas les caractéristiques des microgels, sauf curieusement pour les compositions contenant du NIPMAM et de la RITC qui sont plus grosses. Pour tous, la sensibilité au glucose est conservée.

L'avantage pratique de microgel plus gros ne se limite pas à améliorer l'efficacité de la centrifugation. Il permet l'observation en microscopie optique (Figure 3.7 et 3.8), dont l'avantage est de pouvoir visualiser les microgels dans leur état hydraté, contrairement aux techniques de microscopie électronique où les microgels sont dans un état sec.



*Figure 3.7 : Cliché de microscopie optique en contraste de phase, objectif x100  
Microgel NIPMAM, BIS, DDOPBA sans SDS.*

En ce qui concerne les microgels marqués à la rhodamine, l'incorporation du monomère est vérifiée car l'observation en microscopie d'épifluorescence devient possible (Figure 3.8) et ne perturbe en rien la structure ou la réponse au glucose des microgels.



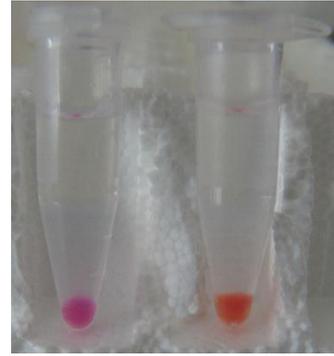
*Figure 3.8 : Image de microscopie épifluorescente - Excitation 450-490 nm ; Emission 515 nm.  
Microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA sans SDS marqué.*

### *I.3 : Résultats*

#### *I.3.1 : Résultats qualitatifs*

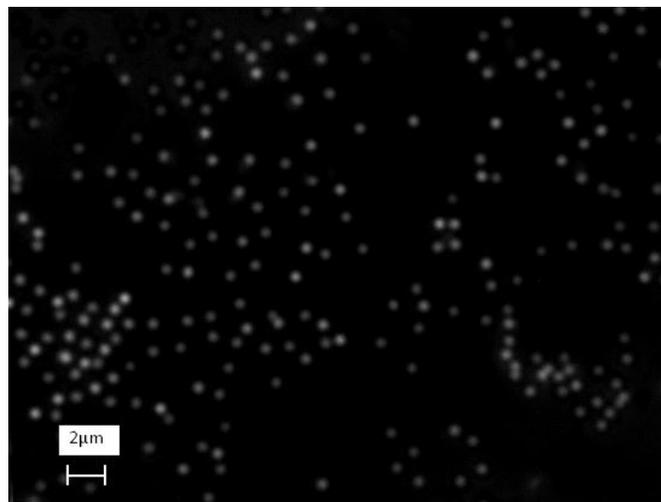
Comme nous l'avons présenté au dernier paragraphe, l'incorporation de l'insuline dans les microgels est réalisée à l'état gonflé c'est à dire à froid. Le processus d'encapsulation est ensuite « bloqué » par augmentation de la température pour conduire le microgel dans un état de gonflement où il est plus contracté (C) et où son réseau est moins perméable. De cette façon, l'insuline a moins de chance de diffuser car le réseau est moins perméable.

De manière visuelle, nous pouvons vérifier l'encapsulation d'insuline dans le réseau des microgels. Ci-dessous le microgel (marqué par de la rhodamine) passe de la couleur rose quand il est plein d'eau, à la couleur orange quand il encapsule l'insuline-FITC, qui est jaune (Figure 3.9).



*Figure 3.9 : Photographie de microgels concentrés avant et après incubation d'insuline FITC.*

Enfin de manière microscopique, le succès de l'encapsulation de l'insuline FITC peut aussi être observé par microscopie optique dans la mesure où les microgels sont assez gros (Figure 3.10)



*Figure 3.10 : Image de microscopie épi fluorescente de microgels - Excitation 450-490 nm ; Emission 515 nm. Microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA sans SDS non marqués, incubés par de l'insuline-FITC.*

En lumière fluorescente, les microgels de ce type ne sont pas visibles. Les clichés d'épifluorescence ci-dessus (Figure 3.10) présentent des microgels non marqués mais incubés par de l'insuline FITC et lavés. Nous remarquons que les microgels sont fluorescents et que cette fluorescence ne peut venir que de l'insuline FITC qui se trouve localisée dans les microgels, soulignant l'efficacité de l'encapsulation et de l'étape de lavage.

### *1.3.2 : Résultats quantitatifs*

Pour évaluer de manière quantitative le taux d'incorporation de l'insuline FITC dans les microgels, nous avons défini le protocole suivant :

Après l'étape d'incorporation de l'insuline, les microgels chargés sont alors dilués dans 1mL de tampon phosphate et l'intensité de l'émission de l'insuline FITC est mesurée par spectroscopie de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation de 492nm pour quantifier la quantité d'insuline dans les microgels.

Dans le cas de microgels marqués par la RITC, une mesure complémentaire de la longueur d'onde d'émission à 580nm est réalisée à une longueur d'onde d'excitation de 540nm pour mesurer la fluorescence de la Rhodamine. La quantité de microgels est alors calculée en utilisant une courbe de calibration de l'intensité de fluorescence de la rhodamine en fonction de la concentration en microgel. Cette deuxième valeur est essentielle car il n'est pas sûr que les 3mg de microgels soient dosés après les lavages répétés. Chaque microgel donne lieu à une courbe de calibration spécifique.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Caractérisations des microgels en termes de composition, de taux de gonflement  $\left(\frac{d_H}{d_0}\right)^3$  et d'insuline encapsulée

Gel						Insuline encapsulée après incubation à 0,1 mg/mL	Insuline encapsulée après incubation à 1 mg/mL
Monomère alkylacrylamide	Réticulant	DDOPBA %mol.	SDS	RITC %mol.	$\left(\frac{d_H}{d_0}\right)^3$ <sup>a</sup>	Insuline par qté de microgel sec (mg/g)	Insuline par qté de microgel sec (mg/g)
NIPAM	BIS	0%	oui	-	12,4	4,3	-
NIPMAM	BIS	10%	oui	-	8	1,1	-
NIPMAM	BIS	10%	-	-	7,1	0,9	-
NIPMAM	BIS	10%	-	0,1%	8,2	0,8	4,7
NIPMAM	EGDMA	10%	-	0,1%	4	0,7	5,5
NEMAM	EGDMA	10%	oui	0,1%	4,3	1,1	2,4
NEMAM	EGDMA	10%	-	0,1%	16,6	0,6	2,1

<sup>a</sup>  $d_H$  = diamètre hydrodynamique à 15°C ;  $d_0$  = diamètre hydrodynamique à l'état contracté ( $T > VPTT$ ).

Quand les microgels sont incubés avec une solution de 0,1 mg/mL, la quantité totale d'insuline que l'on peut récupérer dans les microgels fonctionnalisés par du DDOPBA varie de 0,6 à 1,1 mg par gramme de microgel. Dans le cas d'une incubation par une solution d'insuline FITC de concentration égale à 1mg/mL, les quantités encapsulées varient 2,1 à 5,5 mg par gramme de gel selon la composition du microgel. Ainsi, il est possible d'augmenter la quantité d'insuline encapsulée en jouant simplement sur la concentration de la solution mère. Cependant, nous ne retrouvons pas tout à fait le même facteur de concentration.

Au vu de ce tableau, il est tout d'abord frappant de constater que les microgels non fonctionnalisés au DDOPBA encapsulent plus d'insuline que ceux que nous avons conçus. Il existe un facteur 4 entre les deux. Ceci peut être expliqué en partie par la différence de taux de gonflement observé entre les deux types de microgels. Alors que les microgels de pNIPAM ont un taux de gonflement de l'ordre de 12 quand ils sont dans leur état gonflé à 4°C (Figure 2.14 du chapitre II), ceux fonctionnalisés par le DDOPBA ont un taux de gonflement de l'ordre de 8 pour le pNIPMAM-co-DDOPBA et de l'ordre de 5 pour les formules plus réticulées avec l'EGDMA, qu'elles soient à base de NIPMAM ou de NEMAM. De plus, les microgels fonctionnalisés au DDOPBA comportent certaines charges négatives liés à l'ionisation de ce groupe à ce pH, ce qui ne favorise pas l'encapsulation d'insuline, de charge identique à ce pH. De manière analogue, nous constatons que les compositions au NIPMAM encapsulent plus d'insuline qu'une composition au NEMAM et ce, quel que soit leur taux de gonflement. Il semblerait donc que la structure des microgels soit également un facteur déterminant pour améliorer leur encapsulation.

Il apparait aussi que les microgels plus petits (synthétisés en présence de tensioactifs) encapsulent plus d'insuline que leurs homologues de même composition chimique. Nous pouvons proposer deux hypothèses pour cela :

- soit l'immobilisation de l'insuline est une pure adsorption, donc un phénomène de surface et le phénomène est logique car la surface est plus grande pour des microgels plus petits,
- soit il s'agit bien d'une immobilisation dans le réseau et on peut expliquer cette différence d'encapsulation par la différence de structure des microgels en absence et en présence de tensioactif.

En effet, comme nous l'avons souligné au chapitre I, les structures des microgels synthétisés en présence de tensioactif sont plus homogènes que celles des gros microgels, notamment en ce qui concerne la répartition du réticulant. Ainsi, on pourrait comprendre que la présence

d'une forte quantité de réticulant au cœur des gros microgels bloque la diffusion de l'insuline. De manière générale, les faibles taux d'encapsulation peuvent surprendre. Cependant notre méthode d'encapsulation est loin d'être optimisée. En effet nous pouvons supposer que nos microgels occupent seulement 10% du volume de la solution d'incubation, ils ne peuvent donc encapsuler que 10  $\mu\text{g}$  environ. C'est typiquement ce qu'on obtient pour les microgels de pNIPAM non fonctionnalisés. Ceci correspond aux valeurs données dans la littérature<sup>187</sup>. Sur les 10% effectifs, il apparaît que seulement 25% en moyenne sont finalement incorporés dans nos microgels. Nous avons donc décidé d'optimiser l'incorporation d'insuline en diminuant le volume de la solution d'incubation. Nous avons testé ce procédé sur notre microgel de NEMAM, EGDMA, DDOPBA, SDS, RITC. La solution d'incubation a été diminuée à 40  $\mu\text{L}$  de concentration d'insuline à 1 mg/mL. Les résultats font état d'un taux d'encapsulation proche de 60% pour un taux d'encapsulation final de 7,7 mg d'insuline par g de gel.

## II : Etude de la libération d'insuline-FITC

Maintenant que nous avons mis en évidence l'incorporation d'insuline dans le réseau des microgels, nous allons pouvoir étudier la libération de l'insuline dans des milieux de concentrations connues en glucose. Afin de pouvoir doser l'insuline libérée dans le milieu extérieur au microgel par spectroscopie de fluorescence, il est nécessaire de séparer les microgels du milieu environnant, si nous voulons éviter de mesurer le signal provenant simultanément du milieu et des microgels.

Plusieurs méthodes peuvent être envisagées. Nous désirons trouver celle qui nous apportera des informations quantitatives sur des temps courts. En effet, nous cherchons à déterminer la quantité d'insuline libérée par unité de masse de microgels et par unité de temps. De plus, la réponse cinétique sur des temps courts (de l'ordre de la minute) va nous permettre de sonder la réaction potentielle des microgels *in vivo* en réponse aux variations glycémiques.

Initialement, la méthode proposée et testée avant le début de la thèse a consisté à immobiliser les particules sur un substrat puis à suivre la libération d'insuline dans le milieu extérieur. Cette technique avait pour avantage de maintenir les microgels au contact de la solution, tout en ayant la possibilité de mesurer le signal optique *in situ*, car les microgels immobilisés étaient maintenus en dehors du trajet optique dans la cuve de spectroscopie (Figure 3.11). Cette technique a été testée sur des films de microgels constitués de multicouches de microgels autoassemblées par l'incorporation de polycation comme la poly(allylamine)

hydrochloride (PAH). La libération d'insuline a été suivie dans le temps, en fonction de la température et de la concentration de glucose. Cependant, les résultats obtenus laissent penser que la présence de PAH perturbe le comportement des microgels. En effet, il a été montré que l'adsorption de polymères cationiques sur des microgels anioniques ne se fait pas seulement en surface mais les PAH sont aussi capables de pénétrer dans le microgel, en modifiant ainsi la composition chimique<sup>227</sup>. Nous verrons ultérieurement dans le chapitre V que la présence d'amine dans la matrice modifie considérablement son comportement. Ainsi, la voie multicouches de microgels semble être compromise dans la mesure où un agent d'assemblage est ajouté qui peut perturber le comportement de gonflement des microgels au glucose. Il pourrait être intéressant de sonder une monocouche de microgels, présentant une interface libre avec le solvant. Dans ce cas, les interactions avec un tiers composant sont limitées mais le signal détecté sera très faible car la quantité d'insuline encapsulée dans une monocouche sera infime. En présence de multicouches, le signal est déjà bruité. Finalement, étant donné la complexité de bâtir des multicouches et la difficulté de pouvoir quantifier correctement le signal, nous avons choisi de mettre en place de nouvelles méthodes.

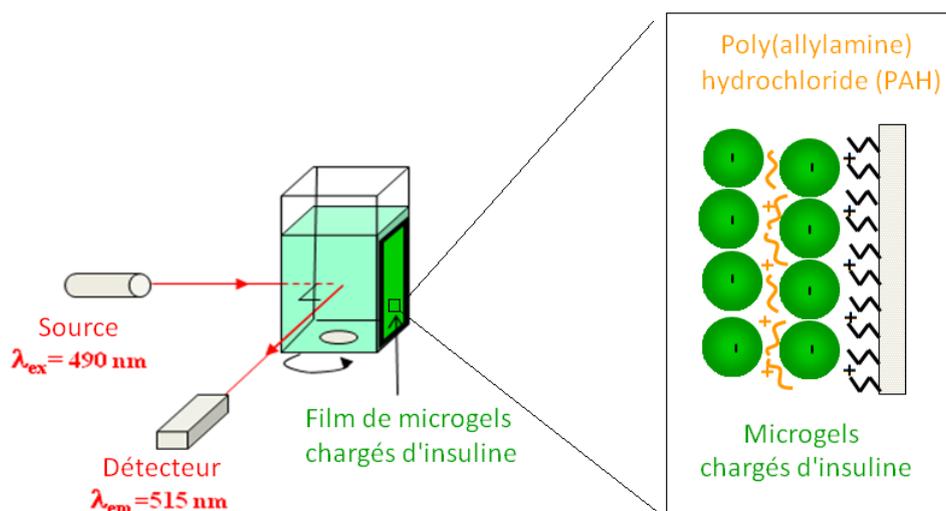


Figure 3.11 : Schématisation de l'étude de libération d'insuline-FITC par fluorescence utilisant des microgels assemblés sous forme de films multicouches.

Nos critères de choix pour les méthodes ont été les suivants :

- analyse quantitative de la quantité d'insuline libérée par unité de masse de polymère,
- suivi spectroscopique de l'insuline libérée sur des temps courts (inférieur à 5 minutes).

Les méthodes habituellement utilisées pour étudier la libération d'un actif d'une suspension, de capsules ou de liposomes par exemple, ont souvent recours à une étape de centrifugation

ou de filtration de la phase dispersée pour mesurer la quantité d'agents libérés dans la phase continue. Dans le cas des microgels, peu de méthodes existent. La filtration ne peut être adoptée car les microgels sont des objets très mous qui pourraient passer à travers les pores sous l'effet d'une pression <sup>228</sup>. La centrifugation a déjà été mise en œuvre <sup>198</sup> mais elle ne donne pas accès aux temps courts. En effet, les microgels sont des objets non seulement mous mais peu contrastés en terme de masse volumique par rapport à l'eau. Ainsi, pour les tailles considérées, les vitesses de centrifugation sont élevées, de même que le temps de centrifugation. Cette méthode ne permettra pas d'accéder aux temps courts. Néanmoins, elle va nous servir de référence.

La deuxième méthode envisagée consiste à isoler les microgels en suspension dans un compartiment séparé par une membrane du milieu de prélèvement. Cette méthode permet de sonder les microgels à l'état dispersé, sans que ceux-ci ne soient manipulés lors d'une étape de centrifugation.

La troisième méthode vise à faire une analyse de l'insuline fluorescente contenue à l'intérieur des microgels. Pour ce faire, il est envisagé d'utiliser la cytométrie de flux pour suivre la fluorescence provenant des microgels eux-mêmes.

Dans un premier temps, afin de vérifier l'aspect sensible au glucose des microgels, nous avons utilisé une méthode préliminaire répondant aux critères mentionnés ci-dessus et permettant d'obtenir des informations semi-quantitatives sur la libération de l'insuline. Dans cette méthode, nous analysons la cinétique de libération de l'insuline à partir d'une pâte concentrée de microgels (Figure 3.12). Cette méthode ne permet pas de sonder les caractéristiques de libération de microgels individuels mais d'un ensemble de microgels.

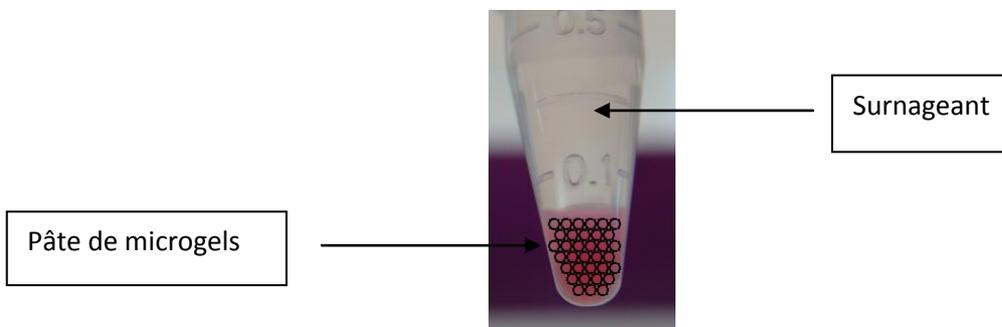


Figure 3.12 : Photographie et schéma de microgels concentrés réunis sous forme de pâte.

### *II.1 : Libération d'insuline à partir d'une pâte de microgels*

Cette méthode, peu conventionnelle, a été adoptée en raison de sa simplicité de mise en œuvre. Elle part du constat expérimental que les microgels, une fois centrifugés et rassemblés en pâte, restent concentrés et ne se redispersent pas spontanément. Cette caractéristique peut être expliquée par la présence de groupements hydrophobes dans les microgels. Toutefois, afin de vérifier la validité de cette technique, il est nécessaire de doser la quantité de microgels qui se redisperse dans le milieu. Pour cela, nous avons fonctionnalisé les microgels à l'aide de marqueurs fluorescents, rhodaminés cette fois. Nous pouvons ainsi doser simultanément, à deux longueurs d'onde différentes, la quantité de fluorescence liée à la présence d'insuline-FITC et celle liée aux microgels qui se détachent de la pâte et qui peuvent ainsi être dosés. La corrélation entre les deux signaux est ensuite analysée pour savoir si l'insuline libérée dans le milieu est libre ou encapsulée dans les microgels dispersés.

#### *II.1.1 : Protocole expérimental*

Après les procédés d'encapsulation d'insuline à froid (état B), les microgels sont centrifugés et lavés à température ambiante (état C). A ce stade les microgels sont concentrés en pâte dans le culot (3 mg représentant environ 50 à 100  $\mu\text{L}$ ). Le surnageant est enlevé et remplacé par 1mL du milieu d'incubation, dans lequel des prélèvements seront effectués au cours du temps afin de mesurer la fluorescence (état D). Ce milieu peut être soit une solution de tampon, soit une solution contenant du glucose. Le milieu est déposé de manière délicate sur le dessus du culot. Des aliquots (100  $\mu\text{L}$ ) sont prélevés au cours du temps et remplacés par le même volume de milieu. Les 100  $\mu\text{L}$  sont ensuite dilués dans 2,5 mL de tampon phosphate (pH=7,4 ; 2 mM) pour effectuer la mesure de fluorescence. L'intensité de la longueur d'onde d'émission de l'insuline FITC est mesurée à 518 nm sous une longueur d'onde d'excitation de 492 nm pour déterminer la quantité d'insuline libérée. La longueur d'onde d'émission de la Rhodamine à 580 nm peut aussi être éventuellement mesurée sous une longueur d'excitation de 540 nm pour vérifier l'absence de microgel dans le surnageant.

#### *II.1.2 : Résultats : libération d'insuline en présence de glucose*

Nos premières études de libération se sont concentrées sur l'analyse de la réponse d'un microgel de NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA, sensible au glucose à pH physiologique et à température ambiante. La libération de l'insuline a été étudiée au cours de l'alternance entre un environnement sans glucose et un autre avec une concentration de 100 mM en glucose.

De manière à prouver que notre protocole expérimental est valide, nous avons étudié les variations de concentration en rhodamine en fonction du temps et de la concentration en glucose. Le taux de rhodamine renseigne sur la présence de microgels dans le surnageant. Si des microgels sont effectivement présents dans le surnageant, l'insuline qui se trouve dans leurs réseaux est dosée au même titre que l'insuline libre. Aussi nous ne sommes plus en mesure de connaître la proportion d'insuline effectivement libérée. Nous avons donc corrélié la cinétique de libération de l'insuline à celle des microgels qui se détachent.

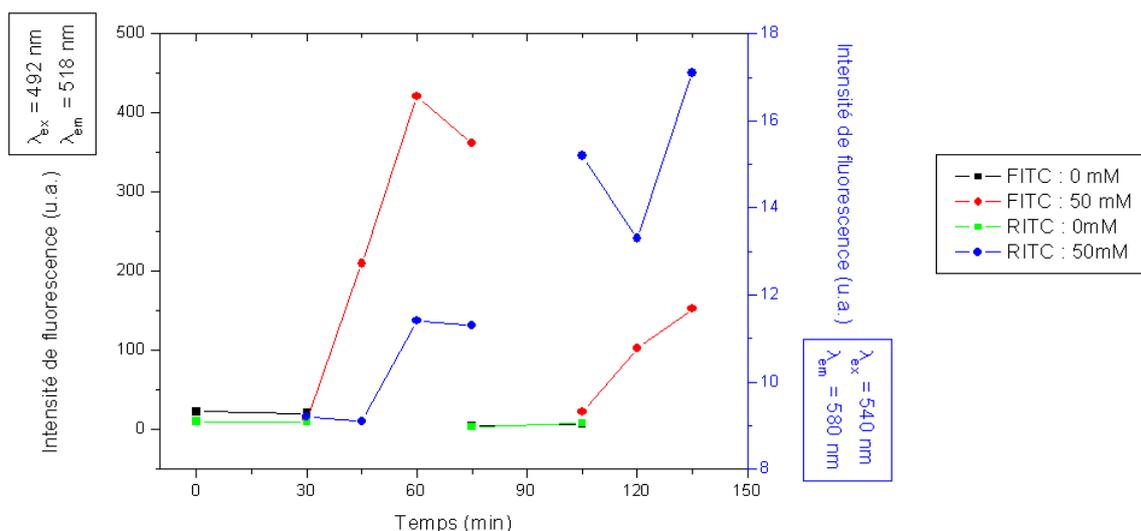


Figure 3.13 : Cinétique de libération de l'insuline-FITC à partir d'une pâte de microgels de NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%) et mesure simultanée de la rhodamine dosée dans le surnageant. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=25°C.

Au-delà des considérations de libération d'insuline en fonction de la concentration en glucose pour lesquelles nous détaillerons après les principales caractéristiques, nous remarquons que l'intensité de fluorescence qui traduit la présence de rhodamine est très faible (< 20 u.a.) pour l'ensemble des formulations testées ci après. Dans le plus défavorable des cas, c'est-à-dire, un microgel dont le taux d'incorporation de rhodamine serait le plus faible, ce signal correspondrait à la présence de 1,1 µg de gel soit moins de 1‰ en rapport des 3mg sondés. Ces signaux sont confondus avec le bruit de fond des études de fluorescence et ne peuvent traduire la présence de microgels libres qu'à l'état de trace.

Maintenant que notre méthode expérimentale a été validée, nous pouvons nous concentrer sur l'étude de la libération d'insuline en fonction de la concentration en glucose.

Ci-dessous, nous pouvons observer (Figure 3.14) qu'en absence de glucose, la quantité d'insuline libérée est très faible (de l'ordre de quelques µg). En présence de glucose, la quantité d'insuline libérée atteint près de 70 µg en 30 minutes au cours du premier cycle.

L'alternance a été poursuivie sur 5 cycles soulignant l'alternance de libération ou non de l'insuline. Au fur et à mesure de la cinétique, la réponse à la présence de glucose est plus faible ce qui peut être expliqué par le fait que la concentration à l'intérieur des microgels diminue progressivement. De plus, compte tenu de notre dispositif expérimental, la libération d'insuline à partir du culot met en jeu la diffusion à travers toute l'épaisseur de la pâte de microgel. Ainsi, il est logique que les cinétiques soient plus rapides au départ car la libération provient des couches de microgels les plus proches de l'interface avec le milieu sondé. Au cours du temps, le contenu de ces microgels diminue et l'insuline restante peut être drainée à partir des couches plus profondes de microgels, ce qui ralentit ainsi la cinétique.

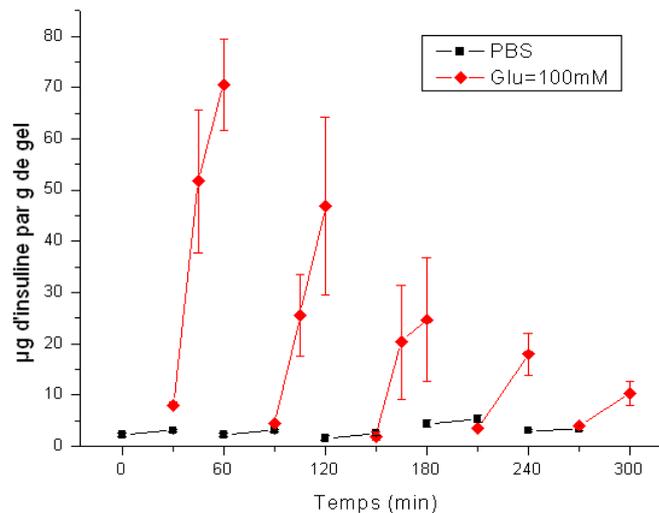


Figure 3.14 : Cinétique de libération d'un gel NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%).  
Solution d'incubation à 0,1mg/mL, Tampon phosphate (2 mM, pH = 7,4), T=25°C.

Pour mettre en évidence l'influence de la concentration de la solution d'incubation d'insuline FITC, nous avons étudié la libération de microgels incubés par une solution de concentration égale à 1mg/mL (Figure 3.15). Nous avons en effet mis en évidence (Tableau 3.2) que lorsque la concentration en insuline de la solution d'incubation était plus importante d'un facteur 10, le taux d'encapsulation était meilleur (x 5 en moyenne). Là encore, le comportement d'alternance de libération en fonction de la concentration est conservé. En outre, la diminution de la libération au cours du temps est moins marquée, du fait de la plus grande concentration incubée en insuline.

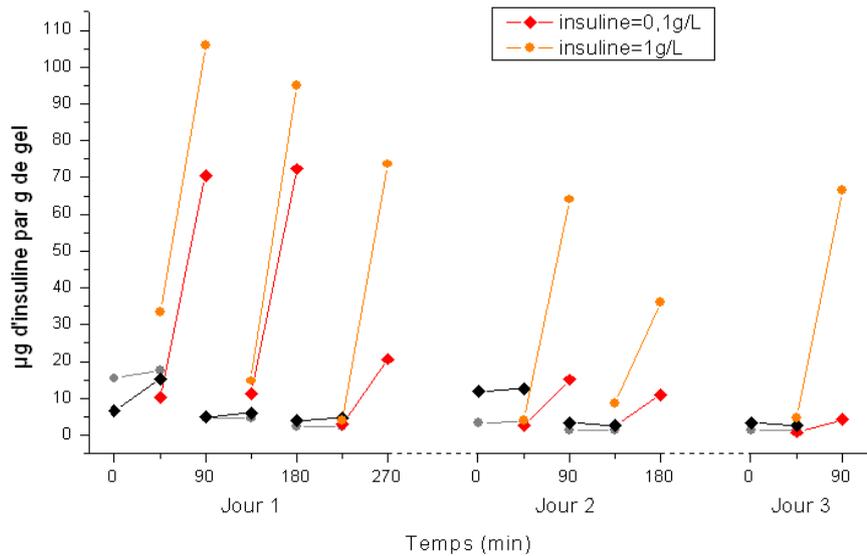


Figure 3.15 : Cinétique de libération d'un gel NIPMAM, BIS, DDOFBA (10%).

Solution d'incubation à 1 ou 0,1mg/mL, Tampon phosphate (2 mM, pH = 7,4), T=25°C.

Il a donc été possible d'étudier la cinétique de libération sur trois jours en laissant pour la nuit la cinétique se poursuivre dans un milieu sans glucose. La courbe de la figure 3.16 présente la quantité cumulée d'insuline libérée au cours du temps réel (la libération entre les cycles est prise en compte). La libération est quasiment stoppée au bout d'une journée et demie pour les microgels les moins chargés en insuline, tandis qu'elle continue d'évoluer au cours du 3eme jour pour ceux en contenant le plus. La courbe cumulée met néanmoins en évidence le fait que la libération est stoppée pour des quantités ne correspondant qu'à 50% du chargement en insuline estimé. Durant la nuit, une libération est cependant observée (de l'ordre de 50 µg par nuit soit moins de 1% de l'insuline initialement encapsulée), mais cette observation ne constitue pas une barrière à un fonctionnement en conditions physiologiques dans la mesure où, la nuit, le patient a besoin d'un taux basal d'insuline. On pourrait imaginer qu'un même analogue de l'insuline encapsulé joue le rôle d'analogue lent et rapide, selon son temps d'action déterminé par le microgel.

### Chapitre III : Application à la délivrance d'insuline

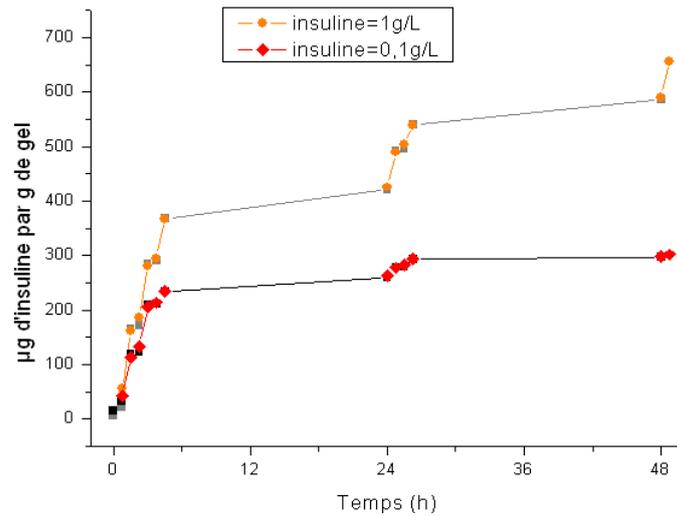


Figure 3.16 : Cinétique de libération d'un gel NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%).  
Solution d'incubation à 1 ou 0,1mg/mL, Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=25°C.

De façon à vérifier que le concept de délivrance observé à 25°C pouvait être transposé dans les conditions de température physiologiques, nous avons étudié la réponse d'un microgel de NEMAM (Figure 3.17). Ce matériau a été soumis à une alternance de milieu pauvre ou riche en glucose (respectivement 0mM ou 100mM) à 37°C dans un tampon phosphate (2mM, pH=7,4). D'un point de vue expérimental, le maintien de la température dans les conditions physiologiques a été possible en positionnant les microgels dans une étuve. Les étapes de lavage, bien que réalisées en dehors de l'étude, ne prenaient pas plus de quelques minutes et afin de ne pas créer de choc thermique, les milieux pauvres et riches en glucose étaient eux aussi maintenus à 37°C.

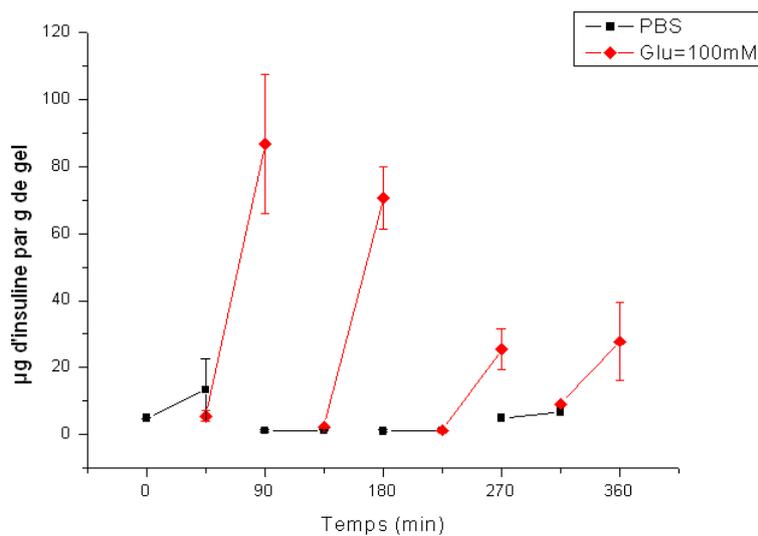


Figure 3.17 : Cinétique de libération d'un gel NEMAM EGDMA DDOPBA (10%).  
Solution d'incubation à 0,1mg/mL, Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=37°C.

La principale différence avec les courbes précédemment présentées réside sur le fait que la libération sans glucose est un peu plus importante pour le premier cycle que pour ceux des formules au NIPMAM. Cette libération peut être expliquée par le fait que le microgel à base de NEMAM est dans un état relativement gonflé à 37°C dans la mesure où sa VPTT est proche de 60°C (Figure 2.22). Ainsi, étant plus gonflé, le microgel retiendrait moins l'insuline en absence de glucose. Cependant le comportement général de libération est conservé. La libération épouse l'alternance des milieux dans lesquels est présent ou non le glucose. Ce comportement est aussi valable à salinité physiologique même si nous ne montrons pas la courbe.

### *II.1.3 : Résultats : dépendance de la concentration au glucose*

Si la libération selon un mode « on-off » est bien observée et utile pour répondre au besoin des patients diabétiques, il ne faut pas tomber dans l'excès inverse d'une trop grande libération d'insuline. Cet excès serait en effet source de complication pour le patient qui rencontrerait alors des épisodes d'hypoglycémie.

Nous avons donc étudié la réponse de nos microgels en fonction de la concentration de glucose, dans un domaine bien plus proche du domaine physiopathologique du diabète (0 à 20mM). L'objet de cette étude consiste à démontrer les capacités du microgel à libérer de l'insuline de manière modulée en fonction de la concentration en glucose.

Le début de l'étude est mené de manière similaire aux études précédentes. Pendant les trente premières minutes, les microgels sont étudiés dans une solution dont la concentration en glucose est nulle. Passé ce délai, le milieu est remplacé par des solutions dont la concentration en glucose varie entre 5 et 20 mM (Figure 3.18) et le niveau de fluorescence du surnageant est régulièrement relevé.

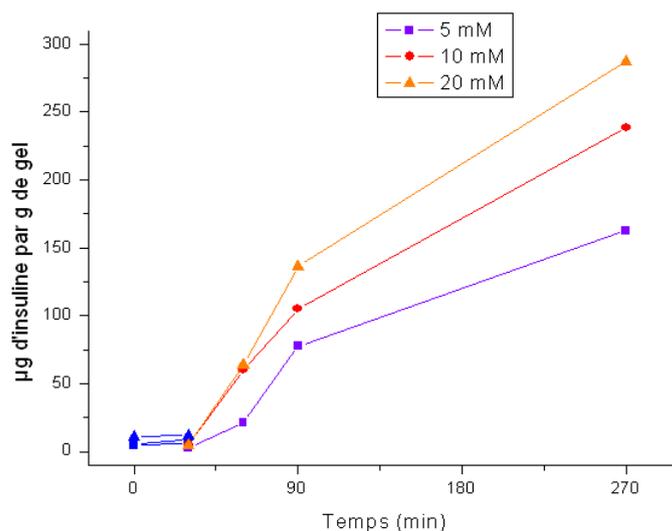


Figure 3.18 : Cinétique de libération d'un gel NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%).  
Solution d'incubation à 0,1mg/mL, Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=25°C.

Lors de l'ajout de glucose, la libération d'insuline est déclenchée. Cette libération est plus importante lorsque la concentration en glucose dans le milieu est plus importante aussi. La modulation de la réponse répond à la concentration en glucose du milieu. Notons que pour sonder des écarts significatifs, les temps d'analyse ont été allongés. En effet, sur des temps courts, les quantités d'insuline libérées étant faibles, les écarts de comportement étaient du même ordre de grandeur que la barre d'erreur.

Dans le même esprit, nous avons alors étudié une formulation au NEMAM qui nous permet d'étudier le comportement de modularité des microgels dans les conditions de températures physiologiques. (Figure 3.19)

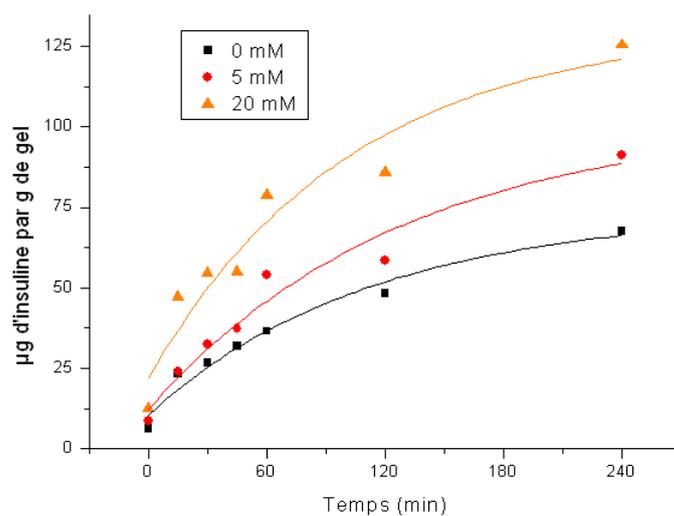


Figure 3.19 : Cinétique de libération d'un gel NEMAM, EGDMA, DDOPBA (10%).  
Solution d'incubation à 0,1 mg/mL, Tampon PBS, T=37°C.

Là encore, le comportement est conservé. La quantité d'insuline libérée est modulée selon la concentration en glucose. Cependant, comme nous l'avons évoqué lors de l'étude de libération par alternance, une quantité non négligeable d'insuline est libérée en absence de glucose du fait que l'étude est menée à une température très inférieure à la VPTT (Figure 2.22)

#### *II.2 : Libération d'insuline à partir de microgels dispersés*

Dans les études précédentes, nous avons mis en évidence les comportements de libération des microgels sous la forme d'une pâte. Bien que les résultats et les conditions expérimentales soient rigoureux, nous avons cherché à évaluer le comportement des microgels dans des conditions où l'ensemble des microgels serait dispersé. Il nous faut donc séparer physiquement ou temporairement les microgels du milieu de prélèvement. Différentes techniques ont été développées ou se sont offertes à nous. Nous détaillerons dans les paragraphes suivants ces nouvelles méthodologies ainsi que les résultats expérimentaux mis en évidence.

##### *II.2.1 : Dosage par retrait des microgels par centrifugation*

Une première piste pour améliorer les conditions expérimentales de notre étude a été de redisperser entre chaque mesure le culot puis de venir centrifuger l'échantillon (14000 rpm, pendant 15 minutes) au bout d'un temps désiré afin d'analyser le surnageant. 100  $\mu$ L du surnageant, dont la totalité sera remplacée, sont analysés. Pendant le laps de temps qui sépare deux analyses, le microgel est agité de manière modérée (puissance moyenne) sur un vortex.

De manière à étudier le comportement des microgels, nous avons d'abord opté pour des microgels synthétisés sans tensioactifs. Plus gros, l'efficacité des étapes de centrifugation sera meilleure. En effet le temps de centrifugation comme la vitesse, seront maintenus constants (15 min à 14000 rpm). Le microgel de NIPMAM, BIS, DDOPBA est soumis à trois concentrations en glucose. Les résultats sont tracés en taux cumulés (Figure 3.20). Nous retrouvons encore une fois une preuve de la sensibilité des nanogels à la concentration en glucose et de leur capacité à délivrer des doses d'insuline adaptée à la glycémie. En effet, les microgels libèrent d'autant plus d'insuline que la concentration en glucose est grande. Au bout de deux heures, la quantité libérée est très faible, un plateau est atteint au niveau des cinétiques. Le pourcentage d'insuline libérée par rapport à la quantité encapsulée n'a pas été

établi de manière précise car les taux d'encapsulation n'ont pas été mesurés systématiquement sur les mêmes microgels.

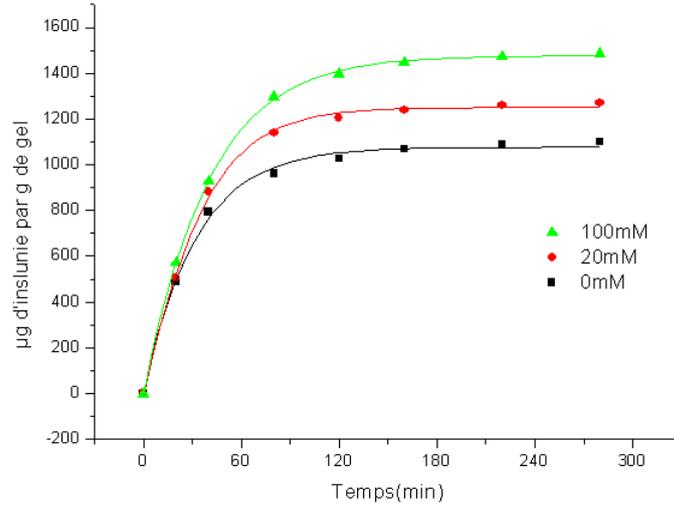


Figure 3.20 : Cinétique de libération d'un microgel de NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%) sans SDS en fonction de la concentration en glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=25°C.

Notre étude s'est ensuite portée sur les microgels de dimension plus petite pour comprendre l'influence de la taille sur la cinétique de libération (Figure 3.21) et l'influence de la température, en utilisant des microgels sensibles au glucose à 37°C (Figure 3.22).

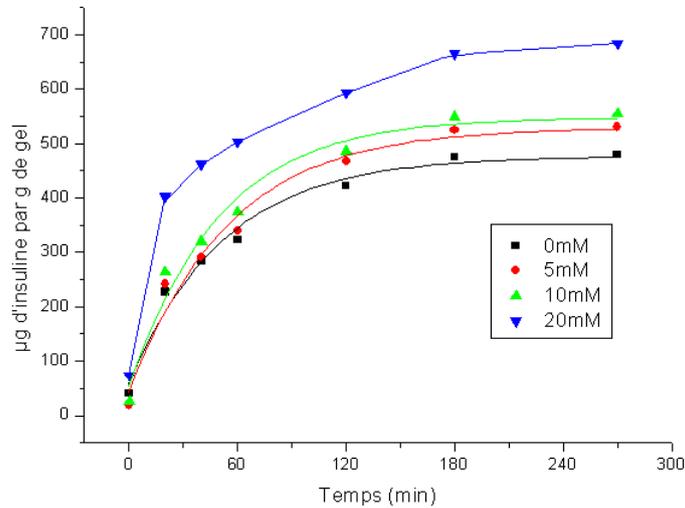


Figure 3.21 : Cinétique de libération d'un microgel de NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%) avec SDS en fonction de la concentration en glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=25°C.

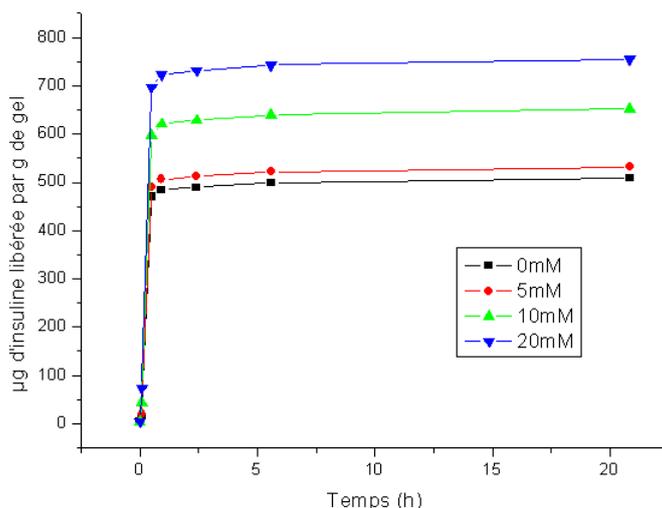


Figure 3.22 : Cinétique de libération d'un microgel de NEMAM, EGDMA, DDOPBA (10%) avec SDS en fonction de la concentration en glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=37°C.

Les allures de libération entre les deux microgels de tailles différentes sont comparables. La libération est moins rapide avec les petits microgels, pour lesquels le plateau n'est atteint qu'au bout de 3h. Les quantités libérées sont également plus faibles que pour les gros microgels, d'autant que l'encapsulation était meilleure. La libération ne semble pas totale (l'estimation à partir du tableau 3.2 donne un taux de 60% au maximum pour la plus forte concentration en glucose).

La comparaison du comportement en fonction de la température nous montre que les cinétiques sont beaucoup plus rapides lorsque la température augmente. La sensibilité au glucose continue de se manifester mais les microgels libèrent leur contenu sur des temps très courts (15 minutes). Dès le premier prélèvement, les microgels libèrent l'insuline de manière différenciée en fonction de la concentration en glucose. Pour les prélèvements suivants, l'insuline n'est plus libérée et une partie de l'insuline reste piégée dans les microgels. Le pourcentage d'insuline libérée varie entre 45 à 70% dans les conditions de l'étude.

Plusieurs questions se posent pour cette méthode : pourquoi autant d'insuline resterait piégée alors que les cinétiques de libération ne semblent plus évoluer ? La libération aux temps courts est sensible au glucose. Elle est donc sensible au gonflement des microgels, en rapport avec leur porosité. Il est difficile de comprendre pourquoi l'insuline ne diffuse pas hors des microgels jusqu'à ce que ceux-ci soient totalement vides.

Pour tenter d'expliquer ce phénomène, nous avons incriminé des artéfacts liés à la méthode d'investigation, pensant notamment que la centrifugation pouvait induire une compression des

microgels. Nous avons donc mesuré la quantité d'insuline libérée par un même microgel, incubé dans le même milieu, mais avec des temps de prélèvements différents (et donc de cycles de centrifugation différents). La quantité d'insuline libérée dépend intimement du nombre de mesures effectuées (Figure 3.23). Elle est d'autant plus grande que la fréquence des mesures est faible. La méthode induit donc des perturbations sur le signal. Nous avons donc mesuré le diamètre hydrodynamique des microgels au cours des cycles de centrifugation (Figure 3.24). Une nette diminution de la taille est observée au cours des cycles. Les cycles de centrifugation-redispersion ont donc un impact sur l'état des microgels. Sans pouvoir expliquer ce phénomène, nous constatons que les diamètres hydrodynamiques sont au départ très différents, puis leur taille s'uniformise au cours des cycles. Il semblerait que les microgels n'aient pas le temps de reprendre leur taille initiale entre deux mesures. Ce tassement des taux de gonflement pourrait expliquer que l'insuline n'est plus libérée après un certain nombre de cycles. Seuls les premiers points de mesure permettent de sonder une différence de libération liée à la différence de gonflement entre les états avec et sans glucose.

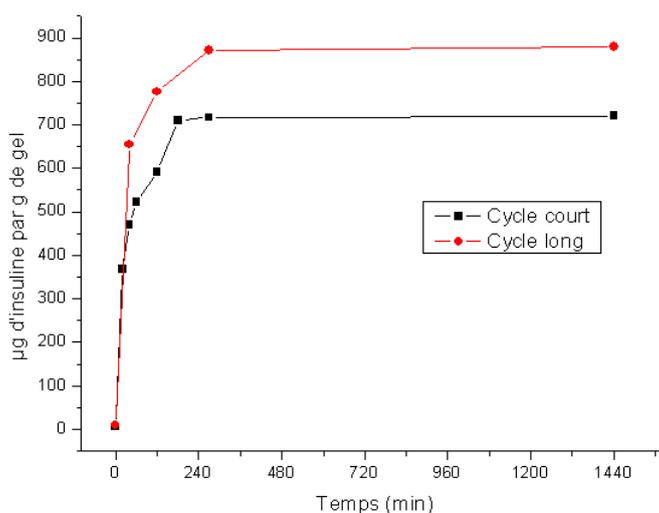


Figure 3.23 : Cinétique de libération d'un microgel de NIPMAM, BIS, DDOPBA avec SDS en fonction du nombre de cycles de centrifugations/redispersions.

Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4, [Glucose]=100 mM), T=25°C.

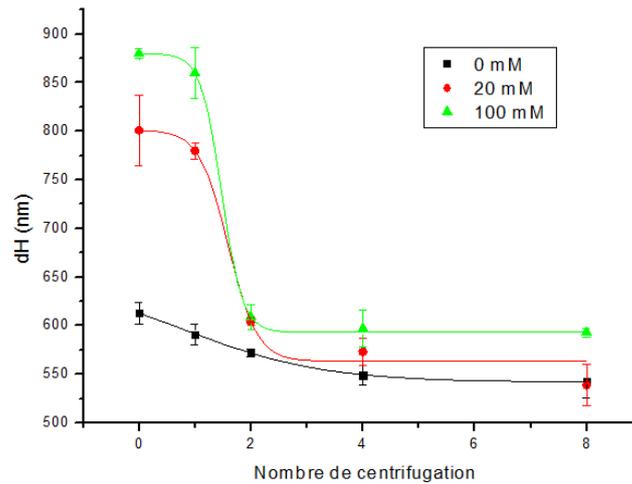


Figure 3.24 : Evolution du diamètre hydrodynamique d'un microgel de NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%) avec SDS en fonction du nombre de cycles centrifugations/redispersions. Les centrifugations durent 5 minutes, l'échantillon est ensuite agité 20 minutes. La mesure est faite juste avant la centrifugation suivante.

Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4),  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

Au final, la méthode de centrifugation-redispersion est une méthode qui nous a permis de confirmer la dépendance au glucose de la libération d'insuline. Cependant, cette méthode induit une modification de l'état de gonflement des microgels et ne permet pas de sonder leur cinétique.

### II.2.2 : Microgels dans une cellule de dialyse

Nous avons donc cherché à étudier les microgels dans leur état dispersé. De façon à séparer physiquement les microgels dispersés du milieu d'étude, nous avons cherché des dispositifs expérimentaux où les microgels seraient contenus dans une cellule de dialyse.

Le premier dispositif utilisé a été le système *QUIXSEP microdialyser*. Le schéma de principe de cette cellule de microdialyse est représenté ci-dessous (Figure 3.25) :

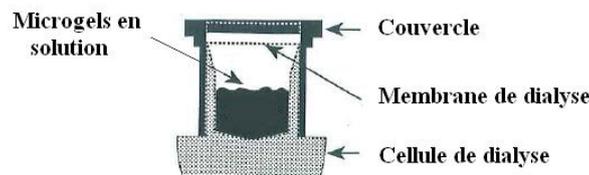


Figure 3.25 : Schéma d'une cellule de microdialyse *QUIXSEP*.

D'une contenance de 1 mL au maximum, la solution de microgel disposée en son centre est séparée du milieu d'analyse (10 mL de solution de concentration en glucose connue) par une

membrane de dialyse (MCWO 10000). Malheureusement, ce dispositif n'est pas assez étanche et une contamination du milieu extérieur par les microgels était visible de manière macroscopique. Malgré nos efforts, les différentes études ont toujours mis en évidence la faible étanchéité du système et l'impossibilité de mettre en évidence la sensibilité au glucose.

Nous avons alors étudié un autre système, toujours basé sur le principe de séparation de la solution de microgels et du milieu d'étude par l'intermédiaire d'une membrane. Nous avons alors essayé d'adapter un dispositif utilisé pour la centrifugation dont la caractéristique est de retenir des espèces dont le poids moléculaire serait supérieur à la limite de la membrane (Figure 3.26).

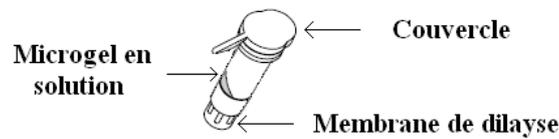


Figure 3.26 : Schématisation du dispositif adapté de MICROCON de MILLIPORE.

Nous avons adapté le dispositif suivant de la manière suivante : Le compartiment est chargé par 3mg de microgel incubés, lavés et redispersés dans 0,5 mL de tampon phosphate (2 mM, pH=7,4). Le compartiment est ensuite refermé et l'ensemble est placé dans un volume de 10mL de tampon phosphate physiologique de concentration en glucose connue. La libération d'insuline est suivie en prélevant le milieu extérieur où l'insuline d'un poids moléculaire de 5,8 kD, inférieure à la limite de coupure de la membrane (10 kD), est capable de diffuser à travers la membrane du dispositif.

Nous avons d'abord cherché à déterminer le comportement de libération des microgels. Pour cela nous avons soumis les microgels à un milieu sans glucose et un autre avec glucose (Figure 3.27). Cette fois-ci, nous n'avons pas réussi à distinguer la réponse en présence et en absence de glucose. Les deux réponses sont superposables. De surcroît, la quantité libérée au bout de 8 heures est inférieure à 10% du signal. Pour référence, on avait obtenu environ 50% du signal en 30 minutes avec la méthode de centrifugation. Nous pouvons donc conclure que l'introduction de la membrane freine le dosage de l'insuline, probablement à cause du temps de diffusion de l'insuline à travers la membrane.

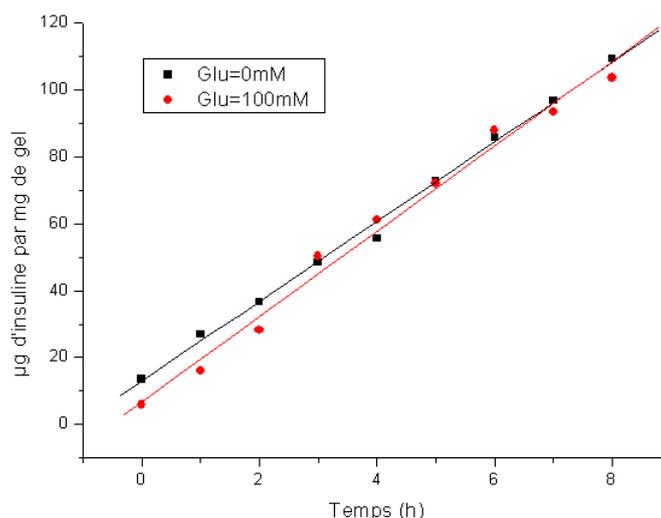


Figure 3.27 : Evolution de la quantité d'insuline libérée en fonction de la concentration en glucose. Microgel NIPAM, BIS, DDOPBA (10%), RhB, incubé dans une solution de 0,1 mg/mL d'insuline-FITC. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4) T=25°C.

Curieusement, cette méthode s'est révélée fructueuse sur des échantillons de microgels différents (cf chapitre IV, paragraphe I.3). Nous avons cherché à comprendre pourquoi et nous avons révélé deux autres cas pour lesquels il était possible de matérialiser l'influence d'un paramètre sur la cinétique de libération d'un hydrogel. Nous avons tout d'abord étudié la libération d'insuline à partir de microgels thermosensibles, de pNIPAM, afin de mettre en évidence l'influence de la température sur la libération (Figure 3.28). Les cinétiques étudiées à 40°C, i.e. au-dessus de la VPTT du microgel, montrent une libération nettement plus rapide qu'à température ambiante, pour laquelle le signal reste quasiment nul. Ce résultat est en accord avec les travaux de Lyon<sup>222, 226</sup>. Toutefois, les cinétiques doivent être suivies durant plusieurs heures pour obtenir ce genre d'information. Notons également que l'influence de la température sur la libération n'est pas forcément le résultat d'un changement du gonflement des microgels mais peut également être attribué à une accélération de la diffusion liée à l'agitation thermique.

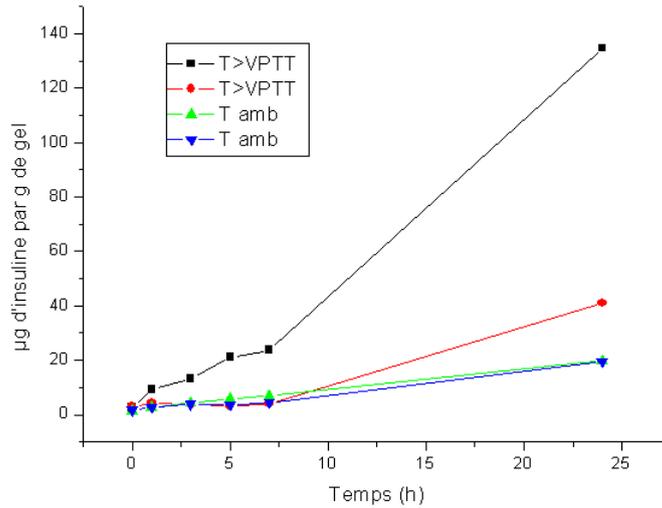


Figure 3.28 : Evolution de la quantité d'insuline libérée en fonction de la concentration en glucose.

Microgel NIPAM, BIS, incubé dans une solution de 0,1 mg/mL d'insuline-FITC.

Tampon phosphate (2 mM, pH=7.4).

Nous avons finalement étudié la situation d'un microgel sensible au glucose à une température supérieure à la température ambiante, avec et sans glucose. Nous nous sommes placés à 32°C, dans une configuration où la différence de gonflement en présence et en absence de glucose est peu marquée mais le microgel sans glucose est contracté (Figure 3.4). Cette étude cinétique montre que la libération est plus rapide en présence de glucose qu'en absence (Figure 3.29). Nous avons attribué ce résultat au fait qu'en absence de glucose, le microgel est très contracté et libère donc très peu d'insuline. Il est donc possible de distinguer son comportement de celui où il est légèrement gonflé par la présence de glucose.

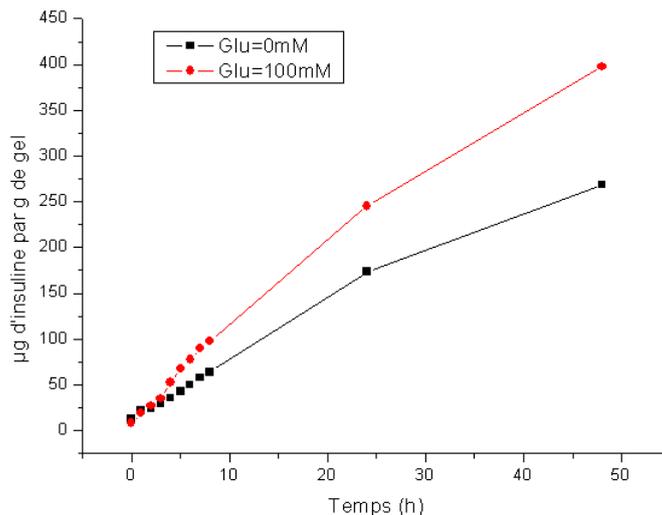


Figure 3.29 : Evolution de la quantité d'insuline libérée en fonction de la concentration en glucose.

Microgel NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%), RhB, incubé dans une solution de 0,1 mg/mL d'insuline-FITC. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4) T=32°C.

En conclusion sur cette méthode, les seules situations où elle s'est révélée pertinente concerne la comparaison de la libération pour des microgels très peu gonflés. Notre hypothèse est que la présence de la membrane ralentit significativement le dosage de l'insuline dans le compartiment qui ne contient pas les microgels. L'influence des microgels n'apparaît donc que lorsque l'insuline est libérée lentement, auquel cas la diffusion à travers la membrane n'est pas le processus limitant. Pour pallier le problème de diffusion à travers la membrane, nous avons donc eu recours à une membrane de pores plus gros, grâce à l'utilisation de puits de culture de type *Transwell* de la marque *Corning*. De manière schématique, ce dispositif se présente de la façon suivante (Figure 3.30):

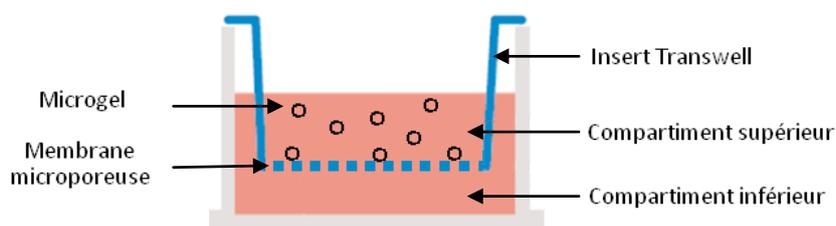


Figure 3.30 : Représentation schématique d'un puits de culture de type *Transwell*.

La taille de coupure de la membrane est donnée pour 400 nm. Cette dernière est donc perméable à l'insuline libérée par nos microgels les plus gros, c'est-à-dire ceux synthétisés sans tensioactifs dont la taille varie entre 600 nm et 800 nm (Figure 3.4).

Nous avons soumis une formulation de NIPMAM, BIS, 10%DDOPBA marquée par de la RITC à cette méthode expérimentale en présence d'un tampon phosphate sans glucose et d'un autre avec 100mM de glucose. Les microgels sous forme de solution sont disposés dans le compartiment supérieur. La fluorescence au cours du temps est relevée dans le compartiment inférieur où seule l'insuline libérée peut diffuser. Il a été vérifié que les microgels ne pouvaient pas passer à travers la membrane en mesurant le taux de rhodamine. Cette méthode n'apporte cependant pas une amélioration significative sur les temps courts (Figure 3.31).

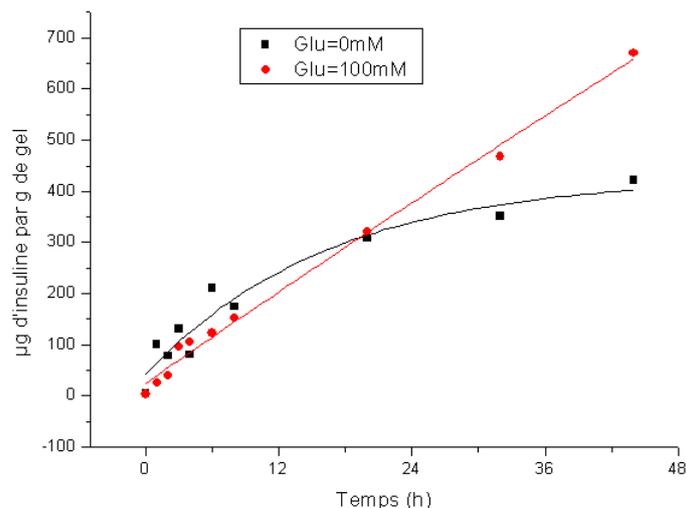


Figure 3.31 : Cinétique de libération d'un gel NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%) RhB incubé dans une solution de 0,1 mg/mL d'insuline-FITC. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4),  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

### II.2.3 Cytométrie de flux

Nous avons envisagé d'utiliser la cytométrie de flux pour déterminer le taux de fluorescence lié à chacun des microgels, afin de suivre l'évolution de leur contenu au cours du temps. La cytométrie de flux est une technique généralement utilisée en biologie moléculaire, en hématologie, en immunologie, ou encore en biologie marine, pour compter, caractériser ou trier des cellules suspendues dans un fluide. Dans un cytomètre en flux, les cellules à étudier sont suspendues dans un liquide et circulent une à une dans une chambre de mesure (Figure 3.32a), qui permet de recueillir des informations sur leur diffusion ou leur fluorescence. Pour confiner les objets dans la partie centrale de la chambre et pour être certain de ne considérer que la mesure d'un objet isolé à chaque fois, l'échantillon de départ est dilué *in-situ* par un système de *focalisation hydrodynamique* faisant intervenir un fluide dit *de gaine* de même type mais de vitesse différente (Figure 3.32a). Plusieurs milliers d'objets peuvent être analysés par seconde.

Notre intérêt dans cette technique réside dans le fait qu'elle permet simultanément de recueillir des informations sur la diffusion de lumière par les objets en suspension, et ce, à deux angles différents, ainsi que des informations sur la fluorescence des objets. Ainsi, nous envisageons de caractériser les microgels par cette technique en utilisant un BD FACS Canto.

L'intensité de la diffusion vers l'avant est mesurée par une photodiode à faible ouverture numérique d'entrée et munie d'un point aveugle pour arrêter le faisceau incident. Pour ne pas être gêné par la lumière de fluorescence émise, on place sur le chemin un filtre passe-bande qui ne conserve que la composante de diffusion quasi-élastique. La diffusion sur le côté est

recupérée par un objectif à huile placé à 90° et doté d'une grande ouverture numérique (n.a.=1,2). Le demi-angle collecteur est donc d'environ 53°. Le signal de fluorescence est acheminé par une série de miroirs vers chaque canal de fluorescence correspondant à un maximum de longueur d'onde d'émission. Il est possible d'inclure dans le logiciel de traitement des paramètres de compensation intercanaux qui permettent de comparer les valeurs de fluorescence entre elles.

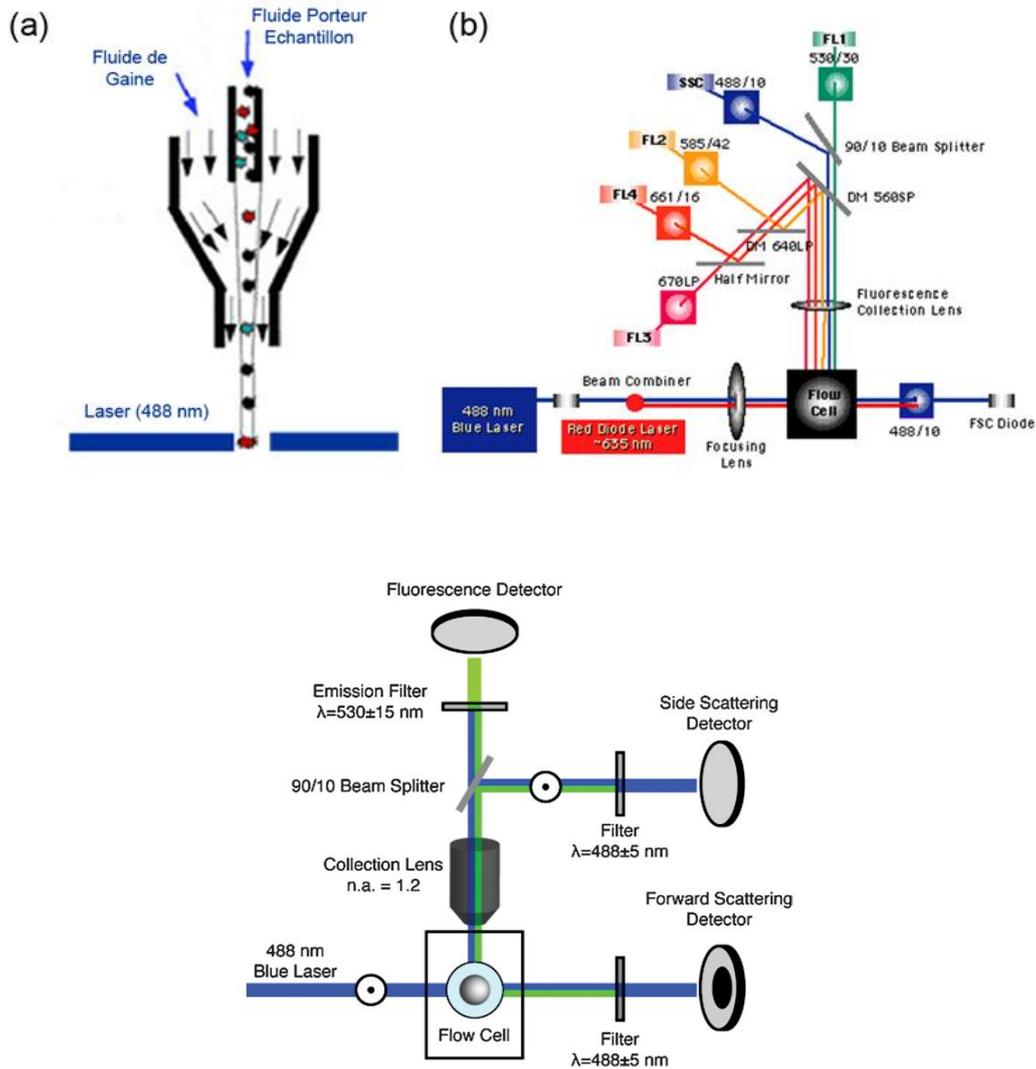


Figure 3.32 : Schématisation du dispositif de cytométrie en flux.

Pour mettre au point la méthode, nous utilisons des microgels marqués par de la fluoresceine (0,1% mol d'acryloylfluoresceine) <sup>229</sup>. Nous avons donc introduit des échantillons de différentes dilutions dans le cytomètre de flux. Un échantillon contenant 8,5 mg/mL de microgels est dilué 1000 et 5000 fois, ce qui correspond à  $6 \cdot 10^6$  et  $1,2 \cdot 10^6$  objets par mL.

Dans des conditions d'amplification qui ont été optimisées, on mesure les signaux de diffusion vers l'avant (FSC), à 90° (SSC), et en fluorescence (FITC) (Figure 3.33). On repère que le bruit de fond est amplifié et génère un signal tel que la diffusion à 90° inférieure à 200 cps ou l'intensité de fluorescence inférieure à 60 cps, appartient au bruit de fond. Nous éliminons ces populations de notre décompte pour ne s'intéresser qu'aux objets qui émettent un niveau supérieur et sont les microgels. Les deux échantillons avec les deux dilutions sont injectés dans le cytomètre. On détecte 15000 et 3000 événements pendant un temps de 20 s pour les échantillons dilués 1000 et 5000 fois. Le nombre d'objets détectés est proportionnel dans cette gamme au nombre d'objets injectés et le signal détecté est constant, on en déduit que ce sont bien les objets individuels qui passent devant le détecteur et non des agrégats. Nous avons sélectionné ces conditions pour étudier le signal émis par une même population mais incubée dans des milieux différents et en particulier, avec une concentration croissante en glucose.

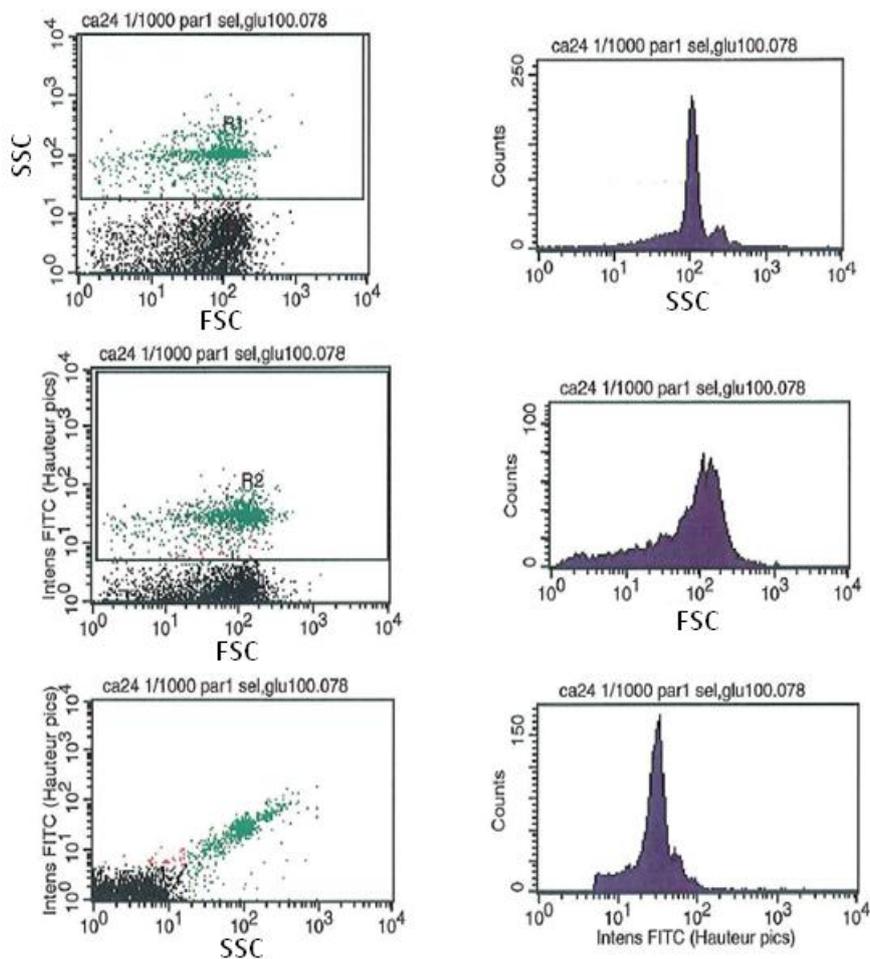


Figure 3.33 : Données brutes de cytométrie. Evolution des signaux de SSC, de FSC et d'intensité de fluorescence (FITC).

Quelle que soit le taux de dilution (1/1000 ou 1/5000), le signal de diffusion vers l'avant (FSC) et le signal de diffusion à 90° (SSC) diminuent quand la concentration en glucose augmente (Figure 3.34), tandis que le signal de fluorescence reste constant. La chute est même plus prononcée pour le signal de diffusion à 90°. Ce phénomène a été vérifié pour plusieurs types de microgels sensibles au glucose. Pour des microgels de pNIPAM seul, les signaux restent constants quelle que soit la concentration en glucose. En se référant à la théorie de Mie qui décrit l'évolution du signal de diffusion de lumière en fonction de l'angle d'observation, de la taille et de l'indice complexe des particules, dans le cas des microgels, deux paramètres peuvent affecter le signal de diffusion : lors de l'addition de glucose, la taille augmente alors que l'indice de réfraction diminue. Ces deux paramètres influencent les signaux de diffusion de manière opposée. L'augmentation de la taille devrait conduire à une augmentation des signaux de diffusion, à la fois vers l'avant et sur le côté, tandis que l'indice de réfraction doit agir dans le sens contraire. Pour exemple, la théorie de Mie a été confrontée aux résultats de cytométrie de flux pour la caractérisation d'émulsions<sup>230</sup> (Figure 3.35) et montre que l'augmentation de la taille conduit à une augmentation du signal de diffusion. Ainsi, d'après notre résultat expérimental, l'indice de réfraction est le paramètre qui gouverne le signal détecté puisque le signal diminue quand le taux de gonflement augmente. Ce résultat confirme une particularité de la cytométrie de flux déjà mentionnée à propos des émulsions : l'indice de réfraction a une grande influence sur le signal, comme en témoigne le paramétrage des courbes de cytométrie de flux, qui est sensible à la 3<sup>ème</sup> décimale de l'indice de réfraction. Ainsi, nous montrons que la cytométrie de flux est une technique qui nous permet de caractériser le gonflement des microgels. Elle pourrait se révéler intéressante là où la DLS serait limitée, par exemple si les microgels étaient en présence d'une deuxième population d'objets. La cytométrie de flux permettrait alors de trier les signaux et d'isoler ceux relatifs aux microgels. Ceci pourrait se révéler utile dans un milieu complexe comme un fluide biologique.

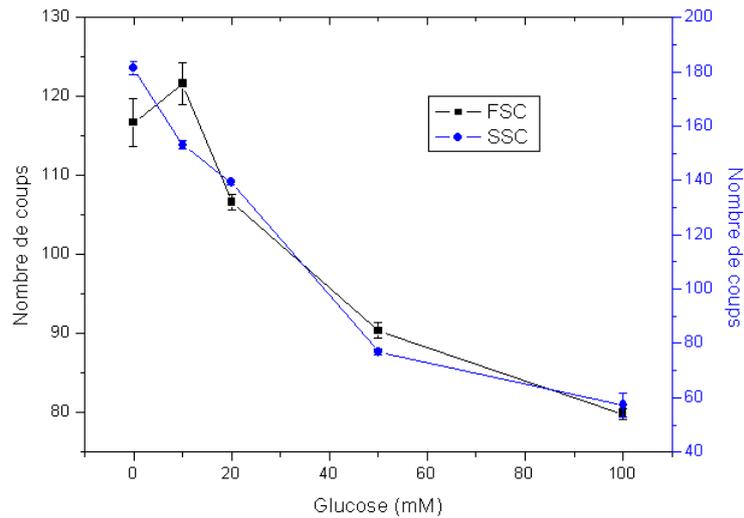


Figure 3.34 Evolution des signaux de diffusion vers l'avant et à 90° pour un microgel de NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%).

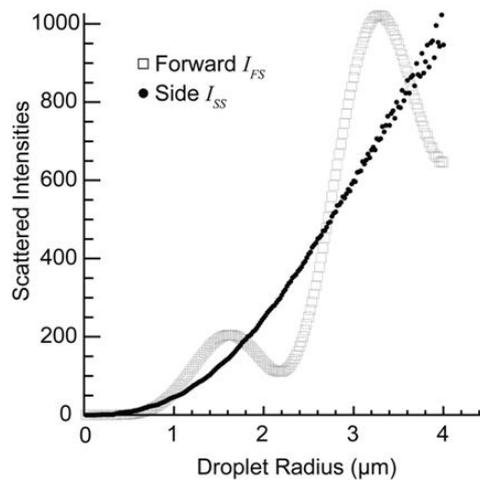


Figure 3.35 extraite de <sup>230</sup>. Evolution du signal de diffusion vers l'avant et à 90° pour des particules d'indice de réfraction 1,468.

Enfin, nous avons appliqué cette technique à la détection de microgels porteurs de fluorescence, via l'incorporation d'insuline-FITC. Les microgels chargés en insuline-FITC (avec une concentration d'incubation de 0,1 mg/mL) ont été introduits dans les mêmes conditions que précédemment dans le cytomètre de flux. Malheureusement, le signal de fluorescence détecté au temps initial est légèrement au-dessus du bruit de fond. Il n'a donc pas été possible de suivre la décroissance du signal de fluorescence au cours du temps. Ce résultat mérite d'être réitéré pour des microgels contenant un chargement initial en insuline plus élevé.

### III : Etude de la libération d'un analogue rapide de l'insuline

Comme nous l'avons mentionné au début de ce chapitre, l'insuline peut être sous forme d'agrégats ou de monomères. Sa pharmacocinétique sera différente. Ainsi, dans le contexte de cette étude, l'objectif général est bien de pouvoir libérer dans le sang un analogue de l'insuline capable d'agir rapidement. Nous devons donc nous assurer que nous encapsulons l'insuline sous forme de monomère. Nous avons donc tenté de comparer le comportement de l'insuline-FITC utilisée comme modèle jusqu'à présent à un analogue rapide de l'insuline, fourni par Sanofi-Aventis. Les techniques d'encapsulation et de libération resteront les mêmes mais une alternative au dosage de l'insuline doit être trouvée car cet analogue n'est pas fluorescent.

#### III.1 : Dosage par spectroscopie d'absorption UV-Vis

En 1976, Marion M. BRADFORD expose un protocole expérimental de détermination quantitative de protéine<sup>231</sup>. Le principe repose sur la variation de la fluorescence de la molécule de Coomassie Brilliant Blue G-250. La liaison de cette molécule avec une protéine provoque en effet une diminution et une inversion de son maxima d'absorption et de sa longueur d'onde caractéristique. En effet sans protéine, une solution de coomassie sera de couleur rouge alors qu'en présence de protéine la solution virera au bleu. Au plus une protéine est ajoutée dans le milieu, au plus la couleur rouge s'estompe et la bleue apparaît.

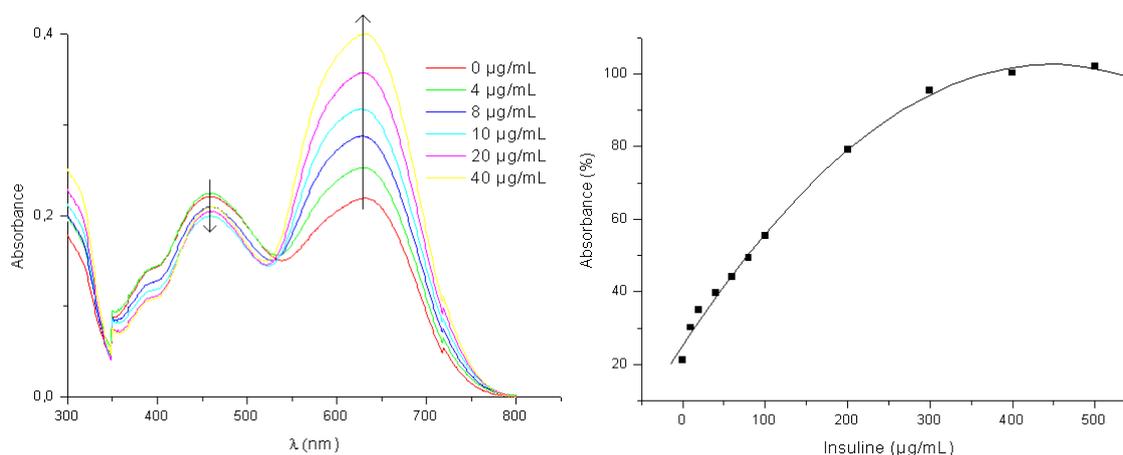


Figure 3.36 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration en insuline.

Malheureusement, les limites de détection de cette mesure sont bien au-dessus des taux que nous pouvons espérer lors de la libération d'insuline par les microgels. Nous avons bien essayé d'augmenter la concentration en insuline à 1 mg/mL dans la solution d'incubation pour mener une cinétique de libération selon le même procédé. Malheureusement les quantités

détectées sont trop faibles. Nous avons alors essayé d'augmenter encore plus la concentration jusqu'à 5 mg/mL mais là encore, les variations en présence ou en absence de glucose sont dans le bruit de fond du système.

### *III.2 : Dosage par voie électrochimique*

Finalement, une méthode électrochimique sera également abordée. Cette méthode ne requiert pas d'insuline marquée par un fluorophore. Elle peut donc s'appliquer à tout type d'insulines, natives ou analogues. Cette méthode permettrait de doser l'insuline in situ dans le milieu sans avoir recours à la séparation des microgels, ce qui pourrait permettre d'accéder à des cinétiques sur des temps courts.

Le principe de la détection électrochimique repose sur l'oxydation de la molécule d'insuline par une électrode de carbone. L'oxydation de la molécule engage les 4 acides aminés de type tyrosines des chaînes A (positions 14 et 19) et B (20 et 26) selon la réaction d'oxydation suivante <sup>232</sup> :  $C-OH \longrightarrow C=O + H^+ + e^-$ . De nombreux exemples d'un tel procédé ont été décrits dans la littérature <sup>233-238</sup>. La plupart des procédés expérimentaux fait appel à des électrodes de carbone modifiées dont la construction nécessite un travail coûteux en temps et en investissement. Fort de l'expérience dans le domaine de l'électrochimie au sein de notre laboratoire, l'usage d'une électrode de carbone non modifiée est apparu comme une solution alternative convenable pour étudier, dans une première approche, la détection d'insuline par voie électrochimique.

D'un point de vue pratique, les électrodes mises en jeu sont au nombre de trois :

- une électrode de travail au carbone,
- une électrode de référence (Ag/AgCl),
- une contre électrode (Pt).

Le mode de détection est un mode DPV pour Differential Pulse Volta, ce qui correspond au tracé de la dérivée d'une voltampérométrie cyclique classique. Une modulation du potentiel de 50 mV est appliquée pendant une durée de 50 ms. La période T est fixée à 0,5 s et le balayage du potentiel est évalué entre 0,3 V et 1 V. Les résultats expérimentaux montrent une bonne détection de l'insuline, même pour les faibles concentrations (43 nM soit 0.25 mg/L d'insuline). La méthode développée ici ne permet pas une mesure continue mais plutôt semi-continue dans la mesure où l'électrode doit être polie de manière à ce que sa surface ne soit pas recouverte d'un film passivant qui se formerait au cours de l'oxydation de l'insuline.

Néanmoins cette étape ne prend que quelques minutes et les mesures peuvent être répétées toutes les 5 minutes sans difficulté.

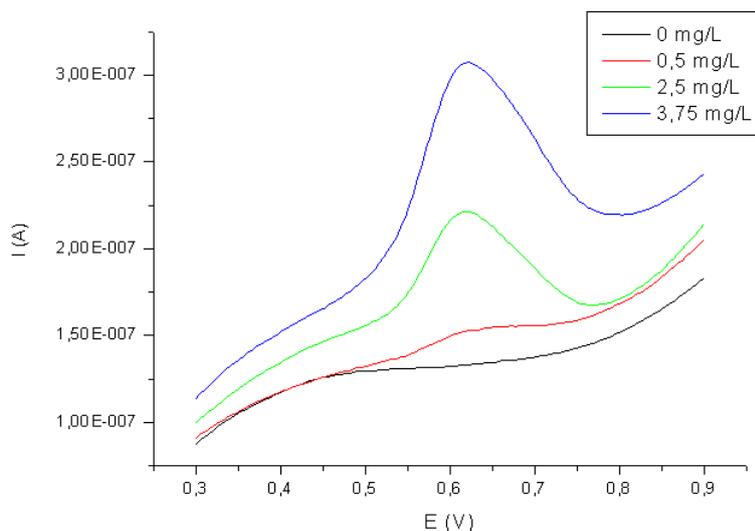


Figure 3.37 : Evolution d'un tracé de DVP en fonction de la concentration en insuline.

Malgré nos efforts et la mise en place d'un protocole de polissage, nous n'avons pas réussi à définir une courbe de calibration de manière reproductible. Aussi, bien qu'élégante, cette méthode n'a pu être poursuivie pour décrire la libération d'insuline par les microgels.

#### IV : Conclusion au chapitre encapsulation libération

En définitive, les formulations microgels qui ont été détaillées dans le chapitre précédent ont été utilisées comme des modèles pour évaluer leurs comportements en tant que vecteurs d'encapsulation et de délivrance. L'insuline a été encapsulée par la méthode d'incorporation et la quantité incorporée peut être augmentée selon les conditions d'incubation. De manière élégante, les microgels ont montré la capacité de délivrer de l'insuline en rapport avec la concentration en glucose. Ce mécanisme de délivrance modulée peut être répété sur plusieurs cycles et autant de fois que le microgel n'est pas encore vide. En revanche, la cinétique de délivrance de l'insuline n'a pas pu être mesurée avec précision. Nous n'avons pu obtenir les données que pour un ensemble de microgel rassemblé en pâte. Les efforts entrepris pour obtenir les cinétiques de libération de microgels dispersés se sont révélées infructueuses car celles évaluées ont montré la présence d'artéfacts. Seule la méthode par cytométrie de flux n'a pas été expérimentée jusqu'au bout. Elle sera reprise prochainement.

**Chapitre IV : Développement d'une nouvelle  
génération de microgels sensibles au glucose –  
nouvelle route vers la biocompatibilité**



## **Introduction au chapitre**

Les premières études de libération d'insuline à partir des microgels sensibles au glucose développées au chapitre II montrent que ces objets présentent un potentiel intéressant pour la délivrance d'insuline asservie à la glycémie. Cependant, ces mesures préliminaires sont loin de remplir le cahier des charges exigé par leur application pharmaceutique. Sans vouloir s'adresser ici à toutes ces exigences qui dépassent largement le cadre de cette thèse, nous souhaitons au moins améliorer le comportement des microgels vis-à-vis de l'encapsulation et de la délivrance d'insuline, en jouant sur la structure des objets. Dans ce chapitre, nous présentons deux nouvelles familles de microgels sensibles au glucose :

- des microgels de structure interne contrôlée, qui présentent un agencement différent des motifs récepteurs,
- des microgels sensibles au glucose impliquant un mécanisme de gonflement différent de celui utilisé jusqu'à présent.

### **I : Microgels de structure interne contrôlée**

Des travaux effectués au laboratoire ont permis de maîtriser l'agencement des groupes fonctionnels au sein d'un microgel. Deux voies ont été explorées et ont permis d'aboutir à des structures de type cœur-écorce, dans lesquelles le groupement fonctionnel peut être inséré sélectivement au cœur ou en périphérie de la particule. La première voie s'intéresse à des structures cœur-écorce dans lesquelles le cœur et l'écorce sont deux hydrogels sensibles à des stimuli de nature chimique différente. Ces systèmes peuvent donner lieu à des structures multisensibles. La deuxième voie s'intéresse à des objets hybrides, pour lesquels le cœur est une particule inorganique. Cette deuxième voie peut être avantageusement utilisée pour obtenir des structures creuses, par dissolution du cœur inorganique.

#### *I.1 : Microgels cœur-écorce*

Comme nous l'avons vu au chapitre II, la localisation des unités boroniques dans un microgel « simple », c'est-à-dire réalisé en procédé batch, repose sur sa réactivité par rapport à celle des autres comonomères. Vu les échelles de taille de nos objets, nous n'avons pas de moyen de quantifier précisément la distribution des récepteurs au glucose dans les microgels simples. Ainsi, une façon de maîtriser cet agencement consiste à réaliser la synthèse en deux étapes. Une première étape de polymérisation génère un microgel sans récepteur. Ce microgel

sert de germes pour une deuxième étape de polymérisation dans laquelle seront incorporés les récepteurs au glucose (Figure 4.1). Une structure cœur-écorce présentant un cœur thermosensible et une écorce sensible au glucose devrait être obtenue. Ce type de structure pourrait présenter un intérêt potentiel pour nos applications dans la délivrance d'actif car les récepteurs seront plus facilement accessibles à l'espèce cible. De plus, nous avons déjà mentionné que l'introduction de motifs phénylboroniques augmentait l'hydrophobie du réseau. Ainsi, des structures cœur-écorce n'ayant des récepteurs qu'en périphérie permettraient d'aménager un intérieur hydrophile.

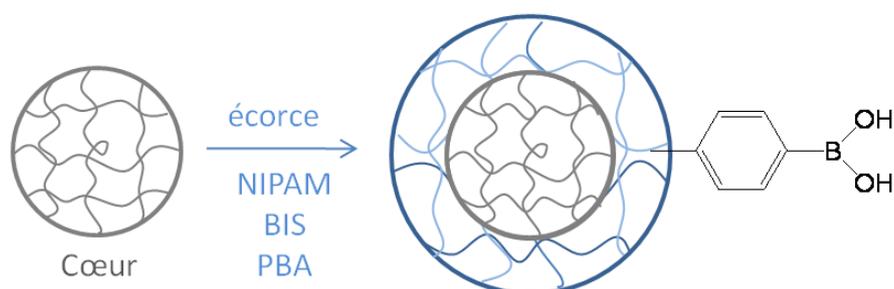


Figure 4.1 : Schématisation 2D d'un microgel cœur-écorce fonctionnalisé par un monomère de PBA.

De telles structures ont déjà été rapportées par l'équipe de Lyon <sup>167</sup> qui a été la première à synthétiser des microgels cœur-écorce avec un cœur sensible à la température et une écorce sensible au pH. Depuis, d'autres travaux se sont intéressés à des microgels cœur-écorce constitués de polymères thermosensibles différents <sup>172</sup>. Notre équipe a adapté ces méthodes pour introduire les dérivés phénylboroniques <sup>239</sup>. D'un point de vue pratique, la première étape est celle de construction d'un microgel thermosensible. Cette synthèse est réalisée en présence de SDS afin d'obtenir des objets relativement petits, typiquement de l'ordre d'une centaine de nanomètres à l'état contracté. Nous verrons par la suite que ce paramètre est important. Dans la deuxième étape, on introduit un mélange de comonomères identiques à ceux du chapitre II. La concentration totale en monomères est maîtrisée car elle contrôle l'épaisseur de l'écorce <sup>170</sup>.

Le protocole expérimental utilisé est scindé en deux étapes distinctes. La synthèse du cœur, comme celle de l'écorce, est préparée par polymérisation radicalaire par précipitation <sup>149</sup> selon le protocole de synthèse détaillé au chapitre II à la différence que la synthèse du cœur est menée sans DDOPBA et que celle de l'écorce s'articule autour d'une solution mère de cœur.

A la suite de la première partie de la synthèse, les microgels sont centrifugés de manière à être purifiés. Ils sont introduits (3 mg/mL) dans le mélange de monomères de l'écorce pour un volume total de 25 mL. Les monomères constituant l'écorce sont copolymérisés selon le ratio (97,5-X : 2,5 : X) (NIPAM : BIS : APBA). Une fois obtenus, les microgels sont dialysés et centrifugés de manière similaire à leurs homologues microgels.

Pour exemple, nous présentons le comportement des microgels constitués d'un cœur de pNIPAM et d'une écorce de pNIPAM-co-APBA. Les analyses présentées sont conduites à un pH de 8,5 car le pKa du dérivé boronique est de 8,2<sup>94</sup>. La figure 4.2 montre l'évolution du diamètre hydrodynamique en fonction de la température pour des microgels synthétisés à partir de différentes concentrations de monomères lors de la deuxième étape, à taux de PBA constant. Pour les trois concentrations en monomères dans l'écorce, les courbes évoluent de façon parallèle, ce qui montrent que leur transition de phase volumique est identique, en accord avec leur teneur en dérivé PBA constant. Cependant, le diamètre dans l'état contracté est d'autant plus grand que la concentration en monomères dans l'écorce est grande. Il peut donc être déduit que ce paramètre permet de contrôler la taille finale des objets lors de leur synthèse et donc l'épaisseur de l'écorce puisque le cœur est identique. De manière plus surprenante, nous remarquons également que les diamètres des microgels à 20 et 40 mM de monomères dans l'écorce sont plus petits que le cœur lorsqu'il est seul, pour une gamme de température en-dessous de 35°C. Ceci s'explique par le fait que l'écorce est dans un état plus contracté que le cœur s'il était seul dans les mêmes conditions. Ainsi, l'écorce impose une contrainte mécanique au cœur. Il est donc plus comprimé que s'il était à son équilibre thermodynamique de gonflement. De telles observations ont déjà été rapportées pour d'autres systèmes où l'écorce était plus contractée que le cœur<sup>53, 170, 171, 174</sup>. Ceci est facilement compréhensible si l'on s'en réfère à la variation de gonflement (Figure 4.2). Nous voyons bien que les trois comportements thermiques sont superposables, en accord avec une concentration en PBA constante, et plus contractés que le cœur seul.

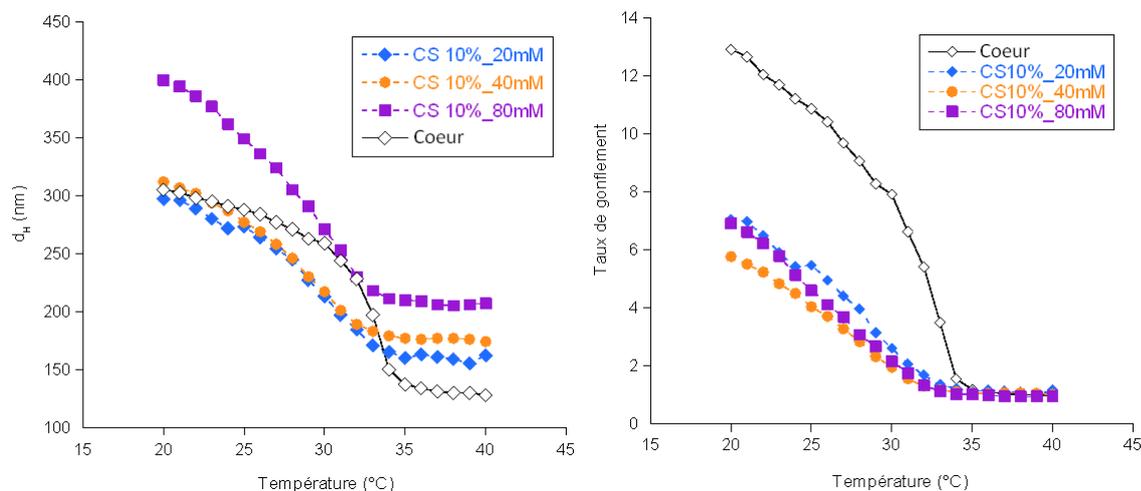


Figure 4.2 : Evolution du diamètre hydrodynamique ou du taux de gonflement en fonction de la température et de différentes concentrations de monomères lors de la deuxième étape, à taux de PBA constant (10%). Les microgels sont constitués d'un cœur de pNIPAM et d'une écorce de pNIPAM-APBA. Tampon Tris (2 mM, pH=8,5).

Pour une écorce d'épaisseur donnée, la concentration en PBA a été variée. Le gonflement est d'autant plus faible que la concentration en PBA est grande, en accord avec l'effet hydrophobe de l'introduction de ces motifs. (Figure 4.3).

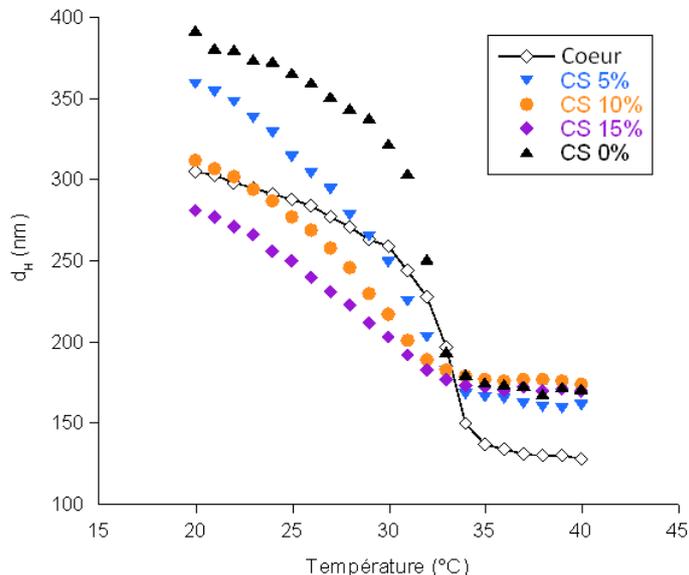


Figure 4.3 : Evolution du diamètre hydrodynamique en fonction de la température pour un microgel de pNIPAM (cœur) et un microgel cœur-écorce (cœur : pNIPAM, écorce : pNIPAM-co-APBA, 40 mM de monomères dans l'écorce) en fonction de la teneur en récepteurs. Tampon Tris (2 mM, pH=8,5).

En présence de glucose, ces microgels gonflent. Le comportement de l'écorce est comparable au comportement des microgels que nous avons décrit dans les chapitres précédents. Lorsque du glucose est ajouté, l'écorce devient plus hydrophile et gonfle (Figure 4.4). La compression

du cœur est relaxée et à mesure que la concentration en glucose est plus grande, le cœur retrouve son taux de gonflement initial. Les différents états du microgel sont récapitulés sur la figure 4.5.

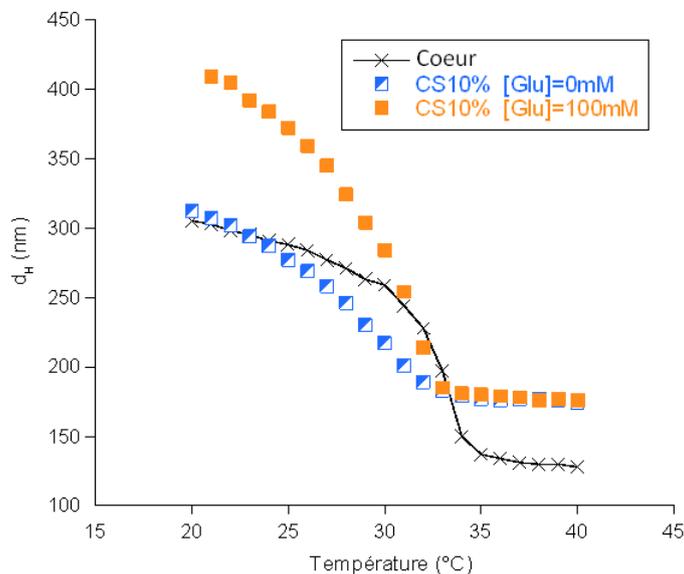


Figure 4.4 : Evolution du diamètre hydrodynamique en fonction de la température pour un microgel de pNIPAM (cœur) et un microgel cœur-écorce (cœur : pNIPAM, écorce : pNIPAM-co-APBA, 40 mM de monomères dans l'écorce) en présence et en absence de glucose. Tampon Tris (2 mM, pH=8,5).

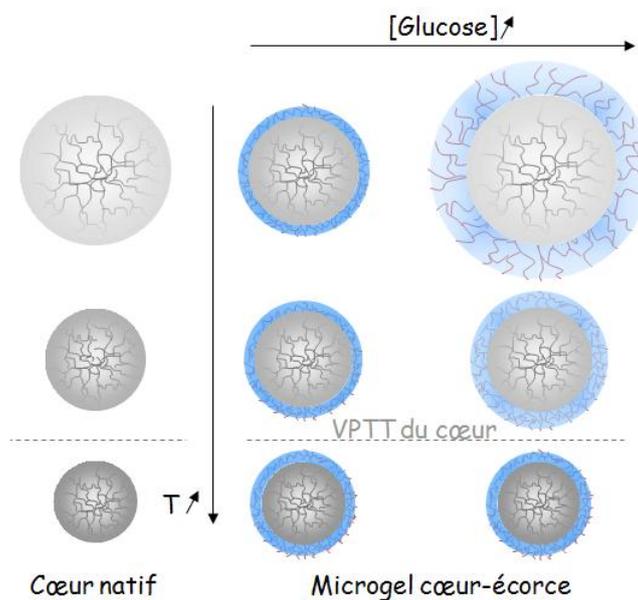


Figure 4.5 : Représentation schématique des différents états d'un microgel cœur-écorce en fonction de la concentration en glucose et de la température.

La même stratégie de diminution du pH de travail a été appliquée à la synthèse de microgels cœur-écorce susceptibles de gonfler en présence de glucose à pH=7,4 et à une température

ambiante. Ainsi, un microgel constitué d'un cœur de pNIPAM et d'une écorce pNIPAM-co-DDOPBA (10% mol.) a été synthétisé selon le même protocole que précédemment, en remplaçant le NIPAM par du NIPMAM et l'APBA par du DDOPBA. Son comportement en température, sans et avec glucose, a été mesuré à un pH physiologique (Figure 4.6). Pour comparaison, le comportement du cœur de pNIPAM est donné dans les mêmes conditions.

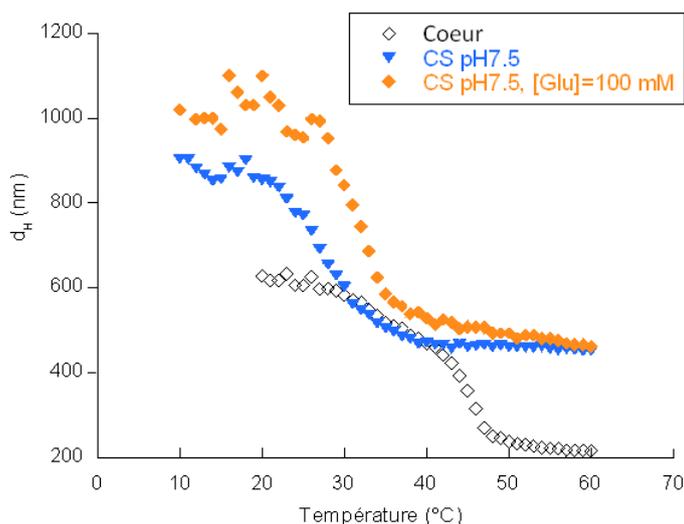


Figure 4.6 : Evolution du diamètre hydrodynamique en fonction de la température pour un microgel de pNIPAM (cœur) et un microgel cœur-écorce (cœur : pNIPAM, écorce : pNIPAM-co-DDOPBA, 40 mM de monomères dans l'écorce) en présence et en absence de glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4).

Le concept est donc valide quel que soit le système. Le comportement de ce microgel vis-à-vis de l'incorporation d'insuline et de sa libération a alors été évalué. Avant de rapporter ces résultats, nous allons présenter la deuxième voie mise en œuvre pour obtenir des microgels structurés.

### I.2 : Nanocapsules d'hydrogel

Une autre voie de structuration des microgels étudiée au laboratoire a permis de synthétiser des nano-objets hybrides présentant un cœur de silice et une écorce d'hydrogel. Ces matériaux peuvent servir de précurseur à des microgels creux, c'est-à-dire des particules cœur-écorce dont le cœur a été dissous. Ainsi, notre objectif est d'utiliser ce concept pour obtenir des nanocapsules d'hydrogel sensibles au glucose. Ces microgels creux pourraient permettre d'améliorer les propriétés d'encapsulation de l'insuline.

Une étude complète de la synthèse de particules constituées d'un cœur de silice et d'une écorce de pNIPAM réticulé, a été réalisée et publiée dans Langmuir<sup>240</sup> (Figure 4.7). Elle a

permis d'obtenir également des particules hybrides constituées d'un cœur de silice et d'une écorce d'hydrogel sensible au glucose, dans des conditions non physiologiques toutefois. Nous rappelons ici brièvement les principales étapes pour obtenir de tels objets. Tout comme précédemment, il s'agit de synthétiser l'écorce d'hydrogel par polymérisation radicalaire par précipitation en présence de germes, qui constitueront le cœur des objets. Dans le cas des particules hybrides, les germes sont des nanoparticules de silice, fonctionnalisées par un motif méthacrylate, obtenus par greffage du methacryloxypropyltriméthoxysilane (MPS) sur les groupements silanols de la silice. Ainsi, les chaînes de polymère en croissance vont copolymériser avec les méthacrylates de la surface de la silice. L'étude a été réalisée en utilisant du NIPAM et du BIS comme monomères.

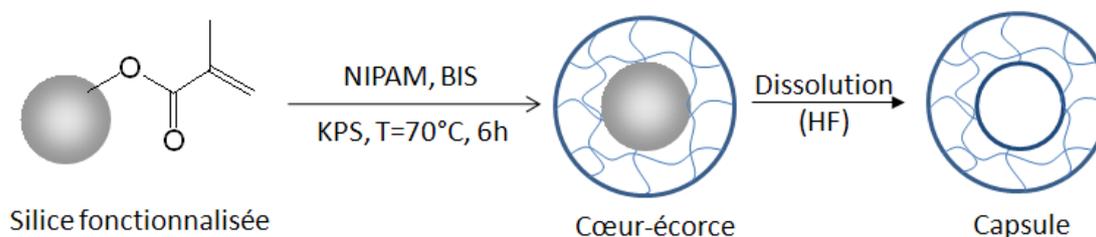


Figure 4.7 : Schématisation de la construction de capsule d'hydrogel.

Plusieurs paramètres contrôlent la structure de l'objet :

- la densité de fonctionnalisation en MPS doit donc être suffisamment importante de manière à obtenir une écorce uniforme,
- comme pour les cœurs-écorces précédents (gel@gel), la concentration en monomères permet de fixer l'épaisseur de l'écorce,
- à concentration constante en monomères et en particules de silice, la taille de l'écorce ne dépend pas de la taille de la silice. Si la taille des germes augmente, leur surface disponible sera moindre, une nucléation homogène s'installe dans le milieu et des particules d'hydrogel seul se forment dans la suspension. Cependant, ces particules peuvent être séparées des particules hybrides par centrifugation dans la mesure où leurs caractéristiques en terme de taille et de masse ne sont pas les mêmes.

Ainsi, il a été montré que ces particules hybrides pouvaient être synthétisées avec un bon contrôle de leur structure. Elles peuvent également servir de précurseur à des microgels creux, obtenus par dissolution du cœur de silice par de l'acide fluorhydrique. Ces objets ont été caractérisés, notamment par microscopie à force atomique<sup>240</sup>.

### *1.2.1 : Capsules sensibles au glucose*

Ce protocole étant bien établi, il paraît simple d'obtenir des objets similaires en introduisant les fonctions boroniques comme nous l'avons fait précédemment, c'est-à-dire par copolymérisation. Cependant, tous les essais sur ce plan se sont révélés infructueux. Les particules de silice se sont agrégées lors de la synthèse et il n'a pas été possible d'obtenir des particules cœur-écorce bien définies.

Nous avons alors adopté une autre méthode. Puisqu'il a été possible d'obtenir des structures cœur-écorce sur un cœur d'hydrogel, nous avons décidé de polymériser une deuxième écorce sur les particules hybrides  $\text{SiO}_2$ @hydrogel thermosensible. Le cœur de silice a été ensuite dissous et des capsules double écorce sont obtenues (Figure 4.8). Ce protocole a dans un premier temps été réalisé pour obtenir des objets  $\text{SiO}_2$ @pNIPAM@pNIPAM-co-DDOPBA. Nous l'avons adapté pour obtenir des particules sensibles au glucose à une température plus proche des conditions physiologiques, c'est-à-dire  $\text{SiO}_2$ @pNIPMAM@pNIPMAM-co-DDOPBA.

Le protocole de synthèse s'articule autour de trois étapes distinctes<sup>240</sup>. La première consiste dans la synthèse et dans la fonctionnalisation des particules de silice par de la méthacryloxypropyltriméthoxysilane (MPS) sur les groupements silanols de la silice. En pratique une solution d'éthanol absolu (195 mL), d'eau (29 mL) et d'ammoniac (11 mL) sont introduits dans un ballon tricol de 1 L surmonté d'un réfrigérant. Après agitation et chauffage contrôlé de manière à fixer la taille des particules (70°C : 140 nm ; 40°C : 230 nm ; 27°C : 350 nm), le Tetraéthoxysilane (TeOs) est ajouté (16,5 mL) rapidement. La réaction est laissée à agitation modérée pendant 1 heure. Pour fonctionnaliser la surface des particules de silice, une solution de MPS est ajoutée de manière à obtenir une monocouche avec un taux de couverture proche de 2 molécules.nm<sup>-2</sup>. Après 10h de réaction et élimination du milieu réactionnel, les particules de  $\text{SiO}_2$  sont obtenues.

Les seconde et troisième étapes pour synthétiser respectivement un microgel cœur-écorce de type  $\text{SiO}_2$ @gel ou  $\text{SiO}_2$ @gel@gel sont réalisées selon une réaction de copolymérisation par précipitation conventionnelle autour d'une masse contrôlée de particule de  $\text{SiO}_2$  ou de  $\text{SiO}_2$ @gel. Ces étapes sont semblables au protocole de synthèse d'un gel@gel décrit au paragraphe I.1 de ce chapitre. Enfin, le cœur peut être dissous pour obtenir les capsules correspondantes par action du HF.

Chapitre IV : Développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose – nouvelle route vers la biocompatibilité

Le succès de cette méthode de construction est attesté par des clichés de TEM (Figure 4.8) sur lesquels la double écorce est nettement visible, qu'il s'agisse des particules hybrides ou des capsules après dissolution de la silice. Ces dernières images montrent également la disparition de la silice du cœur de l'objet. La différence de contraste entre les images provient de l'utilisation d'un agent de contraste, l'acétate d'uranyle.

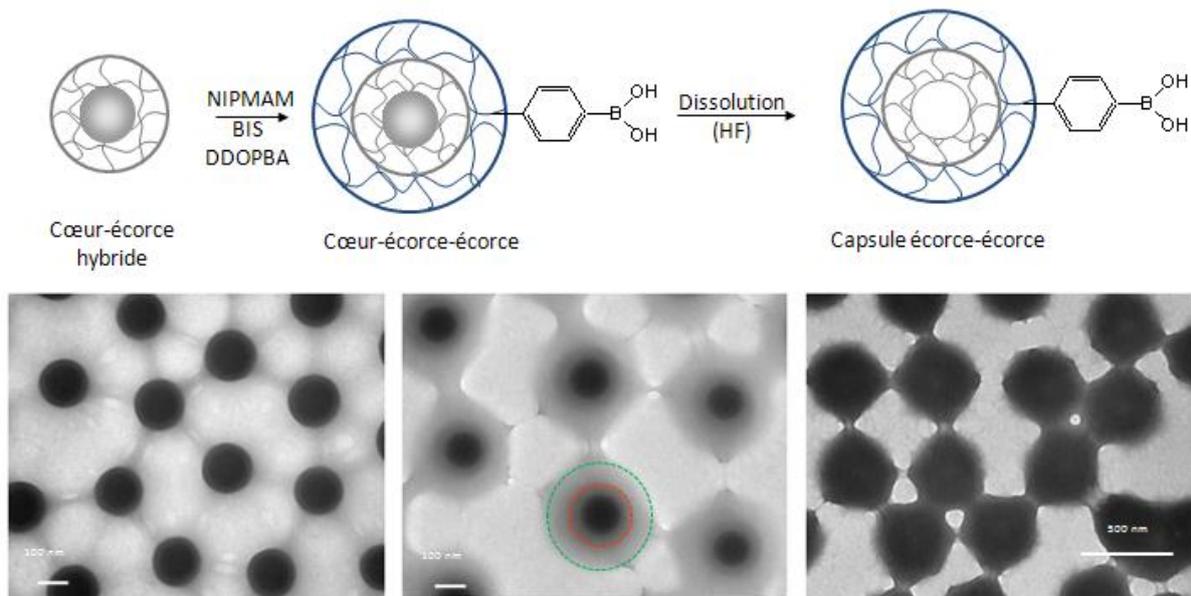


Figure 4.8 : Schématisation de la construction de capsule d'hydrogel bicouche et clichés TEM associés aux différentes étapes de la construction pour un cœur de silice ( $d=140$  nm), une écorce intermédiaire de pNIPMAM, une écorce externe de pNIPMAM-co-DDOPBA (10% mol.).

Les particules ainsi synthétisées ont été caractérisées pour vérifier l'introduction de dérivé boronique. Ainsi, la zétamétrie a été utilisée pour vérifier la présence de motifs boroniques à la surface (Figure 4.9). L'introduction de motifs boroniques amène en effet une modification de la mobilité électrophorétique en fonction de la concentration en glucose à mesure que ces derniers passent d'un état neutre à chargé. La charge nette des particules augmente (en valeur absolue) pour un pH supérieur à 7. Ces résultats prouvent l'incorporation du PBA dans la particule. En effet, son pKa du dérivé PBA étant de 7,8, la charge nette augmente nettement pour des pH situés autour de cette valeur.

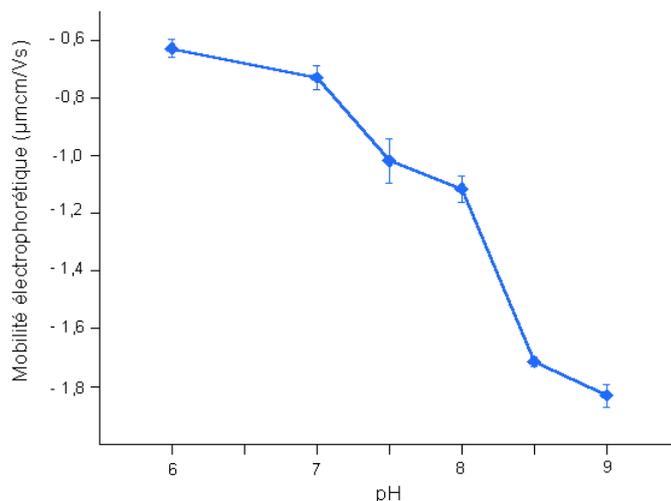


Figure 4.9 : Evolution de la mobilité électrophorétique d'une particule cœur-double écorce ( $SiO_2@pNIPAM@pNIPAM-co-DDOPBA$  (10% mol.) en fonction du pH. Tampon phosphate (2 mM),  $T=25^\circ C$

Le taux de gonflement en présence de glucose a été mesuré pour ce composé (Figure 4.10), et mesuré en parallèle de l'évolution de la mobilité électrophorétique. Les particules gonflent en présence de glucose à  $25^\circ C$ , ce qui montre que l'incorporation de PBA donne lieu à une sensibilité au glucose. En parallèle, la mobilité électrophorétique augmente (en valeur absolue) quand la concentration en glucose augmente. Ceci prouve que les motifs PBA forment des esters chargés avec le glucose. Ces résultats sont encourageants, bien que le taux de gonflement ne soit pas très élevé. Ce défaut a été attribué au fait que l'écorce est composée de pNIPAM-co-PBA. La sensibilité au glucose ne serait pas maximale à température ambiante avec ce monomère alkylacrylamide.

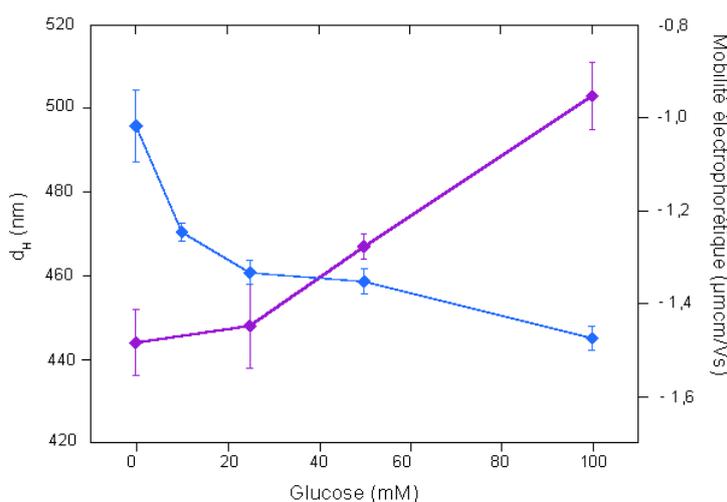


Figure 4.10 : Evolution de la mobilité électrophorétique et du diamètre hydrodynamique d'une particule cœur-double écorce ( $SiO_2@pNIPAM@pNIPAM-co-DDOPBA$  (10% mol.) en fonction de la concentration en glucose. Tampon phosphate (2 mM,  $pH=7,4$ ),  $T=25^\circ C$ .

Ainsi, les expériences sont réitérées en substituant le NIPAM par le NIPMAM. Ce monomère se substitue facilement au NIPAM pour donner des structures cœur-écorce  $\text{SiO}_2@p\text{NIPMAM}$  (Figure 4.11). Comme indiqué sur la figure 4.8, les étapes suivantes sont aussi réalisées avec succès. Le comportement thermique des différentes entités est présenté sur la figure 4.11. La température de transition du cœur est plus élevée que pour le cœur de pNIPAM. L'introduction de motifs boroniques (10% dans l'écorce) fait chuter la température de transition à cause de l'hydrophobie de l'écorce. En présence de glucose, les particules gonflent pour des températures inférieures à 37°C (Figure 4.11).

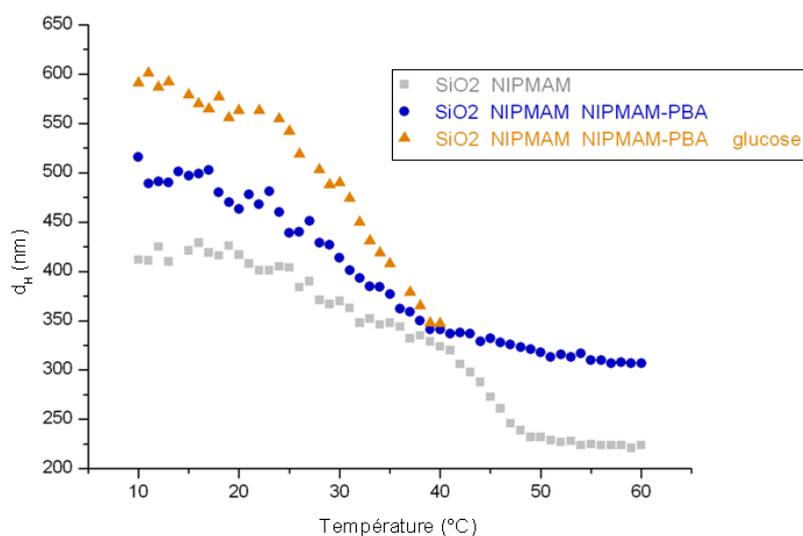


Figure 4.11 : Evolution du diamètre hydrodynamique d'un microgel cœur-écorce ( $\text{SiO}_2@p\text{NIPMAM}$ ) et d'un microgel cœur-double écorce ( $\text{SiO}_2@p\text{NIPMAM}@p\text{NIPMAM-co-DDOPBA}$  (10% mol.) en fonction du pH et de la concentration en glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4).

### 1.3 : Utilisation des microgels de structure interne contrôlée pour l'encapsulation et la délivrance d'insuline

Les objets précédemment décrits sont maintenant utilisés pour encapsuler de l'insuline. La méthode d'imprégnation utilisée pour les microgels « simples » a été reconduite pour cette étude. Les données sont récapitulées dans le tableau 4.1. A titre de comparaison, le taux d'encapsulation d'un microgel « simple » est rappelé.

Tableau 4.1 : Caractérisations du taux de gonflement  $\left(\frac{d_H}{d_0}\right)^3$ , de l'encapsulation de microgel en fonction de leur structure. [Insuline]=0,1 mg/mL

Structure	$\left(\frac{d_H}{d_0}\right)^3$	Insuline par quantité de microgel (mg/g)
Microgel simple (NIPMAM-DDOPBA 10% mol.)	7,1	0,9
Cœur-écorce (NIPMAM@NIPMAM-DDOPBA 10% mol.)	6,9	1,4
Capsule (SiO <sub>2</sub> dissoute@NIPMAM@NIPMAM-DDOPBA 10% mol.)	5,6	0,9

<sup>a</sup>  $d_H$  = diamètre hydrodynamique à 15°C ;  $d_0$  = diamètre hydrodynamique à l'état contracté ( $T > VPTT$ ).

Cette quantité s'élève à 1,4 mg/g pour des microgels cœur-écorce, ce qui est 1,5 fois plus important que pour le microgel simple correspondant. En revanche, pour les capsules, nous ne notons pas d'amélioration significative. Ce résultat est décevant car on s'attendait à une nette amélioration liée à la présence de la cavité. La libération de l'insuline de ces objets a également été étudiée, en utilisant la méthode de libération à travers une membrane de dialyse. Comme nous l'avons mentionné au chapitre précédent, cette méthode est celle qui perturbe le moins les microgels. Toutefois, si elle s'est révélée décevante pour des microgels simples, elle semble bien adaptée aux microgels cœur-écorce.

### 1.3.1 : Microgels cœur-écorce

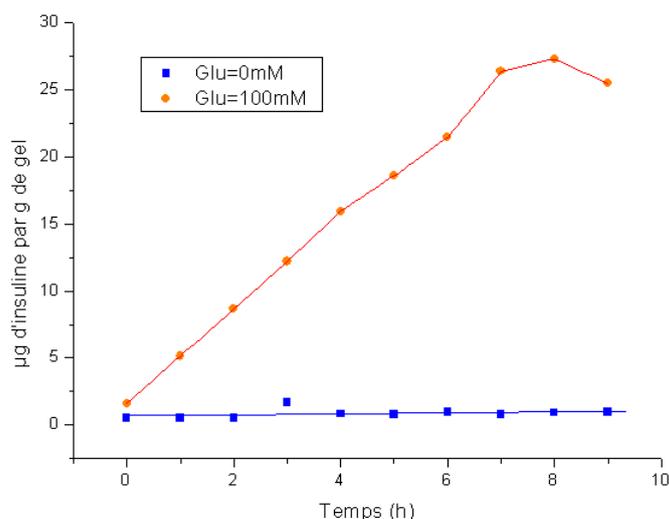


Figure 4.12 : Cinétique de libération d'un microgel cœur écorce en fonction de la concentration en glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=25°C.

La cinétique de libération montre une libération progressive de l'insuline en présence de glucose alors qu'elle s'avère nulle en absence de glucose. Après 7h de libération, cette dernière ralentit pour atteindre un palier. Par rapport aux systèmes étudiés précédemment, la réponse de la libération d'insuline à la présence de glucose est très nette. En absence de glucose, aucune fuite n'est détectée. Ce résultat n'a pu être mis en évidence qu'avec ce type d'objets en utilisant cette méthode. En absence de glucose, l'écorce hydrophobe semble donc être un frein à la libération d'insuline. Ces résultats sont fort encourageants. L'écorce jouerait donc le rôle de barrière modulable en fonction de la concentration en glucose.

### 1.3.1 : Nanocapsules d'hydrogel

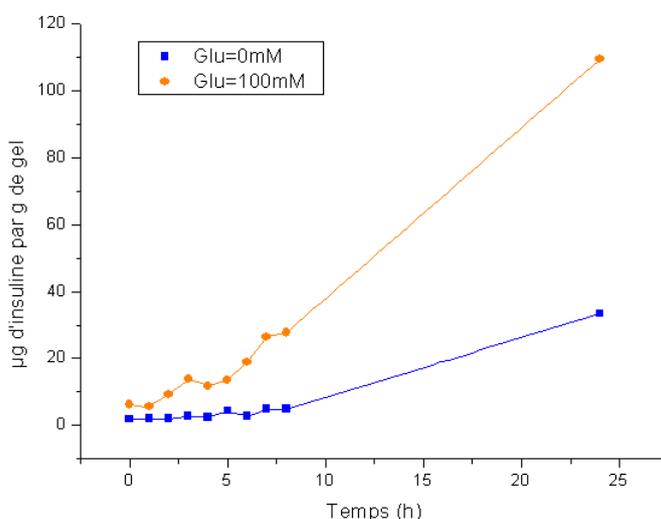


Figure 4.13 : Cinétique de libération d'insuline par des capsules ( $\text{SiO}_2$  dissoute@NIPMAM@NIPMAM-DDOPBA 10% mol.) en fonction de la concentration en glucose. Tampon phosphate (2 mM)  $T=25^\circ\text{C}$ .

Comme leurs homologues monocouches, les édifices bicouches libèrent l'insuline de manière modulée en fonction de la concentration en glucose. Après 8 heures, le profil de libération est sensiblement le même que celui des capsules monocouches. Il est donc surprenant de remarquer que la méthode de suivi cinétique par dialyse a été un échec pour les structures simples mais permet de sonder des différences nettes de libération selon la concentration en glucose pour des structures cœur-écorce. Sans pouvoir tout à fait comprendre ce résultat, nous l'attribuons à des temps caractéristiques de libération beaucoup plus grands. En effet, il semble que les microgels simples libèrent l'insuline sur des temps très courts. La méthode de dialyse n'est donc pas adaptée. En revanche, elle permet de sonder le comportement des structures cœur-écorce, avec une différence marquée selon la présence de glucose. Cela semble indiquer que les temps de libération sont plus lents. Nous remarquons surtout que la

libération en absence de glucose est quasi nulle, ce qui ne se produit pas avec les structures simples. L'agencement des microgels en cœur-écorce semble donc nettement améliorer le problème de fuite d'insuline en absence de glucose.

## **II : Microgels glycosilés sensibles au glucose**

### *II.1 : Développement de nouveaux matériaux*

Dans cette partie du chapitre, nous présentons des microgels sensibles au glucose utilisant un principe de gonflement différent de celui présenté jusqu'à présent. Ce travail s'inscrit dans la perspective de développer à terme des microgels sensibles au glucose mais non thermosensibles. Or, nous l'avons vu jusqu'à présent, la combinaison du réseau thermosensible avec les fonctions boroniques permet d'obtenir un processus de gonflement lié au changement de LCST de la chaîne de polymère. Pour ce faire, nous avons envisagé d'utiliser la réticulation comme un levier pour moduler l'état de gonflement des microgels. Nous proposons d'introduire une réticulation basée sur une complexation entre les boronates et les chaînes de polymères, qui pourrait alors se dissocier en présence de glucose libre. L'introduction de motifs glycosilés sur la chaîne de polymère devrait permettre cette réticulation (Figure 4.14). Ainsi, nous souhaitons synthétiser des objets constitués de réseaux interpénétrés :

- un réseau constitué de liens covalents, obtenu grâce au monomère tétrafonctionnel,
- un réseau constitué de liens réversibles, obtenu par complexation des boronates avec des motifs glycosilés, les deux fonctions étant présentes sur les chaînes. Ainsi, l'introduction de glucose libre dans le milieu devrait entrer en compétition avec les motifs glycosilés et permettre la dissociation du deuxième réseau, engendrant ainsi le gonflement de l'hydrogel. Ce concept ne tient plus compte du caractère thermosensible de l'hydrogel.

Chapitre IV : Développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose – nouvelle route vers la biocompatibilité

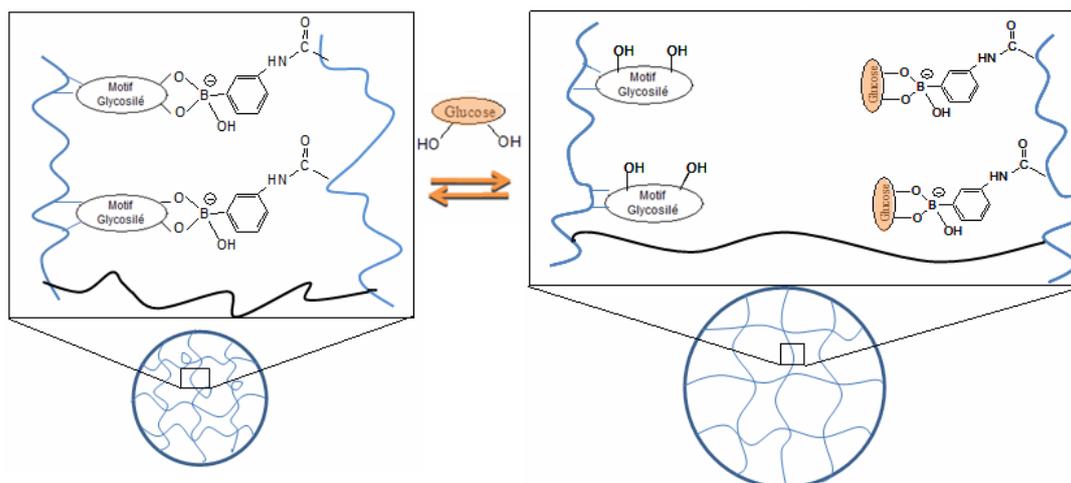


Figure 4.14 : Représentation schématique du gonflement des microgels par compétition du glucose libre avec les motifs glycosilés du réseau, qui forment un réseau interpénétré par complexation avec les boronates.

Afin de voir si ce concept est valide, nous avons essayé de le mettre en œuvre facilement, en introduisant un motif supplémentaire glycosilé aux structures précédemment étudiées. Ainsi, la voie de la copolymérisation radicalaire par précipitation restera privilégiée. Nous introduirons simplement un comonomère supplémentaire, porteur de la fonction glycosilée. Nous avons sélectionné successivement deux candidats : l'acrylamide-2-deoxyglucose (AGA) et le glycosyloxyethyl methacrylate (GEMA), dont les structures sont montrées sur la figure 4.15. Le monomère AGA n'est pas commercial et sa synthèse a été réalisée selon le protocole décrit par Stenzel et al.<sup>241</sup>. Le GEMA possède lui l'avantage d'être disponible commercialement. Cependant, il n'a été identifié que dans un deuxième temps, lorsque le comportement des premiers microgels comportant l'AGA a pu être analysé et leurs limites démontrées.

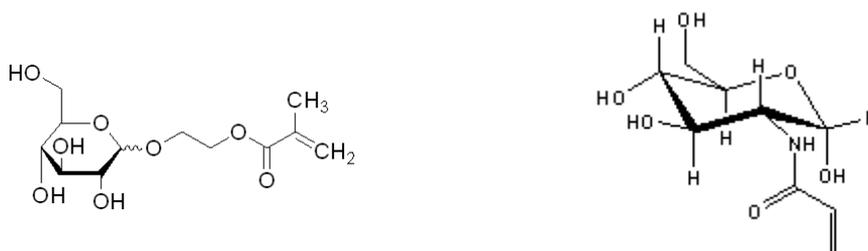


Figure 4.15 : Structure chimique des molécules de GEMA (gauche) et d'AGA (droite).

L'incorporation des ces dérivés glycosilés s'est toujours faite selon le principe de copolymérisation radicalaire des monomères constitutifs. La seule différence réside dans le

fait que nous avons réalisé la synthèse dans un milieu tamponné à un pH=8.5 de façon à favoriser la complexation entre les monomères glycosilés et les monomères à base de PBA. Cette idée s'inspire des principes d'empreinte moléculaire, pour lesquels un réseau de polymère est synthétisé en présence de sa cible pour induire une configuration des motifs de reconnaissance favorable à la complexation de la cible. Nous espérons favoriser ici la proximité entre les motifs glycosilés et les motifs PBA. Les principales caractéristiques des composés obtenus sont récapitulées dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Caractérisations de microgels glycosilés

Nom	Monomère	Réticulant (% mol)	Récepteur au glucose (% mol)	Monomère complexant (% mol)	% B mol. <sup>a</sup>	Polymère soluble (% mt.) <sup>b</sup>	d <sub>H</sub> (nm) T=15°C pH 7,4	d <sub>H</sub> (nm) T>VPTT pH 7,4
<b>NmBPBA10</b>	NIPMAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (10%)	-	8,1	51	502 (0,023)	251 (0,117)
<b>NmBPBA10 AGA10</b>	NIPMAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (10%)	AGA 10%	7,9	51	633 (0,048)	242 (0,157)
<b>NmBPBA10 GEMA10</b>	NIPMAM	BIS (2,5%)	DDOPBA (10%)	GEMA 10%	5,3	74	431 (0,002)	153 (0,135)

a : Taux de Bore dans le microgel, mesuré par analyse élémentaire.

b : Taux de polymère soluble, obtenu après ultracentrifugation (50 000 rpm, 30 min).

Tous les microgels nouvellement synthétisés sont uniformes en taille et ne présentent pas de structure particulière en microscopie électronique (pour exemple, voir Figure 4.16). Leur comportement thermique est alors analysé (Figure 4.17). Sur ce graphe, nous constatons que la température de transition de phase volumique du microgel en absence de glucose est bien plus élevée que pour le composé correspondant sans AGA. La température de transition est plus proche de celle du NIPMAM pur. Ainsi, nous constatons que l'introduction d'AGA induit un déplacement de la VPTT vers les plus hautes températures. Ce résultat est en accord avec le caractère hydrophile des motifs glycosilés. Ce changement de température constitue une preuve indirecte de l'introduction effective d'AGA dans la structure. En effet, les essais menés par RMN du <sup>1</sup>H n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de ces groupes. Sur la figure 4.17, nous remarquons également que cette nouvelle composition est sensible au glucose, comme le prouve l'étude du gonflement en fonction de la concentration en glucose (Figure 4.18). Néanmoins, le caractère thermosensible du pNIPMAM continue de jouer un rôle sur cette sensibilité, puisqu'on observe un déplacement de la VPTT lors de l'ajout de glucose. Cependant, le mécanisme peut également tirer profit de la variation de réticulation, si les motifs AGA se complexent avec les motifs PBA.

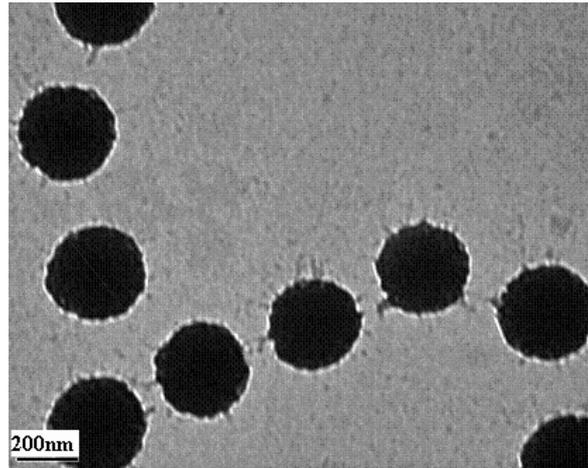


Figure 4.16 : Cliche MET d'un microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA, 10% AGA.

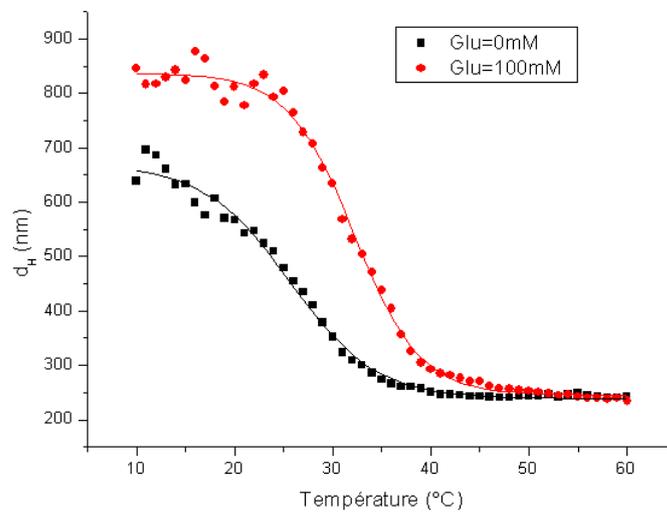


Figure 4.17 : Evolution du diamètre hydrodynamique d'un microgel de NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA, 10% AGA en fonction de la température, en absence et en présence de glucose (100 mM). Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4).

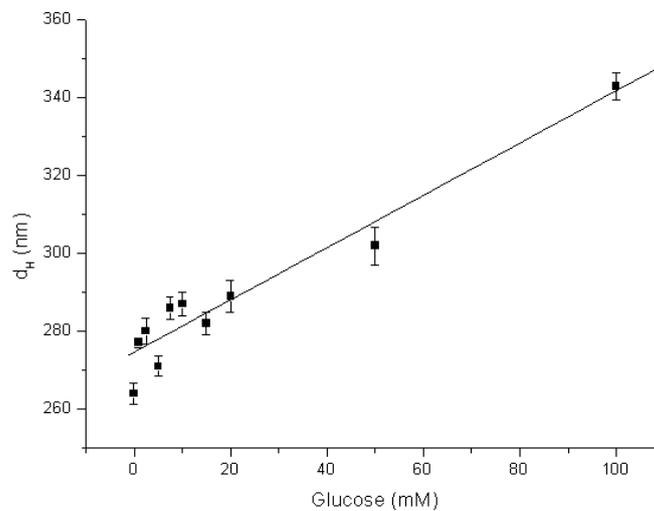


Figure 4.18 : Evolution du diamètre hydrodynamique d'un microgel de NIPMAM, BIS, 10%DDOPBA, 10%AGA en fonction de la concentration en glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=37°C.

Pour comprendre plus finement les mécanismes de gonflement, nous allons avoir recours à la mesure de la mobilité électrophorétique. En effet, si le mécanisme de compétition de complexation est à l'origine d'un changement de la densité de réticulation, alors l'état de charge avant et après gonflement ne doit pas varier. Les complexes inter-chaînes ont *a priori* le même état d'ionisation que la complexation des boronates avec le glucose libre. Ainsi, contrairement aux microgels présentés au chapitre II, la mobilité électrophorétique devrait présenter peu d'écart entre les états sans glucose et avec glucose. Nous constatons qu'un écart significatif existe. Nous en concluons que le mécanisme de réticulation par complexation n'a pas été très efficace.

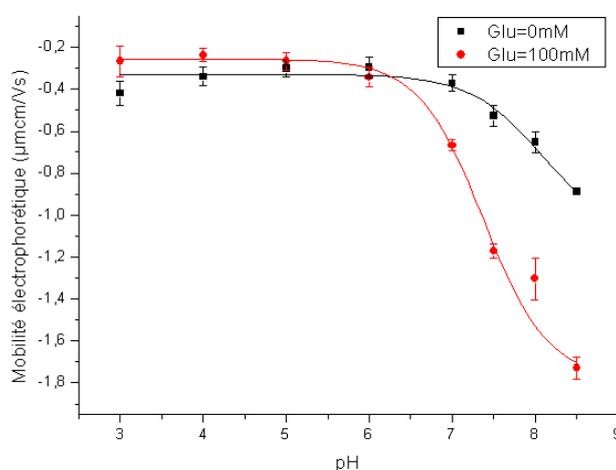


Figure 4.19 : Evolution de la mobilité électrophorétique d'un microgel de pNIPMAM, BIS, DDOPBA-AGA 10% en fonction de la concentration en glucose et du pH. Tampon phosphate (2 mM),  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

Pour expliquer cet échec, nous nous sommes interrogés sur les constantes de complexation de l'AGA ou de son précurseur, la glucosamine, avec les dérivés boroniques. Parmi les nombreuses publications traitant des constantes de complexation entre ce type de motifs et les fonctions boroniques, une seule mentionne la complexation du N-acetyl-D-glucosamine par un polymère porteur de fonctions boroniques<sup>242</sup>. Il ne s'agit pas d'une mesure directe de la constante de complexation mais de son impact sur une variation de LCST du polymère. Les résultats de cette publication montrent de façon évidente que ce composé n'est pas bien complexé. Nous avons voulu vérifier ce phénomène en utilisant les particules développées au chapitre II comme sonde de cette affinité. Nous avons mesuré l'évolution du diamètre des microgels de pNIPMAM-BIS-DDOPBA 10% en fonction de la concentration en N-acetyl-D-glucosamine (Figure 4.20). Nous n'avons pas pris la N-glucosamine car ce composé est chargé et les variations de gonflement n'auraient pas pu être interprétées. Le gonflement est très faible, ce qui prouve que la constante de complexation est elle aussi, très faible.

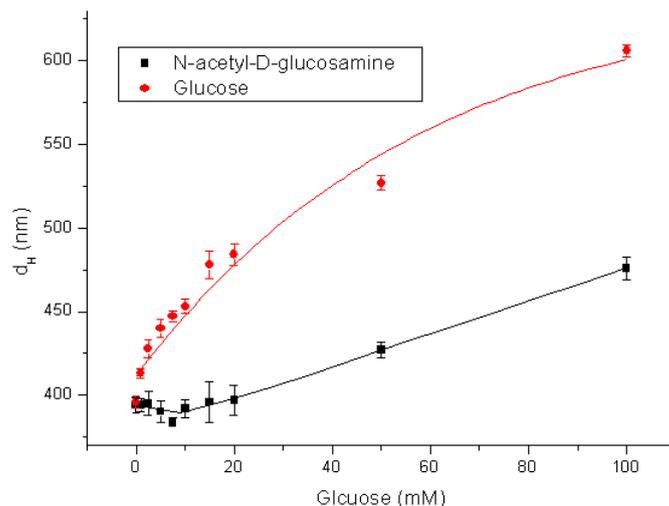


Figure 4.20 : Evolution du diamètre hydrodynamique de microgel de pNIPMAM, BIS, DDOPBA (10%) en fonction du dérivé glucosé. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=25°C.

Afin d'améliorer la complexation inter- et intra-chaînes, nous avons décidé d'opter pour un autre monomère glycosilé, porteur d'une fonction polymérisable de type acrylique ou acrylate, mais cette fois-ci positionnée sur le carbone anomérique du glucose. Le glycosyloxyethyl methacrylate (GEMA) semble répondre à ce critère.

L'introduction de 10% de GEMA à la copolymérisation ne nuit pas à l'obtention de microgels, qui restent monodisperses en taille et sans structuration évidente (Figure 4.22). Comme l'AGA, le GEMA permet d'augmenter l'hydrophilie du réseau de NIPMAM et d'augmenter sa VPTT. Le microgel obtenu reste sensible au glucose, avec toutefois une amplitude moindre (Figure 4.21 et 4.23).

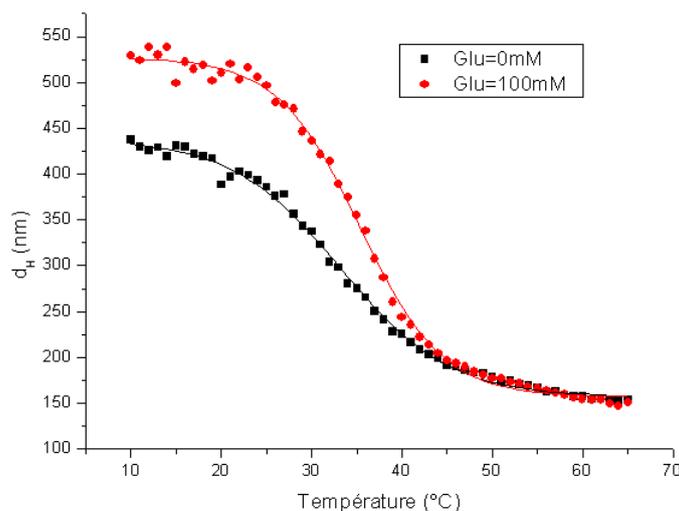


Figure 4.21 : Evolution du diamètre hydrodynamique d'un microgel de NIPMAM, BIS, 10%DDOPBA, 10%GEMA en fonction de la concentration en glucose et de la température. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4).

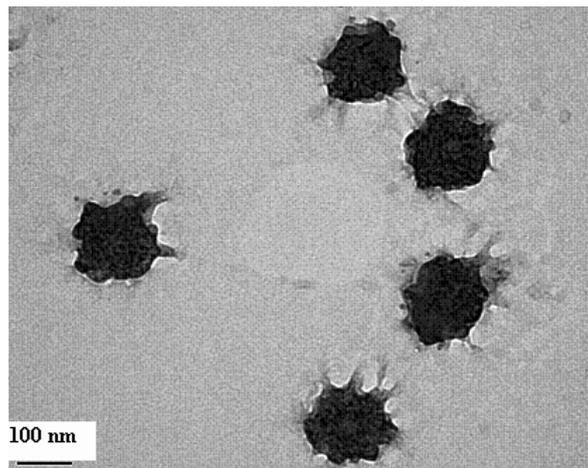


Figure 4.22 : Cliche MET d'un microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA, 10% GEMA.

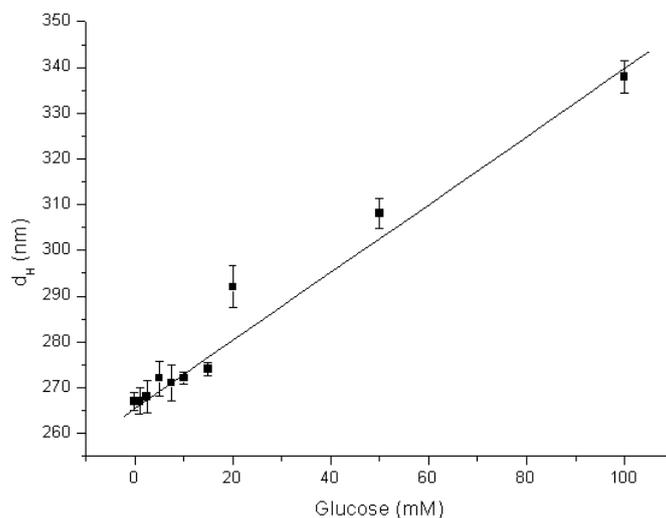


Figure 4.23 : Evolution du diamètre hydrodynamique d'un microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA, 10% GEMA en fonction de la concentration en glucose.

Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4, [NaCl]=150mM), T=25°C.

Afin de sonder le mécanisme de gonflement, nous avons une nouvelle fois analysé la mobilité électrophorétique du microgel en fonction du pH, en l'absence et en présence de glucose (Figure 4.24). Cette fois-ci, les deux courbes sont très similaires. Elles ne présentent pas un écart significatif entre l'absence et la présence de glucose. On pourrait donc en déduire que la complexation inter- ou intra-chaînes dans le réseau a bien lieu. Le réseau ne gonfle pas par une variation de sa charge ou de son hydrophilie, mais il gonfle par variation de la réticulation.

Chapitre IV : Développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose – nouvelle route vers la biocompatibilité

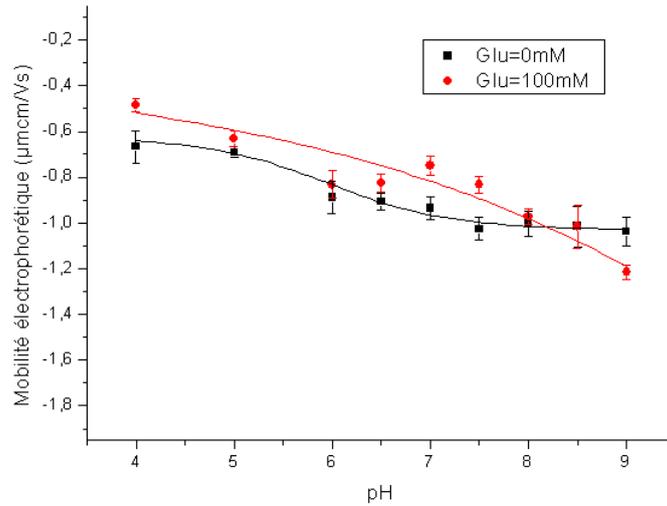


Figure 4.24 : Evolution de la mobilité électrophorétique d'un microgel de GEMA 10% en fonction de la concentration en glucose et du pH. Tampon phosphate (2 mM), T=25°C.

II.2 Application des microgels glycosilés à l'encapsulation et la délivrance d'insuline

Les objets que nous venons de décrire précédemment sont maintenant utilisés pour encapsuler de l'insuline et aussi pour étudier leur potentiel en terme de délivrance. La méthode d'imprégnation que nous avons développée pour les microgels simples a été réutilisée pour ces nouveaux objets. Afin de comparer les résultats, les valeurs de taux d'encapsulation d'un microgel simple sont rappelées.

Tableau 4.2 : Caractérisations de microgels glycosilés

Gel						[insu]=0,1mg/mL
Monomère	Réticulant	DDOPBA	Monomère complexant	SDS	$\left(\frac{d_H}{d_0}\right)^3$	Insuline par qtté de microgel (mg/g)
NIPMAM	BIS	10%	-	oui	8	1,1
NIPMAM	BIS	10%	AGA 10%	oui	17,9	1,6
NIPMAM	BIS	10%	GEMA 10%	oui	22,4	5,8

<sup>a</sup>  $d_H$  = diamètre hydrodynamique à 15°C ;  $d_0$  = diamètre hydrodynamique à l'état contracté (T>VPTT).

Il est notable que la quantité d'insuline encapsulée est bien plus grande que celle emprisonnée pour des microgels simples. En présence de GEMA, le rapport avec un microgel simple est 5 fois plus grand. Indéniablement, le taux de gonflement est beaucoup plus important ce qui souligne le caractère hydrophile des monomères complexants d'AGA et de GEMA. De manière à caractériser la libération, nous nous sommes intéressés à ce dernier microgel. La

méthode de dialyse n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. En revanche, la méthode de centrifugation-redispersion a permis de montrer le caractère glucose-sensible de la libération d'insuline (Figure 4.25). Nous retrouvons une signature proche de celle du composé à base de NEMAM-DDOPBA (Figure 3.22 du chapitre III), avec une libération très rapide dès les premiers instants. Ce type de cinétique peut être simplement lié à la température qui est de 37°C pour ces deux composés. La cinétique est légèrement plus lente pour tous les composés étudiés à 25°C par cette méthode. Nous notons que la quantité libérée est voisine de celle des microgels décrits au chapitre III, alors que la quantité encapsulée est nettement supérieure. Ce résultat reste inexpliqué à ce jour.

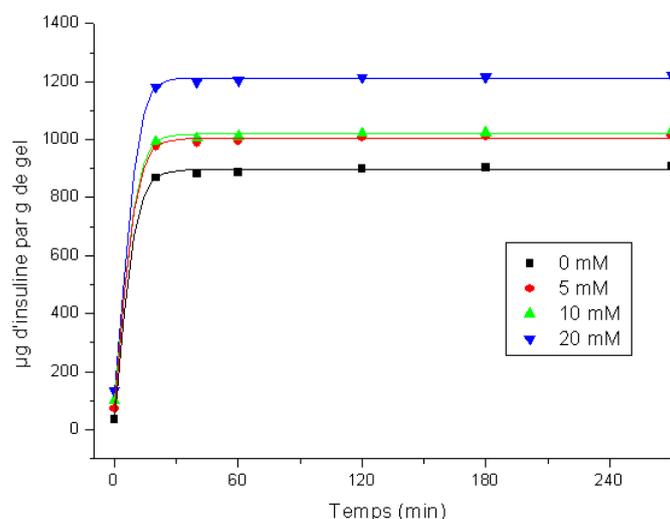


Figure 4.25 : Cinétique de libération d'un microgel NIPMAM, BIS, DDOPBA et GEMA (10%).  
Tampon PBS,  $T=37^{\circ}\text{C}$ .

### II.3 : Biocompatibilité des matériaux

Afin d'amorcer une démarche vers la délivrance d'insuline *in vivo*, nous avons entrepris une première série de tests de cytotoxicité des microgels vis-à-vis des cellules. Ces tests ont été réalisés à la plateforme technologique de Xavier Arnozan, en collaboration avec Marlène Durand et Martine Renard.

Nous avons pour objectif de rechercher des différences de comportement entre différentes structures chimiques de microgels, afin, si possible, de dresser un guide pour les orientations futures. Ainsi, nous avons choisi de tester des formules de références décrites au chapitre II, l'une à base NIPMAM-DDOPBA, l'autre à base de NEMAM-DDOPBA, auxquelles nous avons comparé les formules incluant des motifs glycosylés. Nous souhaitons en particulier voir quel est le rôle de l'hydrophilie du microgel. Il est en effet supposé que les structures plus

hydrophobes s'adsorbent plus facilement et de façon non spécifique, que les structures hydrophiles. Afin de différencier l'influence de la structure chimique de celle de l'état physique du microgel, nous avons également choisi de mener une étude sur un matériau identique mais dans des conditions de température différente, afin d'étudier le rôle du gonflement.

Il s'agit d'une étude de cytotoxicité directe (les microgels sont amenés au contact de lignée cellulaire), par deux méthodes (métabolique et viabilité), de microgels aux concentrations de 5, 1 et 0,5 mg/mL repris en milieu de culture, sur la lignée 3T3 (fibroblastes de souris). Les concentrations ont été choisies de façon à ce que la suspension reste liquide. Les microgels sont au préalable stérilisés par deux expositions successives de 15 minutes d'UV. Ils sont ensuite redispersés dans un milieu de culture (M199 + 10% SVF). Nous avons vérifié que le milieu de culture n'entraînait pas de floculation des microgels (Figure 2.31 Chapitre II). Cette suspension est alors déposée pendant 24H sur des cellules à subconfluence, à 37°C ou 25°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>. Pour les cultures cellulaires, les contrôles sont :

- négatifs : de l'agar (stérilisé et aux mêmes concentrations), et du milieu de culture,
- positifs : du phénol 64 g/L.

### *II.3.1 : Le test du MTT*<sup>243</sup>

Le MTT (Bromure de 3-(4-5 diméthylthiasol-2-yl)diphényl tétrazolium) est un sel de tétrazolium de couleur jaune en solution aqueuse à pH neutre. Il est réduit en cristaux bleus de formazan par les succinates déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. La quantité de formazan généré par les cellules après leur incubation avec le MTT est directement liée à leur activité métabolique.

- les cellules sont préalablement rincées au PBS avant le dépôt du substrat.
- dépôt de 200 µL de MTT dilué dans du DMEM sans rouge de phénol.
- le substrat est mis au contact des cellules 3h à 37°C (95% d'humidité, 5% CO<sub>2</sub>).
- le surnageant est ôté.
- les cellules sont lysées à l'aide de 130 µL de DMSO pur afin de solubiliser les cristaux de formazan intracellulaires.
- 100 µL sont transférés en 96 puits pour la lecture de densité optique.

La lecture de l'intensité de la coloration sur le lecteur de plaque est effectuée à la longueur d'onde de 550 nm contre une longueur d'onde de référence de 630 nm. Les résultats bruts

sont exprimés en unité d'absorbance pour une densité optique à 540 nm, en % du milieu et en % de l'agar.

### *II.3.2 : Le test du Rouge Neutre*<sup>244</sup>

Le Rouge Neutre (RN) est un colorant vital qui se fixe par liaison électrostatique sur les sites anioniques de la matrice lysosomiale et toute diminution de l'incorporation de ce colorant traduit une altération de l'intégrité membranaire de ce compartiment :

- dépôt de 200µL de rouge neutre dilué dans du DMEM sans rouge de phénol,
- les cellules sont préalablement rincées au PBS avant le dépôt du substrat,
- le substrat est mis au contact des cellules 3h à 37°C (95% d'humidité, 5% CO<sub>2</sub>),
- le surnageant est ôté,
- les cellules sont lysées à l'aide de 130 µL d'acide acétique (à 1% (v/v) dans de l'éthanol à 50% (v/v)),
- 100 µL sont transférés en 96 puits pour la lecture de la densité optique.

La lecture de l'intensité de la coloration sur le lecteur de plaque est effectuée à la longueur d'onde de 550 nm contre une longueur d'onde de référence de 630 nm. Les résultats bruts sont exprimés en unité d'absorbance pour une densité optique à 540 nm, en % du milieu et en % de l'agar.

### *II.3.3 : Résultats*

La cytotoxicité des matériaux est avérée pour une viabilité (en % du résultat pour le milieu seul) inférieure à 80%. Toutes les expériences sont répliquées 3 fois, avec à chaque fois, 3 mesures pour chaque concentration. Ne pourront être interprétables que les expériences pour lesquelles le phénol est toxique (donc < 80%), et le milieu non toxique (> 80%). A ce titre, certaines études à 25°C n'ont pas été interprétables (Figures 4.26 et 4.27). De plus, il convient de souligner que le test au rouge neutre est moins pertinent que celui au MTT. En effet, il mesure l'adsorption du colorant sur la matrice. Or, lors de ces essais, il a été remarqué que certains microgels se collaient à la surface des cellules et emprisonnaient le rouge neutre à cette surface. Ainsi, le rouge neutre peut être légèrement surdosé, sans que cet artefact ne soit quantifiable. Nous reporterons tout de même cette analyse car les résultats obtenus par le test au rouge neutre sont similaires à ceux du MTT. Il sera intéressant par la suite de quantifier l'adhésion des microgels à la surface des cellules.

Chapitre IV : Développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose – nouvelle route vers la biocompatibilité

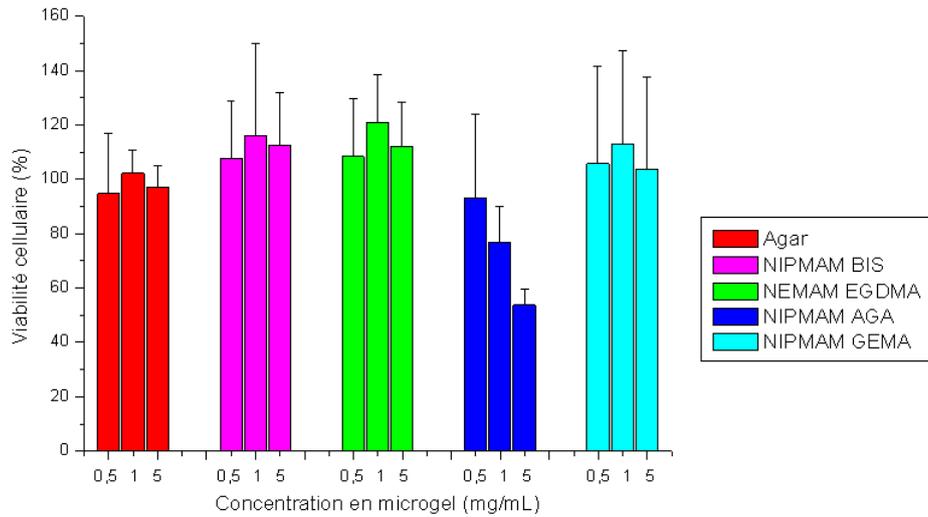


Figure 4.26 : Evolution de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration et de la nature en microgel. Test MTT,  $T=37^{\circ}\text{C}$ .

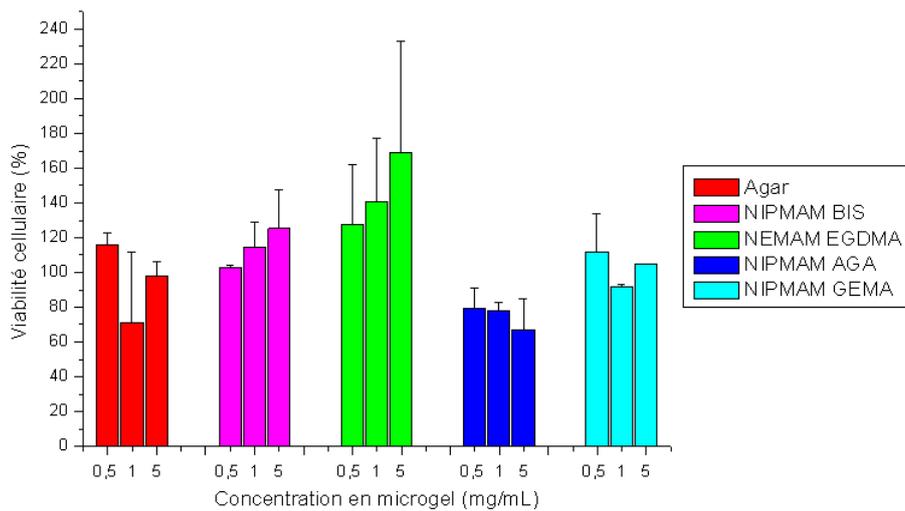


Figure 4.27 : Evolution de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration et de la nature en microgel. Test RN,  $T=37^{\circ}\text{C}$ .

Le résultat de ces expériences est assez surprenant. Les cellules survivent en présence de microgels totalement synthétiques, fonctionnalisés par du PBA. La seule cytotoxicité détectée apparaît pour les microgels contenant de l'AGA. Nous nous attendions au contraire à ce que l'introduction de motif améliore l'hydrophilie du système et donc la biocompatibilité. Ce résultat a priori surprenant nous suggère une autre interprétation. Il se peut que les microgels n'aient aucune cytotoxicité tant qu'ils restent à l'état de microgels, dans un milieu totalement débarrassé des contaminants hydrosolubles. Il se peut que l'élimination des polymères

## Chapitre IV : Développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose – nouvelle route vers la biocompatibilité

hydrosolubles par centrifugation n'ait pas été totalement efficace pour le microgel à base d'AGA.

En l'absence de cytotoxicité, la comparaison de l'influence de la température n'apporte pas d'information sur l'influence de l'état de gonflement (Figure 4.28).

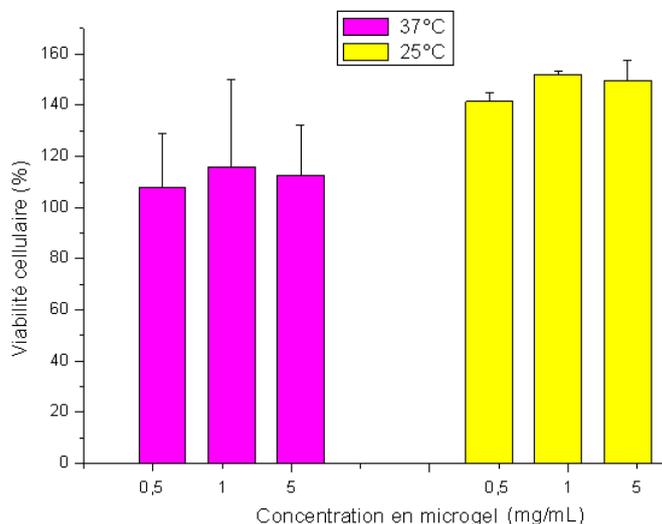


Figure 4.28 : Evolution de la viabilité cellulaire en fonction de température et de la concentration en microgel NIPMAM, BIS, DDOPBA (10%). Test MTT.

Toutefois, ces conclusions ne sont que préliminaires et nécessitent une étude plus approfondie. Ces expériences seront à renouveler afin de voir si la cytotoxicité ne se révèle pas à plus forte teneur en microgels.

### III : Conclusion au chapitre développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose – nouvelle route vers la biocompatibilité

En définitive les formulations de microgels qui ont été détaillées dans les chapitres précédents ont été utilisées pour synthétiser des édifices de nature chimique comparable mais dont les caractéristiques structurales ou les mécanismes de gonflement sont différents. Comme pour les objets précédents, l'insuline a été incorporée dans ces nouveaux vecteurs de délivrance et la quantité d'insuline a pu être augmentée selon la structure ou la chimie de ces nouveaux outils. Le comportement vis-à-vis de la délivrance d'insuline s'est révélé différent selon les structures. Les structures cœur-écorce en particulier, montrent une meilleure étanchéité en absence de glucose.

Les structures comportant des groupements glycosilés ont été synthétisées pour évaluer le potentiel d'un autre mécanisme de gonflement ne nécessitant pas de polymère à LCST. Ce type de gonflement pourrait être mis en œuvre pour des microgels à base de polymères naturels, parfaitement biocompatibles. Le caractère hydrophile de ces structures nous a incités à regarder leur impact sur la cytotoxicité.

Ainsi, les premières études de cytotoxicité ont été initiées de manière à comprendre l'influence de la chimie et plus particulièrement du caractère hydrophile des microgels sur la viabilité cellulaire de lignées de cellules. Ces résultats sont encourageants car la plupart des microgels n'ont pas révélé de toxicité, ce qui tend à prouver que l'acide phénylboronique peut être utilisé dans ces structures sans être néfaste à ces concentrations. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour comprendre l'origine de la cytotoxicité révélée par une formule et pour essayer de quantifier l'adhésion des microgels sur les cellules. La cytotoxicité devra être évaluée dans des concentrations plus importantes. Dans tous les cas, cette série de mesures n'est qu'un premier pas vers des applications biologiques et devra être menée de manière systématique et plus approfondie pour des microgels spécifiquement conçus pour les applications *in vivo*.



**Chapitre V : Développement d'une nouvelle  
génération de microgels sensibles au glucose par  
contraction - nouvelle route vers l'élaboration de  
capteurs**



Dans ce chapitre, nous allons revenir sur la sélectivité des microgels sensibles au glucose. En effet, les structures présentées jusqu'à ce point du manuscrit ont pour caractéristique commune une augmentation du taux de gonflement lors de l'ajout de glucose. Comme nous l'avons montré aux chapitres III et IV, cette variation peut être utilisée de façon avantageuse pour la délivrance d'insuline asservie à la glycémie. Toutefois, les études abordées ont été réalisées *in vitro* dans des milieux simples, s'affranchissant ainsi d'éventuels problèmes d'interférences avec d'autres saccharides présents dans le milieu. Or, nous avons mis en évidence que ces interférences étaient réelles, même si nous pouvons penser qu'elles puissent être négligeables vu les faibles concentrations physiologiques des interférents. Il y a donc un intérêt certain à envisager la synthèse de microgels sensibles au glucose et sélectifs du glucose. Nous allons donc décrire sur quels principes repose l'obtention d'un hydrogel sélectif avant de développer la stratégie que nous avons utilisée pour appliquer ce principe à la construction de microgels.

## **I : Introduction au chapitre et rappel sur le principe de la contraction**

Dans la majorité des études décrites dans le chapitre I, le mécanisme de gonflement en réponse à une augmentation de la concentration en glucose ou plus globalement en saccharides entraîne une augmentation de la taille du réseau. L'origine de la variation de l'état de gonflement d'un hydrogel si nous nous en référons à la théorie de gonflement décrite au chapitre I peut être reliée à trois causes :

- une variation de la densité de réticulation,
- une variation de la densité de charge,
- une variation de l'affinité entre le polymère et le solvant.

Le phénomène de contraction de la taille du microgel ou plus globalement d'un hydrogel alors que la concentration en saccharides augmente est moins décrit mais présente cependant des avantages certains, notamment en ce qui concerne la sélectivité,<sup>90, 102, 112, 140, 141, 144</sup>. En effet, le mécanisme de reconnaissance est différent et permet la sélectivité vis-à-vis de la détection du glucose.

### *I.1 : Contraction par effet de densité de réticulation et sélectivité*

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre I §.III, les acides boroniques peuvent complexer le glucose de façon sélective, en tirant partie du fait que le glucose est l'un des seuls monosaccharides présents *in vivo* à présenter deux fonctions diols dont la stéréochimie

est favorable à une complexation simultanée par deux fonctions boroniques. Il est alors question de complexe bis-boronate-glucose, encore noté complexe 2 : 1. Le D-glucose, est présent en solution sous différentes formes isomériques : les anomères  $\alpha$ - et  $\beta$ -glucofuranose et  $\alpha$ - et  $\beta$ -glucopyranose. Ces espèces proviennent de la conversion de la forme linéaire aldehydoglucose au cours d'un processus appelé la mutarotation. A l'équilibre, la forme la plus commune est la forme  $\alpha$ -pyranose (60,9%) tandis que la forme  $\beta$ -pyranose représente 38,8%. Les formes furanose ne représentent que 0,15% chacune<sup>245</sup>. Le mode de complexation 2 : 1 a été sujet à controverse car différentes études menées sur des récepteurs moléculaires ont montré que cette complexation pouvait avoir lieu sous forme pyranose dans certains cas<sup>246, 247</sup> mais plutôt sous forme furanose dans d'autres situations<sup>210, 248, 249</sup>. Dans le cas des solutions aqueuses, la RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  indique que la forme furanose est prépondérante, le premier site boronique se liant aux OH en position (1,2) de la forme furanose du D-glucose, tandis que le second se lie aux positions (5,6) en milieu aqueux ou (3,5,6) en milieu aqueux basique (Figure 5.1).

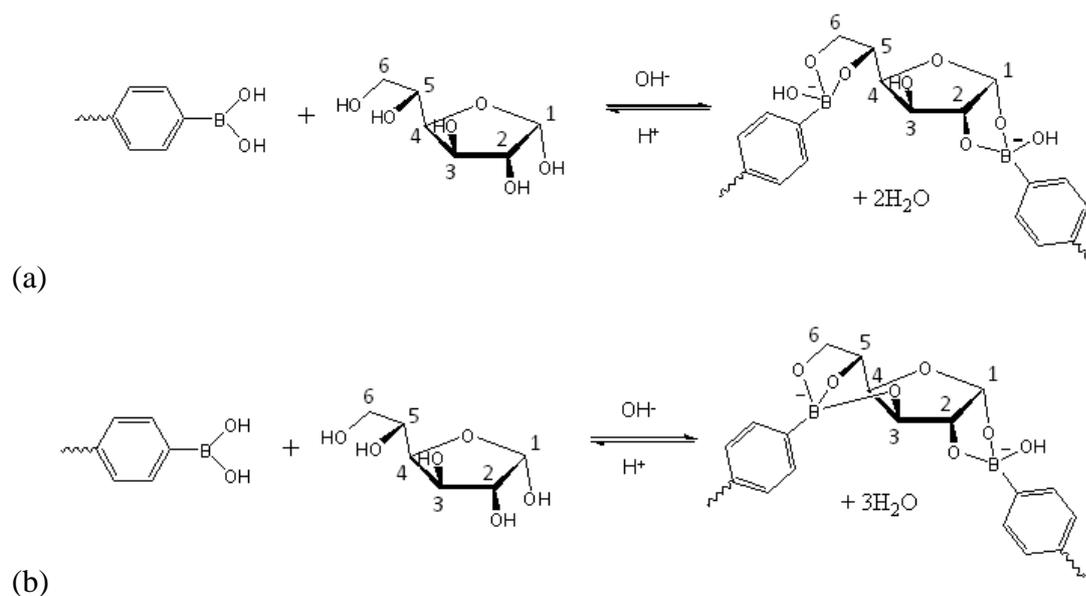


Figure 5.1 : Equilibre de complexation PBA/Glucose en conditions acides (a) ou basiques (b).

Au-delà de ces considérations supramoléculaires, la mise en œuvre de tels complexes permet d'obtenir des hydrogels qui se contractent en présence de glucose. En effet, la formation de ces liens induit des points de réticulation supplémentaires qui conduisent à une augmentation de l'élasticité du gel. Depuis les travaux pionniers d'Asher<sup>102</sup>, plusieurs types d'hydrogels fonctionnalisés par des fonctions boroniques ont permis de construire des capteurs spécifiques. Pour favoriser ce mécanisme par rapport au complexe 1 : 1, il semble nécessaire

d'introduire des charges positives dans la structure du réseau. Les travaux initiaux d'Asher utilisaient la présence d'éther couronnes ou de chaînes poly(éthylenglycol) pendantes pour piéger les ions sodium tandis que par la suite, tous les hydrogels testés<sup>112, 140-142</sup> ont incorporé des fonctions amines, chargées positivement au pH considéré. Ces charges positives ont vraisemblablement pour rôle de permettre l'approche des deux boronates chargés négativement et leur complexation avec le glucose en limitant la répulsion électrostatique entre eux. Cependant, l'équipe d'Asher a montré plus récemment qu'il était possible d'obtenir ce type d'hydrogels sans avoir recours à des charges positives, simplement en augmentant très fortement la densité de fonctions boroniques dans le gel<sup>138</sup>.

Toutefois, si les travaux relatifs aux hydrogels contractiles commencent à être nombreux, ceux concernant les microgels restent quasiment inexistantes. Les seules structures contractiles rapportées dans la littérature ont été synthétisées par l'équipe de Pelton<sup>223</sup>. Il s'agit de microgels à base de NIPAM copolymérisés en présence de dérivés d'amines et fonctionnalisés par des récepteurs PBA. Ces microgels amphotères présentent, selon la composition chimique et dans certaines conditions environnementales, un comportement de gonflement ou de contraction. Le mécanisme de contraction repose sur le changement de la densité de charge des microgels en fonction de la concentration en glucose. En effet si la charge globale initiale du microgel est positive, l'addition de glucose entraînera l'apparition de charges négatives (par les esters boroniques). La charge globale du microgel sera donc moins grande et l'hydrogel se contractera. En revanche si le microgel est déjà de charge négative, alors l'addition de glucose ne fera qu'augmenter la charge nette du réseau et le microgel gonflera. Si la reconnaissance d'un saccharide entraîne une contraction du microgel, ce mode de sensibilité ne semble pas être sélectif. En effet, il ne repose que sur la variation de l'état de charge du récepteur et du microgel en fonction de la concentration en glucose et non sur la formation d'un bis-bidentate. Bien que les expériences n'aient pas été réalisées, nous pouvons aisément imaginer que n'importe quel saccharide amènera cette variation de charge nécessaire pour différencier l'état initial de l'état final. Aussi, même si ce principe est élégant, le microgel n'est pas sélectif d'un type de sucre.

## II : Stratégie de contraction, influence du réticulant

Partant des résultats obtenus par Asher sur l'influence de la présence de poly(éthylène glycol) au voisinage des fonctions boroniques pour favoriser les complexes bis-bidentate, nous avons entrepris une étude plus poussée du comportement de la série de microgels développée dans le chapitre II, dans le but notamment de sonder l'influence de la nature du réticulant. En effet, comme nous l'avons déjà souligné, le réticulant a dû être adapté au choix du monomère alkylacrylamide. Nous avons été amenés à incorporer dans la structure de notre réseau un monomère difonctionnel comportant une fonction oxyde d'éthylène, similaire aux chaînes PEG utilisées par Asher. Ainsi, des microgels utilisant le BIS ou l'EGDMA ont été synthétisés. Une même formule a été obtenue avec chacun de ces deux agents réticulants. Nous allons donc pouvoir sonder l'influence de la nature du réticulant sur le comportement des microgels en présence de glucose.

### II.1 : Comportement des microgels en présence de glucose à différents pH

Nous reprenons donc les études menées au chapitre II et les complétons par une investigation du comportement des microgels dans différents pH. Ainsi, le gonflement des microgels NEMAM/EGDMA/DDOPBA 10% et NIPMAM/EGDMA/DDOPBA 10% à différentes concentrations en glucose est étudié à pH 8,5 et comparé aux résultats initiaux (Figures 5.2 et 5.3). Ces deux études sont menées à une température de 25°C, c'est-à-dire loin de la VPTT de ces systèmes.

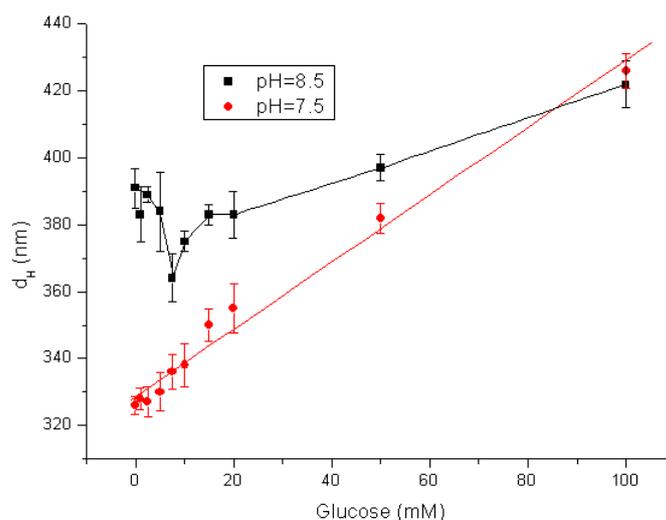


Figure 5.2 : Evolution du diamètre hydrodynamique d'un microgel NEMAM, EGDMA, 10%DDOPBA en fonction de la concentration en glucose et du pH du milieu.  
Tampon (phosphate ou Tris 2 mM, [NaCl]=150 mM), T=25°C.

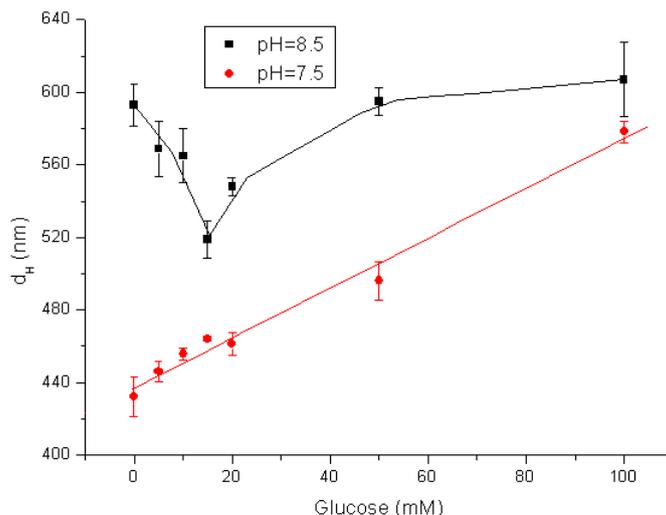


Figure 5.3 : Evolution du diamètre hydrodynamique d'un microgel NIPMAM, EGDMA, 10% DDOPBA en fonction de la concentration en glucose et du pH du milieu. Tampon (phosphate ou Tris 2mM, [NaCl]=150 mM), T=25°C.

Pour les deux types de microgels, le comportement à pH 7,5 et 8,5 est très différent. La principale différence entre les deux pH réside dans le comportement de gonflement aux plus faibles concentrations en glucose. A pH=7,5, le microgel gonfle, alors qu'à pH=8,5 le microgel est initialement gonflé car les acides boroniques sont sous forme ionisés. En ajoutant du glucose dans le milieu, le microgel commence d'abord par se contracter, puis gonfler. Il s'avère donc que les microgels synthétisés dans un but de gonflement au glucose sont capables de se contracter lorsqu'ils sont utilisés loin au-dessus de leur pKa. Nous allons chercher à comprendre quels sont les paramètres qui influencent cette contraction.

## II.2 : Influence de la composition du microgel

Nous venons de montrer que les deux formules contenant de l'EGDMA comme réticulant sont susceptibles de contraction à pH 8,5. Afin de vérifier que le comportement contractile est lié au rôle du réticulant, nous comparons le comportement dans les mêmes conditions des microgels NIPMAM/BIS/DDOPBA 10%. Celui-ci gonfle quelle que soit la concentration en glucose (Figure 5.4). Il apparaît clairement que l'EGDMA est responsable du phénomène de contraction. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'EGDMA présente un groupe oxyde d'éthylène, tout comme le PEG introduit dans les hydrogels par Asher. Le rôle de ce groupement a été attribué à sa capacité d'immobilisation des cations du milieu comme les ions Na<sup>+</sup>, ce qui permet ainsi de réduire la répulsion électrostatique entre boronates adjacents et qui favorise les complexes 2 : 1. Afin de vérifier cette hypothèse, nous étudions la

réponse des microgels contractiles en absence et en présence de sel (Figure 5.5). La contraction persiste en absence de sel mais l'amplitude de la réponse est bien plus faible (le taux de gonflement passe de 1 à 0,88 alors que la contraction atteint 0,67 en présence de sel), ce qui tend à confirmer le mécanisme de stabilisation par les groupes oxydes d'éthylène et l'importance des ions sodium.

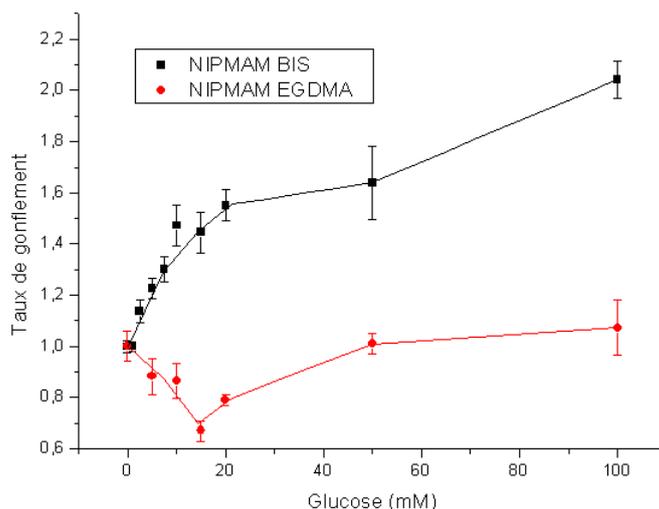


Figure 5.4 : Evolution du taux de gonflement pour deux microgels de pNIPMAM réticulés par du BIS et de l'EDGMA en fonction de la concentration en glucose. Tampon TRIS (2 mM, pH=8,5, [NaCl]=150 mM), T=25°C.

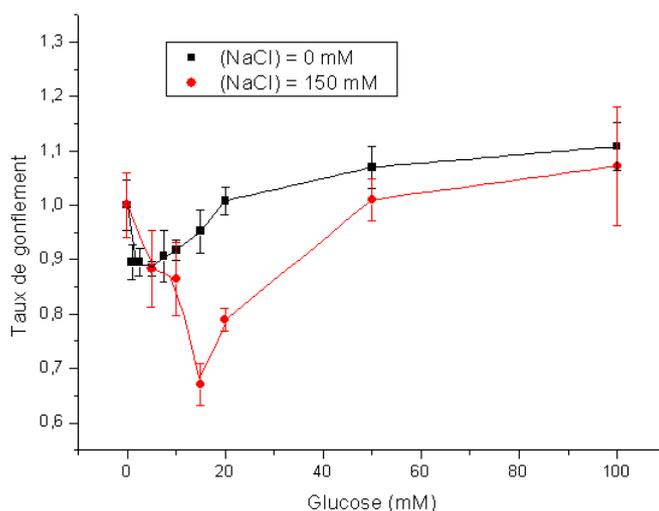


Figure 5.5 : Influence de la présence de sel sur la contraction d'un microgel NIPMAM, EGDMA, DDOPBA. Tampon TRIS (2 mM, pH=8,5), T=25°C.

### II.3 : Influence de la concentration en DDOPBA

Comme nous l'avons vu dans les études précédentes, les conditions pour obtenir une contraction de microgel sont la présence d'EGDMA, de cations apportés par le sel et immobilisés sur la matrice et une température inférieure à la VPTT.

Pour l'heure, la contraction n'a été observée qu'à un pH de 8,5, c'est-à-dire au-dessus du pKa du DDOPBA. Notre objectif est désormais d'étudier plus avant d'autres formules de microgels susceptibles de répondre à ces critères, en espérant générer une contraction à pH physiologique. Ainsi, nous avons sondé des microgels contenant de l'EDGMA et des teneurs supérieures en DDOPBA. Nous avons donc étudié la réponse d'un microgel dont le taux de récepteur est augmenté à 15% (Figure 5.6). L'augmentation du taux de récepteurs dans le microgel ne favorise pas l'établissement du phénomène de contraction dans les conditions physiologiques. Tout au plus, nous exaltons la réponse dans les conditions précédentes de pH élevés (pH=8,5).

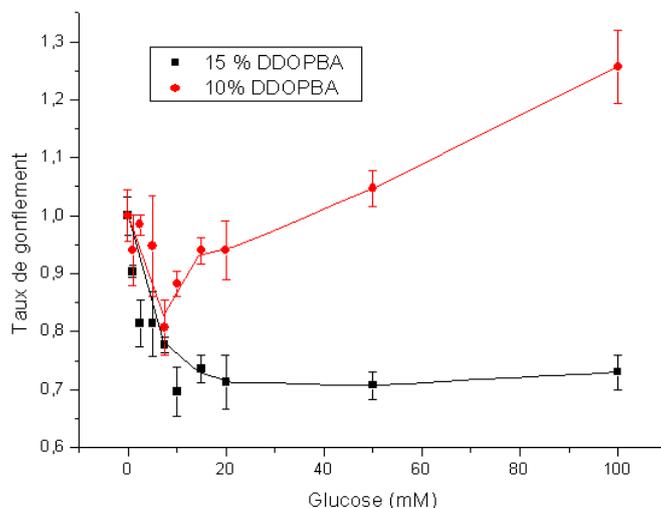


Figure 5.6 : Evolution NEMAM, EGDMA, DDOPBA en fonction de la concentration en glucose. Tampon tris (2 mM, pH=8,5, [NaCl]=150 mM), T=25°C.

Le puits de contraction est, en effet, augmenté. Pour 10% en DDOPBA, le microgel se contracte jusqu'à un taux de gonflement de 0,8. En revanche pour le microgel à 15% en DDOPBA, la contraction atteint une valeur inférieure (0,69). Il convient de noter que nous n'avons pas pu introduire plus de récepteurs au glucose dans le microgel. Pour une composition de 20% en DDOPBA dans le milieu réactionnel, les microgels deviennent polydispersés et partiellement agrégés.

#### II.4 : Mise en évidence de la sélectivité

De manière à illustrer la sélectivité de la complexation 2 : 1, nous avons étudié l'évolution du taux de gonflement d'un microgel à deux saccharides différents : le glucose et le fructose (Figure 5.7).

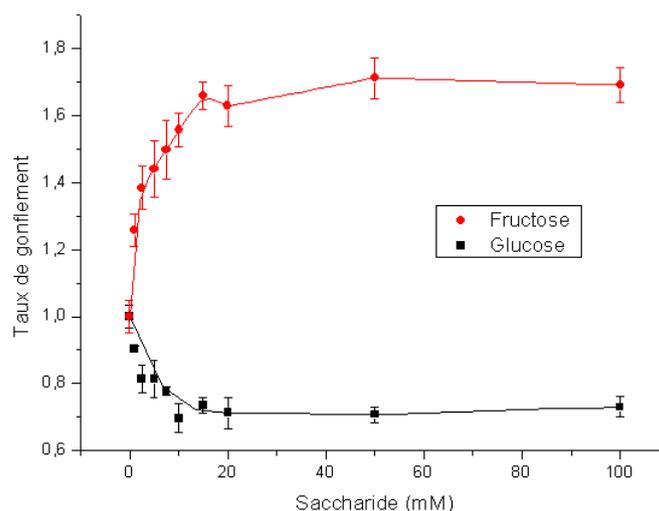


Figure 5.7 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NEMAM, EGDMA, 15% DDOPBA en fonction de la concentration et de la nature du saccharide. Tampon Tris (pH=8,5, [NaCl]=150 mM), T=25°C.

Alors que le microgel se contracte en présence de glucose, le même microgel gonfle en présence de fructose et ceci dans les mêmes conditions de pH, de salinité et de température. Ce comportement est une preuve indirecte que la contraction est bien liée à la complexation 2 : 1, qui est sélective du D-glucose par rapport aux autres saccharides. Ainsi, nous avons réussi à élaborer les premiers microgels sensibles au glucose et sélectifs. Cependant, ce concept serait d'autant plus élégant s'il pouvait présenter le même profil de réponse à pH physiologique. Après avoir montré les limitations de la série de microgels constitués d'EDGMA, nous nous sommes tournés vers une autre stratégie.

### III : Stratégie de contraction autour de la diminution du pKa du récepteur

Le bilan effectué sur le comportement des microgels à base d'EDGMA montre que les microgels se contractent en présence de glucose lorsqu'ils sont utilisés dans un état initial très gonflé, c'est-à-dire pour un pH très largement au-dessus du pKa du dérivé boronique et à une température bien en-dessous de la VPTT. Pour obtenir une contraction à pH physiologique, il semble désormais utile de revisiter le pKa du dérivé boronique. Or, la chimie nous a déjà

permis d'améliorer ce point en synthétisant le DDOPBA. Néanmoins, nous avons montré au chapitre II que l'abaissement du pKa d'un comonomère ne peut être assuré que dans une certaine gamme. Une autre méthode couramment utilisée pour augmenter l'acidité du bore consiste à modifier son environnement, notamment via l'introduction d'une amine dans le réseau de polymère<sup>97</sup>. En effet, la présence de l'atome d'azote, riche en électrons, permet des interactions acide-base de Lewis avec le bore, lui-même pauvre en électrons. Ceci a pour conséquence d'abaisser le pKa du dérivé boronique et de protéger le complexe glucose-boronate de l'hydrolyse à bas pH<sup>118</sup>.

C'est cette méthode que nous avons choisie de mettre en œuvre pour diminuer le pKa de l'acide phénylboronique et ainsi, tester son efficacité sur la sélectivité du microgel. Cette voie est plus simple à mettre en œuvre que la modification de la structure chimique du récepteur, qui aurait été plus longue et plus lourde en termes d'investissement.

### *III.1 : Incorporation d'allylamine dans les microgels*

Nous avons choisi d'introduire la fonction amine par copolymérisation de l'allylamine (Figure 5.8) avec les comonomères habituels. Nous nous sommes focalisés sur les microgels à base de NIPMAM dont la réactivité permet une synthèse plus modulable en terme de réticulant associé, puisqu'aussi bien le BIS que l'EGDMA peuvent être utilisés. En outre, l'utilisation de BIS permettra de mettre plus facilement en évidence le rôle de l'amine sur la sélectivité alors que celui de l'EGMA n'est plus à démontrer.

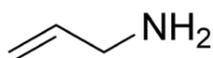


Figure 5.8 : Structure de l'allylamine.

Trois nouveaux microgels ont alors été synthétisés et sont présentés ci-dessous. Ces microgels seront comparés aux microgels de référence sans allylamine. Leur comparaison entre eux nous permettra de déterminer l'influence de la nature du réticulant ainsi que l'influence de la teneur en allylamine. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Caractérisation de microgels qui incorporent de l'allylamine

Nom	Monomère	Réticulant (% mol)	Allylamine (% mol)	Récepteur au glucose (% mol)	% B mol. <sup>a</sup>	Polymère soluble (% mt.) <sup>b</sup>	d <sub>H</sub> (nm) T=15°C pH 7,4 (PDI)	d <sub>H</sub> (nm) T>VPTT pH 7,4 (PDI)
NmBPBA10	NIPMAM	BIS (2,5%)	0	DDOPBA (10%)	8,1	51	502 (0,023)	251 (0,117)
NmBPBA10 ALL10	NIPMAM	BIS (2,5%)	10	DDOPBA (10%)	6,1	40	418 (0,039)	240 (0,107)
NmBPBA10 ALL20	NIPMAM	BIS (2,5%)	20	DDOPBA (10%)	5,8	39	643 (0,031)	266 (0,172)
NmEPBA10	NIPMAM	EGDMA (10%)	0	DDOPBA (10%)	8,6	49	515 (0,054)	309 (0,002)
NmEPBA10 ALL10	NIPMAM	EGDMA (10%)	10	DDOPBA (10%)	4,5	46,2	673 (0,123)	351 (0,294)

a : Taux de Bore dans le microgel, mesuré par analyse élémentaire.

b : Taux de polymère soluble, obtenu après ultracentrifugation (50 000 rpm, 30 min).

### Caractérisation des microgels contenant de l'allylamine

Les taux de bore incorporé, comme les polymères linéaires, sont légèrement inférieurs à ceux de leurs homologues sans allylamine. La présence d'allylamine n'a pas d'influence sur la taille à l'état contracté, c'est-à-dire dans les conditions de la synthèse. La structure des microgels en microscopie électronique à transmission nous montre les mêmes caractéristiques que leurs homologues sans allylamine et notamment la structure particulière cœur-écorce des microgels qui contiennent de l'EGDMA (Figure 5.9).

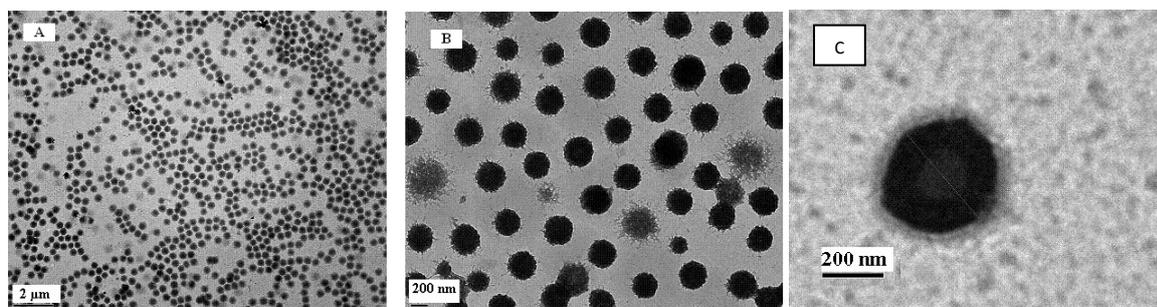


Figure 5.9 : Clichés MET de microgels enrichis en ALLYLAMINE

A : NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA, 10% Allylamine

B : NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA, 20% Allylamine

C : NIPMAM, EGDMA, 10% DDOPBA, 10% Allylamine

Afin de vérifier que l'amine a bien été introduite, nous avons mesuré la mobilité électrophorétique des microgels en fonction du pH (Figure 5.10). En effet, l'allylamine possède un pKa de 9,7. Au-dessous de son pKa, l'amine est protonée. Le microgel doit donc comporter une charge positive. La charge nette du microgel dépendra du ratio entre les fonctions amines et les fonctions boroniques, qui ont elles-mêmes une charge négative pour

un pH au-delà de leur pKa. Nous constatons que, quel que soit le pH, la mobilité électrophorétique est d'autant plus grande que la teneur en allylamine lors de la synthèse est grande. Ce résultat indique clairement que l'allylamine a bien été incorporée, de façon proportionnelle à la quantité introduite lors de la synthèse. L'évolution en fonction du pH ne présente pas exactement le même profil pour tous les composés. Ceci s'explique par le fait que le pKa de l'acide boronique dépend de la quantité d'allylamine environnante, et probablement de leur proximité. Ainsi, la mobilité présente un plateau à bas pH puis diminue en fonction du pH mais le seuil pour cette diminution n'est pas constant selon les formules. Ce seuil semble inférieur à 7 pour les microgels contenant 20% d'allylamine, ainsi que pour celui contenant de l'EGDMA.

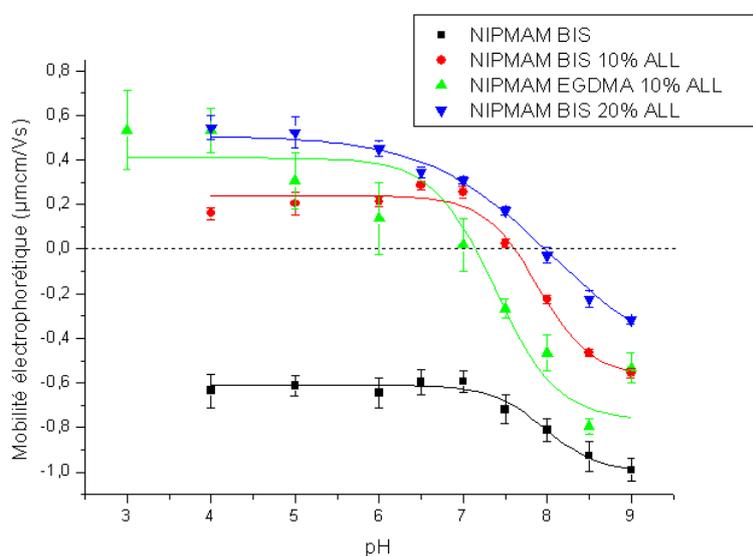


Figure 5.10 : Evolution de la mobilité électrophorétique en fonction de la teneur en allylamine et du pH. Tampon phosphate (2 mM), T=25°C.

### III.1.1 : Conséquence de l'introduction d'allylamine sur le comportement en température des microgels

A teneur en dérivé boronique constante, si celui-ci était dans son état neutre, on s'attendrait à ce que la présence d'amines chargées augmente la température de transition de phase volumique et augmente le taux de gonflement, du fait de la présence d'un motif chargé. Nous pouvons voir ce comportement à un pH de 5, c'est-à-dire bien en-dessous du pKa de l'acide boronique (Figure 5.11).

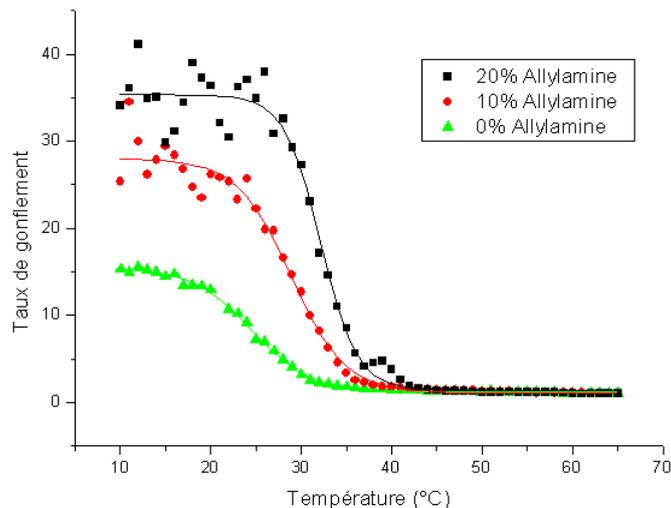


Figure 5.11 : Evolution du taux de gonflement de microgel NIPMAM, BIS, DDOPBA en fonction de la température et de la teneur en Allylamine. Eau Ultrapure (pH=5,4).

En condition de pH physiologique, le comportement de ces microgels est rendu complexe par le fait qu'il s'agisse de microgels amphotères. Les microgels amphotères ont un comportement particulier. Ils peuvent se contracter quand le ratio entre charges positives et négatives est de 1<sup>250, 251</sup>. Ainsi, selon la teneur en DDOPBA et leur état d'ionisation, qui dépend lui-même de la quantité d'allylamine environnante, il est possible d'observer une contraction du microgel par rapport à la référence sans allylamine (Figure 5.12). C'est ce qu'on observe en pratique avec le microgel contenant 10% d'allylamine à pH 7,4. Sa charge nette à ce pH est nulle. Son homologue à 20% d'allylamine est extrêmement gonflé et présente une VPTT supérieure dans les mêmes conditions car sa charge nette est positive. Il présente le comportement classique d'un microgel de polyélectrolyte.

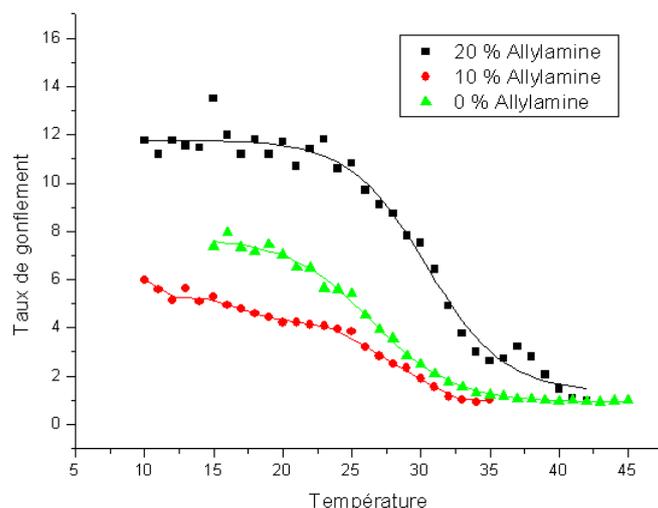


Figure 5.12 : Evolution du taux de gonflement de microgel NIPMAM, BIS, DDOPBA en fonction de la température et de la teneur en Allylamine. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4).

### III.1.2 : Comportement en présence de glucose

Les microgels sont maintenant étudiés en présence de glucose, dans différentes conditions de pH et de salinité, afin de comparer leur comportement aux microgels étudiés dans la première partie de ce chapitre. Pour le microgel NIPMAM/BIS/DDOPBA contenant 10% d'allylamine, les résultats sont donnés sur la figure 5.13.

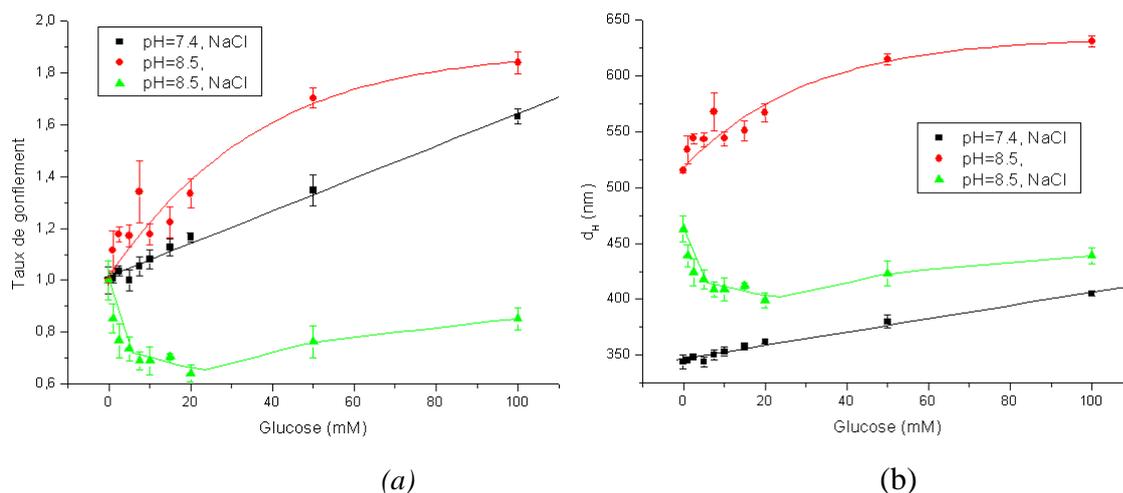


Figure 5.13 : Evolution du taux de gonflement (a) et du diamètre hydrodynamique (b) du microgel NIPMAM, BIS, DDOPBA, 10% ALLYLAMINE en fonction des différentes conditions expérimentales de pH et de salinité,  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

Comme pour les microgels contenant de l'EGDMA sans allylamine, un pH élevé et la présence de sel favorisent la contraction. Cependant, la contraction n'est pas effective dans les conditions physiologiques de pH et de salinité comme nous l'espérons. Néanmoins notre postulat de début de travail est valide puisque l'on montre que l'incorporation d'allylamine favorise la contraction du microgel. En effet, le microgel analogue sans allylamine (Figure 5.4) gonfle à pH 8,5.

### III.2 : Influence de la nature du réticulant sur la contraction

L'allylamine a été également incorporée à la composition NIPMAM, EGDMA et DDOPBA. Sans Allylamine, ce microgel se contractait seulement à pH=8,5. Nous voulons voir si la combinaison des deux éléments favorisant la contraction permet qu'elle intervienne à pH physiologique (Figure 5.14).

Chapitre V : Développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose par contraction – nouvelle route vers l'élaboration de capteurs

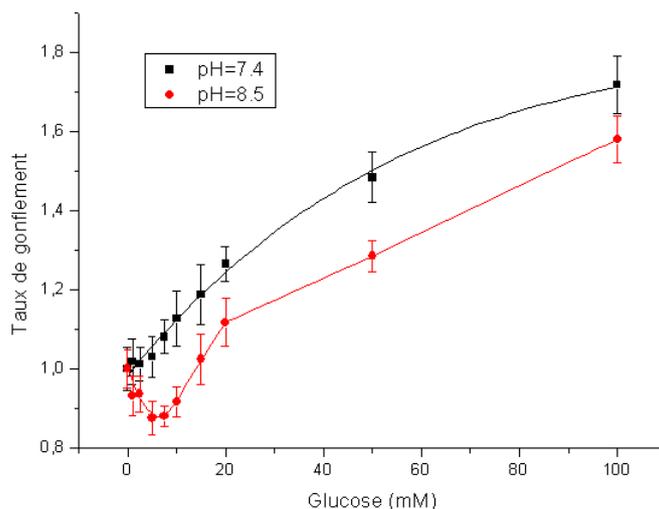


Figure 5. 14 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NIPMAM, EGDMA, DDOPBA, 10% ALLYLAMINE en fonction de la concentration en glucose et du pH du milieu.  
 $[NaCl]=150\text{ mM}$ ,  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

Malheureusement, l'incorporation de l'allylamine ne permet toujours pas de favoriser la contraction à un pH physiologique. Pire, la contraction est beaucoup moins marquée avec l'EGDMA qu'avec le réticulant BIS. Ceci peut être lié à la plus faible densité de récepteur lié à une réactivité différente des monomères.

### III.3 : Influence de la concentration en Allylamine

Nous nous intéressons alors au microgel contenant le réticulant BIS et davantage d'allylamine (20%). Nous avons d'abord étudié la réponse en glucose de cette formule (Figure 5.15).

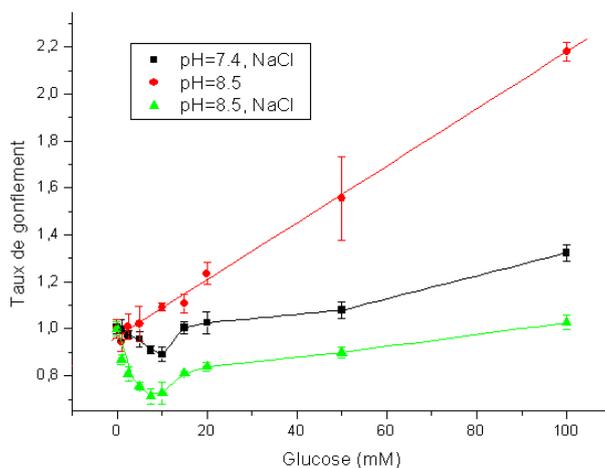


Figure 5.15 : Evolution du taux de gonflement en fonction de la concentration en glucose et de différentes conditions expérimentales.

Microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA, 20% Allylamine,  $T=25^{\circ}\text{C}$ .

Cette fois-ci, nous obtenons bien la contraction désirée dans les conditions physiologiques espérées (salinité et pH). Le microgel se contracte jusqu'à 10 mM, pour un taux de gonflement égal à 0,87. La contraction est encore plus importante à un pH de 8,5. Encore une fois, la présence de sel augmente le phénomène.

Le mécanisme de contraction peut avoir plusieurs origines : il s'agit soit d'une complexation de type bis-bidentate qui permet d'augmenter la densité de réticulation en présence de glucose, soit d'un effet électrostatique lié à la présence des charges opposées. En effet, comme nous l'avons mentionné plus haut, la diminution de la charge nette du microgel s'accompagne d'une contraction. Or, la complexation du glucose entraîne une augmentation de la densité de charge négative, qui peut s'opposer aux charges positives de l'allylamine. De fait nous avons donc étudié la mobilité électrophorétique des synthèses détaillées ci-dessous, pour discuter du mécanisme mis en jeu lors de la contraction.

### *III.4 : Mécanisme de contraction et sélectivité*

#### *III.4.1 : Mobilité électrophorétique*

La mobilité électrophorétique a été étudiée en fonction du pH pour différentes concentrations en glucose. Nous ne présentons les résultats sous forme de graphe que pour le microgel NIPMAM, BIS, DDOPBA 10%, ALLYLAMINE 20% (Figure 5.16). Les autres résultats seront rassemblés dans le tableau 5.2. Nous notons que pour des pH supérieurs à 6,5, la mobilité diminue quand la concentration en glucose augmente. Ceci s'explique par l'augmentation du nombre de charges négatives liées à la complexation du glucose par l'acide phénylboronique. Ainsi, la mobilité change en présence de glucose dès que le pH atteint 6,5. Cela signifie que la complexation a lieu dès ce pH. Notons que cette valeur est bien plus faible que celle déterminée pour un microgel simple NIPMAM/BIS/DDOPBA montrée au chapitre II (la variation de charge nette intervenait au-delà de 7,5). Ainsi, il semble que la présence d'amine dans le microgel permette la complexation du glucose à des pH plus bas que le pKa du DDOPBA.

Chapitre V : Développement d'une nouvelle génération de microgels sensibles au glucose par contraction – nouvelle route vers l'élaboration de capteurs

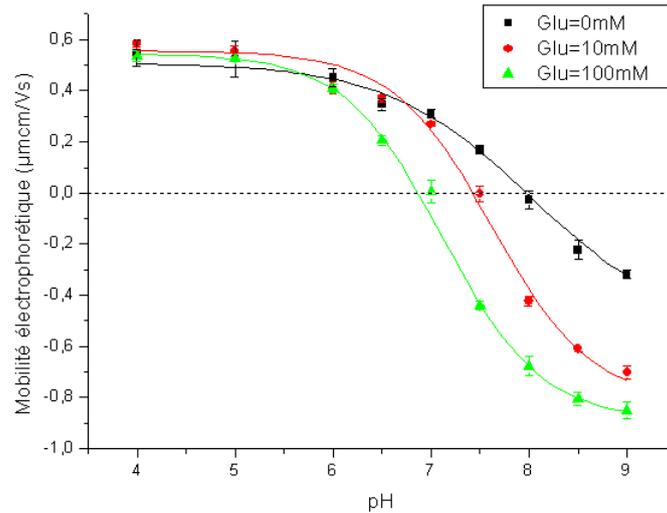


Figure 5.16 : Evolution de la mobilité électrophorétique d'un microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA 20% ALLYLAMINE en fonction de la concentration en glucose et du pH ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ).

Le tableau 5.2 résume les valeurs de mobilité électrophorétique sans glucose et avec glucose pour des concentrations caractéristiques du comportement des microgels (concentration du puits de contraction et concentration loin du puits de contraction, respectivement 10 et 100 mM). Si le mécanisme de contraction est de nature électrostatique, un microgel gonflera si  $|\mu_{\text{Glu}}| > |\mu_0|$  soit  $|\mu_{\text{Glu}}| - |\mu_0| > 0$  et se contractera dans le cas contraire.

Tableau 5.2 : Mobilité électrophorétique et comportement de gonflement

% ALL	pH	Mobilité électrophorétique ( $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{Vs}$ )			Comportement				
		[Glu] 0mM	[Glu] 10mM	[Glu] 100mM	Th. 10mM	Exp. 10mM	Th. 100mM	Exp. 100mM	
0	7,5	-0,719	x	-0,911	x	x	> 0	G	O
	8,5	-0,928	x	-1,292	x	x	> 0	G	O
10	7,5	0,025	-0,251	x	> 0	G	x	x	O
	8,5	-0,465	-0,685	x	> 0	C	x	x	N
20	7,5	0,172	-0,004	-0,440	< 0	C	> 0	G	O
	8,5	-0,224	-0,611	-0,806	> 0	C	> 0	G	N

Nous constatons que le signe de la variation de la densité de charge en fonction de la concentration en glucose, n'est pas systématiquement corrélé avec le phénomène de contraction ou de gonflement. En particulier, un certain nombre de situations de contraction correspond à une augmentation de la densité de charge. Ainsi, le mécanisme de contraction

n'est donc pas basé sur des effets de charges mais sur les effets de changements de densité de réticulation sous l'effet d'une complexation 2 : 1. L'allylamine a vraisemblablement joué son rôle d'abaisser le pKa de l'acide boronique, pour stabiliser le complexe avec le glucose qui maintenant possède la faculté de se contracter dans les conditions physiologiques (exception faite de la température).

### III.4.2 : Sélectivité

La complexation du glucose dans un complexe bis-bidentate est en principe sélective du glucose. Nous avons donc étudié la variation du taux de gonflement du microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA, 20% ALLYLAMINE en fonction de la concentration en saccharide de différentes natures (Glucose, Fructose et Galactose), (Figure 5.17).

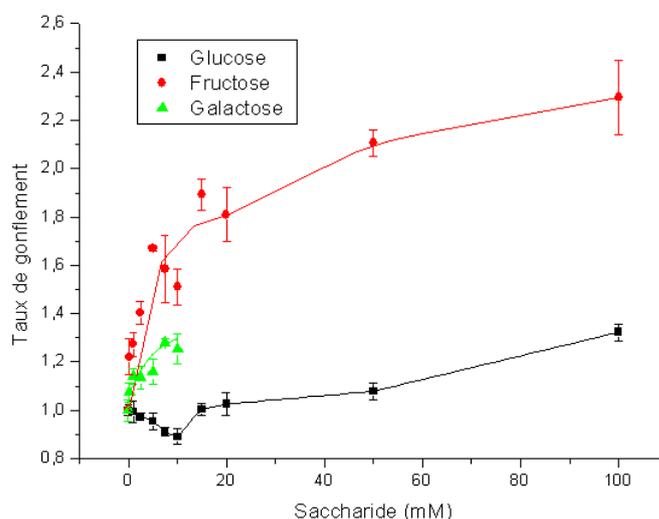


Figure 5.17 : Evolution du taux de gonflement d'un microgel NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA, 20% ALLYLAMINE en fonction de la concentration et de la nature en saccharide.

Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4, [NaCl]=150 mM), T=25°C.

Ce microgel est bien sélectif du glucose puisque le fructose et le galactose entraînent un phénomène de gonflement, typique d'une complexation 1 :1. En définitive, la sélectivité est une nouvelle preuve que la contraction est bien liée à un mécanisme de complexation de type 2 : 1 et donc de variation de la densité de réticulation.

#### **IV : Développement de capteurs fluorescents et libération par contraction**

Forts des résultats précédents, nous avons cherché à développer des capteurs au glucose sélectifs à base de microgels. Nous avons choisi de rendre ces microgels fluorescents, avec l'idée de détecter une variation de fluorescence en fonction du glucose. Cette approche permettrait d'obtenir les premiers microgels fluorescents sensibles au glucose et sélectifs. Avant de présenter nos résultats, nous dressons un petit bilan bibliographique sur l'utilisation des microgels sensibles au glucose comme capteur.

##### *IV.1 : Etat de l'art des capteurs fluorescents*

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, les microgels peuvent être utilisés, comme les hydrogels, pour développer des capteurs au glucose. La contraction ou le gonflement qui s'ensuit est dans notre cas responsable de conséquences purement dimensionnelles (variation de la taille). D'autres voies, dans la littérature, ont couplé ce changement de taille à une variation des propriétés optiques des microgels.

Une première voie a consisté à développer des microgels fluorescents où la sensibilité au glucose module l'intensité de fluorescence du réseau. Pour cela KLIMANT a d'abord mis au point un procédé reposant sur le concept de transfert d'énergie par résonance de type Förster appelé FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Ce phénomène fait intervenir deux fluorophores dont l'émission de l'un permet à l'autre d'être excité. Plus les fluorophores seront proches spatialement, plus le phénomène sera intense. Dans le cas contraire, une augmentation de la distance entre les deux espèces diminuera l'intensité de ce transfert. (Figure 5.18).

Des hydrogels de tailles micrométriques<sup>252</sup> basés sur la copolymérisation de NIPAM, de PBA et de deux fluorophores ont donc été étudiés. La reconnaissance du glucose par le PBA entraîne un gonflement de l'hydrogel. Les deux fluorophores ont été choisis de telle sorte que la longueur d'onde d'excitation du second soit proche de la longueur d'onde d'émission du premier. De fait si la distance augmente sous une augmentation de la concentration en glucose, la longueur d'onde d'émission du premier fluorophore ne peut plus exciter le second. Le pic d'émission du premier fluorophore est donc de plus en plus visible en présence de glucose alors que le pic d'émission du second l'est de moins en moins.

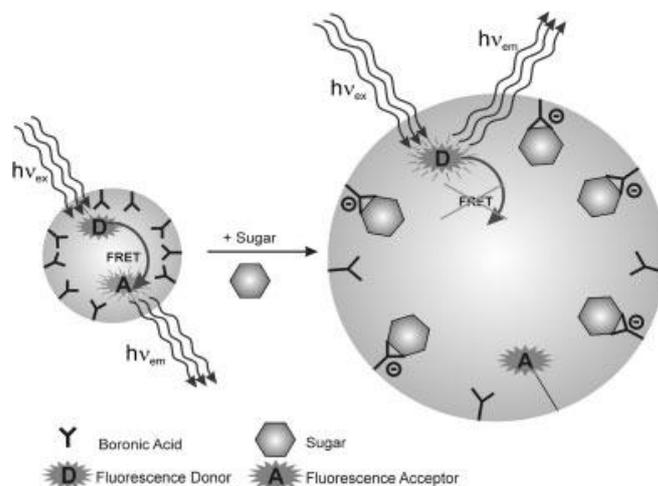


Figure 5.18 : Schématisation de l'établissement du mécanisme de FRET.

Dans ces premiers travaux Klimant présente une bonne sensibilité au glucose de ces matériaux à 27°C et à des pH de 8,5 ou 9. En outre ces recherches montrent que les microgels arrivent à leur état de gonflement à l'équilibre dans des temps proches de la dizaine de minutes. Dans ces études de 2009 <sup>253</sup>, Klimant montre de manière très détaillée le comportement réversible et la modularité de ces matériaux. En outre, il ajuste la composition chimique de son récepteur pour parvenir à la même sensibilité au glucose mais dans les conditions de pH physiologiques. En effet alors que le pKa de son récepteur au glucose était de 8,5 dans ses premières recherches, dans les suivantes il est de 7,9, beaucoup plus proche de 7,4, valeur du pH dans les conditions physiologiques.

Toujours pour des applications en fluorescence, Zhou <sup>254</sup> a développé des microgels fonctionnalisés par des récepteurs PBA où à l'intérieur sont contenus des quantum dots fluorescents de CdTe/ZnS (CdS QDs). La fluorescence des CdS QDs dans les microgels de poly(N-isopropylacrylamide-acrylamide-acide phenylboronique) [p(NIPAM-AAm-PBA)] est réversiblement éteinte ou non lorsque les microgels subissent respectivement un gonflement ou une contraction en réponse à la concentration de glucose dans le milieu extérieur (Figure 5.19).

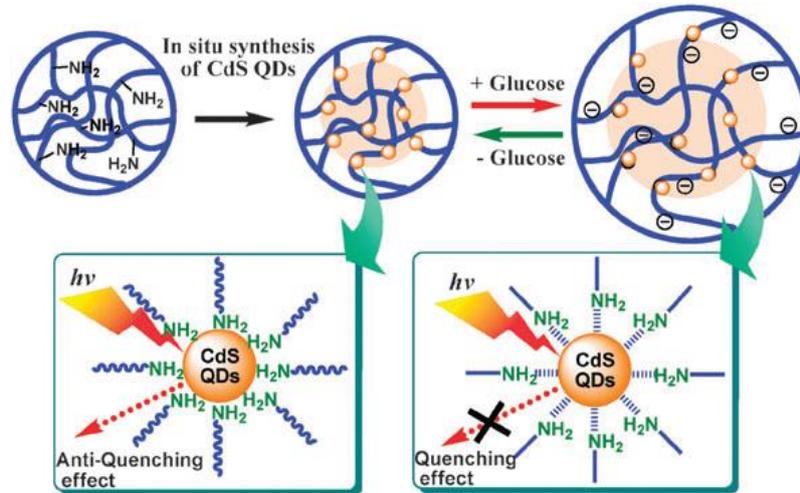


Figure 5.19 : Mécanisme de fluorescence par effet fluorescent de CdS QDs.

L'intensité de fluorescence diminue quand la concentration en glucose augmente. Les études montrent une bonne sensibilité dans les conditions physiologiques de concentrations en glucose et de pH.

Enfin toujours basé sur le principe de détection optique, une équipe a organisé des microgels sensibles au glucose en réseau cristallin, piégés dans une matrice de polymère non sensible au glucose<sup>255</sup>. Ce système se différencie des travaux d'Asher dans le sens où ce n'est pas la matrice hydrogel qui gonfle mais les microgels qui composent le réseau. Dans ces travaux, la matrice hydrogel n'est pas sensible mais le réseau de sphères qui sera constitué de microgels sensibles au glucose le sera. Aussi ce n'est plus la longueur d'onde qui variera mais l'intensité de la lumière diffractée en fonction de la concentration en glucose, en réponse au changement d'indice de réfraction des microgels. Les résultats font effectivement part d'un changement d'intensité de la longueur d'onde diffractée et une bonne sensibilité au glucose mais dans des conditions de pH non physiologique.

#### IV.2 : Développement de microgels fluorescents

La stratégie que nous avons choisie repose sur le constat que la polarité des microgels varie en fonction de leur état de gonflement. Ainsi, l'incorporation d'un fluorophore sensible à la polarité du milieu peut conduire à des variations de fluorescence associées au gonflement des microgels. Ce concept a été développé par Iwai<sup>256-258</sup> pour des microgels de pNIPAM. En utilisant un comonomère fluorescent à base de benzofurazane (BD) à la matrice de pNIPAM, ces auteurs ont obtenu des microgels dont la fluorescence augmente en fonction de la

température, aux alentours de la VPTT de telle sorte que la variation de gonflement du microgel entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence. Adapté à nos microgels sensibles au glucose, plus la concentration en glucose serait grande plus l'intensité de fluorescence varierait. En outre, incorporé dans un de nos microgels sélectifs, la modulation de la fluorescence serait sélective d'une forme à une autre de saccharides et nous permettrait de créer des capteurs fluorescents au glucose, comme les technologies précédemment décrites.

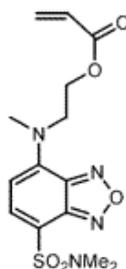


Figure 5.20 : Structure chimique de la molécule de DBD-AE<sup>256</sup>.

#### IV.2.1 : Microgel au NIPMAM

Ce monomère (0,1%) a été introduit lors de la copolymérisation tout d'abord pour obtenir une structure NIPMAM/BIS/DDOPBA fluorescente qui gonfle en présence de glucose. Après purification par dialyse et centrifugation, les caractéristiques du microgel ont été vérifiées et le comportement au glucose est proche de celui obtenu pour la structure sans monomère fluorescent.

Nous avons étudié les propriétés de fluorescence d'une suspension de microgels à 0,1 mg/mL. Le spectre d'émission est donné en figure 5.21. Le monomère fluorescent a donc bien été incorporé au microgel et lorsque la température augmente, le profil du spectre change.

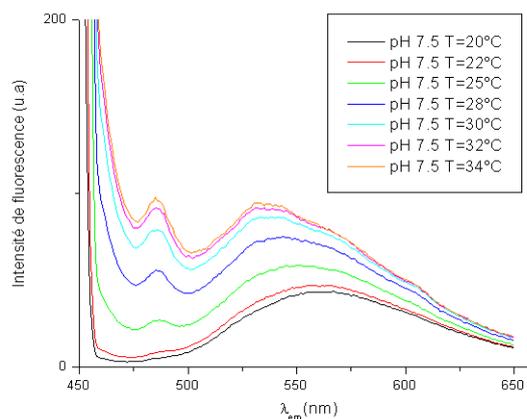


Figure 5.21 : Evolution du spectre d'émission d'un microgel de pNIPMAM-co-DBD-AE en fonction de la température (longueur d'onde d'excitation :  $\lambda_{ex}=444$  nm).

Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), concentration en microgels dans le milieu : 0,1 mg/mL.

Nous constatons que l'intensité maximale d'émission augmente en même temps qu'elle se déplace vers le bleu. Ce comportement traduit une augmentation de l'hydrophobie autour des unités DBDAE. Ainsi, nous pouvons alors tracer l'évolution de l'intensité émise à cette longueur d'onde en fonction de la température (Figure 5.22).

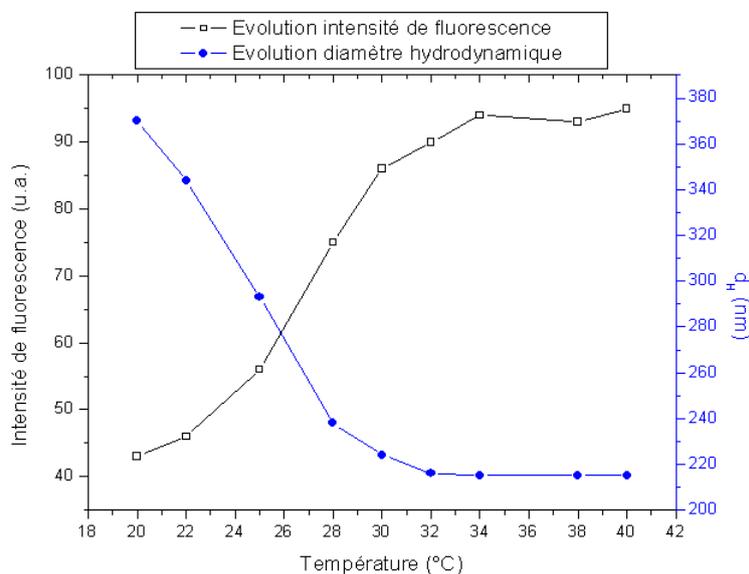


Figure 5.22 : Evolution de l'intensité de fluorescence ( $\lambda_{ex}=444$  nm) et du diamètre hydrodynamique d'un microgel de pNIPMAM-co-DBD-AE en fonction de la température. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4).

La courbe de l'évolution de la fluorescence décrit la courbe inverse de l'évolution du diamètre hydrodynamique en fonction de la température d'un microgel de pNIPMAM. L'intensité présente trois parties distinctes. Pour les faibles températures, elle varie peu. Puis l'augmentation est importante pour atteindre un maximum et son palier, passée la VPTT du microgel de NIPMAM (35°C). L'intensité de fluorescence du microgel est donc sensible à la température, ce qui provient du changement de polarité ambiante. En effet, le microgel devient plus hydrophobe quand la température augmente au-dessus de la VPTT.

Nous avons alors étudié l'influence de la concentration en glucose sur la fluorescence. L'évolution du diamètre en fonction de la concentration en glucose est représentée pour comparaison (Figure 5.23).

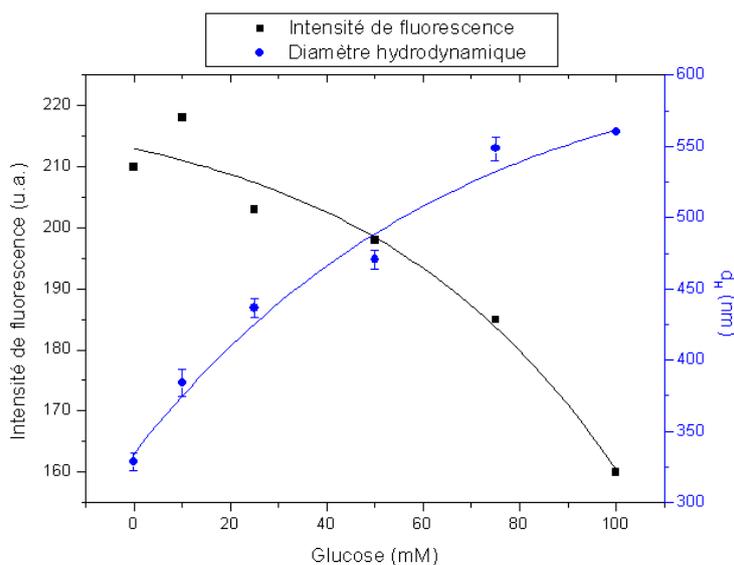


Figure 5.23 : Evolution de l'intensité de fluorescence ( $\lambda_{ex}=444$  nm) d'un microgel de NIPMAM DBD-AE en fonction de la concentration en glucose. Tampon phosphate (2 mM, pH=7,4), T=25°C.

Les microgels ainsi obtenus sont bien sensibles au glucose. La fluorescence diminue quand la concentration en glucose augmente. Là encore, lorsque le microgel gonfle, la polarité du milieu augmente, ce qui diminue la fluorescence du motif BD. Nous avons donc réussi à synthétiser des microgels fluorescents sensibles au glucose dans des conditions physiologiques.

#### IV.2.2 : Microgel au NEMAM

A partir de ce résultat encourageant, nous avons cherché à construire des microgels fluorescents sélectifs du glucose. Ainsi, il nous faut obtenir des microgels contractiles possédant des fonctions BD. Le monomère fluorescent est copolymérisé en présence des comonomères qui ont mené à l'obtention du microgel contractile à pH 7,4, c'est-à-dire le NIPMAM, BIS, 10% DDOPBA et 20% d'ALLYLAMINE. Le but de cette synthèse est d'obtenir un microgel dont la fluorescence varierait de manière sélective à la présence de glucose. Le comportement attendu est une contraction en présence de glucose et donc une augmentation de l'intensité de fluorescence. En revanche, en présence de fructose ou de galactose, le microgel devrait gonfler et l'intensité diminuer.

Malgré les efforts entrepris, nous n'avons pas réussi à copolymériser les monomères de façon à construire un nouveau microgel contractile. Il semble que le taux de DDOPBA introduit soit très faible et la structure synthétisée n'était plus sensible au glucose, que ce soit par gonflement ou contraction. Faute de temps et de monomère fluorescent, cette synthèse n'a pas pu être reconduite.

### **V : Conclusion au chapitre contraction**

Au terme de la synthèse d'une série de microgels fonctionnalisés par l'acide phénylboronique et d'une construction rationnelle par copolymérisation articulée autour des monomères constitutifs mais aussi de monomères additifs, nous avons élaboré une nouvelle classe de microgels. La particularité de ces réseaux réside dans leur sensibilité aux saccharides qui, de manière sélective, permet pour un même microgel d'obtenir deux comportements diamétralement opposés en fonction de la nature du saccharide présent dans le milieu environnemental. En outre, nous avons réussi à obtenir ce comportement dans les conditions physiologiques de pH et de salinité.

Sans succès nous avons essayé de développer des capteurs fluorescents dans les mêmes conditions mais le concept a été démontré et un travail plus poussé permettra sûrement de développer des capteurs fluorescents sélectifs du glucose en conditions physiologiques.

## **Conclusion générale**



Dans ce travail de thèse, nous avons développé une variété de microgels sensibles au glucose, utilisant l'acide phénylboronique comme récepteur du glucose, présentant un intérêt dans le cadre du traitement du diabète, soit en tant que capteurs, soit en tant que vecteurs pour la délivrance d'insuline.

Sur le plan des matériaux eux-mêmes, ce travail a permis un certain nombre d'avancées. Nous avons mis en place une stratégie de synthèse de microgels, qui nous permet, grâce à une construction rationnelle par copolymérisation articulée autour des monomères constitutifs, d'élaborer de manière simple et contrôlée, une gamme d'objets de structures et de propriétés variées. Des voies simples ont ainsi été proposées pour obtenir des matériaux répondant aux exigences des applications dans le domaine biomédical, voire même anticipant un besoin de structures plus complexes. Ainsi, des microgels sensibles au glucose présentant les critères suivants ont été obtenus :

- Sensibilité au glucose en conditions physiologiques ;
- Sélectivité du glucose par rapport aux autres saccharides ;
- Microgels structurés cœur-écorce pour une réponse affinée à des stimuli multiples ;
- Microgels creux pour une meilleure capacité d'encapsulation.

Le potentiel de ces matériaux pour leurs applications en tant que capteurs et vecteurs a été évalué. Ainsi, nous avons pu montrer une nouvelle voie pour obtenir des capteurs fluorescents à base de microgels. Mais une grande partie de ce travail a surtout été consacrée à leur application comme vecteur de l'insuline. L'encapsulation d'insuline dans les microgels a été réalisée avec succès. Des améliorations pourront être apportées pour en augmenter l'efficacité grâce à des leviers qui ont pu être identifiés. La libération de l'insuline à partir des microgels a été établie, montrant clairement une dépendance à la concentration en glucose. La réversibilité du processus a aussi pu être validée. Un travail de fond visant à déterminer avec précision les cinétiques de libération d'insuline en fonction de la structure des microgels n'a pu aboutir. Cependant, cette étude a permis d'évaluer la pertinence de différentes méthodes expérimentales permettant le suivi cinétique de la libération. Contrairement à ce qui était attendu, peu de méthodes ont pu donner satisfaction, soit parce que leurs échelles de temps n'étaient pas adaptées aux cinétiques de libération, soit parce qu'elles induisaient des artefacts. Certaines méthodes comme la cytométrie de flux semblent prometteuses et méritent une attention prochaine.

## Conclusion générale

Malgré ces complications, les résultats obtenus ont permis d'affirmer que la technologie des hydrogels ou des microgels sensibles au glucose peut répondre de manière conceptuelle aux attentes des patients diabétiques pour permettre la délivrance d'insuline en boucle fermée. Cette alternative aux voies proposées à l'heure actuelle pour traiter le diabète de type 1 garde toute sa pertinence.

Ainsi, l'utilisation de ce concept pour des applications cliniques entraîne de nouvelles exigences que nous n'avons pas prises en compte dans cette thèse, dont, en particulier la notion de biocompatibilité et la résorption des vecteurs. Quelques études de cytotoxicité ont été amorcées et ont permis d'établir avec satisfaction que certains de nos objets n'étaient pas toxiques. Ces résultats préliminaires mettent en défaut certaines idées reçues sur la toxicité du groupe phénylboronique. Ainsi, ce groupement pourrait être utilisé dans le futur comme récepteur du glucose, d'autant qu'il a été également montré que les interférences avec les monosaccharides présents dans les fluides biologiques étaient négligeables. Pour une application *in vivo*, la structure chimique de ces vecteurs sera donc revisitée, en combinant par exemple les propriétés de ce récepteur avec des biomolécules non toxiques. Un nouveau mécanisme de gonflement au glucose devra alors être mis en œuvre. La voie ouverte dans ce mémoire utilisant la compétition entre le glucose avec des complexes interchaînes de polymère, pourra être appliquée. Ainsi, le chemin vers les applications cliniques nécessitera le développement de nouveaux vecteurs, l'étude de leur pharmacocinétique et de leur biocompatibilité, en s'appuyant sur le savoir-faire acquis au cours de cette thèse.

## **Références bibliographiques**



## Références bibliographiques

1. Stumvoll, M.; Goldstein, B. J.; van Haeften, T. W., Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet* **2005**, 365, (9467), 1333.
2. Kahn, C. R., Banting lecture: Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* **1994**, 43, (8), 1066.
3. Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H., Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **2004**, 27, (5), 1047.
4. Matthews, D. R.; Cull, C. A.; Stratton, I. M.; Holman, R. R.; Turner, R. C., UKPDS 26: Sulphonylurea failure in non-insulin-dependent diabetic patients over six years. *Diabetic Medicine* **1998**, 15, (4), 297.
5. Shamoan, H.; Duffy, H.; Fleischer, N.; Engel, S.; Saenger, P.; Strelzyn, M.; Litwak, M.; Wylie-Rosett, J.; Farkash, A.; Geiger, D.; Engel, H.; Fleischman, J.; Pompei, D.; Ginsberg, N.; Glover, M.; Brisman, M.; Walker, E.; Thomashunis, A.; Gonzalez, J., The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* **1993**, 329, (14), 977.
6. Lacy, P. E., Treating diabetes with transplanted cells. *Scientific American* **1995**, 273, (1), 50.
7. Opara, E. C.; Kendall Jr, W. F., Immunoisolation techniques for islet cell transplantation. *Expert Opinion on Biological Therapy* **2002**, 2, (5), 503.
8. Soon-Shiong, P., Treatment of type I diabetes using encapsulated islets. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, 35, (2-3), 259.
9. Klonoff, D. C., Continuous glucose monitoring: Roadmap for 21st century diabetes therapy. *Diabetes Care* **2005**, 28, (5), 1231.
10. Steil, G. M.; Rebrin, K., Closed-loop insulin delivery - What lies between where we are and where we are going? *Expert Opinion on Drug Delivery* **2005**, 2, (2), 353.
11. Hovorka, R., Continuous glucose monitoring and closed-loop systems. *Diabetic Medicine* **2006**, 23, (1), 1.
12. Hoeg-Jensen, T.; Ridderberg, S.; Havelund, S.; Schäffer, L.; Balschmidt, P.; Jonassen, I. B.; Vedso, P.; Olesen, P. H.; Markussen, J., Insulins with built-in glucose sensors for glucose responsive insulin release. *Journal of Peptide Science* **2005**, 11, (6), 339.
13. Hoeg-Jensen, T.; Havelund, S.; Nielsen, P. K.; Markussen, J., Reversible insulin self-assembly under carbohydrate control. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (17), 6158.
14. Almdal, K.; Dyre, J.; Hvidt, S.; Kramer, O., Towards a phenomenological definition of the term 'gel'. *Polymer Gels and Networks* **1993**, 1, (1), 5.
15. Kavanagh, G. M.; Ross-Murphy, S. B., Rheological characterisation of polymer gels. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **1998**, 23, (3), 533.
16. Yamauchi, A.; Yoshihito, O.; Kanji, K.; Takao, F.; Okihiko, I.; Yoshitsugu, H.; Tsutomu, M.; Tadao, S.; Lin, W.; Hatsuo, I., Gels: Introduction. In *Gels Handbook*, Academic Press: Burlington, 2001; p 4.
17. Campoccia, D.; Doherty, P.; Radice, M.; Brun, P.; Abatangelo, G.; Williams, D. F., Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials* **1998**, 19, (23), 2101.
18. Prestwich, G. D.; Marecak, D. M.; Marecek, J. F.; Vercruyse, K. P.; Ziebell, M. R., Controlled chemical modification of hyaluronic acid: Synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release* **1998**, 53, (1-3), 93.
19. Lin, Y.-H.; Liang, H.-F.; Chung, C.-K.; Chen, M.-C.; Sung, H.-W., Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials* **2005**, 26, (14), 2105.
20. Kamath, K. R.; Park, K., Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 11, (1-2), 59.
21. Candau, S.; Bastide, J.; Delsanti, M., *Structural, elastic, and dynamic properties of swollen polymer networks*. Springer-Verlag: 1982; p 27.
22. Jones, D. F.; Treloar, L. R. G., The properties of rubber in pure homogeneous strain. *Journal of Physics D: Applied Physics* **1975**, 8, (11), 1285.

23. Candau, F.; Ballet, F.; Debeauvais, F.; Wittmann, J. c., Structural properties and topological defects of swollen polymeric mesophases: Low angle X-ray diffraction and optical microscopic studies. *Journal of Colloid And Interface Science* **1982**, 87, (2), 356.
24. Bastide, J.; Leibler, L., Large-scale heterogeneities in randomly cross-linked networks. *Macromolecules* **1988**, 21, (8), 2647.
25. Li, Y.; Tanaka, T., Phase transitions of gels. *Annual Review of Materials Science* **1992**, 22, (1), 243.
26. Rubinstein, M.; Colby, R. H.; Dobrynin, A. V.; Joanny, J. F., Elastic modulus and equilibrium swelling of polyelectrolyte gels. *Macromolecules* **1996**, 29, (1), 398.
27. Saunders, B. R.; Vincent, B., Microgel particles as model colloids: Theory, properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **1999**, 80, (1), 1.
28. Brannon-Peppas, L.; Peppas, N. A., Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. IX. The mechanisms of drug release from pH-sensitive swelling-controlled systems. *Journal of Controlled Release* **1989**, 8, (3), 267.
29. Loxley, A.; Vincent, B., Equilibrium and kinetic aspects of the pH-dependent swelling of poly(2-vinylpyridine-co-styrene) microgels. *Colloid and Polymer Science* **1997**, 275, (12), 1108.
30. Siegel, R. A., Hydrophobic weak polyelectrolyte gels: Studies of swelling equilibria and kinetics. *Advances in Polymer Science* **1993**, 109, 233.
31. Brazel, C. S.; Peppas, N. A., Synthesis and characterization of thermo- and chemomechanically responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) hydrogels. *Macromolecules* **1995**, 28, (24), 8016.
32. Dong, L.; Hoffman, A. S., A novel approach for preparation of pH-sensitive hydrogels for enteric drug delivery. *Journal of Controlled Release* **1991**, 15, (2), 141.
33. Nakamae, K.; Nizuka, T.; Miyata, T.; Furukawa, M.; Nishino, T.; Kato, K.; Inoue, T.; Hoffman, A. S.; Kanzaki, Y., Lysozyme loading and release from hydrogels carrying pendant phosphate groups. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1997**, 9, (1), 43.
34. Katchalsky, A.; Michaeli, I., Polyelectrolyte gels in salt solutions. *Journal of Polymer Science* **1955**, 15, (79), 69.
35. Mamytbekov, G.; Bouchal, K.; Ilavsky, M., Phase transition in swollen gels 26. Effect of charge concentration on temperature dependence of swelling and mechanical behaviour of poly(N-vinylcaprolactam) gels. *European Polymer Journal* **1999**, 35, (11), 1925.
36. Lagutina, M. A.; Dubrovskii, S. A., The swelling pressure of weakly ionic acrylamide gels. *Polymer Science - Series A* **1996**, 38, (9), 1059.
37. Mamada, A.; Tanaka, T.; Kungwachakun, D.; Irie, M., Photoinduced phase transition of gels. *Macromolecules* **1990**, 23, (5), 1517.
38. Xulu, P. M.; Filipcsei, G.; Zrinyi, M., Preparation and Responsive Properties of Magnetically Soft Poly(N-isopropylacrylamide) Gels. *Macromolecules* **2000**, 33, (5), 1716.
39. Filipcsei, G.; Fehér, J.; Zrinyi, M., Electric field sensitive neutral polymer gels. *Journal of Molecular Structure* **2000**, 554, (1), 109.
40. Tanaka, T.; Nishio, I.; Sun, S. T.; Ueno-Nishio, S., Collapse of gels in an electric field. *Science* **1982**, 218, (4571), 467.
41. Haiqing, L.; Mao, Z.; Renhuang, W., Ionic-Strength- and pH-Responsive Poly[acrylamide-co-(maleic acid)] Hydrogel Nanofibers. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2007**, 208, (8), 874-880.
42. Hideki, I.; Nicholas, A. P., Novel complexation hydrogels for oral peptide delivery: *In vitro* evaluation of their cytocompatibility and insulin-transport enhancing effects using Caco-2 cell monolayers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003**, 67A, (2), 609-617.
43. Ichikawa, H.; Peppas, N. A., Novel complexation hydrogels for oral peptide delivery: *In vitro* evaluation of their cytocompatibility and insulin-transport enhancing effects using Caco-2 cell monolayers. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2003**, 67, (2), 609.
44. Miyata, T.; Uragami, T.; Nakamae, K., Biomolecule-sensitive hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (1), 79.

## Références bibliographiques

45. Watanabe, M.; Akahoshi, T.; Tabata, Y.; Nakayama, D., Molecular specific swelling change of hydrogels in accordance with the concentration of guest molecules. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (22), 5577.
46. Wang, G.; Kuroda, K.; Enoki, T.; Grosberg, A.; Masamune, S.; Oya, T.; Takeoka, Y.; Tanaka, T., Gel catalysts that switch on and off. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, 97, (18), 9861.
47. Oya, T.; Enoki, T.; Grosberg, A. Y.; Masamune, S.; Sakiyama, T.; Takeoka, Y.; Tanaka, K.; Wang, G.; Yilmaz, Y.; Feld, M. S.; Dasari, R.; Tanaka, T., Reversible molecular adsorption based on multiple-point interaction by shrinkable gels. *Science* **1999**, 286, (5444), 1543.
48. Aoki, T.; Nakamura, K.; Sanui, K.; Kikuchi, A.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Ogata, N., Adenosine-Induced Changes of the Phase Transition of Poly(6-(acryloyloxymethyl)uracil) Aqueous Solution. *Polymer Journal* **1999**, 31, (11\_2), 1185.
49. Aoki, T.; Nishimura, T.; Sanui, K.; Ogata, N., Phase-transition changes of poly(N-(S)-sec-butylacrylamide-co-N-isopropylacrylamide) in response to amino acids and its chiral recognition. *Reactive and Functional Polymers* **1998**, 37, (1-3), 299.
50. Aoki, T.; Nishimura, T.; Sanui, K.; Ogata, N., Phase-transition changes of poly(N-(S)-sec-butylacrylamide-co-N-isopropylacrylamide) in response to amino acids and its chiral recognition. *Reactive and Functional Polymers* **1998**, 37, (1-3), 299.
51. Miyata, T.; Asami, N.; Uragami, T., Preparation of an Antigen-Sensitive Hydrogel Using Antigen-Antibody Bindings. *Macromolecules* **1999**, 32, (6), 2082.
52. Miyata, T.; Asami, N.; Uragami, T., A reversibly antigen-responsive hydrogel. *Nature* **1999**, 399, (6738), 766.
53. Kim, J.; Nayak, S.; Lyon, L. A., Bioresponsive hydrogel microlenses. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (26), 9588.
54. Ehrick, J. D.; Deo, S. K.; Browning, T. W.; Bachas, L. G.; Madou, M. J.; Daunert, S., Genetically engineered protein in hydrogels tailors stimuli-responsive characteristics. *Nature Materials* **2005**, 4, (4), 298.
55. Thornton, P. D.; McConnell, G.; Ulijn, R. V., Enzyme responsive polymer hydrogel beads. *Chemical Communications* **2005**, (47), 5913.
56. Thornton, P. D.; Mart, R. J.; Ulijn, R. V., Enzyme-responsive polymer hydrogel particles for controlled release. *Advanced Materials* **2007**, 19, (9), 1252.
57. Reese, C. E.; Baltusavich, M. E.; Keim, J. P.; Asher, S. A., Development of an intelligent polymerized crystalline colloidal array colorimetric reagent. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (21), 5038.
58. Asher, S. A.; Peteu, S. F.; Reese, C. E.; Lin, M. X.; Finegold, D., Polymerized crystalline colloidal array chemical-sensing materials for detection of lead in body fluids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002**, 373, (7), 632.
59. Murphy, W. L.; Dillmore, W. S.; Modica, J.; Mrksich, M., Dynamic hydrogels: Translating a protein conformational change into macroscopic motion. *Angewandte Chemie - International Edition* **2007**, 46, (17), 3066.
60. Murakami, Y.; Maeda, M., DNA-Responsive Hydrogels That Can Shrink or Swell. *Biomacromolecules* **2005**, 6, (6), 2927.
61. Murakami, Y.; Maeda, M., Hybrid Hydrogels to Which Single-Stranded (ss) DNA Probe Is Incorporated Can Recognize Specific ssDNA. *Macromolecules* **2005**, 38, (5), 1535.
62. Ishihara, K.; Kobayashi, M.; Ishimaru, N.; Shinohara, I., Glucose induced permeation control of insulin through a complex membrane consisting of immobilized glucose oxidase and poly(amine). *Polymer Journal* **1984**, 16, (8), 625.
63. Ishihara, K.; Matsui, K., Glucose-responsive insulin release from polymer capsule. *Journal of Polymer Science, Part C: Polymer Letters* **1986**, 24, (8), 413.
64. Albin, G.; Horbett, T. A.; Ratner, B. D., Glucose sensitive membranes for controlled delivery of insulin: Insulin transport studies. *Journal of Controlled Release* **1985**, VOL. 2, 153.

65. Albin, G. W.; Horbett, T. A.; Miller, S. R.; Ricker, N. L., Theoretical and experimental studies of glucose sensitive membranes. *Journal of Controlled Release* **1987**, 6, (1), 267.
66. Klumb, L. A.; Horbett, T. A., Design of insulin delivery devices based on glucose sensitive membranes. *Journal of Controlled Release* **1992**, 18, (1), 59.
67. Traitel, T.; Cohen, Y.; Kost, J., Characterization of glucose-sensitive insulin release systems in simulated in vivo conditions. *Biomaterials* **2000**, 21, (16), 1679.
68. Zhang, K.; Wu, X. Y., Modulated insulin permeation across a glucose-sensitive polymeric composite membrane. *Journal of Controlled Release* **2002**, 80, (1-3), 169.
69. Kang, S. I.; Bae, Y. H., A sulfonamide based glucose-responsive hydrogel with covalently immobilized glucose oxidase and catalase. *Journal of Controlled Release* **2003**, 86, (1), 115.
70. Hassan, C. M.; Doyle Iii, F. J.; Peppas, N. A., Dynamic behavior of glucose-responsive poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. *Macromolecules* **1997**, 30, (20), 6166.
71. Dorski, C. M.; Doyle Iii, F. J.; Peppas, N. A. In *Preparation and characterization of glucose-sensitive P(MAA-g-EG) hydrogels*, Polymeric Materials Science and Engineering, Proceedings of the ACS Division of Polymeric Materials Science and Engineering, San Francisco, CA, USA, 1997; Anon, Ed. ACS: San Francisco, CA, USA, 1997; p 281.
72. Doyle Iii, F. J.; Dorski, C.; Harting, J. E.; Peppas, N. A. In *Control and modeling of drug delivery devices for the treatment of diabetes*, Proceedings of the American Control Conference, Seattle, WA, USA, 1995; Seattle, WA, USA, 1995; p 776.
73. Ito, Y.; Casolaro, M.; Kono, K.; Imanishi, Y., An insulin-releasing system that is responsive to glucose. *Journal of Controlled Release* **1989**, 10, (2), 195.
74. Cartier, S.; Horbett, A.; Ratner, B. D., Glucose-sensitive membrane coated porous filters for control of hydraulic permeability and insulin delivery from a pressurized reservoir. *Journal of Membrane Science* **1995**, 106, (1-2), 17.
75. Goldstein, I. J.; Hollerman, C. E.; Smith, E. E., Protein-Carbohydrate Interaction. II. Inhibition Studies on the Interaction of Concanavalin A with Polysaccharides\*. *Biochemistry* **1965**, 4, (5), 876.
76. Edelman, G. M.; Cunningham, B. A.; Reeke Jr, G. N.; Becker, J. W.; Waxdal, M. J.; Wang, J. L., The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1972**, 69, (9), 2580.
77. Miyake, K.; Tanaka, T.; McNeil, P. L., Lectin-Based Food Poisoning: A New Mechanism of Protein Toxicity. *PLoS ONE* **2007**, 2, (8), e687.
78. Miyata, T.; Jikihara, A.; Nakamae, K.; Hoffman, A. S., Preparation of poly(2-glucosyloxyethyl methacrylate)-concanavalin A complex hydrogel and its glucose-sensitivity. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1996**, 197, (3), 1135.
79. Miyata, T.; Jikihara, A.; Nakamae, K.; Hoffman, A. S., Preparation of reversibly glucose-responsive hydrogels by covalent immobilization of lectin in polymer networks having pendant glucose. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2004**, 15, (9), 1085.
80. Zhang, R.; Tang, M.; Bowyer, A.; Eisenthal, R.; Hubble, J., Synthesis and characterization of a d-glucose sensitive hydrogel based on CM-dextran and concanavalin A. *Reactive and Functional Polymers* **2006**, 66, (7), 757.
81. Tanna, S.; Sahota, T. S.; Sawicka, K.; Taylor, M. J., The effect of degree of acrylic derivatisation on dextran and concanavalin A glucose-responsive materials for closed-loop insulin delivery. *Biomaterials* **2006**, 27, (25), 4498.
82. Borrok, M. J.; Kiessling, L. L.; Forest, K. T., Conformational changes of glucose/galactose-binding protein illuminated by open, unliganded, and ultra-high-resolution ligand-bound structures. *Protein Science* **2007**, 16, (6), 1032.
83. Vyas, N. K.; Vyas, M. N.; Quioco, F. A., Sugar and signal-transducer binding sites of the Escherichia coli galactose chemoreceptor protein. *Science* **1988**, 242, (4883), 1290.
84. Ehrick, J. D.; Luckett, M. R.; Khatwani, S.; Wei, Y.; Deo, S. K.; Bachas, L. G.; Daunert, S., Glucose responsive hydrogel networks based on protein recognition. *Macromolecular Bioscience* **2009**, 9, (9), 864.

## Références bibliographiques

85. Kitano, S.; Koyama, Y.; Kataoka, K.; Okano, T.; Sakurai, Y., A novel drug delivery system utilizing a glucose responsive polymer complex between poly (vinyl alcohol) and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) with a phenylboronic acid moiety. *Journal of Controlled Release* **1992**, 19, (1-3), 161.
86. Boeseken, J.; Vermaas, N., On the Composition of Acid Boric Acid-Diol Compounds. *The Journal of Physical Chemistry* **1931**, 35, (5), 1477.
87. Springsteen, G.; Wang, B., A detailed examination of boronic acid-diol complexation. *Tetrahedron* **2002**, 58, (26), 5291.
88. Boeseken, J., *Carbohydrate Chemistry* **1947**, 4, 189-210.
89. James, T. D.; Samankumara Sandanayake, K. R. A.; Shinkai, S., A glucose-selective molecular fluorescence sensor. *Angewandte Chemie (International Edition in English)* **1994**, 33, (21), 2207.
90. Siegel, R. A.; Gu, Y.; Lei, M.; Baldi, A.; Nuxoll, E. E.; Ziaie, B., Hard and soft micro- and nanofabrication: An integrated approach to hydrogel-based biosensing and drug delivery. *Journal of Controlled Release* **141**, (3), 303.
91. Kataoka, K.; Miyazaki, H.; Okano, T.; Sakurai, Y., Sensitive glucose-induced change of the lower critical solution temperature of poly[N,N-dimethylacrylamide-co-3-(acrylamido)phenyl-boronic acid] in physiological saline. *Macromolecules* **1994**, 27, (4), 1061.
92. Kataoka, K.; Miyazaki, H.; Bunya, M.; Okano, T.; Sakurai, Y., Totally synthetic polymer gels responding to external glucose concentration: Their preparation and application to on-off regulation of insulin release. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (48), 12694.
93. Matsumoto, A.; Ikeda, S.; Harada, A.; Kataoka, K., Glucose-responsive polymer bearing a novel phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at physiological pH conditions. *Biomacromolecules* **2003**, 4, (5), 1410.
94. Matsumoto, A.; Yoshida, R.; Kataoka, K., Glucose-responsive polymer gel bearing phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at the physiological pH. *Biomacromolecules* **2004**, 5, (3), 1038.
95. Matsumoto, A.; Yamamoto, K.; Yoshida, R.; Kataoka, K.; Aoyagi, T.; Miyahara, Y., A totally synthetic glucose responsive gel operating in physiological aqueous conditions. *Chemical Communications* **46**, (13), 2203.
96. Asher, S. A.; Alexeev, V. L.; Goponenko, A. V.; Sharma, A. C.; Lednev, I. K.; Wilcox, C. S.; Finegold, D. N., Photonic crystal carbohydrate sensors: Low ionic strength sugar sensing. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (11), 3322.
97. Shiino, D.; Murata, Y.; Kubo, A.; Kim, Y. J.; Kataoka, K.; Koyama, Y.; Kikuchi, A.; Yokoyama, M.; Sakurai, Y.; Okano, T., Amine containing phenylboronic acid gel for glucose-responsive insulin release under physiological pH. *Journal of Controlled Release* **1995**, 37, (3), 269.
98. Kikuchi, A.; Suzuki, K.; Okabayashi, O.; Hoshino, H.; Kataoka, K.; Sakurai, Y.; Okano, T., Glucose-sensing electrode coated with polymer complex gel containing phenylboronic acid. *Analytical Chemistry* **1996**, 68, (5), 823.
99. Holtz, J. H.; Holtz, J. S. W.; Munro, C. H.; Asher, S. A., Intelligent Polymerized Crystalline Colloidal Arrays: Novel Chemical Sensor Materials. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, (4), 780.
100. Holtz, J. H.; Asher, S. A., Polymerized colloidal crystal hydrogel films as intelligent chemical sensing materials. *Nature* **1997**, 389, (6653), 829.
101. Asher, S. A.; Sharma, A. C.; Goponenko, A. V.; Ward, M. M., Photonic crystal aqueous metal cation sensing materials. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (7), 1676.
102. Alexeev, V. L.; Sharma, A. C.; Goponenko, A. V.; Das, S.; Lednev, I. K.; Wilcox, C. S.; Finegold, D. N.; Asher, S. A., High ionic strength glucose-sensing photonic crystal. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (10), 2316.
103. Lee, Y. J.; Braun, P. V., Tunable inverse opal hydrogel pH sensors. *Advanced Materials* **2003**, 15, (7-8), 563.
104. Takeoka, Y.; Watanabe, M., Template synthesis and optical properties of chameleonic poly(N-isopropylacrylamide) gels using closest-packed self-assembled colloidal silica crystals. *Advanced Materials* **2003**, 15, (3), 199.

105. Takeoka, Y.; Watanabe, M., Polymer gels that memorize structures of mesoscopically sized templates. Dynamic and optical nature of periodic ordered mesoporous chemical gels. *Langmuir* **2002**, 18, (16), 5977.
106. Nakayama, D.; Takeoka, Y.; Watanabe, M.; Kataoka, K., Simple and precise preparation of a porous gel for a colorimetric glucose sensor by a templating technique. *Angewandte Chemie - International Edition* **2003**, 42, (35), 4197.
107. Lee, Y. J.; Pruzinsky, S. A.; Braun, P. V., Glucose-Sensitive Inverse Opal Hydrogels: Analysis of Optical Diffraction Response. *Langmuir* **2004**, 20, (8), 3096.
108. Blyth, J.; Millington, R. B.; Mayes, A. G.; Frears, E. R.; Lowe, C. R., Holographic sensor for water in solvents. *Analytical Chemistry* **1996**, 68, (7), 1089.
109. Kabilan, S.; Marshall, A. J.; Sartain, F. K.; Lee, M. C.; Hussain, A.; Yang, X.; Blyth, J.; Karangu, N.; James, K.; Zeng, J.; Smith, D.; Domschke, A.; Lowe, C. R., Holographic glucose sensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, 20, (8 SPEC. ISS.), 1602.
110. Lee, M. C.; Kabilan, S.; Hussain, A.; Yang, X.; Blyth, J.; Lowe, C. R., Glucose-sensitive holographic sensors for monitoring bacterial growth. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (19), 5748.
111. Kabilan, S.; Blyth, J.; Lee, M. C.; Marshall, A. J.; Hussain, A.; Yang, X. P.; Lowe, C. R., Glucose-sensitive holographic sensors. *Journal of Molecular Recognition* **2004**, 17, (3), 162.
112. Dean, K. E. S.; Horgan, A. M.; Marshall, A. J.; Kabilan, S.; Pritchard, J., Selective holographic detection of glucose using tertiary amines. *Chemical Communications* **2006**, (33), 3507.
113. Honda, M.; Takeoka, Y.; Seki, T.; Kataoka, K. In *Preparation and optical properties of ordered arrays of glucose-responsible nanogel particles trapped in inverse opal polystyrene*, Polymer Preprints, Japan, Nagoya, 2006; Nagoya, 2006; p 1717.
114. Horgan, A. M.; Marshall, A. J.; Kew, S. J.; Dean, K. E. S.; Creasey, C. D.; Kabilan, S., Crosslinking of phenylboronic acid receptors as a means of glucose selective holographic detection. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, 21, (9), 1838.
115. Lei, M.; Baldi, A.; Nuxoll, E.; Siegel, R. A.; Ziaie, B., A hydrogel-based implantable micromachined transponder for wireless glucose measurement. *Diabetes Technology and Therapeutics* **2006**, 8, (1), 112.
116. Matsumoto, A.; Sato, N.; Sakata, T.; Yoshida, R.; Kataoka, K.; Miyahara, Y., Chemical-to-electrical-signal transduction synchronized with smart gel volume phase transition. *Advanced Materials* **2009**, 21, (43), 4372.
117. Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B., The relationship among pKa, pH, and binding constants in the interactions between boronic acids and diols - It is not as simple as it appears. *Tetrahedron* **2004**, 60, (49), 11205.
118. Hisamitsu, I.; Kataoka, K.; Okano, T.; Sakurai, Y., Glucose-responsive gel from phenylborate polymer and poly(vinyl alcohol): Prompt response at physiological pH through the interaction of berate with amino group in the gel. *Pharmaceutical Research* **1997**, 14, (3), 289.
119. Podual, K.; Doyle Iii, F. J.; Peppas, N. A., Dynamic behavior of glucose oxidase-containing microparticles of poly(ethylene glycol)-grafted cationic hydrogels in an environment of changing pH. *Biomaterials* **2000**, 21, (14), 1439.
120. Niwa, M.; Sawada, T.; Higashi, N., Surface monolayers of polymeric amphiphiles carrying a copolymer segment composed of phenylboronic acid and amine. Interaction with saccharides at the air-water interface. *Langmuir* **1998**, 14, (14), 3916.
121. Winblade, N. D.; Nikolic, I. D.; Hoffman, A. S.; Hubbell, J. A., Blocking adhesion to cell and tissue surfaces by the chemisorption of a poly-L-lysine-graft-(poly(ethylene glycol); phenylboronic acid) copolymer. *Biomacromolecules* **2000**, 1, (4), 523.
122. Lorand, J. P.; Edwards, J. O., Polyol complexes and structure of the benzeneboronate ion. *Journal of Organic Chemistry* **1959**, 24, (6), 769.
123. Yan, J.; Fang, H.; Wang, B., Boronolactins and fluorescent boronolactins: An examination of the detailed chemistry issues important for the design. *Medicinal Research Reviews* **2005**, 25, (5), 490.

124. Oi, T.; Takeda, T.; Kakihana, H., Esterification of boric acid with 1,2-propanediol, 3-amino-1,2-propanediol, and 3-dimethylamino-1,2-propanediol as studied by boron-11 NMR spectroscopy. *Bull Chem Soc Jpn* **1992**, (65), 1903–1909.
125. Van Duin, M.; Peters, J. A.; Kieboom, A. P. G.; Van Bekkum, H., The pH dependence of the stability of esters of boric acid and borate in aqueous medium as studied by  $^{11}\text{B}$  NMR. *Tetrahedron* **1984**, 40, (15), 2901.
126. Van Duin, M.; Peters, J. A.; Kieboom, A. P. G.; Van Bekkum, H., Studies on borate esters II. Structure and stability of borate esters of polyhydroxycarboxylates and related polyols in aqueous alkaline media as studied by  $^{11}\text{B}$  NMR. *Tetrahedron* **1985**, 41, (16), 3411.
127. Soundararajan, S.; Badawi, M.; Montano Kohlrust, C.; Hageman, J. H., Boronic acids for affinity chromatography: Spectral methods for determinations of ionization and diol-binding constants. *Analytical Biochemistry* **1989**, 178, (1), 125.
128. Springsteen, G.; Wang, B., Alizarin red S. as a general optical reporter for studying the binding of boronic acids with carbohydrates. *Chemical Communications* **2001**, (17), 1608.
129. Shiomori, K.; Ivanov, A. E.; Galaev, I. Y.; Kawano, Y.; Mattiasson, B., Thermoresponsive Properties of Sugar Sensitive Copolymer of N-Isopropylacrylamide and 3-(Acrylamido)phenylboronic Acid. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2004**, 205, (1), 27.
130. Ivanov, A. E.; Shiomori, K.; Kawano, Y.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B., Effects of polyols, saccharides, and glycoproteins on thermoprecipitation of phenylboronate-containing copolymers. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (4), 1017.
131. Ivanov, A. E.; Panahi, H. A.; Kuzimenkova, M. V.; Nilsson, L.; Bergenstahl, B.; Waqif, H. S.; Jahanshahi, M.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B., Affinity adhesion of carbohydrate particles and yeast cells to boronate-containing polymer brushes grafted onto siliceous supports. *Chemistry - A European Journal* **2006**, 12, (27), 7204.
132. Ivanov, A. E.; Eccles, J.; Panahi, H. A.; Kumar, A.; Kuzimenkova, M. V.; Nilsson, L.; Bergenstahl, B.; Long, N.; Phillips, G. J.; Mikhalovsky, S. V.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B., Boronate-containing polymer brushes: Characterization, interaction with saccharides and mammalian cancer cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2009**, 88, (1), 213.
133. Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K., Surface characterization of functionalized polylactide through the coating with heterobifunctional poly(ethylene glycol)/polylactide block copolymers. *Biomacromolecules* **2000**, 1, (1), 39.
134. Uchimura, E.; Otsuka, H.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K., Totally synthetic polymer with lectin-like function: Induction of killer cells by the copolymer of 3-acrylamidophenylboronic acid with N,N-dimethylacrylamide. *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, 72, (3), 307.
135. Otsuka, H.; Ikeya, T.; Okano, T.; Kataoka, K., Activation of lymphocyte proliferation by boronate-containing polymer immobilised on substrate: The effect of boron content on lymphocyte proliferation. *European Cells and Materials* **2006**, 12, 36.
136. Matsumoto, A.; Sato, N.; Kataoka, K.; Miyahara, Y., Noninvasive sialic acid detection at cell membrane by using phenylboronic acid modified self-assembled monolayer gold electrode. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, (34), 12022.
137. Alexeev, V. L.; Das, S.; Finegold, D. N.; Asher, S. A., Photonic crystal glucose-sensing material for noninvasive monitoring of glucose in tear fluid. *Clinical Chemistry* **2004**, 50, (12), 2353.
138. Ben-Moshe, M.; Alexeev, V. L.; Asher, S. A., Fast responsive crystalline colloidal array photonic crystal glucose sensors. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (14), 5149.
139. Ward Muscatello, M. M.; Stunja, L. E.; Asher, S. A., Polymerized crystalline colloidal array sensing of high glucose concentrations. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, (12), 4978.
140. Samoei, G. K.; Wang, W.; Escobedo, J. O.; Xu, X.; Schneider, H. J.; Cook, R. L.; Strongin, R. M., A chemomechanical polymer that functions in blood plasma with high glucose selectivity. *Angewandte Chemie - International Edition* **2006**, 45, (32), 5319.
141. Tierney, S.; Volden, S.; Stokke, B. T., Glucose sensors based on a responsive gel incorporated as a Fabry-Perot cavity on a fiber-optic readout platform. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 24, (7), 2034.

142. Tierney, S.; Hasle Falch, B. M.; Hjelme, D. R.; Stokke, B. T., Determination of glucose levels using a functionalized hydrogel-optical fiber biosensor: Toward continuous monitoring of blood glucose in vivo. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, (9), 3630.
143. Li, S.; Davis, E. N.; Anderson, J.; Lin, Q.; Wang, Q., Development of boronic acid grafted random copolymer sensing fluid for continuous glucose monitoring. *Biomacromolecules* **2009**, 10, (1), 113.
144. Siegel, R. A.; Gu, Y.; Baldi, A.; Ziaie, B. In *Novel swelling/shrinking behaviors of glucose-binding hydrogels and their potential use in a microfluidic insulin delivery system*, Macromolecular Symposia, **2004**, 207, (1), 249.
145. Murray, M. J.; Snowden, M. J., The preparation, characterisation and applications of colloidal microgels. *Advances in Colloid and Interface Science* **1995**, 54, (C), 73.
146. Tanaka, T.; Fillmore, D. J., Kinetics of swelling of gels. *The Journal of Chemical Physics* **1979**, 70, (3), 1214.
147. Tanaka, T.; Sato, E.; Hirokawa, Y.; Hirotsu, S.; Peetermans, J., Critical kinetics of volume phase transition of gels. *Physical Review Letters* **1985**, 55, (22), 2455.
148. Baker, W. O., Microgel, A New Macromolecule. *Industrial & Engineering Chemistry* **1949**, 41, (3), 511.
149. Pelton, R. H.; Chibante, P., Preparation of aqueous latices with N-isopropylacrylamide. *Colloids and Surfaces* **1986**, 20, (3), 247.
150. Duracher, D.; Elaïssari, A.; Pichot, C., Characterization of cross-linked poly(N-isopropylmethacrylamide) microgel latexes. *Colloid and Polymer Science* **1999**, 277, (10), 905.
151. Hazot, P.; Delair, T.; Elaïssari, A.; Pichot, C.; Chapel, J. P.; Davenas, J., Synthesis and characterization of poly (N-ethylmethacrylamide) thermosensitive latex particles. *Macromolecular Symposia* **2000**, 150, 291.
152. McPhee, W.; Tam, K. C.; Pelton, R., Poly(N-isopropylacrylamide) Latices Prepared with Sodium Dodecyl Sulfate. *Journal of Colloid And Interface Science* **1993**, 156, (1), 24.
153. Choi, H. S.; Kim, J. M.; Lee, K. J.; Bae, Y. C., Swelling behavior of thermosensitive N-isopropylacrylamide-ethyl N-acryloylglycine submicron-sized copolymer gel particles. *Journal of Applied Polymer Science* **1998**, 69, (4), 799.
154. Snowden, M. J.; Chowdhry, B. Z.; Vincent, B.; Morris, G. E., Colloidal copolymer microgels of N-isopropylacrylamide and acrylic acid: pH, ionic strength and temperature effects. *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions* **1996**, 92, (24), 5013.
155. Meunier, F.; Elaïssari, A.; Pichot, C., Preparation and characterization of cationic poly(n-isopropylacrylamide) copolymer latexes. *Polymers for Advanced Technologies* **1995**, 6, (7), 489.
156. Wu, X.; Pelton, R. H.; Hamielec, A. E.; Woods, D. R.; McPhee, W., The kinetics of poly(N-isopropylacrylamide) microgel latex formation. *Colloid & Polymer Science* **1994**, 272, (4), 467.
157. Varga, I.; Gilanyi, T.; Mészáros, R.; Filipcsei, G.; Zrinyi, M., Effect of cross-link density on the internal structure of poly(N-isopropylacrylamide) microgels. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, (38), 9071.
158. Stieger, M.; Richtering, W.; Pedersen, J. S.; Lindner, P., Small-angle neutron scattering study of structural changes in temperature sensitive microgel colloids. *Journal of Chemical Physics* **2004**, 120, (13), 6197.
159. Guillermo, A.; Cohen Addad, J. P.; Bazile, J. P.; Duracher, D.; Elaïssari, A.; Pichot, C., NMR investigations into heterogeneous structures of thermosensitive microgel particles. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* **2000**, 38, (6), 889.
160. Arleth, L.; Xia, X.; Hjelm, R. P.; Wu, J.; Zhibinc, H. U., Volume transition and internal structures of small poly(N-isopropylacrylamide) microgels. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* **2005**, 43, (7), 849.
161. Andersson, M.; Maunu, S. L., Structural studies of poly(N-isopropylacrylamide) microgels: Effect of SDS surfactant concentration in the microgel synthesis. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* **2006**, 44, (23), 3305.

162. Hoare, T.; Pelton, R., Highly pH and Temperature Responsive Microgels Functionalized with Vinylacetic Acid. *Macromolecules* **2004**, 37, (7), 2544.
163. Hoare, T.; Pelton, R., Functional Group Distributions in Carboxylic Acid Containing Poly(N-isopropylacrylamide) Microgels. *Langmuir* **2004**, 20, (6), 2123.
164. Hoare, T.; Pelton, R., Titrametric characterization of pH-induced phase transitions in functionalized microgels. *Langmuir* **2006**, 22, (17), 7342.
165. Mumick, P. S.; McCormick, C. L., Water soluble copolymers. 54: N-isopropylacrylamide-co-acrylamide copolymers in drag reduction: Synthesis, characterization, and dilute solution behavior. *Polymer Engineering and Science* **1994**, 34, (18), 1419.
166. Ponratnam, S.; Kapur, S. L., Effect of pH on the reactivity ratios in aqueous solution copolymerization of acrylic acid and N-Vinylpyrrolidone. *J Polym Sci Polym Chem Ed* **1976**, 14, (8), 1987.
167. Jones, C. D.; Lyon, L. A., Synthesis and characterization of multiresponsive core-shell microgels. *Macromolecules* **2000**, 33, (22), 8301.
168. Gan, D.; Lyon, L. A., Tunable swelling kinetics in core - shell hydrogel nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, (31), 7511.
169. Gan, D.; Lyon, L. A., Interfacial nonradiative energy transfer in responsive core-shell hydrogel nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, (34), 8203.
170. Jones, C. D.; Lyon, L. A., Dependence of shell thickness on core compression in acrylic acid modified poly(N-isopropylacrylamide) core/shell microgels. *Langmuir* **2003**, 19, (11), 4544.
171. Jones, C. D.; Lyon, L. A., Shell-restricted swelling and core compression in poly(N-isopropylacrylamide) core-shell microgels. *Macromolecules* **2003**, 36, (6), 1988.
172. Berndt, I.; Richtering, W., Doubly temperature sensitive core-shell microgels. *Macromolecules* **2003**, 36, (23), 8780.
173. Berndt, I.; Pedersen, J. S.; Lindner, P.; Richtering, W., Influence of shell thickness and cross-link density on the structure of temperature-sensitive poly-N-isopropylacrylamide - Poly-N-isopropylmethacrylamide core - Shell microgels investigated by small-angle neutron scattering. *Langmuir* **2006**, 22, (1), 459.
174. Berndt, I.; Pedersen, J. S.; Richtering, W., Temperature-sensitive core-shell microgel particles with dense shell. *Angewandte Chemie - International Edition* **2006**, 45, (11), 1737.
175. Berndt, I.; Popescu, C.; Wortmann, F. J.; Richtering, W., Mechanics versus thermodynamics: Swelling in multiple-temperature-sensitive core-shell microgels. *Angewandte Chemie - International Edition* **2006**, 45, (7), 1081.
176. Berndt, I.; Pedersen, J. S.; Richtering, W., Structure of multiresponsive "intelligent" core-shell microgels. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (26), 9372.
177. Gan, D.; Lyon, L. A., Synthesis and protein adsorption resistance of PEG-modified poly(N-isopropylacrylamide) core-shell microgels. *Macromolecules* **2002**, 35, (26), 9634.
178. Nayak, S.; Gan, D.; Serpe, M. J.; Lyon, L. A., Hollow thermoresponsive microgels. *Small* **2005**, 1, (4), 416.
179. Zhang, F.; Wang, C. C., Preparation of thermoresponsive core-shell polymeric microspheres and hollow PNIPAM microgels. *Colloid and Polymer Science* **2008**, 286, (8-9), 889.
180. Gao, H.; Yang, W.; Min, K.; Zha, L.; Wang, C.; Fu, S., Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) nanocapsules with controlled permeability. *Polymer* **2005**, 46, (4 SPEC. ISS.), 1087.
181. Singh, N.; Lyon, L. A., Au nanoparticle templated synthesis of pNIPAm nanogels. *Chemistry of Materials* **2007**, 19, (4), 719.
182. Snowden, M. J.; Vincent, B., The temperature-controlled flocculation of crosslinked latex particles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1992**, (16), 1103.
183. Serpe, M. J.; Kim, J.; Lyon, L. A., Colloidal hydrogel microlenses. *Advanced Materials* **2004**, 16, (2), 184.
184. Kim, J.; Serpe, M. J.; Lyon, L. A., Hydrogel microparticles as dynamically tunable microlenses. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (31), 9512.

185. Kim, J.; Serpe, M. J.; Lyon, L. A., Photoswitchable microlens arrays. *Angewandte Chemie - International Edition* **2005**, 44, (9), 1333.
186. Nayak, S.; Lee, H.; Chmielewski, J.; Lyon, L. A., Folate-mediated cell targeting and cytotoxicity using thermoresponsive microgels. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (33), 10258.
187. Blackburn, W. H.; Dickerson, E. B.; Smith, M. H.; McDonald, J. F.; Lyon, L. A., Peptide-functionalized nanogels for targeted siRNA delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, 20, (5), 960.
188. Das, M.; Mardyani, S.; Chan, W. C. W.; Kumacheva, E., Biofunctionalized pH-responsive microgels for cancer cell targeting: Rational design. *Advanced Materials* **2006**, 18, (1), 80.
189. Lapeyre, V. r.; Gosse, I.; Chevreux, S.; Ravaine, V. r., Monodispersed Glucose-Responsive Microgels Operating at Physiological Salinity. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (12), 3356.
190. Ge, H.; Ding, Y.; Ma, C.; Zhang, G., Temperature-controlled release of diols from N-isopropylacrylamide-co- acrylamidophenylboronic acid microgels. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, (41), 20635.
191. Zhang, Y.; Guan, Y.; Zhou, S., Synthesis and volume phase transitions of glucose-sensitive microgels. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (11), 3196.
192. Hoare, T.; Pelton, R., Engineering glucose swelling responses in poly(N-isopropylacrylamide)-based microgels. *Macromolecules* **2007**, 40, (3), 670.
193. Hazot, P.; Delair, T.; Elaïssari, A.; Chapel, J. P.; Pichot, C., Functionalization of poly(N-ethylmethacryl-amide) thermosensitive particles by phenylboronic acid. *Colloid and Polymer Science* **2002**, 280, (7), 637.
194. De Geest, B. G.; Jonas, A. M.; Demeester, J.; De Smedt, S. C., Glucose-responsive polyelectrolyte capsules. *Langmuir* **2006**, 22, (11), 5070.
195. Levy, T.; Déjugnat, C.; Sukhorukov, G. B., Polymer microcapsules with carbohydrate-sensitive properties. *Advanced Functional Materials* **2008**, 18, (10), 1586.
196. Zhang, Y.; Guan, Y.; Zhou, S., Permeability control of glucose-sensitive nanoshells. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (12), 3842.
197. Ding, Z.; Guan, Y.; Zhang, Y.; Zhu, X. X., Synthesis of glucose-sensitive self-assembled films and their application in controlled drug delivery. *Polymer* **2009**, 50, (17), 4205.
198. Jin, X.; Zhang, X.; Wu, Z.; Teng, D.; Zhang, X.; Wang, Y.; Wang, Z.; Li, C., Amphiphilic random glycopolymer based on phenylboronic acid: Synthesis, characterization, and potential as glucose-sensitive matrix. *Biomacromolecules* **2009**, 10, (6), 1337.
199. Roy, D.; Cambre, J. N.; Sumerlin, B. S., Sugar-responsive block copolymers by direct RAFT polymerization of unprotected boronic acid monomers. *Chemical Communications* **2008**, (21), 2477.
200. Wang, B.; Ma, R.; Liu, G.; Li, Y.; Liu, X.; An, Y.; Shi, L., Glucose-responsive micelles from self-assembly of poly(ethylene glycol)-a-poly(acrylic acid-co-acrylamidophenylboronic acid) and the controlled release of insulin. *Langmuir* **2009**, 25, (21), 12522.
201. Zhao, Y.; Trewyn, B. G.; Slowing, I. I.; Lin, V. S. Y., Mesoporous silica nanoparticle-based double drug delivery system for glucose-responsive controlled release of insulin and cyclic AMP. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, (24), 8398.
202. Oussoren, C.; Storm, G., Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 50, (1-2), 143.
203. Yang, W.; Gao, X.; Wang, B., Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents. *Medicinal Research Reviews* **2003**, 23, (3), 346.
204. Lapeyre, V.; Gosse, I.; Chevreux, S.; Ravaine, V., Monodispersed glucose-responsive microgels operating at physiological salinity. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (12), 3356.
205. Sierra-Martan, B.; Romero-Cano, M. S.; Fernandez-Nieves, A.; Fernandez-Barbero, A., Thermal control over the electrophoresis of soft colloidal particles. *Langmuir* **2006**, 22, (8), 3586.
206. Duracher, D.; Elaïssari, A.; Pichot, C., Preparation of poly(N-isopropylmethacrylamide) latexes kinetic studies and characterization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **1999**, 37, (12), 1823.

## Références bibliographiques

207. Hazot, P.; Chapel, J. P.; Pichot, C.; Elaissari, A.; Delair, T., Preparation of poly(N-ethyl methacrylamide) particles via an emulsion/precipitation process: The role of the crosslinker. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **2002**, 40, (11), 1808.
208. Hazot, P.; Delair, T.; Pichot, C.; Chapel, J. P.; Elaissari, A., Poly(N-ethylmethacrylamide) thermally-sensitive microgel latexes: Effect of the nature of the crosslinker on the polymerization kinetics and physicochemical properties. *Comptes Rendus Chimie* **2003**, 6, (11-12), 1417.
209. Kawasaki, T.; Akanuma, H.; Yamanouchi, T., Increased fructose concentrations in blood and urine in patients with diabetes. *Diabetes Care* **2002**, 25, (2), 353.
210. Eggert, H.; Frederiksen, J.; Morin, C.; Norrild, J. C., A new glucose-selective fluorescent bisboronic acid. First report of strong  $\alpha$ -furanose complexation in aqueous solution at physiological pH. *Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, (11), 3846.
211. Kawasaki, T.; Ogata, N.; Akanuma, H.; Sakai, T.; Watanabe, H.; Ichiyanagi, K.; Yamanouchi, T., Postprandial Plasma Fructose Level Is Associated with Retinopathy in Patients with Type 2 Diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental* **2004**, 53, (5), 583.
212. Badugu, R.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D., Ophthalmic glucose sensing: A novel monosaccharide sensing disposable and colorless contact lens. *Analytist* **2004**, 129, (6), 516.
213. Katamaya, M.; Matsuda, Y.; Kobayashi, K.; Kaneko, S.; Ishikawa, H., Simultaneous determination of glucose, 1,5-anhydro-D-glucitol and related sugar alcohols in serum by high-performance liquid chromatography with benzoic acid derivation. *Biomedical Chromatography* **2006**, 20, (5), 440.
214. Van Haeringen, N. J.; Glasius, E., Collection method dependant concentrations of some metabolites in human tear fluid, with special reference to glucose in hyperglycaemic conditions. *Albrecht von Graefes Archiv fur Klinische und Experimentelle Ophthalmologie* **1977**, 202, (1), 1.
215. Ohara, T. J.; Rajagopalan, R.; Heller, A., "Wired" enzyme electrodes for amperometric determination of glucose or lactate in the presence of interfering substances. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, (15), 2451.
216. Feneberg, R.; Sparber, M.; Veldhuis, J. D.; Mehls, O.; Ritz, E.; Schaefer, F., Synchronous fluctuations of blood insulin and lactate concentrations in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1999**, 84, (1), 220.
217. Sartain, F. K.; Yang, X.; Lowe, C. R., Holographic lactate sensor. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (16), 5664.
218. Shimojo, N.; Naka, K.; Uenoyama, H.; Hamamoto, K.; Yoshioka, K.; Okuda, K., Electrochemical assay system with single-use electrode strip for measuring lactate in whole blood. *Clinical Chemistry* **1993**, 39, (11 I), 2312.
219. Morishita, M.; Lowman, A. M.; Takayama, K.; Nagai, T.; Peppas, N. A., Elucidation of the mechanism of incorporation of insulin in controlled release systems based on complexation polymers. *Journal of Controlled Release* **2002**, 81, (1-2), 25.
220. Nakamura, K.; Murray, R. J.; Joseph, J. I.; Peppas, N. A.; Morishita, M.; Lowman, A. M., Oral insulin delivery using P(MAA-g-EG) hydrogels: Effects of network morphology on insulin delivery characteristics. *Journal of Controlled Release* **2004**, 95, (3), 589.
221. Kim, B.; Peppas, N. A., Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels for oral protein delivery applications. *Biomedical Microdevices* **2003**, 5, (4), 333.
222. Nolan, C. M.; Serpe, M. J.; Lyon, L. A., Thermally modulated insulin release from microgel thin films. *Biomacromolecules* **2004**, 5, (5), 1940.
223. Su, S.; Ali, M. A.; Filipe, C. D. M.; Li, Y.; Pelton, R., Microgel-based inks for paper-supported biosensing applications. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (3), 935.
224. Scherthaner, G., Immunogenicity and allergenic potential of animal and human insulins. *Diabetes Care* **1993**, 16, (3 SUPPL. 3), 155.
225. Brissova, M.; Petro, M.; Lacik, I.; Powers, A. C.; Wang, T., Evaluation of microcapsule permeability via inverse size exclusion chromatography. *Analytical Biochemistry* **1996**, 242, (1), 104.
226. Nolan, C. M.; Gelbaum, L. T.; Lyon, L. A.,  $^1\text{H}$  NMR investigation of thermally triggered insulin release from poly(N-isopropylacrylamide) microgels. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (10), 2918.

227. Wong, J. E.; Gaharwar, A. K.; Müller-Schulte, D.; Bahadur, D.; Richtering, W., Dual-stimuli responsive PNIPAM microgel achieved via layer-by-layer assembly: Magnetic and thermoresponsive. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 324, (1-2), 47.
228. Hendrickson, G. R.; Andrew Lyon, L., Microgel translocation through pores under confinement. *Angewandte Chemie - International Edition* **49**, (12), 2193.
229. Ferguson, J. A.; Healey, B. G.; Bronk, K. S.; Barnard, S. M.; Walt, D. R., Simultaneous monitoring of pH, CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> using an optical imaging fiber. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 340, (1-3), 123.
230. Fattaccioli, J.; Baudry, J.; Emerard, J. D.; Bertrand, E.; Goubault, C.; Henry, N.; Bibette, J., Size and fluorescence measurements of individual droplets by flow cytometry. *Soft Matter* **2009**, 5, (11), 2232.
231. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, 72, (1-2), 248.
232. Zhang, M.; Mullens, C.; Gorski, W., Insulin oxidation and determination at carbon electrodes. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, (19), 6396.
233. Salimi, A.; Roushani, M.; Soltanian, S.; Hallaj, R., Picomolar detection of insulin at renewable nickel powder-doped carbon composite electrode. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (19), 7431.
234. Wang, J.; Tangkuaram, T.; Loyprasert, S.; Vazquez-Alvarez, T.; Veerasai, W.; Kanatharana, P.; Thavarungkul, P., Electrocatalytic detection of insulin at RuOx/carbon nanotube-modified carbon electrodes. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 581, (1), 1.
235. Salimi, A.; Roushani, M.; Haghghi, B.; Soltanian, S., Amperometric detection of insulin at renewable sol-gel derived carbon ceramic electrode modified with nickel powder and potassium octacyanomolybdate(IV). *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, 22, (2), 220.
236. Wang, J.; Musameh, M., Electrochemical detection of trace insulin at carbon-nanotube-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 511, (1), 33.
237. Pikulski, M.; Gorski, W., Iridium-based electrocatalytic systems for the determination of insulin. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, (13), 2696.
238. Gorski, W.; Aspinwall, C. A.; Lakey, J. R. T.; Kennedy, R. T., Ruthenium catalyst for amperometric determination of insulin at physiological pH. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1997**, 425, (1-2), 191.
239. Lapeyre, V.; Ancla, C.; Catargi, B.; Ravaine, V., Glucose-responsive microgels with a core-shell structure. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 327, (2), 316.
240. Lapeyre, V.; Renaudie, N.; Dechezelles, J. F.; Saadaoui, H.; Ravaine, S.; Ravaine, V., Multiresponsive hybrid microgels and hollow capsules with a layered structure. *Langmuir* **2009**, 25, (8), 4659.
241. Bernard, J.; Hao, X.; Davis, T. P.; Barner-Kowollik, C.; Stenzel, M. H., Synthesis of various glycopolymer architectures via RAFT polymerization: From block copolymers to stars. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (1), 232.
242. Ivanov, A. E.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B., Interaction of sugars, polysaccharides and cells with boronate-containing copolymers: From solution to polymer brushes. *Journal of Molecular Recognition* **2006**, 19, (4), 322.
243. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65, (1-2), 55.
244. Parish, C. R.; Mullbacher, A., Automated colorimetric assay for T cell cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 58, (1-2), 225.
245. Angyal, S. J., The Composition of Reducing Sugars in Solution. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1984; Vol. 42, p 15.
246. Shiomi, Y.; Saisho, M.; Tsukagoshi, K.; Shinkai, S., Specific complexation of glucose with a diphenylmethane-3,3'-diboronic acid derivative: Correlation between the absolute configuration of mono- and di-saccharides and the circular dichroic activity of the complex. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1993**, (17), 2111.

## Références bibliographiques

247. Kondo, K.; Shiomi, Y.; Saisho, M.; Harada, T.; Shinkai, S., Specific complexation of disaccharides with diphenyl-3,3'-diboronic acid than can be detected by circular dichroism. *Tetrahedron* **1992**, 48, (38), 8239.
248. Norrild, J. C.; Eggert, H., Evidence for mono- and bidentate boronate complexes of glucose in the furanose form. Application of  $^1J_{C-C}$  coupling constants as a structural probe. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, (5), 1479.
249. Bielecki, M.; Eggert, H.; Norrild, J. C., A fluorescent glucose sensor binding covalently to all five hydroxy groups of  $\alpha$ -D-glucofuranose. A reinvestigation. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2* **1999**, (3), 449.
250. Nisato, G.; Munch, J. P.; Candau, S. J., Swelling, structure, and elasticity of polyampholyte hydrogels. *Langmuir* **1999**, 15, (12), 4236.
251. Suzuki, H.; Wang, B.; Yoshida, R.; Kokufuta, E., Potentiometric titration behaviors of a polymer and gel consisting of N-isopropylacrylamide and acrylic acid. *Langmuir* **1999**, 15, (12), 4283.
252. Zenkl, G.; Mayr, T.; Klimant, I., Sugar-responsive fluorescent nanospheres. *Macromolecular Bioscience* **2008**, 8, (2), 146.
253. Zenkl, G.; Klimant, I., Fluorescent acrylamide nanoparticles for boronic acid based sugar sensing - from probes to sensors. *Microchimica Acta* **2009**, 166, (1-2), 123.
254. Wu, W.; Zhou, T.; Shen, J.; Zhou, S., Optical detection of glucose by CdS quantum dots immobilized in smart microgels. *Chemical Communications* **2009**, (29), 4390.
255. Liu, Y.; Zhang, Y.; Guan, Y., New polymerized crystalline colloidal array for glucose sensing. *Chemical Communications* **2009**, (14), 1867.
256. Uchiyama, S.; Matsumura, Y.; De Silva, A. P.; Iwai, K., Fluorescent Molecular Thermometers Based on Polymers Showing Temperature-Induced Phase Transitions and Labeled with Polarity-Responsive Benzofurazans. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (21), 5926.
257. Matsumura, Y.; Iwai, K., Thermo-responsive behavior and microenvironments of poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles as studied by fluorescent label method. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 296, (1), 102.
258. Iwai, K.; Matsumura, Y.; Uchiyama, S.; De Silva, A. P., Development of fluorescent microgel thermometers based on thermo-responsive polymers and their modulation of sensitivity range. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, 15, (27-28), 2796.









## Résumé

Le traitement du diabète de type 1 en boucle fermée représente un enjeu majeur tant sur le plan sociétal que thérapeutique. L'une des solutions consiste en une formulation thérapeutique basée sur des microvéhicules capables de délivrer la bonne dose d'insuline selon une cinétique adaptée aux variations de la glycémie.

Les microgels sont des particules de polymère réticulé formant des édifices submicrométriques tridimensionnels gonflés par un solvant, dont le taux de gonflement dépend des conditions environnementales. Leur porosité permet à la fois l'encapsulation d'espèces et leur libération à une vitesse dépendant de leur diffusion à travers le réseau. Nous avons synthétisé des microgels à base de poly(N-alkylacrylamide) fonctionnalisés par des récepteurs du glucose dérivés de l'acide phénylboronique. Ces microgels, à la base thermosensibles, présentent la propriété de changer de volume en fonction de la concentration en glucose et se présentent comme d'excellents candidats pour la délivrance auto-régulée d'insuline dans le cadre du traitement du diabète. Ils permettent la délivrance répétée de doses d'insuline modulée par la glycémie. La quantité d'insuline encapsulée a pu être améliorée en structurant les microgels en architecture cœur-écorce ou capsule.

En outre, nous avons utilisé ces microgels pour développer des capteurs au glucose, sélectifs vis-à-vis des autres saccharides et quelques études de cytotoxicité ont été amorcées et ont permis d'établir avec satisfaction que certains de nos objets n'étaient pas toxiques.

Les résultats obtenus ont donc permis d'affirmer que la technologie des microgels sensibles au glucose peut répondre de manière conceptuelle aux attentes des patients diabétiques pour permettre la délivrance d'insuline en boucle fermée.

### Mots clés :

Hydrogel, microgel, alkylacrylamide, acide phénylboronique, glucose, diabète, insuline, délivrance, boucle fermée.

### Abstract

Bioresponsive hydrogels can change many of their physical properties in response to the recognition of a target in the solution. In particular, changes in hydrogel swelling lead in turn to controllable changes in shape, volume, pore size, mechanical and optical properties. We focus our research on the development of glucose-responsive microgels which hold promising interest in the field of both sensing and drug delivery. These cross-linked polymer particles, made of highly swollen networks, can swell proportionally to the concentration of glucose in the surrounding medium. Since they are porous, they can entrap a drug and release it at a rate dependent on their swelling degree, which is of particular interest in the case of insulin as a drug. Such systems could be used as self-regulated insulin delivery systems for diabetes treatment.

With that aim, we have designed microgels able to sense glucose concentrations in the pathophysiological range, under physiological conditions. Insulin was successfully loaded into the nanogels and was shown to be released at a rate dependent on glucose concentration. Furthermore, microgels with a controlled internal structure were synthesized, such as core-shell microgels and capsules. These latter developments led to improvements in terms of insulin encapsulation efficiency and glucose-triggered delivery. Besides, other nanogel formulations were investigated, in order to improve both their biocompatibility as well as the selectivity of their response to glucose compared to other saccharides.

### Keywords:

Hydrogel, microgel, alkylacrylamide, phenylboronic acid, glucose, diabetes, insulin, drug delivery, closed-loop.