

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par

Léa Messenger

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Physico-chimie des Polymères

Nanogels de polysaccharides pour la délivrance d'insuline

Soutenue le : 14 Décembre 2012

Après avis de : Mme. Catherine Amiel
M. Bernard Cathala

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mme. AMIEL, Catherine	Professeur des Universités, Paris-Est Créteil	Rapporteur
M. CATHALA, Bernard	Directeur de recherche, INRA Nantes	Rapporteur
M. BARTHELEMY, Philippe	Professeur des Universités, Université Bordeaux 2	Président
M. CATARGI, Bogdan	Professeur des Universités, Université Bordeaux 2	Directeur de thèse
Mme. RAVAINÉ, Valérie	Maître de conférences, IPB	Directeur de thèse
Mme. WILDEGGER, Gudrun	Industriel, Sanofi-Aventis	Examineur
Mme. AUZELY-VELTY, Rachel	Professeur des Universités, CERMAV	Membre invité

Remerciements

Ce manuscrit présente les résultats obtenus lors de ce travail de thèse effectué au sein de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM), dans le groupe Nanosystèmes analytiques (NsysA) sous la direction de Valérie Ravaine et de Bogdan Catargi. Je remercie respectivement Alexander Kuhn et Neso Sojic pour l'accueil et les bonnes conditions de travail dont j'ai pu bénéficier durant ces trois années.

J'adresse tout d'abord mes remerciements à l'ensemble des membres du Jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse : Mme Catherine Amiel et M. Bernard Cathala en tant que rapporteurs, Mme Gudrun Wildegger en tant qu'examinatrice, M. Philippe Barthélémy en tant que Président, ainsi que Mme Rachel Auzély-Velty en tant que membre invité.

Je tiens à remercier Mme Valérie Ravaine pour m'avoir confié ce sujet de thèse que nous avons fait évoluer au cours de ces trois années riches en discussions scientifiques et expérimentales quasi quotidiennes. Celles-ci ont permis de dénouer de nombreuses embûches, de rebondir après des moments d'égarements et *in fine*, d'aboutir à cette trace manuscrite. Je la remercie également pour le soutien qu'elle m'a témoigné au cours de cette aventure, de son implication et de son enthousiasme pour la recherche, et de ses nombreux conseils à titre professionnels mais aussi personnels. Je retiens en particulier le conseil suivant : « L'évolution d'une thèse n'est pas linéaire ! ». Merci aussi de m'avoir fait goûter aux joies de l'enseignement *via* les heures de vacances à l'ENSCBP. Mes remerciements vont également à M. Bogdan Catargi pour l'ensemble des discussions échangées entre les mondes tellement différents de la chimie et de la médecine. En conclusion, Je les remercie tous les deux pour la complémentarité de la formation scientifique prodiguée et leur exprime mes vifs encouragements pour la suite de ce projet.

J'adresse ma gratitude à l'ensemble des membres du projet MEDICIN dans lequel s'est inscrite cette thèse, pour la richesse et l'étendue des discussions qui ont jalonné ces trois années. Je tiens en particulier à remercier Rachel Auzély-Velty de m'avoir accueilli au Centre de Recherche des Macromolécules végétales (CERMAV), et Emilie Hachet, doctorante au CERMAV, pour l'ensemble des ses conseils. Merci également à Sanofi-Aventis pour leur soutien scientifique mais aussi financier concrétisé au cours de cette thèse. Mes remerciements vont en outre à l'ANR pour avoir apprécié de la pertinence du projet MEDICIN et pour leur soutien financier.

Je désire également remercier l'ensemble des personnes avec qui j'ai pu collaborer pour mener à bien ce projet : Anne-laure Wirotius, Noël Pinaud et Jean-Michel Lasnier (ISM) pour

les analyses RMN, Eric Laurichesse et Véronique Schmitt (CRPP) pour l'utilisation du microfluidizer, et Nicolas Guidolain (LCPO) pour les analyses GPC. Une partie conséquente de ce travail consistait à imager la structure des nanogels d'acide hyaluronique. Je remercie à ce titre Sabrina Lacomme et Etienne Gontier (BIC) pour la formation et l'utilisation du TEM, Alain Brisson (CBMN) et Isabelle Paintrand (CERMAV) pour l'imagerie cryo-TEM et Patrick Garrigue pour la visualisation des nanogels en AFM. Enfin, pour les évaluations de cytotoxicité menées sur les nanogels, j'adresse mes vifs remerciements à Charlotte Lalande et Martine Renard (PTIB).

Un grand merci à la « team micro/nanogels » du laboratoire pour leur aide précieuse : Véro, Christophe, Florent et surtout Naira (je te suis très reconnaissante pour tout ce que tu as accompli depuis ton arrivée). J'ai également une pensée pour les étudiants novices au monde de la recherche qui ont pu ajouter une pierre à l'édifice : Julie Kempf, Johanne Mbianda et Gaëlle Rivière.

Mes sincères remerciements vont à l'ensemble des membres du laboratoire pour l'ambiance conviviale durant ces trois années passées avec eux. En particulier, merci à Sandra Pinet, Isabelle Gosse et Laurent Bouffier pour leurs conseils en synthèse organique et RMN, ainsi qu'à Stéphane Arbault et Bertrand Goudeau pour les discussions sur l'imagerie et la biologie. Une mention spéciale pour Véronique pour son aide expérimentale précieuse, son écoute à toute heure, et son soutien des plus sincères. Je n'oublie pas Aline, notre maman locale, pour ses conseils toujours pertinents, sa gentillesse et ses opinions engagées (Vive la Bretagne et la cause féminine !).

Je remercie profondément la famille éclectique des étudiants NsysA, sans qui la soupape aurait probablement explosé. Par ordre chronologique : Chris, Yémi, Mathias, Milena, Lisa, Laurent, Gabi, Cath, Suri, Salem, Zahra, Jérôme, Florent, Milica et les petits nouveaux. Une pensée pour les étudiants et jeunes chercheurs de passage : Emeline, Hélène, Pum, Ple, Maria, Kerry, Lorenzo, Michael et Nina. I address them "Melting pot" acknowledgements: Thanks, Danke, dhanyavad, chokrane, Kop Khun Kha, Grazie, Gracias and хвала, for all memorable moments we spent together. Une petite pensée pour le Dr. Emeline Girard pour sa passion des conseils, to Suri for late discussions in front of the microscope, et à KitKat pour sa spontanéité à toute heure.

Enfin, je tiens à remercier de tout cœur Dr. Lisa Peyrard, ma fidèle complice et amie, pour les nombreuses discussions échangées durant ces trois années à refaire le monde (de la recherche ou autre...).

Je remercie mes amis proches et ma famille pour leur écoute et leur soutien sans faille.

Am Ende vielen Dank an meinen Freund, Robin, ohne dich ist alle doof.... *Die Fackel der Liebe entzündet sich in der Küche (wie die Chemie...).*

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1. CONCEPTS GENERAUX ET CONTEXTE DE L'ETUDE	5
I. Hydrogels stimulables : concepts généraux	6
I.1. Définition des hydrogels	6
I.2. Structure des hydrogels	7
I.3. Hydrogels stimulables	8
I.4. Théorie de gonflement	8
I.4.1. Cas des hydrogels neutres	9
I.4.2. Cas des hydrogels chargés	10
I.5. Importance de la taille des hydrogels	12
II. Les matériaux sensibles au glucose : intérêt pour le traitement du diabète...13	
II.1. Le diabète et ses enjeux	13
II.2. Concept des hydrogels sensibles au glucose pour la délivrance d'insuline	14
II.3. Classification des hydrogels sensibles au glucose	17
II.3.1. Hydrogels modifiés par des ligands naturels	17
II.3.2. Hydrogels modifiés par l'acide phénylboronique	21
II.3.3. Microgels et nanogels sensibles au glucose	28
II.3.4. Autres types de matériaux sensibles au glucose utilisant l'acide phénylboronique	31
II.4. Bilan	33
III. Vers des microgels administrables <i>in vivo</i>	33
III.1. Objectif général du projet	33
III.2. Réseaux de Polysaccharides	35
III.2.1. Le HA, un glycosaminoglycane naturel	35
III.2.2. Renforcement des propriétés mécaniques de l'hydrogel : du réseau naturel eu réseau covalent	37
III.2.3. Conclusion intermédiaire	42
III.3. Microgels/Nanogels de polymères hydrosolubles	45
III.3.1. Fabrication de nano/microgels par polymérisation en milieu hétérogène	46
III.3.2. Fabrication de nano/microgels de biopolymères par d'autres techniques	62
III.3.3. Conclusion intermédiaire	65

IV. Projet MEDICIN	68
CHAPITRE 2. SYNTHÈSE DE NANOGELS A BASE D'ACIDE HYALURONIQUE	83
Introduction au chapitre.....	84
I. Stratégie de synthèse des nanogels et concepts de formulation	84
I.1. Stratégie générale de synthèse.....	84
I.2. Réticulation en milieu confiné.....	86
I.3. Cahier des charges pour les nanoréacteurs.....	88
I.4. Concepts de fabrication d'une émulsion.....	88
I.4.1. Stabilité des émulsions	89
I.4.2. Enjeux pour la préparation d'une émulsion de taille contrôlée.....	91
II. Synthèse des précurseurs de HA-MA	95
II.1. Voie de synthèse	95
II.2. Résultats	96
II.3. Quelques commentaires sur les hydrogels issus de ces précurseurs.....	99
III. Fabrication des nanogels par miniémulsion inverse	100
III.1. Miniémulsion inverse fragmentée par ultra-sons	100
III.1.1. Emulsification.....	101
III.1.2. Photopolymérisation	105
III.1.3. Purification de l'huile et redispersion en milieux aqueux	107
III.1.4. Bilan	111
III.2. Miniémulsion inverse fragmentée par dispositif microfluidique	111
III.2.1. Préparation de l'émulsion.....	111
III.2.2. Photopolymérisation	121
III.2.3. Purification des nanogels et redispersion en milieu aqueux	123
IV. Comportement des nanogels en solution- Contrôle de la photopolymérisation	128
IV.1. Présentation de l'étude	128
IV.2. Comportement en solution	130
IV.2.1. Influence des conditions de photopolymérisation sur les propriétés des nanogels	130

IV.2.2. Commentaires sur les conditions de photopolymérisation intermédiaires	134
IV.2.3. Notion de taux de gonflement.....	135
IV.2.4. Difficultés rencontrées lors de la caractérisation	135
IV.3. Contrôle de la réticulation par les méthacrylates.....	136
IV.3.1. Taux de conversion des méthacrylates	137
IV.3.2. Effet du confinement	139
IV.3.3. Avancement de la photopolymérisation dans une émulsion.....	140
IV.3.4. Limite de réticulation	140
IV.4. Influence de la taille de l'émulsion matricielle	141
IV.4.1. Influence de l'état de l'émulsion sur la photopolymérisation.....	141
IV.4.2. Modulation de la taille des gouttes lors de la fabrication de l'émulsion	143
V. Contrôle du taux de gonflement des nanogels	143
V.1. Contrôle du taux de gonflement via le DM.....	144
V.2. Influence de la concentration en macromère C_p dans la phase dispersée	145
V.3. Influence de la masse molaire du macromère	145
V.4. Influence du pH de la dispersion	147
VI. Changement d'échelle du procédé	148
Conclusion.....	149
CHAPITRE 3. APPLICATION A LA PREPARATION DE NANOGELS	
SENSIBLES AU GLUCOSE	153
Introduction	154
I. Macrogels sensibles au glucose par un mécanisme par compétition	157
I.1. Choix du système – constantes de complexation	157
I.2. Synthèse des précurseurs PAA-PBA	158
I.2.1. Sélection des dérivés phénylboroniques.....	158
I.2.2. Synthèse de l'AACPBA.....	159
I.2.3. Synthèse des PAA-PBA	159
I.3. Comportement en solution	163
I.4. Etudes de complexation des PAA-PBA avec le PVA	165
I.5. Adaptation aux réseaux d'acide hyaluronique	167

II. Préparation de nanogels de HA sensibles au glucose	168
II.1. Synthèse des précurseurs HA-MA-PBA.....	169
II.1.1. Voie de synthèse	169
II.1.2. Résultats obtenus	171
II.2. Nanogels de HA-MA-PBA, avec PBA=AACPBA.....	173
II.2.1. Caractéristiques de l'émulsion matricielle.....	173
II.2.2. Caractéristiques des nanogels de HA-MA-PBA.....	174
II.2.3. Réponse au glucose.....	179
II.3. Nanogels de HA-MA-PBA, avec PBA=APBA.....	183
II.3.1. Caractéristiques des nanogels	183
II.3.2. Réponse au glucose.....	186
II.4. Mécanismes envisagés	187
II.4.1. Etudes rhéologiques	188
II.4.2. Etudes par spectroscopie ¹ H-RMN	189
Conclusion.....	193
CHAPITRE 4. PERSPECTIVES POUR LA DELIVRANCE D'INSULINE	197
Introduction au chapitre.....	198
I. Encapsulation <i>in situ</i> de macromolécules	198
I.1. Introduction au problème	198
I.2. Problèmes posés : limite de la photopolymérisation	200
I.2.1. Encapsulation d'une macromolécule fluorescente.....	200
I.2.2. Encapsulation de l'insuline humaine.....	201
I.3. Autres types d'amorçage pour les HA-MA.....	202
I.3.1. Tests préliminaires sur les macrogels.....	203
I.3.2. Préparation des nanogels	205
I.4. Solution alternative : introduction des thiols.....	210
I.4.1. Synthèse des PAA-SH.....	211
I.4.2. Synthèse des HA-SH.....	213
II. Dégradabilité des structures.....	216
II.1. Stabilité des structures	217
II.2. Cinétique de dégradation enzymatique	219

II.2.1. Dosage de la N-acétyl-D-glucosamine	221
II.2.2. Dosage de l'acide D-glucuronique	223
II.3. Autres source de dégradation : influence de l'irradiation sur les chaînes de HA et apport du filtre	225
II.3.1. Caractéristiques de nanogels préparés en présence de filtre	225
II.3.2. Structure des chaînes de polysaccharide	227
Conclusion	229
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	233
PARTIE EXPERIMENTALE.....	239
I. Réactifs	240
II. Détails expérimentaux des synthèses	241
II.1. Synthèses des précurseurs	241
II.2. Synthèse des nanogels.....	249
II.3. Essais d'encapsulation de macromolécules fluorescentes	252
III. Méthodes	253
IV. Calculs théoriques.....	260

Liste des Abréviations

Abréviations et Symboles

B	Emulsion Blanche
C	Courbure
C*	Concentration critique de recouvrement
C ₀	Courbure spontanée
C _a	Nombre capillaire
CBC	Contrôle en boucle fermée
CERMAV	Centre de Recherches sur les macromolécules végétales
CMC	Concentration micellaire critique
C _p	Concentration en polymère
DM	Degré de méthacrylation
DS	Degré de substitution
EM	Emulsion
f	Fonctionnalité
HLB	Balance hydrophile hydrophobe
kDa	Kilodalton
LBL	Layer by Layer
LCST	Lower Critical Solution Temperature
Mc	Masse moyenne des chaînes
MEC	Matrice extracellulaire
GAG	Glycosaminoglycane
M _w	Masse molaire en poids
N	Nombre d'unités monomères
n	Degré d'ionisation
PCCA	Polymerized Colloidal Crystal Array
P _{max}	Puissance maximale de la lampe UV
Q	Gonflement
TA	Tensioactif
X	Nombre de points de réticulation
UI	Unité d'insuline
γ _{int}	Tension de surface
Φ	Fraction volumique
χ ₁₂	Paramètre de Flory

Composés chimiques

AA	Acide acrylique
AAm	Acrylamide
AAPBA	3-(acrylamido)phénylboronique
AACPBA	Acide 4-[(2-aminoéthyl)carbamoyl]phénylboronique
AETMAC	Acryloxyéthyltriméthylammoniumchloride
AMA	Anhydride méthacrylate

Abréviations

AOT	Bis-(2-éthylhéxylsulfosuccinate) de sodium
APBA	Acide 3-aminophénylboronique
ARS	Rouge Alizarine
Con A	Concanavaline A
CS	Chitosan
DEAEM	N,N-diéthylaminoéthylméthacrylate
Dex	Dextran
Dex-MA	Dextran modifié par des méthacrylates
DMF	Diméthyl formamide
Dox	Doxorubicine
DTP	Hydrazide 3,3'-dithiobis propanoïque
DTT	dithioréitol
DVS	Divinylsulfone
EDC	1-éthyle-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EI	Ethylène imine
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
GBP	Protéines ligand du glucose
GMA	glycidyl méthacrylate
GOD	Glucose oxydase
HA	Acide hyaluronique
HA-ADH	Acide hyaluronique modifié par des hydrazides
HA-ALD	Acide hyaluronique modifié par des aldéhydes
HA-GMA	Acide hyaluronique modifié par des glycidyl méthacrylates
HA-MA	Acide hyaluronique modifié par des méthacrylates
HA-PBA	Acide hyaluronique modifié par des acides phénylboroniques
Hase	Hyaluronidase
HA-SH	Acide hyaluronique modifié par des thiols
HEA	Hydroxyéthylacrylate
HEMA	Hydroxyéthylméthacrylate
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPMA	hydroxypropylméthacrylate (HPMA),
KPS	Persulfate de potassium
MA	Méthacrylate
NVCP	N-vinyl caprolactone (NVCP)
OEOMA	Oligo(éthylène glycol) monométhyl éther méthacrylate (OEOMA),
PAA	Acide polyacrylique
PAA-PBA	Acide polyacrylique modifié par des PBA
PAA-SH	Acide polyacrylique modifié par des thiols
p-ADN	ADN plasmide
PBA	Acide phénylboronique
PBS	Phosphate buffered saline
PDMS	Poly(diméthylsiloxane)

Abréviations

PEG	Polyéthylène glycol
PEGDA	poly(éthylène glycol) diacrylate
pNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamide)
PVA	Alcool polyvinylique
ROS	Espèces réactives oxydantes
TEMED	N,N,N',N' tétraméthyle-éthylène-diamine
VP	Vinylpyrrolidone
V-50	2,2'-Azobis(2-méthylpropionamide)dihydrochloride
V-70	2,2'-Azobis(4-méthoxy-2,4-diméthyl valeronitrile)

Termes techniques et caractérisation

AFM	Atomic Force microscopy
DLS	Dynamic Light Scattering
G'	Module élastique
G''	Module de perte
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
ICP	Induced plasma coupling
IR	Infra rouge
MEB	Microscopie électronique à balayage
MF	Microfluidizer
PDI	Indice de Polydispersité
TEM	Microscopie électronique à Transmission
US	Ultrasonication
ppm	partie par million
R _H	Rayon hydrodynamique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique

Introduction générale

Ce travail de thèse porte sur l'élaboration de nanogels sensibles au glucose à base de polysaccharide pour la délivrance d'insuline, en vue d'une amélioration potentielle pour le traitement du diabète de type I. La prise en charge actuelle de cette maladie se fait par des injections pluriquotidiennes d'insuline, contraignantes et imprécises, qui ont amené la communauté scientifique à chercher d'autres solutions pour délivrer l'insuline en boucle fermée, c'est-à-dire sans intervention du patient. Très récemment, cette approche a été mise en place avec succès, grâce à la combinaison d'une pompe à insuline, de capteurs continus et d'algorithmes d'asservissement mimant l'activité pancréatique. Néanmoins, cette solution reste invasive pour le patient. Dans le cadre de ce projet, nous proposons une solution alternative basée sur une forme pharmaceutique aisément administrable, permettant de délivrer l'insuline en fonction de la glycémie du patient.

Dans ce contexte, les micro/nanogels sensibles au glucose ont été identifiés comme des candidats à fort potentiel pour délivrer l'insuline relativement à la concentration en glucose. Les micro/nanogels sont des particules colloïdales de taille inférieure au micromètre. Ces réseaux de polymère réticulé sont capables d'encapsuler une protéine et de la libérer en fonction de l'état de gonflement du réseau, qui peut être modulé par l'application d'un stimulus externe tel que le glucose. Cette modulation du taux de gonflement s'accompagne souvent d'une variation des propriétés physiques du réseau telles que le volume, les propriétés optiques ou la porosité. Ainsi, les nanogels sensibles au glucose se présentent comme des candidats idéaux pour administrer l'insuline de façon asservie à la glycémie. Ils sont obtenus par l'introduction de ligands du glucose dans le réseau de polymère.



Bien que ce domaine de recherche très actif ait conduit à l'élaboration de nouveaux matériaux, peu d'entre eux ont été étudiés en vue d'une application *in vivo* pour la libération d'insuline, et ce pour plusieurs raisons :

- la taille de la matrice utilisée excédait le micromètre, ne conférant pas le caractère injectable au vecteur ;
- les pharmacocinétiques de délivrance d'insuline ne mimaient pas correctement l'activité pancréatique ;
- le caractère biocompatible mais surtout biorésorbable de la matrice n'était pas validé.

Afin de satisfaire aux critères de biocompatibilité et de biorésorption des vecteurs, nous avons choisi de développer des nanogels à base de polysaccharide, tel que l'acide hyaluronique. Ce polysaccharide linéaire est présent dans de nombreux tissus, où il intervient comme agent structural et biologique. Il est de ce fait biocompatible et peut être dégradé par voie enzymatique dans l'organisme. Les particules ainsi préparées pourraient être administrées par voie sous cutanée, sous forme de dépôt. Grâce à leur petite taille, elles pourraient également entrer dans la circulation sanguine, et y circuler sur des périodes prolongées avant d'être dégradées. Leur taille pourrait également être un critère déterminant pour obtenir les bonnes cinétiques de délivrance d'insuline.

La stratégie générale adoptée pour l'élaboration de ces nanovecteurs s'inscrit dans le programme de recherche baptisé Medication for Diabetes with Insulin Contained in Nanogels (MEDICIN). Elle combine des compétences pluridisciplinaires entre chimistes, physico-chimistes, pharmaciens et un endocrinologue. Le développement de nanogels d'acide hyaluronique requiert en particulier un savoir-faire en chimie des polysaccharides, afin d'introduire sur ces polymères naturels les fonctions nécessaires pour l'obtention de réseaux et pour la reconnaissance du glucose, et un savoir-faire pour la miniaturisation de ces réseaux et leur caractérisation. En partenariat avec l'équipe du CERMAV à Grenoble, le rôle de notre équipe consiste à mettre au point ces vecteurs. Plus particulièrement, au cours de cette thèse, nous nous sommes attachés à développer des solutions innovantes pour produire des nanogels d'acide hyaluronique de structure contrôlée, sensibles ou non au glucose, qui ont ensuite été testés du point de vue de leurs propriétés d'encapsulation, biocompatibilité et biorésorption en vue d'une application pharmaceutique.

Ce mémoire présente les travaux effectués dans cette direction de Novembre 2009 à Octobre 2012. Il est divisé en quatre parties.

Le **chapitre 1** décrit les concepts généraux sur les hydrogels, présente un état de l'art sur les matériaux sensibles au glucose, puis décrit les avancées récentes dans le domaine des hydrogels et microgels à base de polysaccharide.

Dans le **chapitre 2**, nous décrivons la préparation de nanogels d'acide hyaluronique par voie miniémulsion. Des précurseurs d'acide hyaluronique modifiés par des méthacrylates sont confinés dans les gouttes d'une miniémulsion et photopolymérisés. Des nanogels de structure contrôlée sont obtenus par le contrôle de l'émulsion matricielle, des conditions de photopolymérisation et de la structure chimique des précurseurs d'acide hyaluronique.

Le **chapitre 3** est dédié à la préparation d'hydrogels et de nanogels sensibles au glucose. Suite aux résultats du chapitre 2, les nanogels sont rendus fonctionnels par l'introduction d'un ligand du glucose, l'acide phénylboronique. Nous discuterons de l'impact de ce ligand sur la sensibilité des nanogels au glucose. Un mécanisme innovant de réponse au glucose sera présenté sur des hydrogels macroscopiques.

Enfin le **chapitre 4** discutera des perspectives d'utilisation de ces systèmes pour la délivrance d'insuline. Nous aborderons leurs propriétés d'encapsulation, de biocompatibilité et de dégradabilité.

Chapitre 1. Concepts généraux et contexte de l'étude

L'objectif de ce chapitre est de dresser l'état des lieux sur les matériaux sensibles au glucose et leur application pour la délivrance d'insuline afin de positionner notre approche. Nous donnerons tout d'abord quelques concepts généraux sur les hydrogels stimulables (partie I). Nous dresserons ensuite l'état des recherches sur les systèmes sensibles au glucose appliqués à la délivrance d'insuline (partie II). Enfin, après avoir défini les objectifs de ce projet de thèse (partie III.1), nous dresserons l'état de l'art sur l'acide hyaluronique et son utilisation en tant que réseau macroscopique (hydrogel) ou microscopique (nano/microgel) (parties III.2 et III.3).

I. Hydrogels stimulables : concepts généraux

Cette section vise à rappeler quelques définitions, afin de présenter clairement les matériaux qui feront l'objet de cette étude.

1.1. Définition des hydrogels

Un gel résulte de l'association de deux constituants : un réseau et un solvant¹. 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, un gel se forme si le polymère présente une affinité pour le solvant. En effet, due à cette affinité, les molécules de solvant vont solvater les chaînes et gonfler le réseau, qui reste insoluble grâce à la présence d'une réticulation. L'ensemble macroscopique réseau polymère/solvant porte le nom de gel. Une dénomination particulière des gels est celle des hydrogels, où le solvant absorbé est l'eau, ce qui rend l'ensemble généralement biocompatible².

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. Sinon il est qualifié de gel neutre.

Comme mentionné ci-dessus, il est crucial de réticuler le réseau, afin de maintenir sa structure tridimensionnelle et d'éviter sa dissolution. Cette réticulation peut avoir plusieurs origines. La réticulation peut également être qualifiée de physique quand elle met en jeu des liaisons de faible énergie comme les liaisons électrostatiques, hydrogènes ou de Van der Waals³. Certains systèmes biologiques peuvent également s'associer *via* la formation d'hélices^{4, 5}. Les liaisons

physiques peuvent se dissocier et la formation du réseau est réversible. La dernière classe d'hydrogels se réfère aux hydrogels chimiques⁶. Dans ce cas, le réseau est constitué de liaisons covalentes entre les chaînes, ce qui rend le réseau généralement plus stable. Ainsi, un gel chimique est constitué d'un réseau permanent dont la densité de réticulation ne dépend pas de facteurs externes. Dans le cadre de ce mémoire, les hydrogels chimiques constituent notre champ d'intérêt.

1.2. Structure des hydrogels

Par la suite, les grandeurs associées au réseau et au fluide seront indexées 2 et 1 respectivement. Un gel chimique, dont la structure générale est représentée en Figure 1.1, est une structure poreuse caractérisée par :

- La fraction volumique en polymère lorsque le gel est à l'état gonflé (ϕ_2). Ce paramètre traduit la quantité de fluide absorbée au sein du réseau.
- la fonctionnalité des nœuds de réticulation (f). Ce paramètre traduit le nombre de chaînes connectées à un nœud.
- la masse moyenne des chaînes entre deux nœuds consécutifs (M_C). Ce paramètre peut également être exprimé en nombre moyen d'unités monomères (N). Ces deux grandeurs sont reliées entre elles par la masse moléculaire d'une unité monomère.

Pour un réseau idéal, les paramètres f et M_C sont constants sur tout le réseau et les chaînes ne sont reliées entre elles que par des liens chimiques. En réalité, les réseaux présentent de nombreux défauts liés à la synthèse des gels. Comme fléché en Figure 1.1 b), le réseau présente également des points d'enchevêtrements, qui créent des nœuds de réticulation supplémentaires, ou encore des chaînes pendantes, connectées uniquement à l'une des extrémités du réseau. On discerne également la présence de boucle, c'est-à-dire une même chaîne connectée à un seul nœud du réseau.

Macroscopiquement, un hydrogel est un matériau poreux, mou (Figure 1.1 a), et capable de conserver sa forme, malgré la tension de son propre poids. Cependant, les propriétés viscoélastiques du réseau sont relativement faibles, avec des modules élastiques compris entre 1 kPa et 10 kPa, en comparaison à celles des élastomères dont les modules plafonnent autour de 100 kPa⁷. Ainsi, le réseau peut subir de grandes déformations linéaires sous faible contrainte. 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 intermédiaire entre le solide et le liquide.

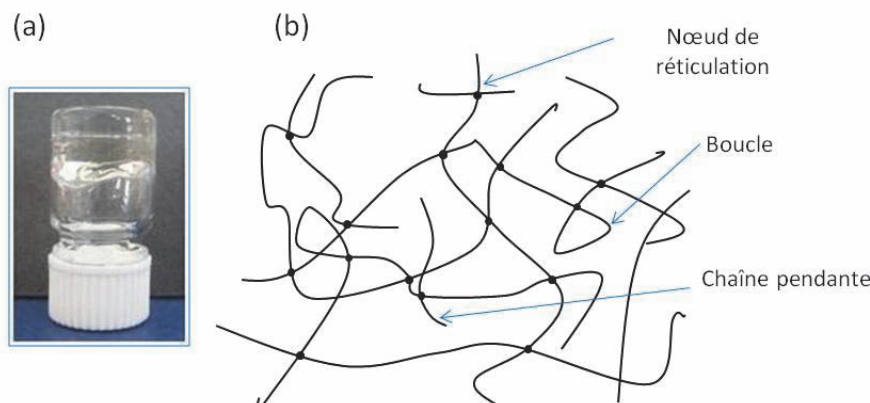


Figure 1.1 : (a) Vue macroscopique et (b) Description moléculaire générale d'un gel chimique.

1.3. Hydrogels stimulables

Comme souligné dans la section I.1, un hydrogel est constitué d'un polymère réticulé gonflé dans l'eau. Non seulement les propriétés de gonflement du réseau peuvent être modulées par des critères physico-chimiques, mais aussi en réponse à un changement des conditions environnementales^{8,9}. On parle alors d'hydrogel stimuable. Le taux de gonflement peut varier de façon considérable par application de ce stimulus. Néanmoins, dans la mesure où la réticulation du réseau est permanente *via* des liaisons covalentes, cette transformation est réversible. Ces variations de gonflement s'accompagnent d'une modification de la plupart des propriétés physiques des hydrogels. Ainsi, le volume, les propriétés optiques, mécaniques ou encore la porosité varient sous l'effet d'un stimulus. De nombreux stimuli ont ainsi été utilisés comme la température, le pH, la lumière^{10, 11} ou un champ électromagnétique⁹ pour rendre les matériaux stimulables. Plus récemment, la reconnaissance moléculaire d'une espèce d'intérêt biologique¹² comme le glucose a été utilisée comme stimulus. 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.

1.4. Théorie de gonflement

Bien que classifiés selon plusieurs critères, l'une des caractéristiques communes aux hydrogels (stimulables ou non), est leur capacité à gonfler en milieu solvaté, et le réseau tend

à se disperser le plus loin possible afin de réduire son énergie libre. Contrairement aux macromolécules non-réticulées, l'état de dispersion maximal est limité par la présence de nœuds de réticulation permanente entre les chaînes. Ainsi, il existe une compétition entre les forces qui tendent à disperser les chaînes de polymères et les forces qui tendent à limiter cette dispersion.

1.4.1. Cas des hydrogels neutres

Le gonflement des gels neutres peut être analysé par la théorie de Flory¹³. 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, elle-même composée d'une partie osmotique (π_{osm}) et d'une partie élastique (π_{el}) de telle sorte que :¹⁴

$$\pi = \pi_{osm} + \pi_{el} \quad (\text{Équation 1.1})$$

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 du réseau. Cette première force est modulée selon l'affinité des chaînes polymères avec le solvant : ainsi, π_{osm} peut aussi être notée π_{mel} . Bien que le réseau immergé dans un bon solvant ait tendance à se disperser le plus loin possible (action de π_{mel}), cette action est limitée par la réticulation permanente. Cette réaction élastique est exprimée par π_{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 limite 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. En adaptant la théorie des polymères en solution, Flory postule que l'enthalpie libre de mélange d'un réseau de polymère réticulé en immersion dans un fluide (ΔG_{tot}) combine deux grandeurs opposées : une enthalpie libre de mélange des polymères en solution (ΔG_{mel}) et un terme supplémentaire d'énergie libre élastique (ΔG_{el}) pour tenir compte des effets de la réticulation, soit¹⁵ :

$$\Delta G_{tot} = \Delta G_{mel} + \Delta G_{el} \quad (\text{Équation 1.2})$$

Le gonflement du réseau à l'équilibre correspond à la situation où la pression π est nulle. Sachant que π dérive de l'enthalpie libre, on admet que la fraction volumique en polymère φ_2 à l'équilibre est donnée par :

$$\varphi_2 = \left\{ \frac{X v_1}{v_c \left(\frac{1}{2} - \chi_{12} \right)} \right\}^{3/5} \quad (\text{Équation 1.3})$$

Où X représente le nombre de point de réticulation présent dans le réseau à l'état contracté et v_1 rappelle le volume molaire du solvant. La grandeur $\frac{X}{v_c}$ décrit la densité moyenne de réticulant au sein de l'hydrogel à l'état contracté. La grandeur χ_{12} est le paramètre d'interaction de Flory entre le solvant et le polymère, et peut être discriminée de la manière suivante :

- Pour $\chi_{12} > \frac{1}{2}$, le polymère, plus difficile à dissoudre, est en régime mauvais solvant.
- Pour $\chi_{12} < \frac{1}{2}$, le polymère en régime bon solvant
- La valeur limite $\chi_{12} = \frac{1}{2}$, correspond à un état de solvation nommé solvant θ .

Ainsi, le gonflement d'un réseau neutre est associé à sa fraction volumique qui dépend de la composition de ce dernier (nœud de réticulation X) mais aussi de sa solvation (contribution de χ_{12}).

1.4.2. Cas des hydrogels chargés

Dans le cas où le réseau est chargé, le gonflement ne peut directement être associé aux considérations décrites ci-dessus. Pour les hydrogels de polyélectrolytes, la présence de groupements chargés le long de la chaîne s'accompagne de contre-ions mobiles, qui assurent l'électroneutralité. Ainsi, il existe au sein du réseau une pression osmotique exercée par les contre-ions et des répulsions électrostatiques entre les chaînes de polymères, conduisant à des taux de gonflement largement supérieurs à leurs homologues neutres. 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. Langer et Peppas recensent en 2003 que le champ d'application des hydrogels compte 40 000 préparations pharmaceutiques, 8000 dispositifs médicaux et 2500 produits pour le diagnostic¹⁶. En outre, ces matériaux sont susceptibles de réagir à de nombreux stimuli.

Les hydrogels sensibles au pH, dont les hydrogels de HA, 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 pH¹⁷. Par exemple, pour les hydrogels comportant des fonctions acides carboxyliques, le gonflement va augmenter en fonction du pH. Ainsi, pour des pH inférieurs au pK_A , les groupements acides sont dans leur état protoné, et donc à l'état neutre. Lorsque le pH est supérieur au pK_A , 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 étirer¹⁸.

La théorie des gels neutres peut être complétée par des termes supplémentaires π_{ion} (contribution des ions) et π_{coul} (contribution électrostatique), chacune de ces contributions agissant en faveur d'un gonflement du réseau.

$$\pi = \pi_{osm} + \pi_{el} + \pi_{ion} + \pi_{coul} \quad (\text{Équation 1.4})$$

La contribution électrostatique est souvent négligée, en revanche la contribution due à la présence d'ions peut s'écrire :

$$\pi_{ion} = \frac{k_B T}{v_1} \{ m \varphi_2 \ln (m \varphi_2) \} \quad (\text{Équation 1.5})$$

Où m est le degré d'ionisation du réseau. En régime bon solvant ($\varphi_2 > 0$, soit $\chi_{12} < 0.5$), la contribution des charges apporte une pression positive, soit un gonflement supplémentaire en comparaison à celui d'un gel non chargé. En mauvais solvant ($\chi_{12} > 0.5$), les gels ioniques se caractérisent par une importante « résistance entropique » au dégonflement. Le confinement des contre-ions est très défavorable, se traduisant par le maintien à l'état gonflé pour des valeurs de χ_{12} très supérieures à 0.5. Toutefois, à partir d'une valeur critique de χ_{12} , cette « résistance entropique » ne contrebalance plus l'effet de non-solvation et le gel transite vers l'état dégonflé.

L'intérêt pour un gel stimuable est de moduler les grandeurs décrites ci-dessus par l'application d'un stimulus externe. Ainsi, on peut envisager la modulation du taux de gonflement par une variation:

- (i) de la densité de charge (contribution de π_{ion})
- (ii) de l'affinité polymère solvant (contribution de χ_{12})
- (iii) de la densité de réticulation (contribution de X)

1.5. Importance de la taille des hydrogels

Les notions des sections précédentes ont été décrites pour des gels macroscopiques, dont la classification s'effectuait selon la nature de la réticulation, la présence de charge sur les chaînes, ou le caractère stimuable du réseau. Cependant, une autre façon de classer les hydrogels s'articule autour de leur taille. Selon la nomenclature IUPAC, les hydrogels peuvent être spécifiés de :

- macrogels si leur taille est de l'ordre du millimètre ou plus
- microgels pour une taille variant entre 100 nm et 100 μ m
- nanogels, où dans ce cas, la taille du réseau oscille entre 1 nm et 100 nm.

Cependant, pour les réseaux de polysaccharides, les études scientifiques définissent les nanogels comme des particules colloïdales dont la taille peut atteindre jusqu'à 500 nm¹⁹.

Les nano/microgels possèdent de nombreuses propriétés communes avec leurs homologues macroscopiques mais leur dynamique de gonflement est très différente des macrogels. En effet, les variations volumiques d'un hydrogel en réponse à 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 que le temps caractéristique de relaxation du réseau était proportionnel au carré de sa longueur caractéristique²⁰. Ainsi les nano/microgels stimulables auront une réponse bien plus rapide que leurs homologues macroscopiques. Pour une application *in vivo* qui constitue l'objectif de ce mémoire, le choix des nano/microgels sensibles au glucose sera favorisé. Nous allons maintenant donner une classification historique des matériaux sensibles au glucose, incluant les travaux sur les hydrogels, micro/nanogels et sur d'autres types de structures (capsules, micelles).

II. Les matériaux sensibles au glucose : intérêt pour le traitement du diabète

II.1. *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 maladie chronique touche 249 millions de personnes à travers le monde, dont plus de 2,5 millions en France, et selon la Fédération Mondiale du Diabète, cette prévalence ne cesserait d'augmenter dans les années à venir²¹.

Cette inhabilité à réguler la glycémie dans la gamme de physiologie normale (de 0,8 à 1,1 g.L⁻¹) 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. Il existe deux types de diabète : le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Ce dernier, forme la plus courante de cette maladie, provient de désordres liés à la sécrétion^{22, 23} et à la résistance à l'insuline. Les traitements actuels pour le diabète de type 2 consistent, outre une hygiène de vie équilibrée, en une prise orale de médicaments pour réduire la glycémie. Dans certains cas, l'insulinothérapie peut devenir indispensable après plusieurs années d'évolution de la maladie, du fait d'une insulino-pénie progressive et inéluctable²⁴.

Dans le cas du diabète de type 1, l'insuline n'est plus sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas car celles-ci subissent une réaction auto-immune qui conduit à leur destruction. Le traitement usuel pour ce type de diabète consiste en de nombreux contrôles quotidiens de la glycémie suivis par des injections d'insuline par voie sous-cutanée. Cependant, ce traitement demeure aliénant et douloureux pour le patient et peut amener à des périodes d'hypoglycémie si la quantité d'insuline a été introduite en quantité trop importante. Afin d'éviter ces anomalies hypoglycémiantes, une thérapie curative peut être envisagée, 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 et éviter les rejets du greffon. Aussi, la transplantation doit être couplée à un traitement immunosuppresseur lourd qui peut s'accompagner de nombreux effets secondaires. A l'heure actuelle, des études en cours visent à encapsuler les îlots dans une membrane semi perméable, qui les protégerait de l'action du système immunitaire²⁵⁻²⁷. Outre les problèmes éthiques soulevés par cette approche, les traitements curatifs sont loin d'être idéaux, avec des taux de

succès souvent décevants, en termes de compatibilité et de durée de vie du greffon chez l'hôte.

C'est pourquoi d'autres solutions alternatives doivent être envisagées. Une avancée majeure serait un système artificiel en boucle fermée capable de mimer l'activité pancréatique. Pour constituer ce système, 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. Les derniers progrès technologiques dans le domaine des capteurs continus au glucose²⁸ ont mené à des prototypes de boucles fermées basés sur la combinaison des trois éléments^{29, 30}. Par exemple, des études récentes sur les enfants diabétiques ont montré qu'il était possible d'utiliser un tel système pendant la nuit^{31, 32}. Très récemment, l'équipe d'Eric Renard a développé un système contrôlé en boucle fermée (CBC). Des essais cliniques sur 11 adolescents et 27 adultes ont été menés, montrant une régulation glycémique très proche de la normoglycémie, sans grande amplitude de variation, et ce pendant de longues périodes³³. Mais la faisabilité de ces systèmes sur plusieurs jours reste à confirmer^{34, 35}. De plus, ces dispositifs restent encore gênants dans les activités quotidiennes. Aussi, le système reste invasif ce qui peut amener le système immunitaire à l'obturer progressivement voire même à le rejeter³⁶.

II.2. Concept des hydrogels sensibles au glucose pour la délivrance d'insuline

Des systèmes « intelligents » de délivrance d'insuline, capables de détecter les variations de glycémie directement dans la circulation sanguine et capables de délivrer l'insuline en rapport avec ces variations, sont donc une solution alternative compétitive. Parmi ces systèmes, les hydrogels sensibles au glucose ont été identifiés comme des candidats à fort potentiel pour délivrer l'insuline en fonction de la concentration en glucose. Le réseau peut gonfler ou se contracter réversiblement en fonction du glucose, ce qui a pour effet de moduler sa porosité. Le concept général d'un matériau sensible au glucose est illustré en Figure 1.2.

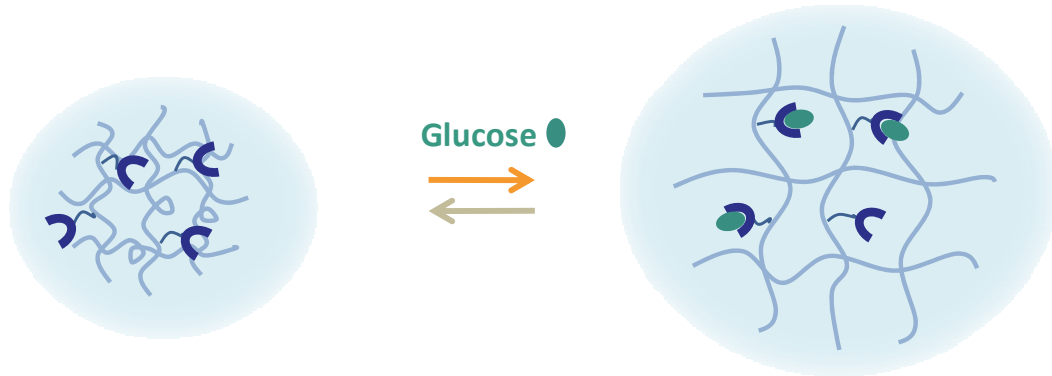


Figure 1.2 : Représentation schématique du concept d'hydrogel sensible au glucose. L'hydrogel, fonctionnalisé par des ligands du glucose, change d'état de gonflement lorsque le ligand interagit avec le glucose en solution.

L'objet de cette section est de décrire les différents systèmes capables de répondre à une variation de la glycémie et leur application potentielle pour la délivrance d'insuline. Ces systèmes se présentent à la fois comme des capteurs du glucose, alliant détection et transduction par le biais du gonflement, mais peuvent simultanément moduler la libération d'insuline. L'insuline, quant à elle, est constituée de 51 acides aminés assemblés sous forme de deux chaînes peptidiques (A et B) associées par des ponts disulfures. L'insuline humaine sous forme monomérique a une petite taille (rayon de 1.34 nm pour une masse molaire de 5,7 kDa), comparable à celle de pores mesurée pour certains hydrogels³⁷.

Les voies d'utilisation des hydrogels sont multiples : i) ces matériaux peuvent servir de membrane pour isoler un réservoir rempli d'une solution d'insuline (Figure 1.3, a et b), ou ii) ils peuvent servir de matrice pour véhiculer l'insuline (Figure 1.3, c et d). En effet, les hydrogels étant poreux, l'insuline peut être physiquement emprisonnée dans le maillage du gel. Chacun de ces modes se subdivise en deux mécanismes, selon les dimensions des pores vis-à-vis de la taille de l'insuline. Ainsi, la membrane peut permettre la diffusion d'insuline par gonflement du gel, grâce à une dilatation de la taille des pores (modes a et c). La contraction de l'hydrogel peut également être utilisée avantageusement : en tant que valve, l'hydrogel peut réguler le passage d'un fluide par rétraction (b) ; en tant que matrice support pour l'insuline, sa contraction peut entraîner l'expulsion du solvant et des molécules en solution (d).

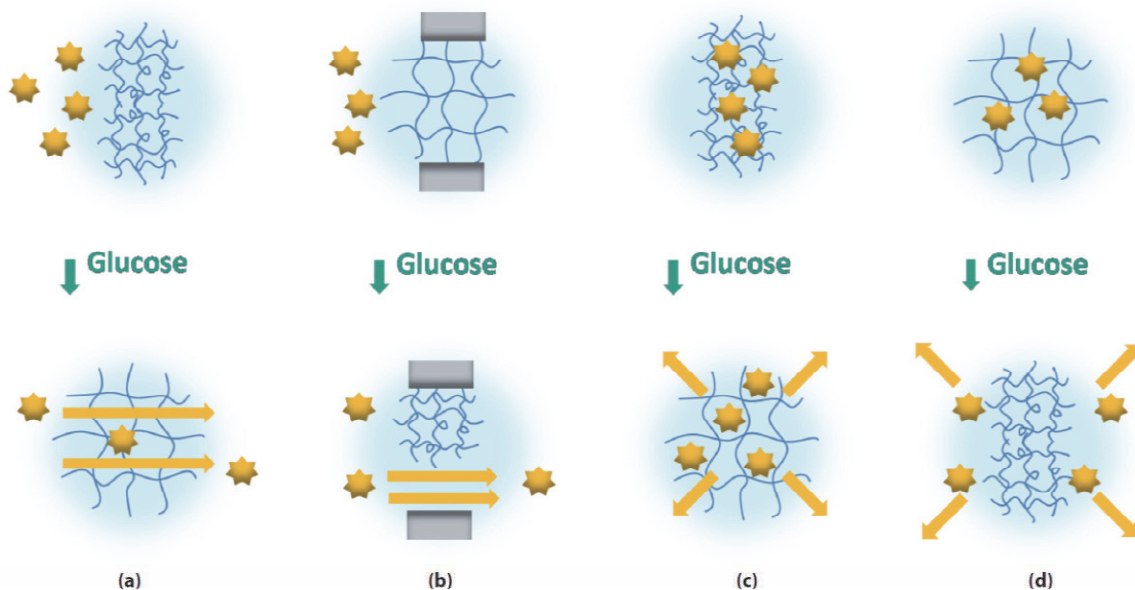


Figure 1.3 : Représentation schématique des différentes voies d'utilisation des hydrogels s'appliquant à la modulation de la libération d'insuline.

Ainsi, la diversité des modes d'utilisation des hydrogels montre à quel point ces matériaux sont prometteurs dans le cadre d'une stratégie de délivrance d'insuline en boucle fermée et explique l'engouement qu'ils ont suscité en termes de recherche depuis ces deux dernières décennies. Leurs formes peuvent également être diverses, ainsi que le mode d'administration de l'insuline qui en découle. Par exemple, les hydrogels en tant que valves peuvent réguler l'administration de l'insuline par une pompe ou éventuellement une chambre implantable, tandis que les hydrogels-supports peuvent être déclinés en tant que patch ou implant sous-cutané. Les membranes d'hydrogels peuvent être planes et tendues sur un support pour assurer l'étanchéité d'un réservoir, ou peuvent être isolées pour former une capsule. Plus récemment, les hydrogels ont été miniaturisés sous forme de particules et de nouveaux modes d'administration de l'insuline ont été envisagés.

Ces thèmes de recherche remontent au début des années 90 en ce qui concerne les hydrogels et se poursuivent à l'heure actuelle de façon très active, comme le témoignent les revues bibliographiques parues depuis 4 ans³⁸⁻⁴⁰. De nombreux hydrogels sensibles au glucose ont été synthétisés, certains travaux s'arrêtant à la présentation du concept et du matériau, d'autres visant plus spécifiquement des applications en tant que capteur du glucose^{41, 42}, d'autres comme support pour la délivrance d'insuline⁴³. Nous n'entendons pas dresser ici un tableau exhaustif des matériaux sensibles au glucose, mais positionner ce travail de thèse dans le domaine. Ainsi, nous allons tout d'abord présenter les différentes voies permettant de préparer

des hydrogels sensibles au glucose, avant de montrer quelques exemples-clé qui montrent le potentiel de ces objets en tant que vecteurs de l'insuline.

II.3. Classification des hydrogels sensibles au glucose.

Quatre familles de récepteurs peuvent être utilisées pour rendre un hydrogel sensible au glucose :

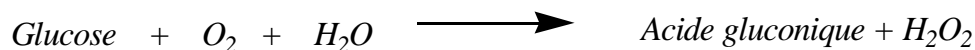
- (i) La glucose oxydase (GOD)
- (ii) La concanavaline A (Con A)
- (iii) Les protéines de liaison au glucose (GPB)
- (iv) L'acide phénylboronique et ses dérivés (PBA)

Les trois premières familles de récepteurs reposent sur des récepteurs naturels tandis que l'acide phénylboronique est synthétique.

II.3.1. Hydrogels modifiés par des ligands naturels

I.1.1.1. Hydrogels modifiés par la Glucose oxydase

Historiquement, les premiers matériaux sensibles au glucose combinaient la GOD comme récepteur au glucose et un gel pH-sensible. La GOD est une enzyme qui catalyse l'oxydation du glucose en peroxyde d'hydrogène et en acide gluconique, selon le mécanisme suivant :



Lors de cette conversion, le pH au sein du gel diminue. Ainsi le gel étant lui-même sensible au pH, il change d'état de gonflement. Si les gels gonflent lorsque le pH diminue, alors il y aura gonflement lors de l'addition de glucose (Figure 1.4). Dans le cas contraire, on peut générer une contraction.

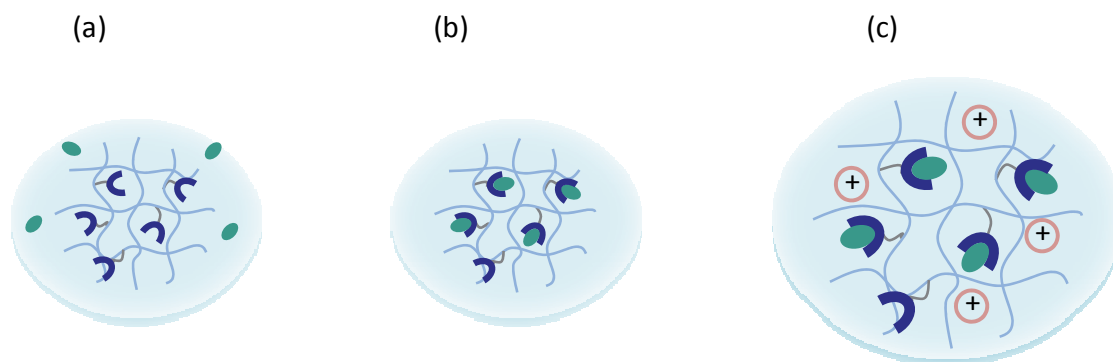


Figure 1.4 : Illustration du changement d'état de gonflement d'un hydrogel fonctionnalisé par la GOD sous addition du glucose. L'ajout de glucose (a) conduit à sa conversion en acide gluconique par la GOD (b), ce qui provoque une chute du pH, à l'origine d'un changement d'état d'ionisation du gel pH-sensible, qui gonfle (c).

Ishihara *et al.* ont été les premiers à utiliser ce mécanisme afin de décrire la perméation d'insuline à travers une membrane sensible au glucose⁴⁴. Cette membrane est elle-même constituée de l'association de deux membranes. La première membrane est pH sensible, formée de N,N-diéthylaminoéthylméthacrylate (DEAEM) et de 2-hydroxypropylméthacrylate (HPMA) et la seconde, couplée à la première est fonctionnalisée par la GOD, ce qui la rend glucose sensible. Sous l'action enzymatique de la GOD, le glucose s'oxyde en acide gluconique, ce qui a pour effet de diminuer le pH du milieu réactionnel. Les amines de la première membrane se protonent et la membrane gonfle. La perméabilité est donc augmentée et l'insuline libérée de manière réversible. Cependant la réaction de catalyse par la GOD est limitée par la présence de l'oxygène dissous dans le milieu et qui doit être à proximité de la GOD. Parmi les stratégies développées pour rendre l'oxygène plus disponible, l'ajout dans le milieu réactionnel de la catalase, enzyme réagissant avec le peroxyde d'hydrogène pour donner de l'oxygène, semble prometteuse^{45, 46}.

Les études décrites ci-dessus portent sur la libération d'insuline induite par un gonflement du gel. Selon les travaux de Peppas^{47, 48}, on peut également envisager la libération de l'insuline *via* la contraction du gel. Cependant les études sont restées à l'état de modèle et la libération d'insuline n'a pas été constatée expérimentalement⁴⁹.

Dans une autre approche, des nanoparticules d'hydrogel ont été incorporées à la préparation d'une membrane où elles jouent le rôle de valve régulant la diffusion de l'insuline à travers la matrice⁵⁰. Une version plus récente utilise des nanoparticules de dioxyde de manganèse afin d'améliorer la tenue mécanique de la membrane, permettant ainsi une durée d'utilisation de

15 jours⁵¹. Des études *in vivo* et *in vitro* ont récemment été menées sur ces systèmes. Elles ont démontré la délivrance d'insuline sur plusieurs cycles aux concentrations physiologiques en glucose, permettant ainsi de pallier les périodes d'hypoglycémie de rats diabétiques sur une semaine⁵².

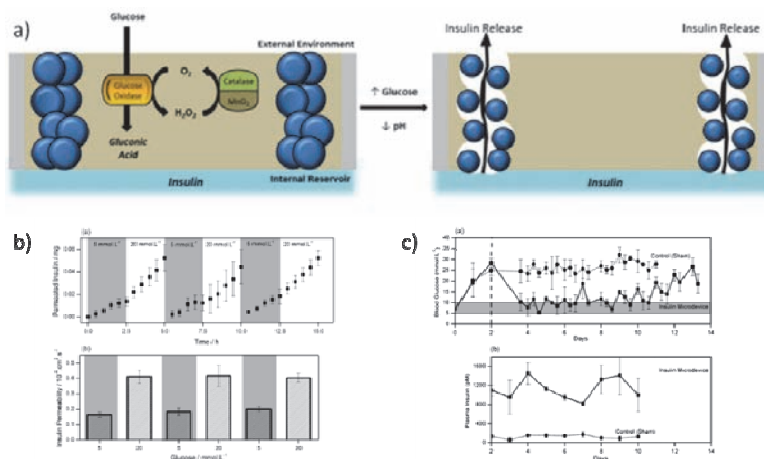


Figure 1.5 : Membranes pour la délivrance d'insuline. a) Vue en coupe de cette membrane, dans laquelle des particules d'hydrogels sensibles au pH sont emprisonnées. Lors de l'ajout de glucose, l'insuline est libérée par la formation de « nano-pores » via la contraction des particules d'hydrogels. b) *In vitro*, la délivrance d'insuline suit un mécanisme réversible on-off en fonction de la concentration en glucose de 5 et 20 mM. c) *In vivo*, la membrane permet de réguler la glycémie des rats diabétiques sur presque 10 jours. Extrait de⁵².

Bien que ce résultat représente une amélioration considérable et prometteuse, l'utilisation des hydrogels à base de GOD constituent des versions implantables mais non injectables dans la circulation sanguine.

II.3.1.1. Hydrogels modifiés par les lectines

Les lectines représentent une famille de protéines qui se lient spécifiquement et de manière réversible aux carbohydrates. Ces protéines interviennent dans de nombreux processus biologiques et notamment au niveau de la reconnaissance cellulaire. La plus étudiée de ces protéines, la Concanavaleine A (Con A), présente quatre sites de reconnaissance⁵³. Cette affinité ouvre la voie à l'élaboration de systèmes qui seraient sensibles à la présence de glucose. Pour ce faire, la Con A est utilisée comme un agent réticulant de l'hydrogel. Ce concept a été proposé par l'équipe d'Hoffman, qui a développé des gels glycosylés complexés par la Con A⁵⁴. Comme illustré en Figure 1.6, l'ajout de glucose rompt la complexation du réseau, au profit de la complexation Con A- glucose, et le gel gonfle.

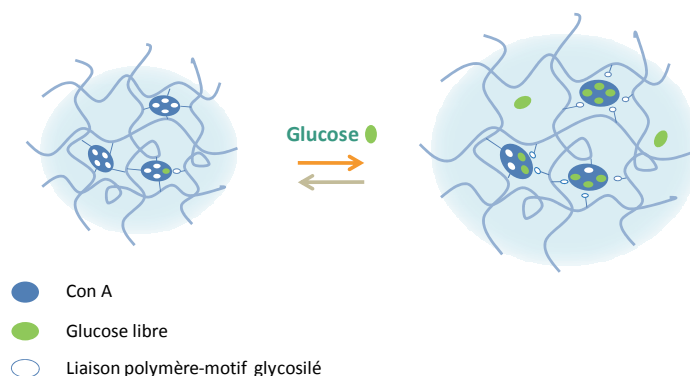


Figure 1.6 : Gonflement d'un gel comportant des motifs glycosylés complexés à la Con A. L'introduction de glucose entraîne une compétition des interactions avec la Con A, ce qui réduit la réticulation du gel.

Cependant, ces systèmes souffrent d'une perte progressive d'activité, due à la perte des entités Con A au cours du temps. Une solution est donc de fixer la Con A de manière permanente à l'hydrogel⁵⁵. Par exemple, l'équipe d'Hubble s'est inspirée de ce concept, en utilisant des membranes d'hydrogels sensibles au glucose, construites par copolymérisation de dextran et de Con A modifiés par un groupement polymérisable⁵⁶. Plus récemment miniaturisés sous forme de microparticules sensibles au glucose, constituées de chitosan, de dextran et de Con A⁵⁷, ces systèmes peuvent être chargés en insuline, dont la libération est modulée par la glycémie⁵⁸.

Bien qu'innovantes, ces technologies n'ont pas encore prouvé leur absence de toxicité, question légitime connaissant la toxicité bien connue de la Con A à haute concentration⁵⁹. Aussi, même si ces systèmes sont prometteurs, d'autres pistes de recherches doivent être poursuivies.

II.3.1.2. Hydrogels modifiés par la 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 entre eux par une charnière. Sa structure a été déterminée à la fois dans l'état lié au glucose et non lié^{60, 61}. 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 1.7). L'équipe de Daunert a entrepris de coupler cette entité particulière de reconnaissance moléculaire à la technologie des hydrogels⁶². 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, entraînant avec elle la contraction du réseau. A ce jour, ces matériaux n'ont pas été testés pour la délivrance d'insuline.

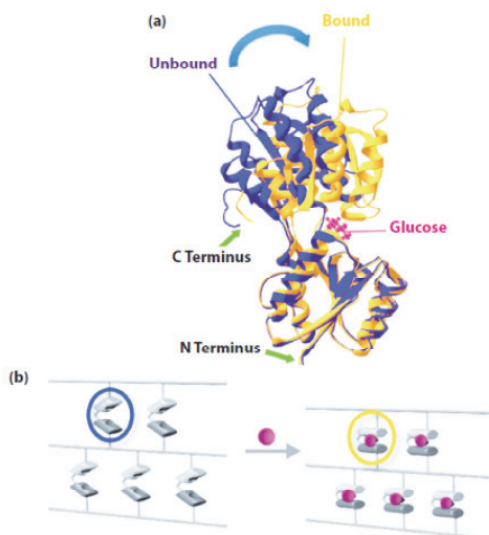


Figure 1.7 : a) Structure de la GBP en absence (bleue) et en présence de glucose (jaune) ; b) représentation schématique de la contraction d'un hydrogel réticulé par la GBP sous l'action du glucose. Le repliement de la protéine est responsable de la contraction du gel (extrait de⁶²).

II.3.2. Hydrogels modifiés par l'acide phénylboronique

Comme montré dans les paragraphes précédents, 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. Le quatrième type de système est basé sur l'utilisation d'un récepteur synthétique, l'acide phénylboronique (PBA).

II.3.2.1. L'acide phénylboronique comme récepteur au glucose

La première étude sur le mécanisme d'interaction entre le PBA et les polysaccharides apparaît en 1954⁶³. Depuis, 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 polyol⁶⁴, l'une des interactions les plus fortes parmi les paires simples et réversibles en milieu aqueux. Le glucose étant un polyol, il peut être complexé par le PBA. De ce fait, ce récepteur synthétique présente un fort potentiel pour sa sensibilité au glucose.

II.3.2.1.1 Equilibres de complexation

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 1.8). 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 pK_A de cette espèce. Lorsque le pH est inférieur au pK_A 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 déprotonne 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 (**4**) avec le groupement diol des saccharides en position cis selon une réaction de condensation. En effet, en configuration sp^2 , les acides boroniques présentent un angle de 120° qui est réduit à 108° 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 pK_A du système.

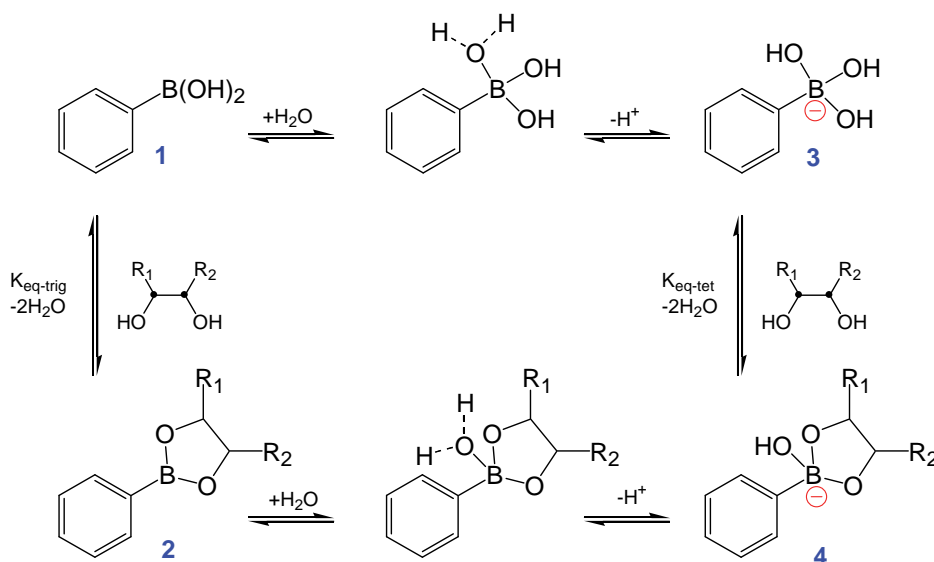


Figure 1.8 : Mécanisme de complexation des diols par les acides boroniques.

La constante K_{trig} , qui décrit l'équilibre entre les deux espèces boroniques (**1** et **2**), est négligeable comparé à K_{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_{eq} (Figure 1.9).

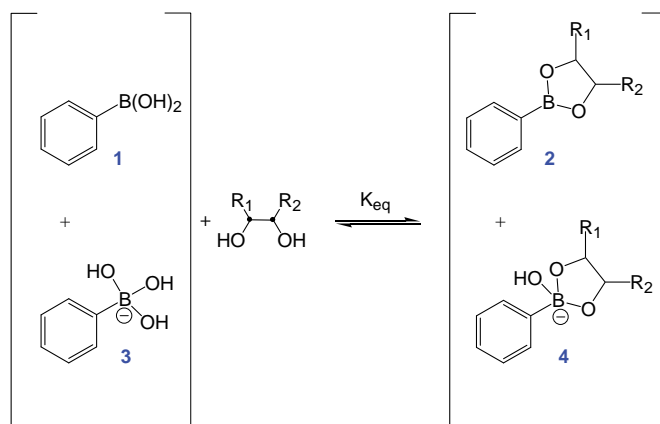


Figure 1.9 : Equilibre entre les différentes formes d'acide phénylboronique.

Le mécanisme de complexation entre le PBA et le glucose se résume selon le schéma de la Figure 1.10. Pour un pH voisin du pK_A 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 les hydrogels sensibles au glucose.

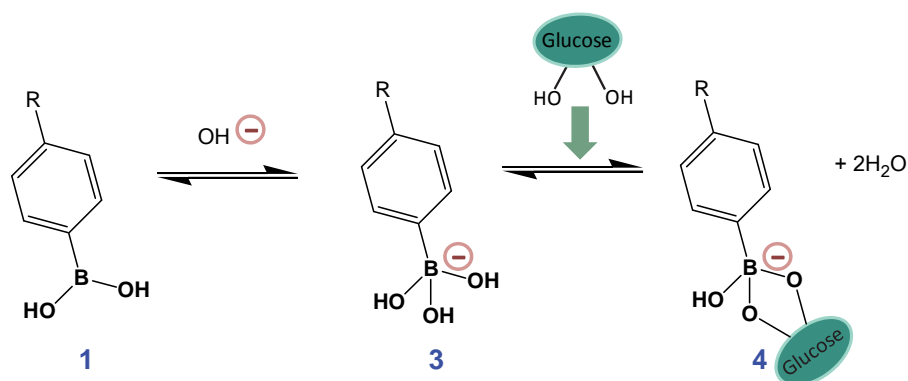


Figure 1.10 : Mécanisme de complexation du glucose par les acides phénylboroniques.

II.3.2.1.2 Constantes de complexation et sélectivité vis-à-vis d'autres saccharides

Comme expliqué ci-dessus, les PBA sont capables de détecter les espèces de type polyol tels que le glucose. Mais qu'en est-il de la sélectivité vis-à-vis des autres diols ? Pour aborder le sujet, il convient tout d'abord d'évoquer la notion de constante de complexation, pour le glucose avec le PBA, puis de comparer cette/ces constante(s) avec celles relatives aux autres monosaccharides présents dans la circulation sanguine tels que le fructose et le galactose. Les premières méthodes de mesure des constantes de complexation utilisent la diminution du pH⁶⁵, et la RMN du bore⁶⁶. La première repose sur une mesure de la diminution du pH provoquée par l'addition d'un diol à une solution d'acide boronique.

Une méthode plus générale et sensible est apparue plus tard par Springsteen *et al.* Cette méthode utilise le rouge Alizarine (ARS), espèce non fluorescente par transfert de proton à l'état excité⁶⁷, qui devient fluorescente lorsque liée à un dérivé phénylboronique. L'addition du glucose va entrer en compétition avec l'ARS pour se lier au dérivé phénylboronique et ainsi diminuer l'intensité de fluorescence (Figure 1.11).

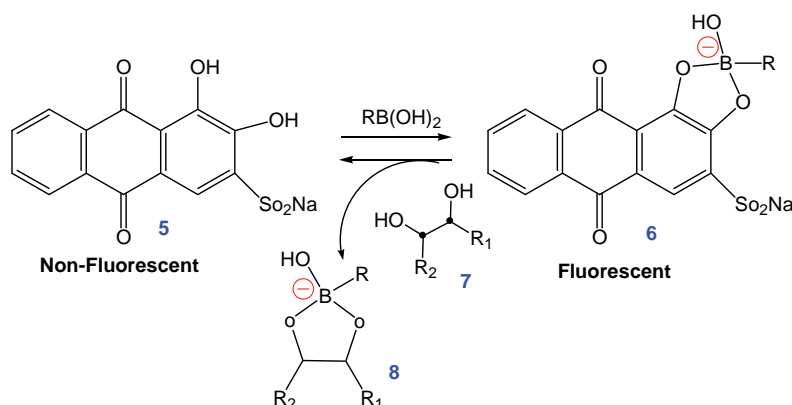


Figure 1.11 : Schéma de complexation de la détermination des constantes de complexation par l'ARS. Adapté de ⁶⁴.

En Tableau 1.1, les constantes de complexation ont été déterminées par cette méthode et comparées à celle obtenue par Lorand *et al.* Les tendances respectent la même évolution pour les deux méthodes mais les valeurs obtenues par l'essai ARS sont plus faibles. Cette divergence provient du fait que pour la mesure par diminution du pH, il a été supposé que tout l'ester formé est sous forme boronate 4.

Tableau 1.1 : Constantes d'associations de diols avec un acide phénylboronique déterminé par la diminution de pH (K_{tet}),⁶⁵ et par compétition de la complexation avec l'ARS (K_{eq})⁶⁴.

Diol:	Constante d'association	
	K_{tet} ^a	K_{eq} ^b
1,3-propane-diol	0.88	
Alcool Polyvinylique	1.9	
Ethylène glycol	2.8	
Phényle-1,2-éthane-diol	9.9	
Glucose	110	4.6
Fructose	4370	160
Catéchol	17500	830
Sorbitol		370
Mannitol	2275	120
Galactose	276	15

^a : Déterminée par la mesure par diminution du pH

^b : Déterminée par compétition de la fluorescence en présence d'ARS.

Il apparaît ainsi que, parmi les monosaccharides, le fructose est généralement bien mieux complexé que le glucose. Une forte compétition avec le galactose est également mesurée. Ces considérations seront discutées pour nos systèmes en paragraphe II.3.3.

II.3.2.2. Mécanismes induisant une variation du taux de gonflement

Comme énoncé en section I.4.2, plusieurs mécanismes peuvent être envisagés pour induire une variation du taux de gonflement en fonction d'un stimulus externe. Nous listerons ici ces mécanismes dans le cas des hydrogels sensibles au glucose *via* les PBA, en illustrant chacun de ces mécanismes avec quelques exemples choisis.

II.3.2.2.1 Mécanisme basé sur la modification de charge du polymère

Une première 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, pour un pH proche du pK_A , l'ajout de glucose déplace l'équilibre vers la forme chargée des PBA, augmentant la densité de charge du réseau. La pression osmotique des ions mobiles augmente. Cette technologie a été adoptée par Asher⁶⁸ dans le cas d'hydrogels très hydrophiles, constitués d'acrylamide copolymérisé avec de l'acide 3-(acrylamido)phénylboronique (AAPBA). 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 les milieux à force ionique modérée, compte tenu du faible différentiel de concentration en

contre-ions dans les milieux interne et externe. Ainsi, ces systèmes n'ont pas été développés comme vecteur d'insuline mais plutôt comme capteur au glucose, par inclusion dans la matrice d'un cristal colloïdal. L'ensemble polymère – cristal colloïdal est dénommé PCCA (Polymerized Colloidal Crystal Array). Par gonflement de l'hydrogel en présence de glucose, le pas du réseau du cristal colloïdal augmente, déplaçant les longueurs d'onde diffractées vers le rouge.

II.3.2.2.2 Mécanisme par compétition

Historiquement, les travaux du Professeur Kataoka ont été pionniers pour la combinaison du récepteur PBA à des polymères⁶⁹⁻⁷². Cette équipe a préparé des hydrogels sensibles au glucose selon deux types de mécanismes. Le premier consiste à former un réseau sur la base d'interactions entre un copolymère d'acrylamide portant des groupements PBA avec un polymère portant les fonctions diols, comme l'alcool polyvinylique⁷¹. L'ajout de glucose libre entraîne la dissolution partielle ou totale de l'hydrogel par compétition avec les interactions PBA-polymère polyol. Ce système, initialement peu stable en milieu physiologique⁷¹, a été amélioré par l'introduction d'amines au voisinage des fonctions acides boroniques⁷², qui ont pour effet d'augmenter le caractère acide du dérivé boronique.

II.3.2.2.3 Mécanisme basé sur l'insolubilité du polymère

Le deuxième mécanisme utilisé par Kataoka consiste à modifier la solubilité du polymère en fonction de la présence de glucose. Pour ce faire, le PBA est associé à un polymère amphiphile, comme le poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM), présentant un caractère « thermosensible ». Ce type de polymère est soluble à basse température et précipite au-delà d'une certaine température critique. La température de transition est d'autant plus basse que le polymère est hydrophobe, c'est-à-dire qu'il perd sa solubilité dans l'eau. Or, le PBA présente un caractère hydrophobe, qui diminue lorsqu'il est complexé au glucose du fait de sa charge. Ainsi, l'introduction de groupements PBA sur un polymère thermosensible va renforcer son caractère hydrophobe et abaisser sa température de solubilité critique. En présence de glucose, la solubilité augmente. Lorsque ces polymères sont réticulés, ils forment des hydrogels dont le taux de gonflement dépend de la température et de la concentration en glucose⁷³. Pour une température donnée, les gels peuvent gonfler proportionnellement à la concentration en glucose. Comme nous le verrons en section II.3.2.3, de tels systèmes ont

montré leur potentiel pour délivrer de l'insuline de manière cyclique en fonction des variations de la glycémie en conditions non physiologiques.

II.3.2.2.4 Mécanisme basé sur la modification de densité de réticulation

Les exemples décrits jusqu'à présent conféraient un gonflement de l'hydrogel en réponse au glucose, *via* un mécanisme de complexation 1:1 entre une unité saccharide (un site de fonction diols) et une unité PBA. Une autre stœchiométrie pourrait être envisagée. En effet, bien que le D-glucose existe majoritairement sous la forme α - et β -glucopyranose, il existe une minorité des formes α - et β -glucofuranose. Dans cette configuration, le glucose présente deux sites de complexation avec le PBA formant un complexe 2:1 bis-boronate glucose. La formation de ce complexe est controversée. Certaines études mettent en jeu la forme glucopyranose⁷⁴, Norild *et al.* impliquent plutôt la forme glucofuranose⁷⁵. Au-delà de ces considérations supramoléculaires, cette complexation 2:1 a été utilisée pour induire une réponse au glucose par un mécanisme de contraction. En effet, la formation de ces liens induit des points de réticulation supplémentaires, permettant de densifier le réseau. S'inspirant de ce mécanisme, les études avant-gardistes d'Asher⁷⁶ ont combiné cette spécificité au sein des hydrogels. Cette équipe a incorporé les cristaux colloïdaux au sein de la matrice d'hydrogel, constituée d'acrylamide, de polyéthylène glycol et d'un dérivé PBA. Lors de l'ajout de glucose, les motifs PBA forment un complexe 2:1 avec le glucose. Ainsi, les unités engagées dans la complexation rendent le réseau plus réticulé et une contraction de l'hydrogel est observée. Dans le cas d'un PCCA, la réponse au glucose induit une diminution du pas du cristal colloïdal, modulant la longueur d'onde diffractée vers les couleurs bleutées.

II.3.2.3. Délivrance d'insuline à partir des hydrogels sensibles au glucose

Les hydrogels sensibles au glucose ont suscité l'engouement des chercheurs, notamment dans le domaine de la délivrance d'insuline à l'instar des différents concepts imaginés par Kataoka. Afin d'obtenir une composition optimale permettant d'asservir la libération de l'insuline à la glycémie, son équipe a imaginé plusieurs approches. Comme décrit en paragraphe II.3.2.2.2, un mécanisme par compétition a été utilisé dans une première approche⁷². L'insuline est modifiée par des groupements glycosilés, permettant sa complexation avec un copolymère contenant des PBA. En présence de glucose, cette complexation se rompt au profit de la complexation PBA-glucose. De l'insuline a ensuite été

incorporée dans ce système, et sa libération s'est révélée asservie avec la concentration en glucose, dans les conditions physiologiques, et ce sur une période de 120 heures.

Utilisant ensuite l'approche mettant en jeu un mécanisme par changement de l'affinité du polymère, Kataoka *et al* ont également étudié la libération d'insuline chargée dans les hydrogels de pNIPAM-co-PBA⁷³. Cette étude révèle un mécanisme de libération on-off régulé par la présence de glucose et le processus est réversible. Cependant, elle n'a été démontrée qu'à pH 9, au-dessus du pK_A du PBA utilisé. Les travaux suivant cette première étude ont alors été dédiés à la synthèse d'un hydrogel de composition optimale permettant cette libération en conditions physiologiques (illustré en Figure 1.12)^{43, 77-79}.

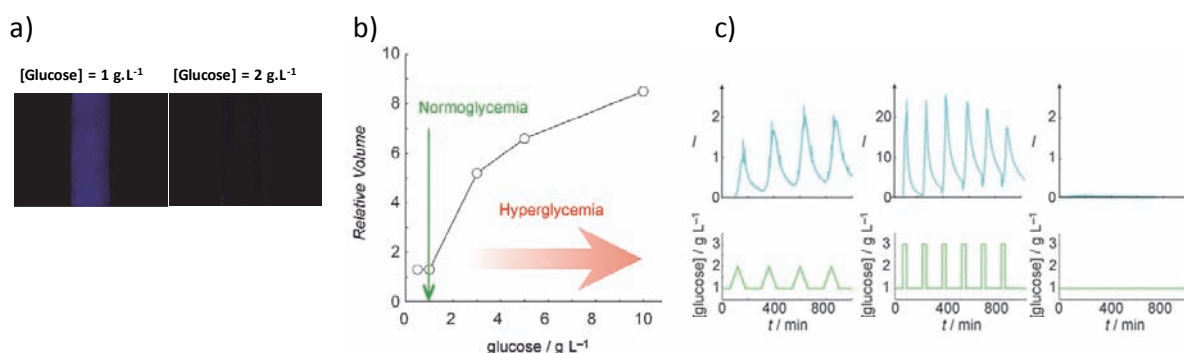


Figure 1.12 : a) Cliché de microscopie à fluorescence de l'hydrogel synthétisé avec une concentration en glucose de 1 g.L⁻¹ (gauche) et 2 g.L⁻¹ (droite) ; la fluorescence témoigne de l'état contracté du gel, tandis que l'hydrogel moins fluorescent est gonflé d'eau ; b) Evolution volumique de l'hydrogel en fonction de la concentration en glucose (flèche verte = normoglycémie). c) en haut : Evolution de la libération de l'insuline fluorescente au sein de l'hydrogel dans les conditions physiologiques (pH=7,4, I=0.15, pH=37°C ; en bas : évolution temporelle de la concentration en glucose (adapté de⁴³).

II.3.3. Microgels et nanogels sensibles au glucose

Les concepts présentés ci-dessus sont très élégants mais souffrent d'un problème majeur par rapport à l'application visée, à savoir que leur cinétique de délivrance ou d'arrêt de délivrance d'insuline est trop lente, encore de l'ordre de l'heure. Idéalement, ces systèmes devraient mimer l'activité pancréatique. La cinétique de libération de l'insuline peut être directement attribuée à la dynamique de gonflement des hydrogels et comme introduit précédemment, il est connu que cette dynamique dépend du carré de la taille des hydrogels²⁰. Ainsi, la miniaturisation des hydrogels pourrait apporter une solution à ce problème de cinétique. Il convient de noter que la stratégie des micro/nanogels répond non seulement aux problèmes de cinétique mais permet également d'envisager une forme pharmaceutique de

l'insuline adaptée aux besoins du patient. En effet, les suspensions de nanogels se présentent sous forme liquide et peuvent donc aisément être injectées à l'aide d'une seringue. En outre, grâce à leur petite taille, ces vecteurs pourraient même passer la barrière cutanée avant de rejoindre la circulation sanguine.

En 2009, date du début de ce travail de thèse, trois équipes incluant la nôtre relaient l'élaboration de micro/nano gels sensibles au glucose. Ces travaux, initiés en 2006, incluent ceux de l'équipe du Prof. Pelton (Université Mc Master, Canada), du Prof. Zhou (Université de New-York, US), et de notre équipe. Toutes les formules développées combinent un polymère thermosensible, caractérisé par une température critique affectant leur solubilité (LCST pour Lower Critical Solution Temperature), avec un dérivé PBA. L'équipe de Pelton et l'équipe de Zhou, élaborent les microgels en deux temps, par greffage du récepteur au glucose de façon covalente sur un microgel déjà existant^{80, 81}. Ces études montrent une sensibilité au glucose, sans pour autant montrer leur capacité à délivrer l'insuline. Plus récemment, l'équipe de Zhou combine la délivrance d'insuline à l'imagerie grâce à l'insertion de nanoparticules d'argent dans les microgels. Les microgels se comportent à la fois comme capteurs (leur fluorescence varie en fonction du taux de glucose grâce au gonflement de la matrice de gel) et comme système de délivrance de l'insuline^{82, 83}.

En parallèle, notre équipe a fait le choix de synthétiser des particules d'hydrogel par copolymérisation, où tout le microgel sensible au glucose est construit en une seule étape. Ces microgels sont constitués de polymères thermosensibles de type poly(N-alkylacrylamide) modifiés par l'acide phénylboronique. Initialement sensibles au glucose à faible salinité⁸⁴, de nouveaux matériaux ont été développés au cours de la thèse de Christophe Ancla afin d'obtenir la réponse au glucose en conditions physiologiques⁸⁵.

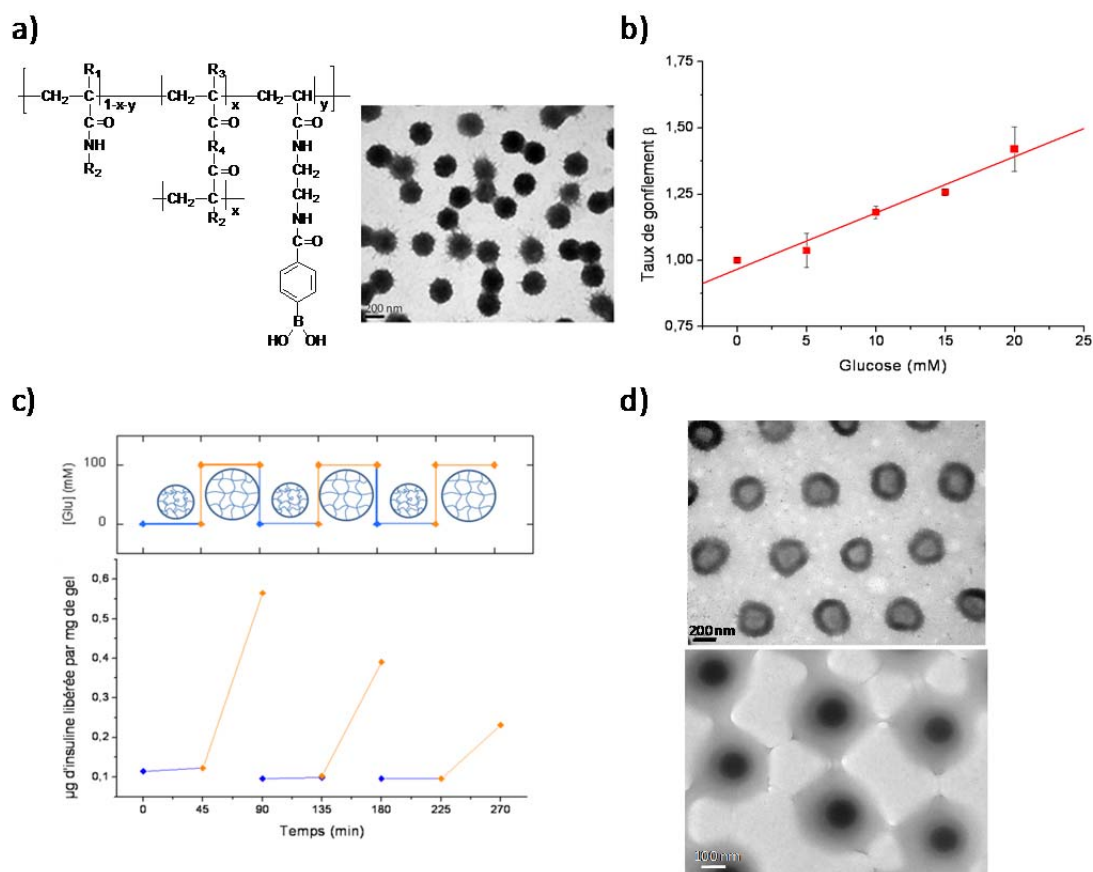


Figure 1.13 : a) Structure et caractéristiques des microgels synthétisés. b) Evolution du taux de gonflement des microgels synthétisés en fonction de la concentration en glucose (conditions physiologiques, $pH=7.4$, $I=0.15$, $T=37^\circ C$). c) Libération de l'insuline en fonction des variations de la glycémie. d) Clichés de microscopie électronique en transmission de microgels cœur-écorce et de nanocapsules d'hydrogels.

Une gamme de microgels de taille uniforme sensibles au glucose a été obtenue de façon reproductible, grâce à une bonne maîtrise des conditions de synthèse. En faisant varier leur composition, ces microgels gonflent proportionnellement à la concentration en glucose, et ce en conditions de pH , salinité et température physiologiques⁸⁶ (Figure 1.13 b). Dans un deuxième temps, C. Ancla a incorporé de l'insuline bovine marquée par de la fluorescéine dans les microgels. La libération de l'insuline s'est révélée asservie à la glycémie, et ce, de façon cyclique (Figure 1.13 c)⁸⁵. Des microgels sensibles au glucose plus sophistiqués ont par ailleurs été développés, permettant de moduler la réponse au glucose par un autre stimulus, comme par exemple des microgels de type cœur-écorce où le cœur n'est sensible qu'à la température, tandis que l'écorce est sensible au glucose⁸⁷. Enfin, des nanocapsules d'hydrogel permettant d'incorporer plus d'insuline ont également été synthétisées⁸⁸.

Les nanogels fonctionnalisés par les boronates sont donc prometteurs en termes de délivrance d'insuline. L'un des points faibles des récepteurs synthétiques du glucose est leur manque de sélectivité vis-à-vis des différents sucres présents *in vivo*. En particulier, comme décrit en section II.3.2.1.2, le fructose et le galactose ont des constantes de complexation avec les boronates élevées en comparaison à celle du glucose. Heureusement, ces sucres ne sont présents qu'à de faibles concentrations *in vivo* (généralement autour de 1% par rapport au glucose). Il a été montré qu'ils n'interféraient pas avec le glucose dans ces conditions. Par ailleurs, concernant la toxicité, il a été vérifié que les dérivés phénylboroniques ne présentaient pas de cytotoxicité, ce qui est encourageant pour leur utilisation au sein des microgels. Cependant, aucune étude *in vivo* n'a été entreprise car les objets synthétisés jusqu'à présent ne sont pas dégradables.

II.3.4. Autres types de matériaux sensibles au glucose utilisant l'acide phénylboronique

Dans la partie ci-dessus, nous avons cité les travaux majeurs utilisant l'acide phénylboronique dans des hydrogels ou microgels qui gonflent lors de l'addition de glucose. Il convient de mentionner que de nombreux autres matériaux sensibles au glucose ont été développés sur la base d'interactions sucres-boronates. Des films de polymères auto-assemblés ont ainsi été préparés⁸⁹, des micelles^{90, 91, 92}, des capsules^{93, 94}. Pour tous ces systèmes, l'addition de glucose détruit l'assemblage. L'absence de réticulation permanente comme celle utilisée dans les hydrogels ou microgels ne permet pas d'assurer la réversibilité de la réponse au glucose. Dans ce domaine, une étude récente utilise des micelles fonctionnalisées par des esters boronates (Figure 1.14)⁹⁵. Les études de délivrance d'insuline se sont révélées concluantes, bien que le mécanisme de libération ne soit pas réversible.

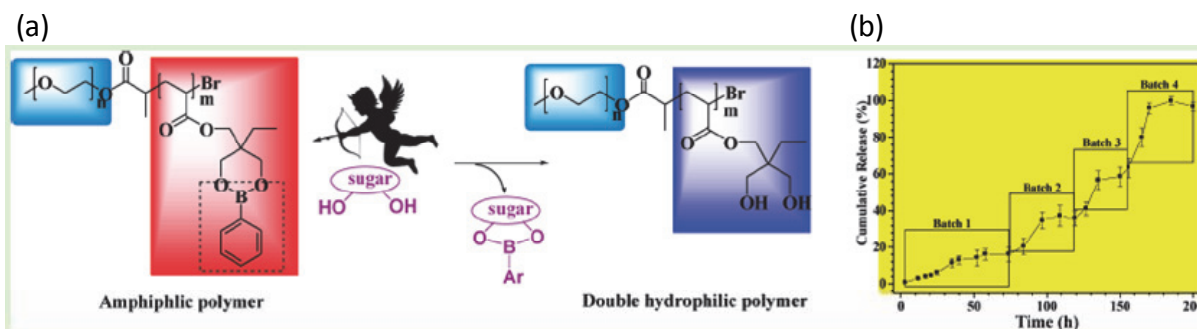


Figure 1.14 : (a) : Concept des micelles sensibles glucose, constituées d'un copolymère amphiphile de poly(éthylène glycol)-b-poly[(2-phénylboronic esters-1,3-dioxane-5-éthyl) méthylacrylate]. Le lien ester cyclique se rompt en présence de glucose. (b) La libération de l'insuline est asservie à la présence de glucose sur 8 jours (par ajout de glucose par cycle). Extrait de ⁹⁵.

Notons également que les acides phénylboroniques ont été utilisés pour modifier la structure de l'insuline elle-même. Cette stratégie vise à modifier le temps de demi-vie de l'insuline *in vivo*. En effet, il a été montré que le temps de demi-vie dépend de la disponibilité de l'insuline dans l'organisme. Or celle-ci est régulée par la forme que présente l'insuline. L'insuline peut s'associer sous forme d'hexamères, de dimères ou être à l'état monomérique. La formation d'hexamères, voire d'édifices de plus haut poids moléculaire obtenus par association avec des polymères, permet de retarder l'action de l'insuline dans l'organisme. Cette association peut être contrôlée en jouant par exemple sur la nature de certains acides aminés. C'est cette stratégie qui est utilisée pour proposer des analogues rapides ou lents de l'insuline^{96, 97}. En modifiant l'insuline par des acides phénylboroniques et des groupes diols, l'équipe de Hoeg-Jensen a permis de moduler l'association de l'insuline en fonction de la glycémie (Figure 1.15).

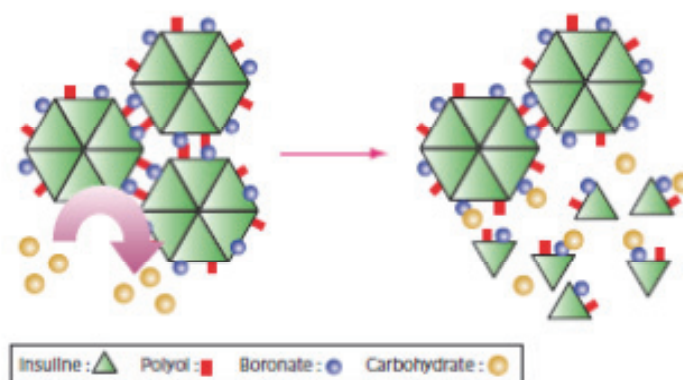


Figure 1.15 : Formation de complexes hexamériques d'insuline sous addition de glucose (extrait de ⁹⁶).

II.4. Bilan

La délivrance d'insuline en boucle fermée serait une avancée majeure pour le traitement du diabète de type I. Les solutions actuellement proposées s'étendent sur deux niveaux d'actions : soit sur l'insuline directement modifiée pour être sensible au glucose ; soit sur une matrice chimique sensible au glucose. Toutes ces recherches ont montré le potentiel de ces systèmes pour libérer l'insuline de façon asservie à la glycémie. Parmi les systèmes matriciels, l'utilisation de microgels sensibles au glucose plutôt que d'hydrogels permet d'envisager une solution injectable dans la circulation sanguine tout en offrant de meilleurs résultats en termes de pharmacocinétique. Cependant les hydro/microgels développés jusqu'à présent montrent leurs limites d'utilisation car ils ne sont pas biodégradables. Une avancée majeure dans cette thématique serait donc de définir un système à la fois biocompatible et biodégradable, capable de détecter le glucose dans des conditions physiologiques afin d'asservir la libération d'insuline à la glycémie.

III. Vers des microgels administrables *in vivo*

III.1. Objectif général du projet

L'objectif principal de cette thèse découle naturellement des conclusions énoncées en paragraphe II.4. Le fil conducteur de ce travail est d'élaborer des nanogels sensibles au glucose à partir de biopolymères, permettant la délivrance d'insuline avec des pharmacocinétiques adaptées.

Les nanoobjets synthétisés devront respecter les critères suivants :

- Biocompatibilité et biodégradabilité de la matrice, avec des sous produits de dégradation non-toxiques ;
- Réponses au glucose rapides, mimant l'activité pancréatique ;
- Taille inférieure à 400 nm afin d'entrer dans la circulation sanguine⁹⁸, et d'avoir un temps de circulation prolongé ;
- Cinétiques de libération d'insuline adaptées au métabolisme, *i.e.* simulant l'activité pancréatique en réponse au glucose.

En 2009, date à laquelle ce projet a débuté, il n'existait pas de système nanométrique réticulé combinant les biopolymères et les acides phénylboroniques. Seule une étude basée sur l'auto-assemblage de polyélectrolytes avait été reportée par Christophe Déjugnat (Figure 1.16 a). Cette équipe s'était attelée à la préparation de microcapsules élaborées par la technique multicouche (LbL)⁹⁴. Bien que les précurseurs utilisés fussent naturels, la taille des microcapsules dépassait le micromètre et le mécanisme de délivrance de l'insuline était non-réversible. Au cours de cette thèse, une étude est venue concurrencer notre approche bien que les mécanismes de fabrication des nanoparticules soient différents. Des nanogels de chitosan modifiés par des groupes boronates ont été fabriqués par auto-assemblage *via* la nanoprécipitation (Figure 1.16 b)⁹⁹. La taille de ces particules auto-assemblées oscille entre 530 nm et 700 nm par addition de glucose.

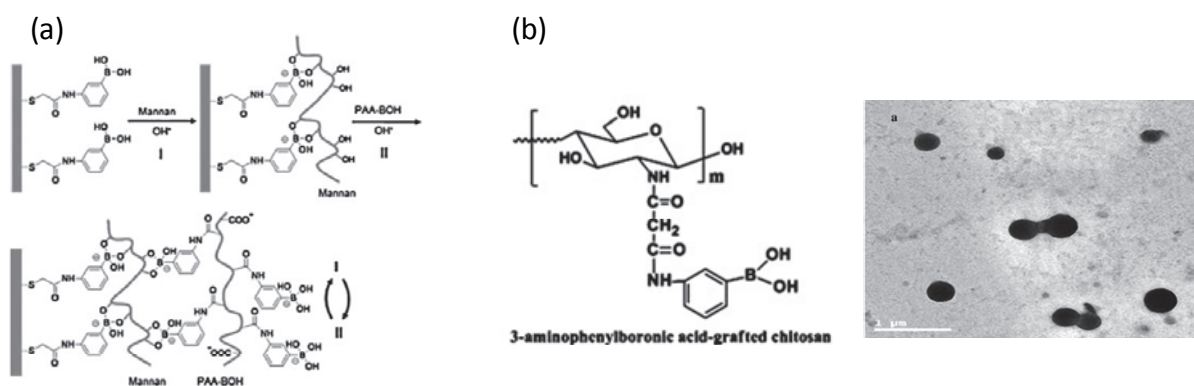


Figure 1.16 : (a) Fabrication par assemblage multicouche de capsules composées d'acide polyacrylique modifié par des PBA et de mannan. (b) Auto-assemblage par nanoprécipitation de chitosan modifié par des PBA.

Ainsi, la recherche au sein de l'équipe, historiquement tournée vers la fabrication de microgels sensibles au glucose à base de poly(N-alkylacrylamide), s'est réorientée vers la fabrication de nanogels sensibles au glucose à base d'un précurseur biocompatible et biodégradable, l'acide hyaluronique (HA).

Les parties qui vont suivre ont pour but de mieux appréhender la discussion des chapitres suivants en donnant les informations clés sur l'acide hyaluronique et son utilisation. Dans une première partie (III.2), nous décrirons tout d'abord la structure et les propriétés physiques et biologiques du HA (section III.2.1). Le HA peut être ensuite utilisé en tant qu'hydrogel ou en tant que particule d'hydrogel (nanogel). Cependant, cette utilisation nécessite un renforcement des propriétés mécaniques du réseau par introduction de nœuds de réticulation. En section III.2.2, nous décrirons les diverses entités chimiques qu'il est possible d'introduire sur la

chaîne de HA pour fabriquer des hydrogels. Dans une deuxième partie (III.3), nous discuterons des méthodes possibles pour miniaturiser le réseau et l'utiliser en tant que nanovecteur.

III.2. Réseaux de Polysaccharides

Le choix s'est porté sur l'acide hyaluronique comme précurseur pour élaborer des matériaux sensibles au glucose pour deux raisons. Il est biocompatible, présent à 56 % dans la peau, 35% dans le système musculo-squelettique et 9% dans les autres régions (sang, fluide synovial, cordon ombilical)¹⁰⁰. De plus, le HA est dégradable *in vivo*, grâce à la présence d'hyaluronidase dans de nombreux organes et fluides¹⁰¹. Au cours de ces dernières années, de nombreuses recherches ont permis d'accumuler des données sur la structure et le rôle du HA dans divers processus de signalisation. Cette biomacromolécule a également suscité l'intérêt des chercheurs pour l'élaboration de biomatériaux aux propriétés complexes pour des applications variées dans le domaine des cosmétiques (vieillesse de la peau) et biomédical (pathologies ostéoarticulaires, chirurgie de l'œil, régénération tissulaire, culture cellulaire). On décompte plus de 600 articles scientifiques sur les hydrogels de HA et une vingtaine sur leurs homologues colloïdaux. D'un point de vue industriel, le développement de produits à partir du HA a attiré l'intérêt des groupes industriels Novozyme, Shiseido, Lifecore, Genzyme, Pierre Fabre, etc. En outre, selon un rapport paru chez Millenium Research Group, le marché global du HA pour les pathologies ostéoarticulaires (seulement) a été évalué à quasiment 1.4 milliard de dollars en 2010.

III.2.1. Le HA, un glycosaminoglycane naturel

III.2.1.1. Origine et structure

En 1934, K. Meyer isole de l'humeur vitreuse bovine une substance de viscosité très élevée, qu'il nomme acide hyaluronique (HA)¹⁰². Mais ce n'est que 20 ans plus tard que la nature des motifs saccharidiques a été identifiée¹⁰³⁻¹⁰⁵. L'acide hyaluronique (HA) est un glycosaminoglycane (GAG) naturel composé d'unités répétitives d'acide D-glucuronique et de *N*-acétyl-D-glucosamine reliées entre elles par des liens glycosidiques β -1,3 et β -1,4 respectivement (Figure 1.17 A). La longueur du disaccharide a été évaluée à 10 Å. Ce polyanion linéaire ($pK_A = 2.9$) et non-sulfaté est également présent dans la matrice

extracellulaire (MEC), un des éléments constitutifs des tissus conjonctifs¹⁰⁶. Le HA intervient dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que la prolifération et la division cellulaire, la morphogénèse et les processus de cicatrisation. L'origine de ses activités biologiques est majoritairement due aux interactions spécifiques que le HA présente avec les récepteurs cellulaires tels que le CD44 et le RHAMM (Figure 1.17 B)¹⁰⁷.

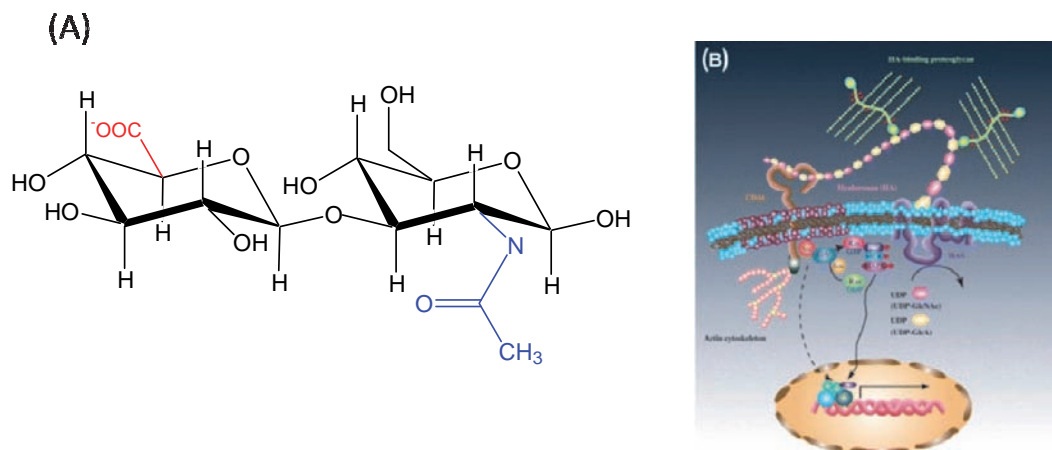


Figure 1.17 : (A) Structure de l'acide hyaluronique (HA), composée d'unités répétitives disaccharidiques d'acide D-glucuronique et d'N-acétyl D-glucosamine. (B) Le HA est présent dans la matrice extracellulaire où il intervient dans de nombreux processus de signalisation¹⁰⁸.

Le mécanisme de synthèse du HA *in vivo* a été mis en évidence par Prehm en 1983^{109, 110}. Contrairement aux autres GAG qui sont synthétisés dans les organelles, le HA est synthétisé dans la membrane cellulaire *via* l'action enzymatique des HA synthases¹¹¹, avant de rejoindre la MEC sans aucune modification de structure et de taille de chaîne.

Initialement obtenu par extraction de crête de coq, le HA est aujourd'hui fabriqué par fermentation bactérienne¹¹². Cette technologie permet d'obtenir, avec de bons rendements, des polysaccharides de masse molaire définie et contrôlée jusqu'à 1 MDa, et de pureté améliorée (présence de protéines résiduelles par extraction des crêtes)¹¹³.

III.2.1.2. Propriétés

De par son activité biologique, le HA est également un polysaccharide de choix pour élaborer des objets biodégradables. En effet, il est dégradé *in vivo* par l'hyaluronidase et les espèces réactives oxydantes (ROS). Son temps de demi-vie varie de l'heure à 2-3 jours¹⁰⁶. Les produits issus de cette dégradation peuvent être éliminés *via* deux processus. Ils peuvent être immédiatement internalisés par les cellules où ils subissent une dégradation définitive dans le

lysosome, ou ils peuvent d'abord circuler dans la circulation sanguine avant d'être éliminés par le système lymphatique (reins, foie et ganglions lymphatiques).

En conditions physiologiques, le poids moléculaire du HA varie de 100 kDa dans le sérum à 8000 kDa dans l'humeur vitrée. La conformation de chaîne majoritaire adoptée est la pelote statistique renforcée par la présence de nombreuses liaisons hydrogènes¹¹⁴. En outre, pour des hauts poids moléculaires (de l'ordre de 5 MDa) et des fortes concentrations ($C > 0.1 \text{ mg.mL}^{-1}$), le HA peut former des réseaux moléculaires enchevêtrés ayant des propriétés viscoélastiques. Ainsi, le HA gonfle sur de très grands volumes et absorbe une large quantité d'eau allant jusqu'à 1000 fois son volume, phénomène renforcé par la présence de nombreuses charges négatives sur la chaîne. En milieu biologique, ce réseau fortement hydraté permet d'occuper l'espace de la MEC tout en jouant le rôle de lubrifiant et de tampon osmotique. De plus, il agit comme tamis moléculaire, régulant les transports de matière *via* les quantités d'eau absorbées. Cependant, ces gels de HA natif présentent des propriétés viscoélastiques relativement faibles et ne permettent pas de garder une intégrité structurale sur de longues durées.

III.2.2. Renforcement des propriétés mécaniques de l'hydrogel : du réseau naturel au réseau covalent.

Ainsi, il est primordial de renforcer les propriétés mécaniques de l'hydrogel par réticulation, soit physique, soit chimique. Nous ne traiterons pas les différentes réticulations physiques que peut former le HA avec d'autres entités. Pour plus d'informations, on pourra se référer aux revues de Hennink^{3, 6}. L'objet de cette section est donc de dresser les différents types de réticulations chimiques que l'on peut introduire sur la chaîne de HA afin d'élaborer des hydrogels aux propriétés mécaniques renforcées. Pour être utilisés en tant qu'hydrogel visant une application biomédicale, les précurseurs de HA doivent présenter une bonne biocompatibilité, *i.e.* les groupements introduits et les réactifs utilisés ne doivent pas avoir de toxicité avérée. De plus, la chimie utilisée doit être chimiosélective pour éviter la formation de produits secondaires toxiques ainsi que la dégradation du HA.

L'étendue des groupements qu'il est possible de greffer sur le HA a été récemment recensée par Glenn Prestwich et par l'équipe de Thierry Vandamme^{115, 116}. Il en ressort principalement trois sites modifiables : la fonction acide, les groupes hydroxyles primaires et secondaires, et le groupement *N*-acétyl (après désacétylation).

La Figure 1.18 présente l'étendue des groupements chimiques que l'on peut introduire sur une chaîne de HA. Les dérivés résultant de ces modifications se divisent en deux catégories : ils sont qualifiés soit de «monolithiques», soit de «vivants»¹¹⁵.

Les dérivés de HA monolithiques sont modifiés de façon irréversible. Le réseau se forme via la réaction chimique entre le HA et les espèces réticulantes. A titre d'exemple, le HA a été réticulé par des groupements bisépoxyde¹¹⁷, ou par la divinylsulfone (DVS)¹¹⁸ en conditions basiques. Le HA peut également être réticulé en conditions acides par du 1-éthyle-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC)¹¹⁹ ou du biscabodiimide¹²⁰. Par exemple, les produits Synvisc® de Genzyme ou Glytone® de Pierre Fabre, injectés respectivement dans les articulations et la peau utilisent ce type de réticulation. Il a été reporté que les hydrogels obtenus ont une durée de vie de 6 à 12 mois (données extraites de Schanté *et al*¹¹⁶), ce qui contrairement au turn-over de 24 heures du HA natif, constitue une nette amélioration. Ainsi, les hydrogels formés à partir de ces précurseurs présentent des propriétés viscoélastiques renforcées et leur dégradation enzymatique se voit retardée. Cependant, ils souffrent d'un manque de complexité structurale et ne peuvent former de nouvelles architectures en présence de cellules, de tissus ou de molécules bioactives. En tenant compte de ces critères, la voie de modification chimique «vivante» peut être une méthode de choix pour fabriquer les précurseurs de HA. Une gamme variée de groupes fonctionnels peut être greffée sur la chaîne de HA comme listée en Figure 1.18. Afin de positionner notre approche, il est essentiel d'aborder les chimies utilisées lors de ce travail de thèse. Ainsi, nous décrirons en particulier les trois modifications suivantes :

- (i) Modification par des groupements hydrazides
- (ii) Modification par des groupements thiols
- (iii) Modification par des méthacrylates.

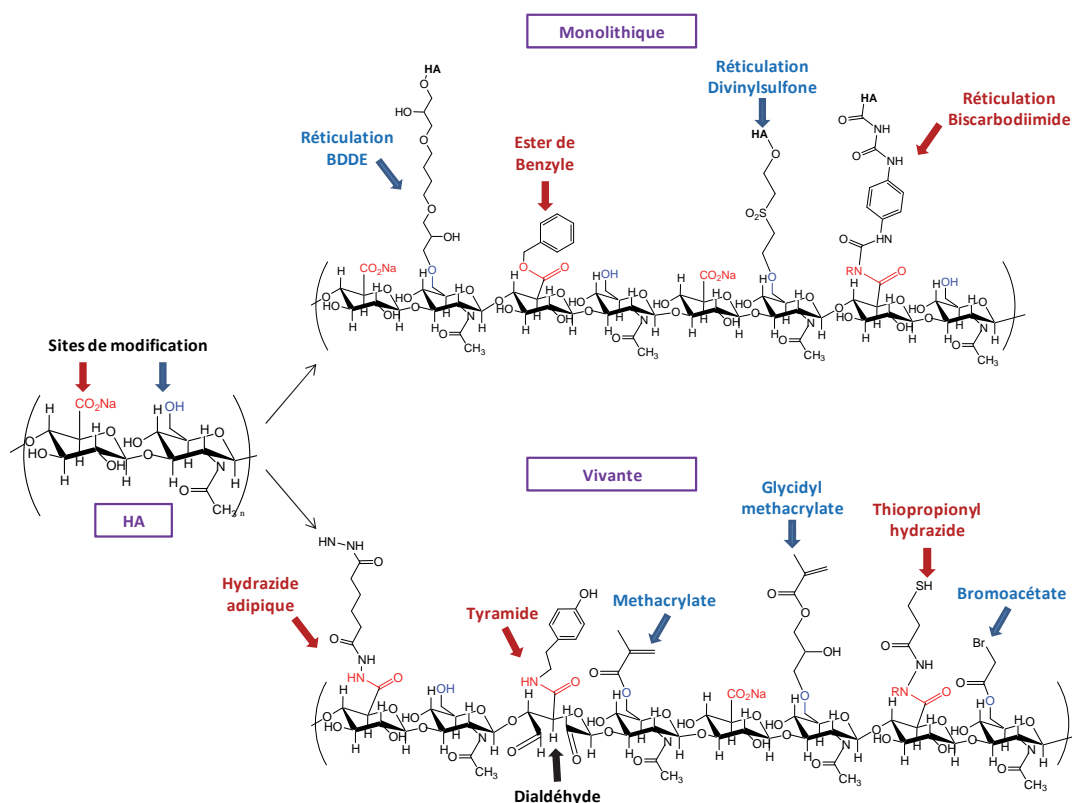


Figure 1.18 : Etendue des groupes fonctionnels qu'il est possible de greffer sur l'acide hyaluronique. Le greffage peut être qualifié : en haut de monolithique (pas de réaction ultérieure possible) ; en bas de vivante (réaction ultérieure possible).

III.2.2.1. Hydrogels par réticulation des groupements hydrazides

L'introduction de groupements hydrazides sur le HA (HA-ADH) se fait généralement par réaction d'un large excès d'acide adipique dihydrazide sur l'acide glucuronique en présence d'EDC à pH=4.75¹²¹, ou en présence d'EDC et de 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) à pH=6.8¹²². Ces précurseurs sont ensuite employés pour former un réseau par réticulation avec un ester cyclique¹²² ou avec un aldéhyde^{123, 124} formant ainsi un lien hydrazone. Le groupement aldéhyde peut être généré directement sur la chaîne de HA par oxydation au periodate (formation d'un dérivé HA-ALD). Cependant, cette réaction entraîne une dégradation partielle du HA. Ossipov *et al.*¹²⁵ ont récemment proposé une solution alternative permettant d'éviter les réactions de dégradation tout en gardant la chimiosélectivité de la réaction.

Les hydrogels ainsi formés ont servi pour l'encapsulation d'entités bioactives telles que des principes actifs, des facteurs de croissance ou des cytokines. Par exemple, des hydrogels résultant de la réaction entre du HA-ADH et du PEG bis(succinimidyl propionate) ont montré une excellente infiltration au sein des cellules, et lorsque chargés avec le facteur de croissance

BMP-2 (« Bone Morphogenetic Protein-2 »), ont conduit à la différenciation de ces cellules en cellules osseuses¹²².

Une autre version a également été développée pour la régénération des tissus des cordes vocales en réticulant des HA-ADH avec des dextrans oxydés en dextrans-aldéhyde¹²⁶.

En combinant des précurseurs de HA-ADH et de HA-ALD avec de la bupivacaïne, un anesthésiant nerveux, il a été montré que ces hydrogels pouvaient être destinés à l'amélioration des temps d'anesthésie de certains nerfs comme le nerf sciatique¹²³.

Ces réseaux sont également très prometteurs comme supports de culture tridimensionnels (3D) de métastases osseuses résultant du cancer de la prostate¹²⁷. Le support 3D permet l'encapsulation des cellules métastatiques qui forment alors des clusters dans le réseau, et ces structures agrégées ne sont pas observées dans le cas d'un support 2D. Les chercheurs ont ainsi pu discriminer, par diminution de ces clusters, l'efficacité de différents anticancéreux envers les cellules en termes de spécificité, de dose administrée et de temps de réponse.

Des structures plus originales telles que des films¹²⁸, des doubles réseaux¹²⁹ ou des réseaux interpénétrés¹²⁶ ont également donné des résultats concluants pour ce type d'applications.

III.2.2.2. Hydrogels par réticulation des groupements thiols

Une autre façon de réticuler les chaînes de HA consiste à introduire des groupements thiols sur la chaîne *via* une réaction d'amidation (précurseurs HA-SH). Les thiols peuvent former des ponts disulfures par une réaction d'oxydation. La cystamine ou la cystéamine ont été couplées au HA par activation de l'acide à l'EDC, pH=4.75¹³⁰. La réactivité de la réaction était relativement faible, l'équipe de Prestwich a alors mis en place une voie de synthèse alternative, en combinant la chimie des hydrazides avec celle des thiols^{131, 132}. Ainsi de nombreux précurseurs HA-SH ont été fabriqués et utilisés pour diverses applications. Par exemple, des films d'hydrogel de HA-thiolés¹³³ ont été utilisés comme support de croissance cellulaire. Les cellules fibroblastes L-929 ont été encapsulées avec succès dans la matrice conduisant à leur viabilité et leur prolifération après 3 jours. Cependant les cinétiques de gélification étaient relativement faibles, empêchant l'utilisation de ces précurseurs *in situ*. Une façon alternative de réticuler le système tout en préservant la biocompatibilité de la réaction a alors été envisagée en réticulant les HA-SH avec des électrophiles difonctionnels tels que les PEG diacrylate (PEGDA) *via* la réaction de Michael^{134, 135}. Les propriétés rhéologiques de ces hydrogels ont été étudiées¹³⁶. L'utilisation de ces réseaux comme support de croissance cellulaire a été concluante en termes de viabilité et de prolifération cellulaire.

De plus, après dégradation du réseau par le glutathion, tripeptide présent *in vivo* capable de cliver les ponts disulfures, la viabilité cellulaire a été observée¹³⁵.

Des réseaux plus élaborés ont également été fabriqués, combinant des précurseurs de HA-SH et des PEGDA avec de la gélatine thiolée¹³⁷ ou de l'héparine thiolée¹³⁸. Ces hydrogels aux propriétés rhéologiques variées¹³⁹, reproduction synthétique de la MEC, ont servi *in vitro* et *in vivo* comme support de croissance cellulaire de fibroblastes HTC¹⁴⁰ ou comme matrice pour l'encapsulation de divers facteurs de croissance¹³⁸.

III.2.2.3. Hydrogels par réticulation des méthacrylates

Une autre voie de réticulation possible et très répandue est l'utilisation de la polymérisation radicalaire de groupements acrylates ou méthacrylates pour former le réseau de HA. La polymérisation radicalaire est actuellement examinée cliniquement pour la formation *in situ* de biomatériaux dans le domaine des ciments osseux et des applications dentaires (pivots, traitements des caries). La polymérisation radicalaire offre la possibilité de former le réseau en solution aqueuse.

L'introduction des (méth)acrylates peut se faire par réaction entre le HA et, du glycidyl méthacrylate (GMA)¹⁴¹⁻¹⁴³ ou de l'anhydride méthacrylique (MA)¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Notons que cette chimie est inspirée des recherches pionnières de Hubbell sur les dérivés oligomères pegylés (PEG) hydrolysables¹⁴⁷. Les précurseurs ou macromères de HA ainsi préparés (notés HA-GMA ou HA-MA) forment un réseau par polymérisation radicalaire des (méth)acrylates pendants. Cette étape doit être amorcée par la génération de radicaux soit par la lumière (photopolymérisation), la température ou par des réactions d'oxydoréduction. Parmi les amorçages utilisés, la photopolymérisation est très largement utilisée pour former les hydrogels de HA-MA. La photopolymérisation permet le contrôle spatial et temporel de la réaction en utilisant la lumière comme levier¹⁴⁸. La structure du réseau peut être modifiée par le laser utilisé ou par des empreintes bien choisies. De plus, la cinétique de l'étape de propagation est relativement rapide comparée aux autres types de polymérisation. Les propriétés physiques et viscoélastiques peuvent également être modulées par le poids moléculaire du HA, le nombre de méthacrylates pendants, et la concentration en macromère¹⁴⁹.

Ainsi de nombreux hydrogels ont été élaborés par photopolymérisation et testés comme support pour différentes applications biomédicales. Des hydrogels de HA-MA ont servi comme support pour la régénération du cartilage *via* l'encapsulation de chondrocytes¹⁴⁹.

Anseth *et al* ont également testé l'efficacité et la spécificité de ces réseaux pour guider la croissance des tissus issus des cellules cardiaques VIC¹⁵⁰. Très récemment, Hachet *et al* ont développé des hydrogels de HA-MA avec des modules variant de 500 à 2100 Pa. Les interactions de ces hydrogels avec différents types de cellules mammaliennes ont été étudiées révélant, outre un mécanisme d'étalement lié aux récepteurs CD44, une dépendance avec la rigidité du macrogel¹⁴⁶.

L'encapsulation *in situ* de cellules ou de protéines pourrait être citée comme facteur limitant d'utilisation de ces hydrogels, du fait de la dénaturation de leur structure en présence de radicaux sous UV. Cependant à faible puissance d'irradiation et en choisissant avec précaution la bande spectrale de la lampe, il a été montré que la BSA pouvait être encapsulée au sein de la matrice¹⁵¹. Plus récemment des tests ont été menés visant à l'encapsulation de facteurs de croissance influant la prolifération et la différenciation des cellules souches^{152, 153}. Les réseaux de HA-MA ont été complexifiés par introduction d'un lien dégradable à base d'acide lactique ou de caprolactone s'hydrolysant au cours du temps, ce qui permet la libération du facteur de croissance. Cette cinétique peut être modulée par la densité de réticulation de l'hydrogel (associée au nombre de méthacrylates ou à la concentration en macromère).

III.2.3. Conclusion intermédiaire

Comme résumé en Tableau 1.2, le HA modifié est très largement utilisé pour élaborer des réseaux macroscopiques. Les biomatériaux peuvent être ensuite utilisés comme support pour la régénération tissulaire de matériaux mous, du fait des modules élastiques compris entre 0.1 Pa et 10 000 Pa, ou pour l'encapsulation et la libération d'entités bioactives, du fait de la taille de pores des réseaux (cf. Tableau 1.2). Plusieurs types de molécules ont été encapsulées, allant des anesthésiants et anticancéreux aux facteurs de croissance. Les cinétiques de libération sont souvent gouvernées par la diffusion. De nombreuses équipes ont également examiné les cinétiques de dégradation de ces gels, soit par action enzymatique de l'hyaluronidase, soit par hydrolyse ou soit par le glutathion dans le cas des dérivés HA-SH. En général, les études ont révélé des cinétiques de dégradation de l'ordre de la journée. Comme le réseau se désintègre par l'action du pH, ou par action enzymatique, ces hydrogels ne présentent pas de caractère stimuable réversible. Ainsi, pour conférer cette sensibilité, en particulier celle au glucose, il est primordial de greffer un récepteur sur la chaîne.

Pour plus d'informations, notons deux revues très exhaustives parues respectivement en 2011 et 2012 qui dressent tous les enjeux de l'ingénierie macromoléculaire sur le HA^{108, 154}.

Tableau 1.2 : Bilan des propriétés des différents hydrogels obtenus et leurs applications, par réticulation des groupements -ADH, -SH et -MA.

Précurseur	Réticulant	MW _{HA} ^a (MDa)	DS ^b (%)	[PM] ^c (wt%)	Modules ^d (kPa)	Porosité ^e	Applications	Réf(s)
HA-ADH	Ester di-fonctionnel	1.5	10-25	1.5	/	20-50 µm (MEB)	Délivrance d'anti-bactériens et d'anti-inflammatoires, de facteur de croissance, ou d'anticancéreux	121, 122, 124, 127
HA-ADH	HA-ALD	0.49 et 1.3	80	2	1-15	/	Encapsulation bupivacaine (anesthésiant nerveux)/ régénération cordes vocales	123, 126
HA-SH	Réaction Michael	/	75	/	10	3-30nm	Délivrance d'hormone de croissance	100
HA-SH	DTPH	0.035	54	5	0.1-1	Pores > taille bradykinine	Délivrance de peptide (Bradykinine)	155
HA-SH	DTPH	0.16-0.25	20-70	1.25-3	0.1-4	125-350 µm (MEB)/dégradation entre 12-48h	Régénération tissulaire (matériaux mous) ; prolifération cellulaire ; encapsulation facteur de croissance	133, 134, 136, 139
HA-MA	GMA	2	< 11	2	0.1-0.15	Entre 530 et 640 nm (calcul)	Culture cellulaire (endothéliales)/ Encapsulation et libération BSA	141, 151
HA-MA	GMA	1.6	14-90	2-10	16-73	/	Culture et prolifération cellulaire (myoblastes)	143
HA-MA	MA	0.49-1.3	8-25	2	1-6	30 µm (MEB)	Régénération corde vocale	142
HA-MA	MA	0.5-0.11	6-12	2-20	2-100	Dégradation de 1 à 38 jours	Culture / encapsulation cellulaire (3T3 fibroblastes, chondrocytes, facteur de croissance)	149, 152
HA-MA	MA	0.78-2.4	3-17	2	0.85-3.4	/	Cicatrisation blessure de l'œil	144
HA-MA	MA	0.1	10-50	1.5-5	0.5-2.1	/	Culture cellulaire (cellules mammaires)	146
HA-MA	MA	5	1.5-100	2	6-55	/	Régénération tissulaire valve cardiaque	145, 150

^a : masse molaire M_w du HA ; ^b : Degré de substitution (DS) en réticulant ; ^c : concentration en précurseur (PM) dans l'hydrogel ; ^d : Modules élastiques G' obtenus par rhéologie ; ^e : porosité estimée soit par MEB , soit par calcul (Flory), soit par diffusion de molécules au sein du réseau.

III.3. *Microgels/Nanogels de polymères hydrosolubles*

Afin d'obtenir un système dédié à l'encapsulation et à la libération d'insuline ou d'actifs en général, il est important de fabriquer des réseaux de taille colloïdale, capables d'atteindre la circulation sanguine. Si jusqu'à présent les micro/nanogels développés reposent sur la chimie des poly-N-alkylacrylamide, c'est que leur mode de synthèse était simple et permettait d'obtenir des objets monodisperses en utilisant le principe de polymérisation par précipitation, dans les conditions où les polymères sont en mauvais solvant. La synthèse de nanogels de polymères hydrosolubles ne peut utiliser ces méthodes. Aussi, d'autres stratégies ont été utilisées afin de miniaturiser les réseaux de polymères hydrosolubles. Nous décrivons dans cette partie les efforts dédiés à la miniaturisation des réseaux de polysaccharide mais aussi de tout précurseur hydrosoluble. Ces précurseurs se divisent en trois catégories :

- 1) **les biopolymères** préalablement modifiés par des groupements réticulables: le chitosan (CS), le dextran (dex), le mannan, le sulfate de chondroïtine, le pullulane, la cellulose, l'alginate et l'hyaluronan.
- 2) **les monomères hydrosolubles** polymérisables incluant : l'acrylamide (AAM), le N-isopropylacrylamide (NIPAM), l'acide acrylique (AA), le 2-hydroxyéthylméthacrylate (HEMA), le 2-hydroxypropylméthacrylate (HPMA), le 2-hydroxyéthylacrylate (HEA), le 2-acryloxyéthyltriméthylammoniumchloride (AETMAC), la vinylpyrrolidone (VP), la N-vinyl caprolactone (NVCP), l'éthylène imine (EI) et l'aniline.
- 3) **les macromères** polymérisables : l'oligo(éthylène glycol) monométhyl éther méthacrylate (OEOMA), le poly(éthylène glycol) diacrylate (PEGDA).

Pour élaborer des microgels/nanogels de biopolymères, i.e. des particules colloïdales **réticulées**, diverses stratégies de synthèse ont été adoptées allant de l'auto-assemblage au confinement au sein de gouttes d'émulsion eau-dans-huile. Ces stratégies, résumées en Figure 1.19, recouvrent :

- (i) la polymérisation en milieu hétérogène (émulsion eau-dans-huile, émulsion eau-dans-eau, liposomes et microémulsions)
- (ii) la polymérisation en milieu homogène
- (iii) l'auto-assemblage
- (iv) le micromoulage et les empreintes lithographiques

En paragraphe III.3.1, nous discuterons des méthodes de polymérisation en milieu hétérogène, en généralisant notre étude à **tous les précurseurs cités ci-dessus** (catégorie 1 + 2 + 3). En paragraphe III.3.2, nous listerons les autres techniques utilisables pour fabriquer des nanogels de polysaccharides en particulier.

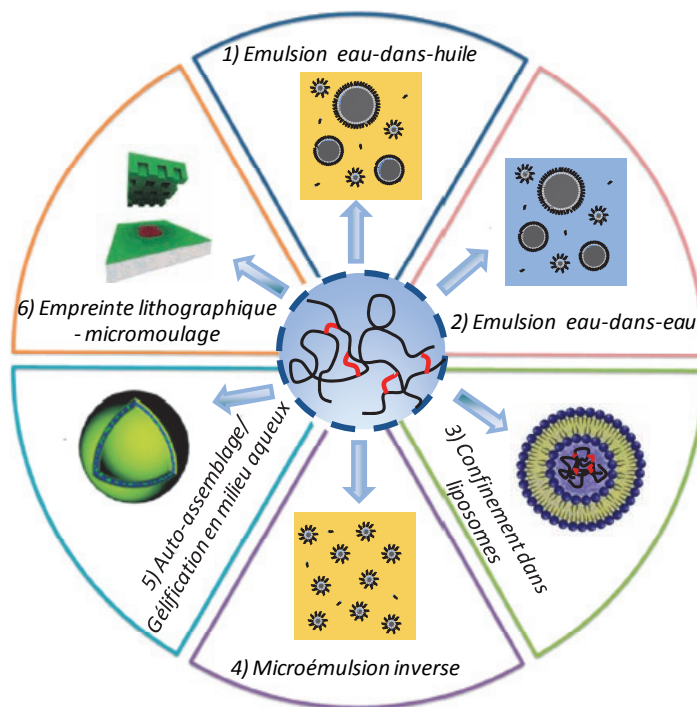


Figure 1.19 : Représentation schématique des diverses stratégies adoptées pour la préparation de nanogels à base de précurseur hydrosoluble. Les procédés 1) à 4) sont inclus dans les procédés de polymérisation en milieu hétérogène (paragraphe III.3.1.1). Les autres procédés seront détaillés en paragraphe III.3.2.

III.3.1. Fabrication de nano/microgels par polymérisation en milieu hétérogène

Comme illustré ci-dessus, les techniques de polymérisation en milieu hétérogène se subdivisent en quatre catégories que nous discuterons progressivement dans cette section :

- (i_a) Gouttes d'eau dans huile (**émulsion inverse**).
- (i_b) Gouttes d'eau dans une phase aqueuse (**émulsion eau-dans-eau**).
- (i_c) Compartiment aqueux dans un milieu aqueux : c'est le cas des **liposomes**
- (i_d) Micelles gonflées = **microémulsion inverse**.

III.3.1.1. Préparation par émulsion inverse

Les émulsions sont définies comme des dispersions de gouttes dans un milieu liquide. Ces émulsions peuvent être soit directes *i.e.* une dispersion de gouttes d'huile dans de l'eau, soit inverses. Dans ce cas, la phase dispersée est aqueuse tandis que la phase continue est organique (émulsion eau-dans-huile). Ces dispersions colloïdales sont thermodynamiquement instables et nécessitent une stabilisation supplémentaire, assurée par des tensioactifs liposolubles. Leur rôle est d'éviter le retour à la séparation de phase par coalescence rapide des gouttes. Les émulsions sont toutes identiques d'un point de vue conceptuel (Figure 1.20 1) mais peuvent être classées en différentes catégories selon leur taille, allant de la centaine de microns à la centaine de nanomètres. Les miniémulsions concernent les émulsions dont la taille des gouttes varie entre la 100 ne de nm et le micromètre, tandis que les nanoémulsions ont une taille inférieure à 100 nm. Notons que par taille, on entend le rayon des gouttes¹⁵⁶.

Pour élaborer des nano/microgels de polysaccharides, les émulsions inverses jouent le rôle de matrice, où les gouttes contiennent le précurseur, permettant de le confiner dans des réacteurs miniaturisés. Cette technologie de choix implique deux étapes : une étape d'émulsification, afin de confiner le précurseur polymérisable/réticulable dans les gouttes d'émulsion, puis une étape de polymérisation/ réticulation, afin de former le réseau.

L'étape d'émulsification peut être menée par plusieurs procédés, adaptés à la gamme de taille visée. Comme résumé en Figure 1.20 2), le système, au départ constitué de deux phases immiscibles, *i.e.* d'une phase dispersée, aqueuse contenant le polymère, et d'une phase organique contenant l'huile et le/les tensioactif(s) (a), est fragmenté par apport d'énergie (b), conduisant à la formation de l'émulsion (c). Aussi, la différence de taille diffère selon l'énergie apportée au système pour le fragmenter. Parmi les techniques de fragmentation, on reporte, les ultrasons, les homogénéiseurs hautes pressions (microfluidiseur), l'inversion de phase, l'émulsification par membrane, et les dispositifs microfluidiques. Ces procédés de fragmentation ne seront pas ici détaillés, le but étant de donner un aperçu des caractéristiques et de l'utilisation des objets colloïdaux préparés.

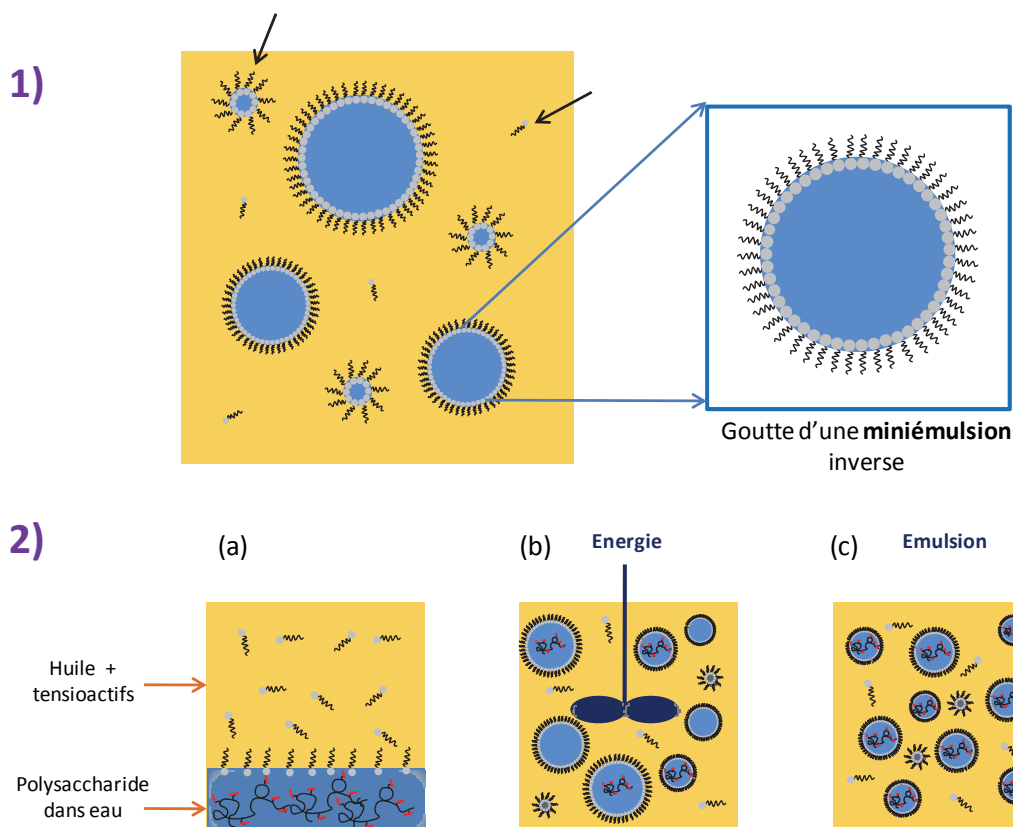


Figure 1.20 : 1) Représentation conceptuelle d'une émulsion eau-dans-huile (W/O)(adapté de^{157, 158}). Dans le milieu, coexiste des gouttes d'huile stabilisées par le/les tensioactif(s) (zoom), des micelles gonflées (car concentration du tensioactif supérieure à sa concentration micellaire critique) et des unimères de tensioactif (fléchés en noir). 2) Représentation de l'étape d'émulsification permettant d'obtenir des gouttes dans lesquelles le polysaccharide est confiné (Adapté de¹⁵⁶).

Il est également possible d'incorporer des actifs hydrosolubles, de l'ADN et des cellules dans la phase aqueuse avant formulation ce qui permet souvent de meilleurs taux d'encapsulation. Après obtention d'une émulsion inverse cinétiquement stable, le mélange est réticulé (changement de pH, de température, mise sous UV) puis purifié par précipitation, centrifugation et lavages à différents solvants tels que l'acétone ou l'éthanol. La taille des objets préparés est contrôlée par la formulation de l'émulsion (quantité de tensioactifs, méthode d'homogénéisation, nature de l'huile) ou par la composition en macromères (quantité de réticulant ou de fonctions réticulables, concentration).

Ainsi, avant de se focaliser sur les mini- et les nanoémulsions inverses, nous donnerons brièvement quelques exemples sur les systèmes microfluidiques et l'émulsification par membrane qui permettent d'obtenir des objets de taille bien supérieure au micromètre.

III.3.1.1.1 Objets de taille supérieur au micromètre

Procédés apparus récemment voire très récemment, les dispositifs microfluidiques et l'émulsification par membrane permettent de former des microgels homogènes en taille¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Ces deux procédés assurent ce bon contrôle de la taille par passage de la phase dispersée, soit dans des canaux microfluidiques, soit à travers une membrane de verre poreux (SPG).

Bien que les dispositifs microfluidiques soient majoritairement utilisés pour fabriquer des microobjets synthétiques de taille moyenne de 50 μm , quelques études reportent la fabrication de microobjets naturels. Comme reporté en Figure 1.21 1), l'équipe d'Eugenia Kumacheva s'est attelée à la fabrication de microgels/capsules d'**alginate** par dispositif microfluidique¹⁶². La fabrication de microgels de **dextran** modifiés par des groupes hydroxyéthylméthacrylate (dex-HEMA) par émulsification dans des canaux microfluidiques a également été reportée. Ces microgels, monodisperses en taille (10 μm) sont biodégradables et utilisables pour la délivrance de protéines¹⁶³. A noter que ces dispositifs permettent également de préparer des structures plus originales telles que les particules Janus, comme a récemment reporté l'équipe de Bernard Cathala (particules pectine-alginate)¹⁶⁴.

Pour l'émulsification par membrane, de nombreuses morphologies ont été élaborées par cette technique, allant des microsphères aux microcapsules. Pour plus de détails, se référer aux revues dans le domaine^{165, 166}. A titre d'exemple, la Figure 1.21 2) décrit la préparation de microsphères de **chitosan** destinées à l'encapsulation d'insuline, par réticulation ionique à la TPP et chimique au glutaraldéhyde¹⁶⁷.

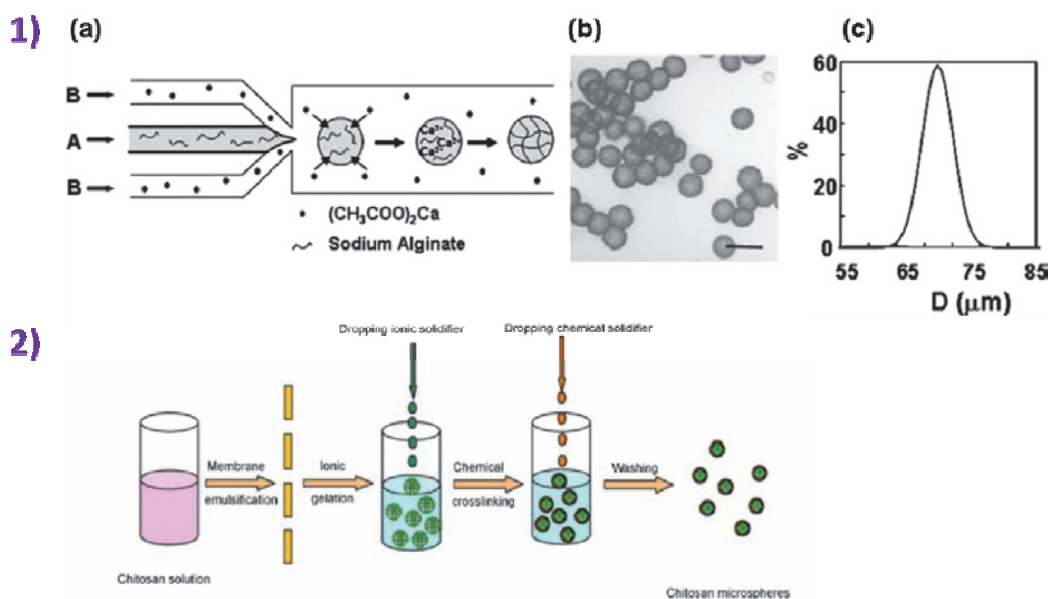


Figure 1.21 : 1) (a) Fabrication de microgels d'alginate par dispositif microfluidique. Une solution d'alginate s'écoule dans le canal, tandis qu'une solution apolaire contenant de l'acétate de calcium est introduite dans les canaux B. A la jonction des canaux, il se forme des gouttes d'alginate qui gélifient par interactions avec les ions Ca^{2+} . (b) et (c) les microgels ont une taille uniforme, révélée par DLS et microscopie optique ; échelle 100 μm. 2) Préparation de microsphères de chitosan par émulsification par membrane (adapté de¹⁶⁷).

III.3.1.1.2 Mini et nanoémulsions inverses

La préparation d'objets colloïdaux par miniémulsion inverse est apparue dans les années 2000. Historiquement, les nanogels préparés par cette technique résultaient de la polymérisation en miniémulsion inverse des monomères d'hydroxyéthylméthacrylate (HEMA), d'acrylamide (AAM) ou d'acide acrylique (AA)¹⁶⁸. Cette technique a depuis été étendue à la préparation de nanoparticules de biopolymère et de macromère hydrosoluble.

Contrairement aux dispositifs reportés ci-dessus, les mini/nano émulsions sont émulsifiées par ultrasonication ou par homogénéisation à haute pression afin d'obtenir des objets de taille $< 1 \mu\text{m}$.

(i) Micro/nanogels de polysaccharide

Pour l'**acide hyaluronique**, des microsphères de HA-ADH ont été préparées en confinant le HA en présence de dihydrazide adipique dans une émulsion inverse W/O constituée d'un mélange huile minérale/span 80/eau¹⁶⁹. La réticulation du système par la di-ADH, initialement utilisée pour générer des réseaux macroscopiques permet de générer des particules sphériques, avec une large distribution autour de 10 μm. Ces microsphères ont

ensuite servi pour l'encapsulation et la délivrance de l'ADN plasmide, (p-ADN) ainsi que pour le ciblage spécifique des cellules. Des structures plus complexes ont été élaborées par l'équipe de Robert Langer¹⁷⁰. Le HA, modifié chimiquement par des groupements hydrazides, a été réticulé en émulsion inverse par l'ajout d'une solution de HA-ADH ou de PEG-dialdéhyde, conduisant à des particules de taille caractéristique autour de 10 μm (Figure 1.22). Les particules ainsi synthétisées peuvent réticuler ultérieurement, formant des doubles réseaux (macroscopiques et microscopiques). Ces architectures plus complexes ont servi pour la régénération des cordes vocales¹⁷⁰.

Cependant, ces deux études se limitent à la formation de particules de taille supérieure au micromètre. Comme illustré en Figure 1.22, des particules de HA-MA de taille nanométrique, autour de 300 nm, ont été récemment préparées par réticulation en émulsion inverse Hexane/PBS. Le HA, préalablement modifié par des groupes GMA, a été confiné en émulsion puis réticulé par amorçage thermique (Figure 1.22 2a). Après purification des nanogels, diverses études rhéologiques ont montré que leur comportement viscoélastique en solution dépend du taux de réticulation en MA (Figure 1.22 2b)¹⁷¹.

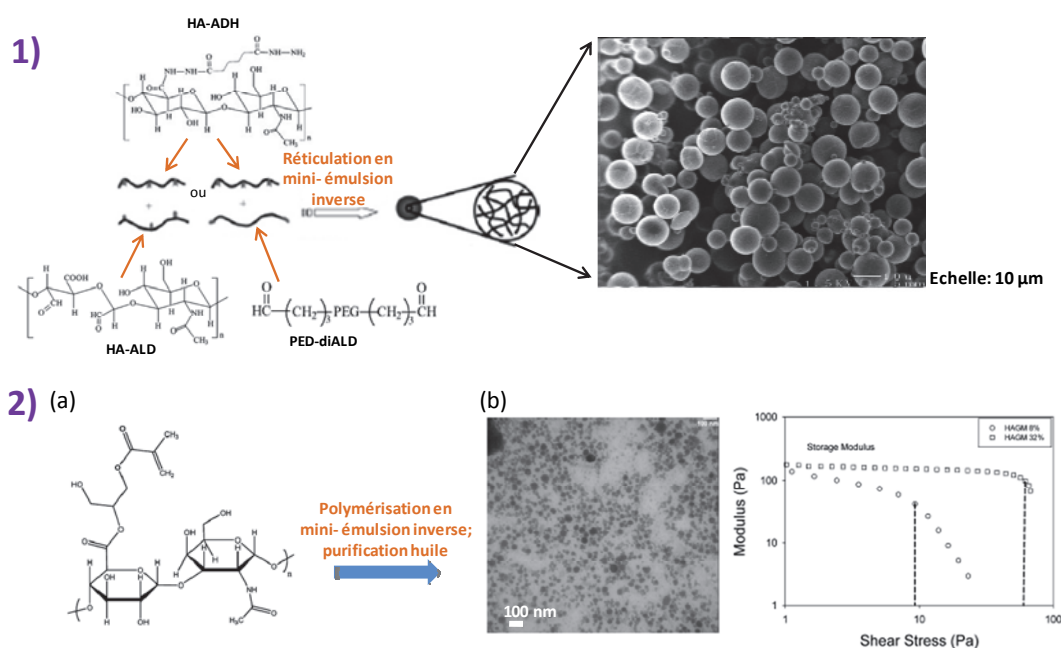


Figure 1.22 : 1) Microgels de HA-ADH préparés par réticulation avec du HA-ALD en miniémulsion inverse. Des particules de taille centrée autour de 10 μm sont obtenues (Extrait de ¹⁷⁰). 2) Exemple de nanogels de HA-MA préparés par miniémulsion inverse. Les MA sont polymérisés par amorçage thermique. Après purification de l'huile, des particules de 300 nm sont obtenues, révélant un comportement viscoélastique dépendant du degré de méthacrylation (Adapté de ¹⁷¹).

Quelques études également intéressantes relatent la préparation de microgels à partir d'autres polysaccharides tels que le **chitosan**, l'**alginate** et le **dextran**.

Le **chitosan** a été réticulé dans les gouttes d'eau par du glutaraldéhyde formant ainsi des microsphères ayant une large distribution de 40 μm à 300 μm ¹⁷². Des actifs ont été encapsulés au sein des gouttes afin d'évaluer leur devenir *in vitro* après relargage.

Plus récemment, des nanoparticules d'**alginate** de 150 nm de diamètre ont été synthétisées par confinement de l'alginate en nanoémulsion¹⁷³. Les gouttes d'eau-alginate dans le décane ont été stabilisées par de l'éther de tétraéthylène monododécyl glycol, ce qui permet d'obtenir une émulsion fine par un procédé d'inversion de phase en température.

Pour la préparation de nanogels à base de **dextran**, notons les travaux très avancés de De Smedt¹⁷⁴. Comme reporté en Figure 1.23 (a), des nanogels de Dex-MA ou de Dex-HEMA en présence de monomère cationique ont été préparés par miniémulsion inverse et réticulés par photopolymérisation. Les nanogels préparés, de taille variant entre 180 nm et 260 nm, dégradables avec le pH (Figure 1.23 c), s'avèrent de bons candidats pour l'encapsulation d'ARN interférant (Si-RNA) (Figure 1.23 c et d). Une autre version de ces systèmes a été développée afin de cibler les zones tumorales, par pégylation de la surface des particules¹⁷⁵.

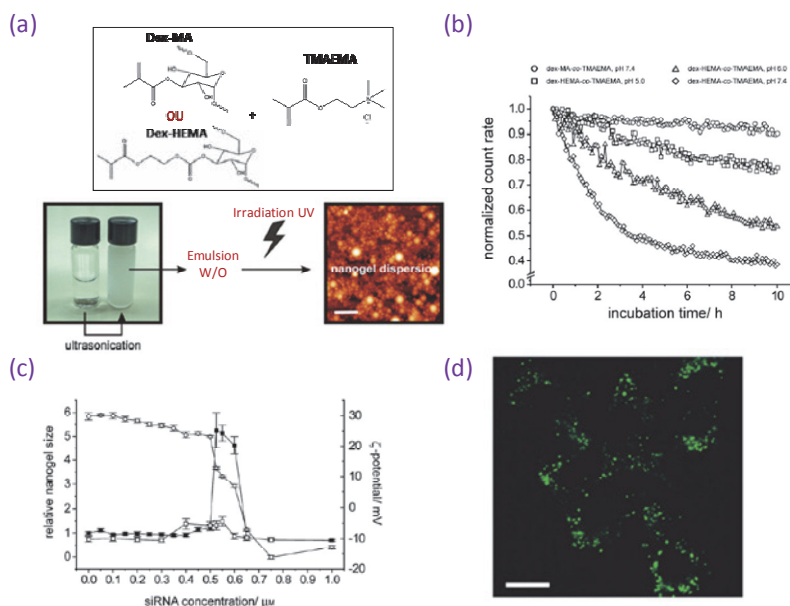


Figure 1.23 : Préparation de nanogels de dextrans-MA, par photopolymérisation en miniémulsion inverse des méthacrylates pendants, en présence de monomère cationique (a). Les nanogels obtenus de taille uniforme centrée autour de 200 nm sont dégradables en fonction du pH, par hydrolyse de l'ester du groupe HEMA (b), et peuvent interagir avec des Si-RNA via la fonction ammonium, conduisant à une inversion de l'état de charge des particules (c). Les nanogels chaperonnent la délivrance du Si-RNA au sein des cellules cancéreuses hépatomes, révélée par microscopie confocale (d). Extrait de¹⁷⁴.

(ii) *Micro/nanogels de monomère ou macromère hydrosoluble*

Les miniémulsions sont aussi une technique de choix pour la préparation de nanogels à partir de monomère ou de macromère hydrosoluble. Très souvent, la polymérisation radicalaire classique est utilisée pour réticuler le système.

Les travaux de Katharina Landfester regorgent d'exemples de nanogels élaborés par polymérisation radicalaire par miniémulsion inverse. A titre d'exemple, la Figure 1.24 illustre une version très récente de leurs travaux¹⁷⁶. Des nanogels d'acrylamide réticulés par des dextrans méthacrylates ont été préparés par polymérisation radicalaire classique en milieu confiné. La densité des nœuds de réticulation a été ajustée par divers paramètres tels que le nombre de méthacrylates présents sur le réticulant, la concentration en réticulant et le ratio entre monomère et réticulant. Les particules préparées, de diamètre de l'ordre de 200 nm dans le cyclohexane, présentent un taux de gonflement modulable une fois transférées dans l'eau. Leur cinétique de dégradation par la dextranase a été investie par DLS et par des mesures de turbidité. Une version plus élaborée de ces réseaux, présentant un double caractère dégradé via la dextranase ou la lumière, a aussi donné des résultats concluants¹⁷⁷.

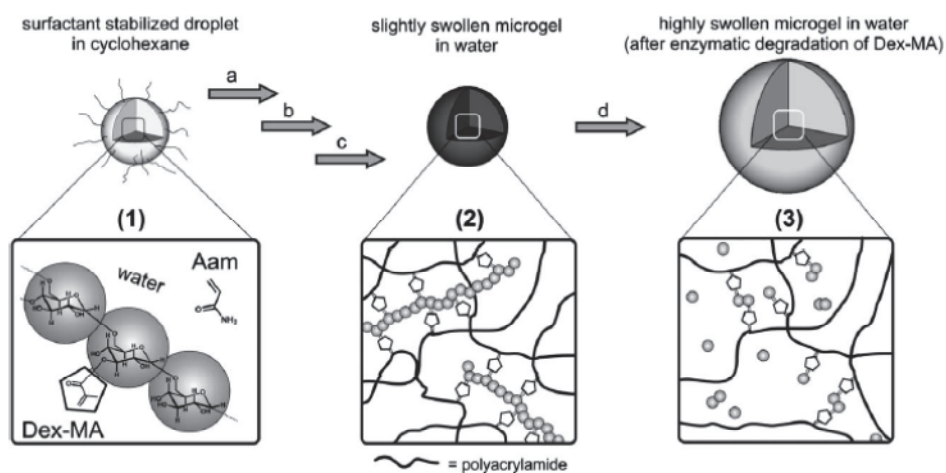


Figure 1.24 : Représentation conceptuelle de microgels d'acrylamide réticulés en miniémulsion inverse par des Dex-MA. Après émulsification (1), les nanogouttes sont réticulées par polymérisation des MA greffés (2). Cette réticulation est dégradée sous l'action enzymatique de la dextranase (3). Extrait de ¹⁷⁶.

D'autres exemples relatent la préparation de nanogels par émulsion inverse à partir de monomères variés tels que l'acrylamide¹⁷⁸, la N-vinylcaprolactone¹⁷⁹, le 2-diéthylaminoéthyl méthacrylate¹⁸⁰, ou l'hydroxyéthylméthacrylate (HEMA)^{181, 182}.

Une autre façon de réticuler le monomère ou le macromère en milieu confiné est l'utilisation de la polymérisation radicalaire contrôlée, soit par ATRP (Polymérisation par Transfert d'Atome) ou par RAFT (polymérisation par Transfert Réversible par Addition-Fragmentation). La polymérisation radicalaire offre un bon contrôle de la polymérisation et la formation de particules colloïdales stables.

Les travaux de Krzysztof Matyjaszewski ont été pionniers pour le développement de nanogels réticulés par ATRP en milieu confiné. Ses recherches ont débuté par la préparation de nanogels d'oligo(éthylène glycol) de monoéthyl éther méthacrylate (OEOMA) par miniémulsion inverse cyclohexane/eau (Figure 1.25 1 et 2)¹⁸³. Une première génération de nanogels non réticulés a été préparée en confinant le macromère d'OEOMA en émulsion puis en le polymérisant par RAFT. Les particules préparées avaient un diamètre de 145 nm, déterminé par DLS, et une morphologie sphérique, déterminée par AFM. Cependant, ces particules non réticulées n'étaient pas biodégradables. Une nouvelle génération a alors été préparée en réticulant le système par des di-méthacrylates fonctionnalisés par des ponts disulfures¹⁸⁴. Ces nanogels, de 260 nm de diamètre, sont dégradables en milieu réducteur. Des études plus poussées ont montré que ces systèmes pouvaient servir à l'encapsulation et la délivrance ciblée d'actifs¹⁸⁵. Des taux d'encapsulation très élevés de l'ordre de 80 % ont été atteints par pré-encapsulation de dextrans fluorescents, servant ici comme modèle d'actif hydrosoluble (Figure 1.25 3). Enfin, une fonctionnalisation supplémentaire par de l'HEMA a permis de fabriquer des nanogels fonctionnalisés par la biotine¹⁸⁴. Cette fonctionnalisation permet de former des nanogels bioconjugués biotinylés-avidine ayant une application potentielle pour le ciblage cellulaire (Figure 1.25 4)¹⁸⁶.

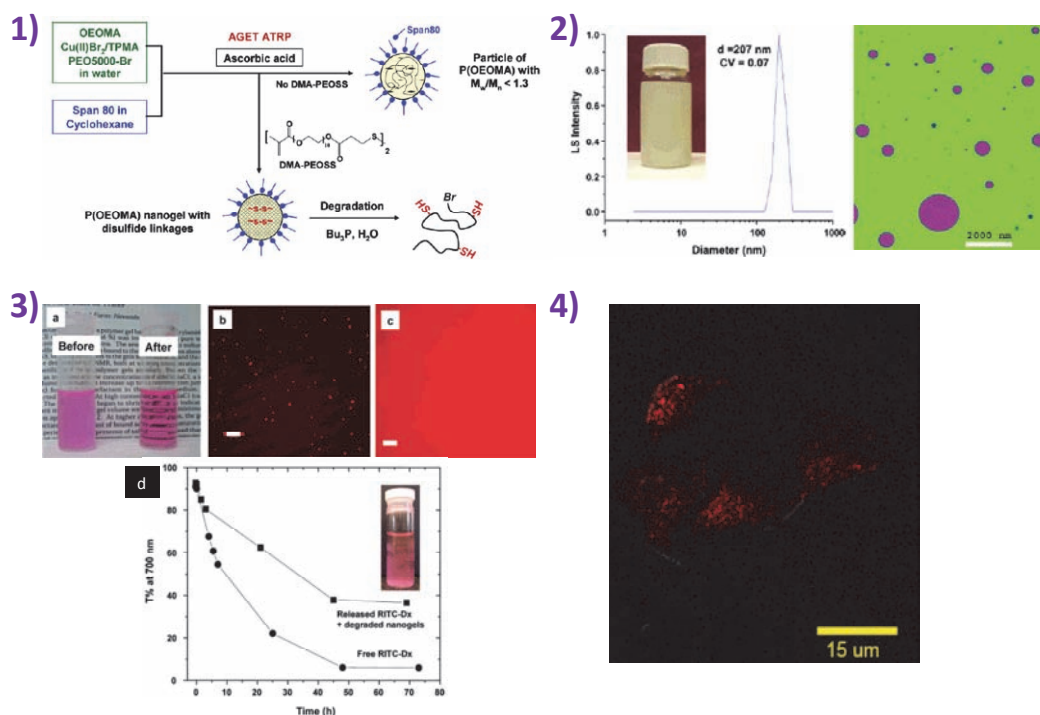


Figure 1.25 : 1) Schéma général pour la préparation par ATRP en miniémulsion de nanogels d'OEOMA, dégradables ou non-dégradables. 2) Caractérisation des nanogels obtenus par DLS et AFM montrant une taille de 200 nm avec une distribution assez large. 3) Encapsulation de RITC-dextran puis délivrance, par dégradation avec le DTT (a-c) ou par le glutathion (d). 4) Internalisation des nanogels au sein d'ostéoblastes MC3T3, par un mécanisme d'endocytose. Extrait de ^{183, 185, 186}.

Une méthode alternative de polymérisation radicalaire contrôlée en miniémulsion inverse est la polymérisation RAFT. Cette technique de polymérisation contrôlée, développée par le Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), permet un très bon contrôle de la polymérisation reposant sur un choix judicieux de l'amorceur. Très utilisée dans le milieu industriel pour la synthèse de polymères aux architectures diverses et contrôlées, cette technique a été adaptée par l'équipe de Schork pour la préparation de particules colloïdales en miniémulsion inverse¹⁸⁷. Par exemple, des nanogels d'acrylamide ont ainsi été préparés. Plus récemment, cette technique a été utilisée pour la fabrication de nanogels de 2-(diméthylamino)éthyl méthacrylate (DMAEMA) en miniémulsion inverse¹⁸⁸.

La préparation de nanogels en miniémulsion par réticulation *via* la polycondensation ou les réactions d'oxydoréduction est également reportée. L'avantage majeur de ces méthodes est que la réticulation ne nécessite pas la présence de radicaux pour amorcer la polymérisation, radicaux qui pourraient altérer la structure des actifs encapsulés.

Une version de nanogels dégradables a été développée par l'équipe de Martin Moëller¹⁸⁹. Leur étude se base sur la réticulation de polyéthylène glycol linéaire ou en étoile, fonctionnalisés par des groupements thiols. La réticulation du système est assurée par l'oxydation des thiols en milieu basique. Les nanogels présentent une taille caractéristique entre 230 nm et 350 nm, et leur morphologie a été investie par microscopie AFM et MEB. De plus, la cinétique de dégradation de ces nanogels par le glutathion et leur non-cytotoxicité ont été prouvées, leur conférant une application potentielle pour la libération d'actifs.

Récemment, des études prometteuses ont également été reportées pour la préparation de nanogels dégradables à base de polyglycérol par émulsion inverse^{190, 191}. La polyaddition par ouverture de cycle (ROP) catalysée en milieu acide a été utilisée pour réticuler le système. Les monomères présentent des fonctions époxydes et hydroxyles et ont été modifiés par des ponts disulfures. Après réticulation du système par ROP en milieu confiné, les cinétiques de dégradation en milieu réducteur ont été déterminées.

Enfin, notons une méthode très en vogue pour réticuler le système: la réticulation par chimie click des thiol-ènes. Cette réticulation a été récemment utilisée pour la préparation de nanogels par miniémulsion inverse¹⁹². Des dérivés de l'acide lactique ont d'abord été linéarisés par ROP, puis réticulés en miniémulsion inverse (ici transparente) par le 1,4-butanediol bis (3-mercapto-propionate) sous UV. Ainsi des nanogels de 50 nm et des nanocapsules de 170 nm ont été fabriqués. Leur dégradation enzymatique a été étudiée par DLS.

III.3.1.2. Emulsion eau-dans-eau (W/W)

La technique des émulsions eau-dans-eau repose sur l'immiscibilité d'un mélange de deux polymères, formant ainsi deux phases distinctes eau-polymère 1 et eau-polymère 2. Cette technique s'avère intéressante pour la fabrication d'objets pour des applications biomédicales et alimentaires car elle ne requiert pas l'utilisation de solvant organique. Seuls quelques exemples de couples de polymères ont été identifiés pour répondre à ces critères : couple dextran/PVA, NIPAM/PVA¹⁹³, Amidon/PEG¹⁹⁴, alginate/caséinate¹⁹⁵, etc. Elle a été initiée par les travaux de Wim Hennink sur la préparation d'hydrogels ou de microgels de dextrans^{196, 197}. L'équipe de Paradossi s'est inspirée de cette méthode. Comme reportée en Figure 1.26, une étude sur des microgels de dextrans modifiés par des MA (Dex-MA), réticulés par photopolymérisation a été menée¹⁹⁸. Des microgels de structure, taille et densité de réticulation contrôlées ont été obtenus (Figure 1.26 b). Le comportement dynamique de

l'eau au sein des microgels s'est avéré affecté par la présence de la matrice polymérique et de son degré de réticulation (Figure 1.26 c). Des études de dégradation ont également été conduites et suivies par DLS et spectrophotométrie UV-vis. Elles ont démontré que la cinétique de dégradation des microgels dépend à la fois de la concentration en enzyme et de la densité de réticulation de la matrice (Figure 1.26 d). Cette approche récente démontre que la connaissance des propriétés physico-chimiques de ces réseaux n'est pas encore complètement établie.

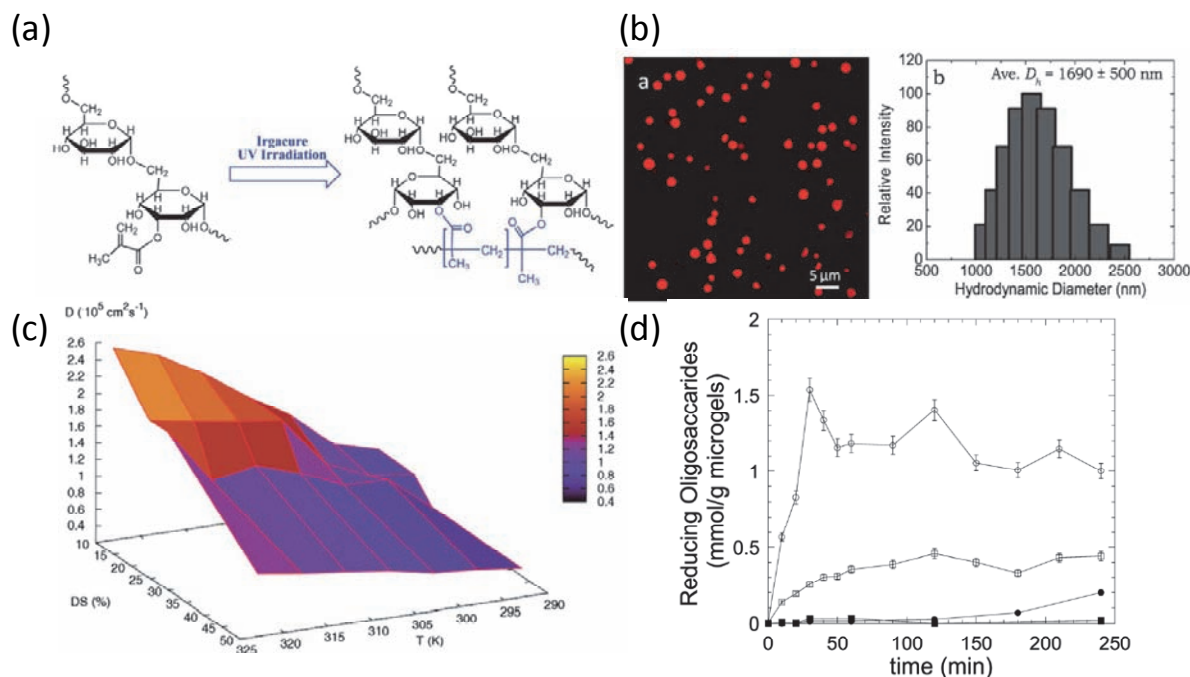


Figure 1.26 : Préparation de microgels de dextran par réticulation en émulsion eau-dans-eau des groupements méthacrylates sous UV (a). Les microgels présentent une taille caractéristique de $1.7\mu\text{m}$ déterminée par DLS et microscopie confocale. (b). Les coefficients de diffusion de l'eau associée à la matrice se révèlent plus faibles que ceux de l'eau en solution, effet renforcé par la densité de réticulation (DS) de la matrice (c). Les cinétiques de dégradation par la dextranase dépendent de la concentration en enzyme (symboles pleins vs vides) et du DS (carré vs point). Extrait de ¹⁹⁸.

III.3.1.3. Utilisation des liposomes comme nanoréacteur

La technique du confinement des précurseurs au sein des liposomes peut être utilisée pour fabriquer des nanogels. Dans ce cas, le précurseur est encapsulé dans le cœur aqueux des vésicules lipidiques, puis réticulé au sein de celles-ci. La photopolymérisation est souvent utilisée pour réticuler le système. Cette technique originale est apparue dans les années 2000. Le protocole de préparation a été établi sur des nanogels synthétiques d'acrylamide, de NIPAM et de poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-1-vinylimidazole)¹⁹⁹. Plus tard, elle a été

adaptée par l'équipe de Stefan de Smedt pour la fabrication de nanogels de dex-MA²⁰⁰. La Figure 1.27 retrace les étapes majeures pour la fabrication de ces nanogels. Le dex-MA est emprisonné dans le cœur des vésicules lipidiques puis réticulé par photopolymérisation des méthacrylates pendants. Les nanogels réticulés ou lipogels sont ensuite transférés en milieu aqueux par purification de la couche lipidique. Des études d'encapsulation et de libération de protéines au sein de ces nanogels se sont avérées concluantes, avec des taux d'encapsulation de l'ordre de 50 %²⁰¹. Une autre équipe a utilisé les liposomes comme nanoréacteurs pour la fabrication de nanogels d'acrylamide ou de bis(acrylamide)²⁰². Cependant ces études souffrent d'une purification difficile des micelles de tensioactifs.

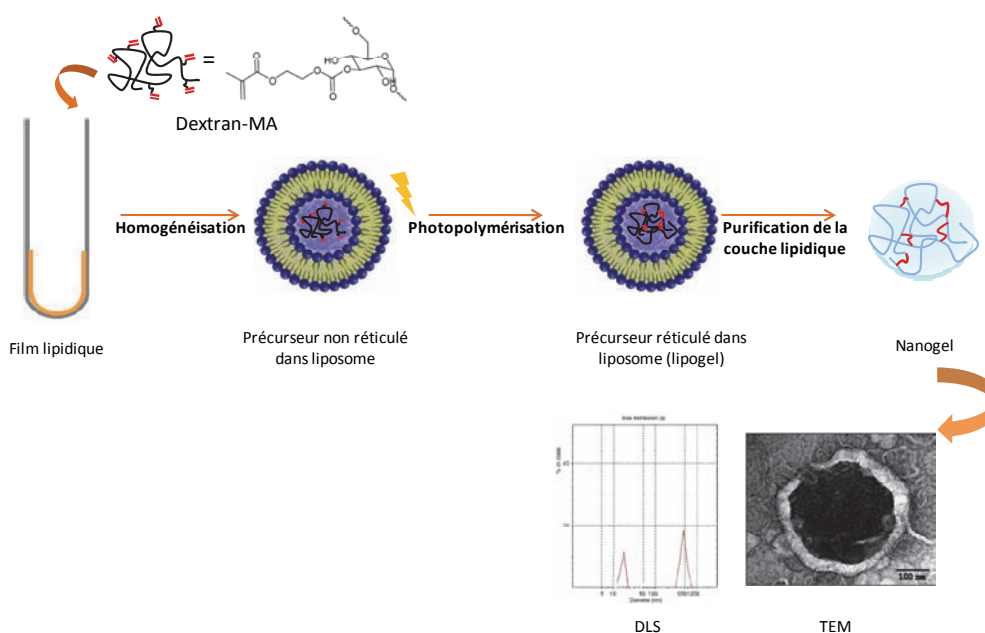


Figure 1.27 : Représentation schématique de la préparation de nanogels de Dex-MA par confinement dans des liposomes jouant le rôle de nanoréacteur. Les nanogels Dex-MA décorés par une couche lipidique ont une taille de 450 nm. Le milieu reste pollué par la présence de micelles comme le montre le signal de DLS. (adapté de²⁰⁰).

III.3.1.4. Préparation par micellisation inverse

Une autre technique très répandue pour préparer des nanogels de polysaccharide ou de (macro)monomère est la micellisation inverse ou la microémulsion inverse.

Dans ce cas, la microémulsion inverse est constituée d'une phase organique contenant une grande quantité de tensioactif et d'une phase aqueuse. A l'équilibre, il se forme une dispersion thermodynamiquement stable et transparente, constituée de micelles inverses gonflées d'eau dispersées dans la phase organique (Figure 1.28). Le bis-(2-éthylhexylsulfosuccinate) de sodium (AOT) est un des tensioactifs les plus utilisés pour l'étude des systèmes micellaires

inverses car il est susceptible de former des microémulsions inverses sans utilisation de cosurfactant. Une microémulsion ternaire (Eau, Alcane, Tensioactif) est donc suffisante pour former des systèmes inverses; ceci rend l'étude de ces systèmes beaucoup plus abordable.

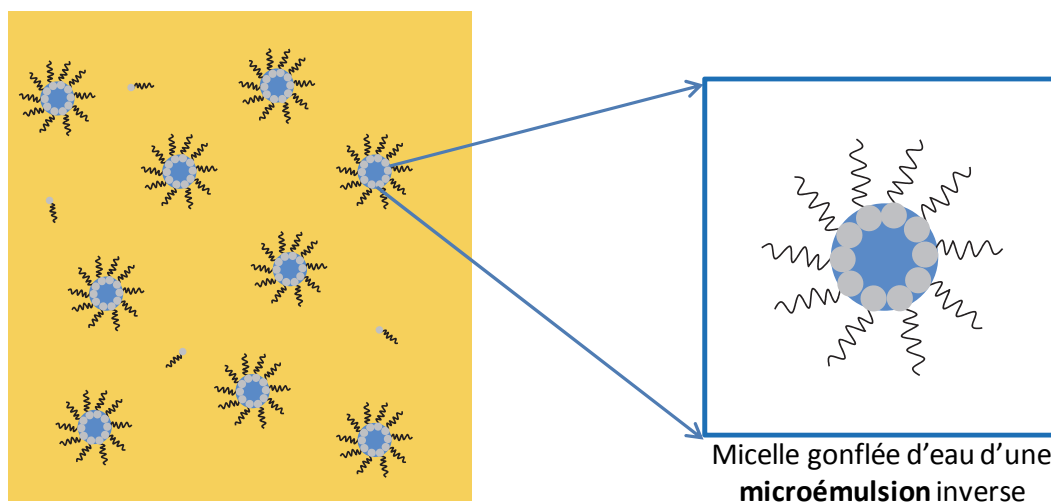


Figure 1.28 : Représentation schématique d'une microémulsion eau dans huile (W/O). Adapté de^{157, 158}

III.3.1.4.1 Nanogels/microgels à partir de polysaccharide

Divers exemples existent dans la littérature concernant la fabrication de nano/microgels de polysaccharide, de taille variable selon la technique d'émulsification utilisée.

Tout d'abord, des nanogels de HA ont été fabriqués par réticulation avec de l' α,β -polyaspartylhydrazide (PA-Hy) en microémulsion inverse. La réticulation est assurée par couplage peptidique entre les fonctions acides du HA et les fonctions amines du PA-Hy²⁰³. Les particules sphériques ainsi formées, de taille inférieure au micromètre, présentent une charge de surface négative. Des études de stabilité ont ensuite montré que ces nanogels étaient stables à pH acide mais se dégradait au bout de 36 heures en présence d'hyaluronidase.

Comme nous l'avons vu précédemment, une autre voie de réticuler le réseau est l'introduction de ponts disulfures. Cette méthode a été adoptée en microémulsion inverse pour fabriquer des nanogels de taille nanométrique, destinés à l'encapsulation de Si-RNA (Figure 1.29)¹³⁰.

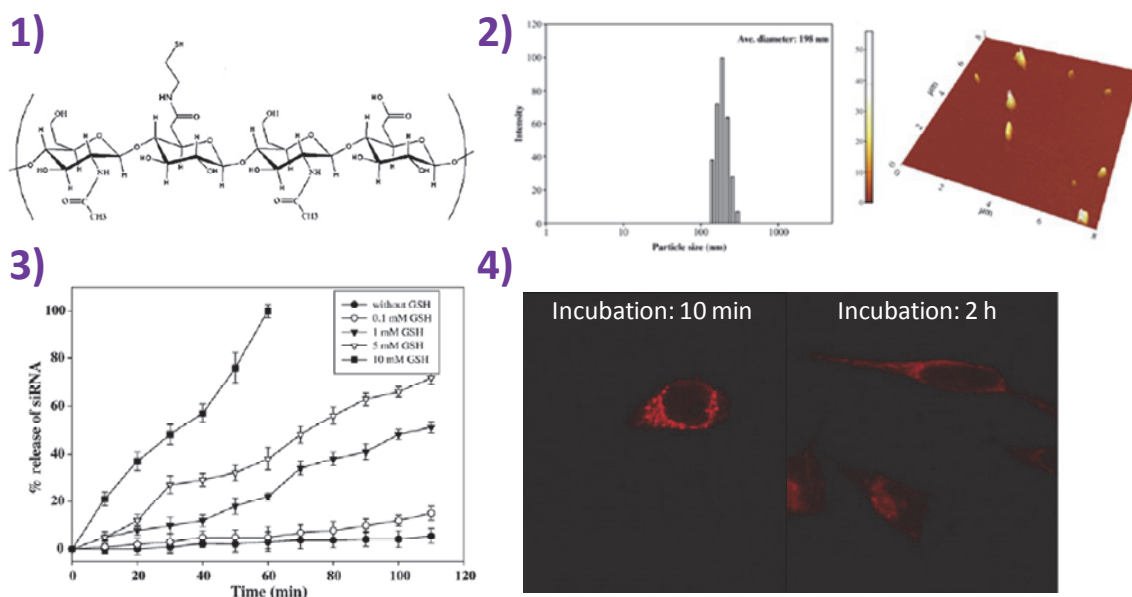


Figure 1.29 : Caractéristiques de nanogels de HA-SH obtenus par microémulsion inverse. (2-3) Les objets de 150 nm de diamètre montrent des cinétiques de dégradation qui dépendent de la concentration en glutathion. (4) Ils sont internalisés par les cellules via les interactions HA-CD44¹³⁰.

Par la suite, deux groupes majeurs dans le domaine ont relaté la préparation de microgels de HA par microémulsion inverse : celui de Nurettin Sahiner et celui de Xinqiao Jia. Au départ, une étude commune aux deux chercheurs relate la fabrication de nanogels de HA réticulés par le DVS en microémulsion inverse^{204, 205}. La microémulsion est constituée d'un mélange isoctane/heptanol/AOT pour la phase continue et d'un mélange HA/DVS/NaOH pour la phase dispersée. La structure et la distribution en taille des microgels ont été optimisées en étudiant l'influence de divers paramètres expérimentaux tels que la concentration en HA dans la phase dispersée. Ils ont conclu leur étude par des essais de cytotoxicité, montrant ainsi une application potentielle de ces nanogels pour la délivrance d'actifs.

Ces équipes ont ensuite décliné leurs études autour des microémulsions inverse isoctane/eau stabilisées par de l'AOT et de l'heptanol. Les travaux de Sahiner se sont diversifiés autour de la fabrication de microgels de HA incluant des particules d'oxyde de fer ou de silice pour des applications biomédicales²⁰⁶⁻²⁰⁹. L'équipe de Jia, quant à elle, s'est attelée à la fabrication de doubles réseaux^{129, 210}. Les particules de HA réticulées par le DVS ont été intégrées dans un réseau de HA réticulé par le GMA²¹⁰. Ces réseaux complexes présentent de nombreuses similitudes avec la matrice extracellulaire et sont donc de bons candidats pour la régénération tissulaire. Une autre étude a également montré que ces particules présentent une taille de

pores entre 5.5 et 7 nm¹²⁹. L'étude a été réalisée en déterminant une taille de coupure *via* l'encapsulation de protéines de différente taille.

Notons quelques études intéressantes sur les autres polysaccharides ou sur le HA combiné à d'autres polysaccharides relatant la préparation de microgels de cellulose²¹¹, d'alginate²¹², de chitosan²¹³, et de HA combiné à l'héparine²¹³. Cependant, la gamme de taille ciblée par ces trois études reste en dehors de notre champ d'application.

III.3.1.4.2 Nanogels/microgels à partir de polymères hydrosolubles

La technique des microémulsions se révèle également efficace pour la fabrication de nanoparticules à base de (macro)monomères hydrosolubles.

L'adaptation des concepts gouvernant la formation de microémulsions à la fabrication des microlatexes a été reportée dans les 1980-1990 par Françoise Candau. Depuis, ces concepts ont été appliqués à d'autres systèmes. Par exemple, des nanogels de chlorure de 2-acryloxyéthyltriméthylammonium (AETMAC) 2- copolymérisés avec du HEA en présence de PEGDA comme agent réticulant en microémulsion inverse ont été fabriqués par microémulsion²¹⁴. Des nanogels de taille, morphologie et taux de gonflement contrôlés ont été obtenus. Le ratio monomère/comonomère/agent réticulant a été modulé de façon à obtenir des nanogels non chargés ou cationiques. Ces derniers ont démontré, outre une faible cytotoxicité, d'excellentes interactions avec les oligonucléotides et l'ADN, leur conférant une utilisation potentielle pour la thérapie génique.

L'utilisation des microémulsions est également reportée pour la préparation de nanogels d'acrylamide et dérivés^{215, 216}, d'acrylonitrile et dérivés²¹⁷, de N-vinylformamide²¹⁸. La technique utilisée pour fabriquer ces derniers a été étendue à la préparation de nanogels de poly(carboxybétaine méthacrylate) (p-CBMA)²¹⁹. Les nanogels préparés, de taille inférieure à 200 nm ont montré une bonne stabilité dans du sérum foetal bovin. Ils ont également servi de modèle pour l'encapsulation de macromolécules fluorescentes. Après décoration avec des groupements cyclo-RGD, leur internalisation par les cellules endothéliales s'est avérée efficace. Des systèmes de libération intelligents, reposant sur une modulation de la charge activée au voisinage de la zone tumorale ont aussi été développés²²⁰. Ces nanovecteurs de poly(2-aminoéthyl méthacrylate) (PAMA) sont réticulés par du PEGDA et modifiés par l'anhydride 2,3-diméthylmaléique *via* une fonction amide. Ils présentent une charge de surface négative qui devient positive au voisinage des tumeurs par dégradation de la fonction amide, augmentant leur internalisation cellulaire.

III.3.2. *Fabrication de nano/microgels de biopolymères par d'autres techniques*

Cette section a pour but de dresser les autres méthodes existantes qui permettent de fabriquer des microgels de polysaccharides. Les deux premières techniques ici listées sont pertinentes et comparables aux émulsions inverses (miniémulsions et microémulsions) en termes de gamme de taille visée. Les techniques lithographiques sont plus éloignées pour la gamme de taille obtenue mais permettent l'élaboration de structures originales.

III.3.2.1. Polymérisation en milieu homogène aqueux

La réticulation chimique covalente en milieux aqueux peut être utilisée pour la préparation de nanoparticules de biopolymères. Cette technique, relativement commode à mettre en œuvre, permet la formation de petites nanoparticules de taille inférieure à 100 nm et ne nécessite pas l'utilisation de solvant organique. Par exemple, des nanoparticules de chitosan ont été préparées par réticulation de celui-ci avec de l'acide dicarboxylique-PEG via un couplage à l'EDC. Les particules formées ont un diamètre caractéristique de 4-24 nm, révélé par microscopie électronique à transmission (TEM). Dans une autre approche, le dianhydride d'éthylène diamine tétraacétique a été utilisé pour la préparation de nanogels à base de chitosan. Ces nanogels présentent une taille caractéristique de 70-80 nm et une sensibilité au pH. A $\text{pH} < 4.8$, leur surface est positive alors qu'elle devient négative pour des $\text{pH} > 5.2$ ²²¹. En jouant sur ces caractéristiques, des agents anticancéreux pH-sensibles ont été encapsulés dans le réseau à pH acide afin de faciliter leur solubilisation. Puis, leur cinétique de libération a été suivie à pH neutre pendant 24 heures.

III.3.2.2. L'auto-assemblage

Une voie alternative pour la fabrication de nano/microgels est l'auto-assemblage. Les polysaccharides sont préalablement modifiés par des groupements hydrophobes puis dispersés en milieu aqueux où ils forment spontanément des nanoparticules.

Plusieurs équipes ont utilisé cette stratégie pour former des particules de HA auto-assemblées destinées à l'encapsulation d'actifs (anti-cancéreux et protéines). Le HA a été modifié par des groupements acétyle (HA-Ac) puis couplé à un agent photosensible, le phéophorbide-a (Pa) (Figure 1.30 1)²²². Ce précurseur amphiphile s'auto-assemble en milieu aqueux en nanoparticules sphériques de 125 nm, caractérisées par DLS et FE-SEM. Cette équipe a

également étudié les propriétés d'auto-assemblage de précurseurs HA-Ac avec des degrés de substitution variant de 0.8 à 2.6 en présence de la doxorubicine (Dox)²²³. Cette étude a démontré que le taux d'encapsulation en Dox variait en fonction du nombre de groupements hydrophobes.

L'équipe de Kazunari Akiyoshi a quant à elle développé des précurseurs amphiphiles de HA-cholestéryl s'auto-assemblant en milieu aqueux²²⁴. Ces nanogels, de taille caractéristique variant entre 20 nm et 70 nm selon le nombre de cholestéryl substitué, se lient spontanément avec différents types de protéines sans en dénaturer leur structure (Figure 1.30 2). Ainsi, des études d'association nanogels-protéines ont été réalisées sur les hormones humaines de croissance et sur les anticorps Exendin-4 et lysozyme. Ces systèmes montrent également une association macroscopique sous forme d'hydrogels en présence de sel, ce qui permet la libération des protéines encapsulées. Les structures formées demeurent liquides et injectables, conférant au système une application pour la délivrance prolongée de protéines.

Cette même équipe avait initialement investi les propriétés d'auto-assemblage du pullulane modifié par des groupements cholestéryl en présence d'insuline²²⁵.

Des recherches similaires ont été conduites sur d'autres polysaccharides de mannan-alkylé C16²²⁶, ou du chitosan modifié par des groupements glycol et 3-diéthylaminopropyl²²⁷. Enfin, une étude menée par Ruth Gref *et al.* relate la préparation de nanogels de dextran auto-assemblé par association en milieux aqueux entre le dextran, modifié par des chaînes lauryl, et de la cyclodextrine (Figure 1.30 3)²²⁷. Des nanogels de taille variable entre 120-150 nm ont été obtenus par variation du ratio dextran-lauryl/cyclodextrine. Les nanogels formés ont montré une bonne stabilité intrinsèque sur de longues périodes.

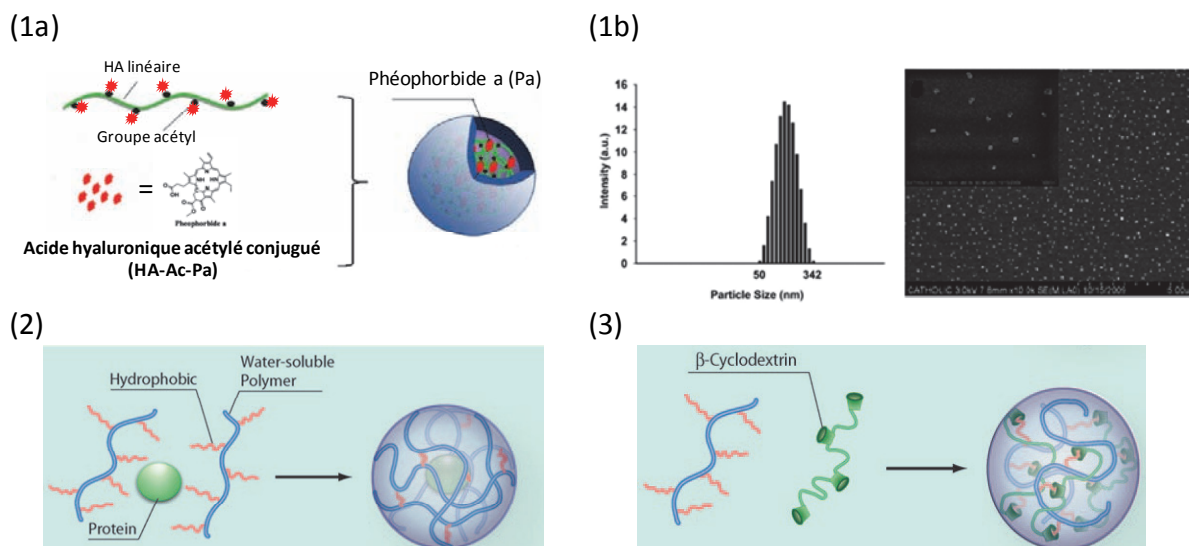


Figure 1.30 : Auto-assemblage de polysaccharides rendus amphiphiles. (1a) Représentation schématique de la préparation de nanogels auto-assemblés à partir de HA modifié par des groupements acétyle conjugués par du phéophorbide a. (1b) Le diamètre hydrodynamique et la morphologie des structures formées ont été déterminés par DLS et FE-SEM²²². L'auto-assemblage peut résulter aussi de l'association entre le précurseur amphiphile et une protéine (2) ou de l'association entre deux précurseurs par un mécanisme hôte-invité (3).

III.3.2.3. Le micromoulage, la photolithographie

Le micromoulage et la photolithographie permettent de préparer des hydrogels et des microgels aux formes variées à partir de précurseurs synthétiques ou naturels. Les réseaux peuvent être formés par réticulation covalente, physique, ou par photopolymérisation. En général, du poly(diméthylsiloxane) (PDMS) est utilisé comme empreinte ayant différentes formes. Les précurseurs sont ensuite moulés dans ces empreintes. Comme illustré en Figure 1.31 (b), la préparation d'hydrogels ou de microgels par micromoulage ou photolithographie a suscité l'intérêt des chercheurs pour l'originalité des formes qu'il est possible de préparer (se référer aux revues récentes parues dans le domaine)^{228, 229}. A titre d'exemple, des microgels d'acide hyaluronique, de taille et forme contrôlées, ont été fabriqués par micromoulage et utilisés pour encapsuler des cellules²³⁰. Le précurseur de HA-MA en présence de cellules a été moulé sur un support en PDMS (Figure 1.31 (a), étapes A-B), puis réticulé sous UV (Figure 1.31 (a), étape C). Après isolation des microgels du support, les cellules encapsulées se sont avérées viables.

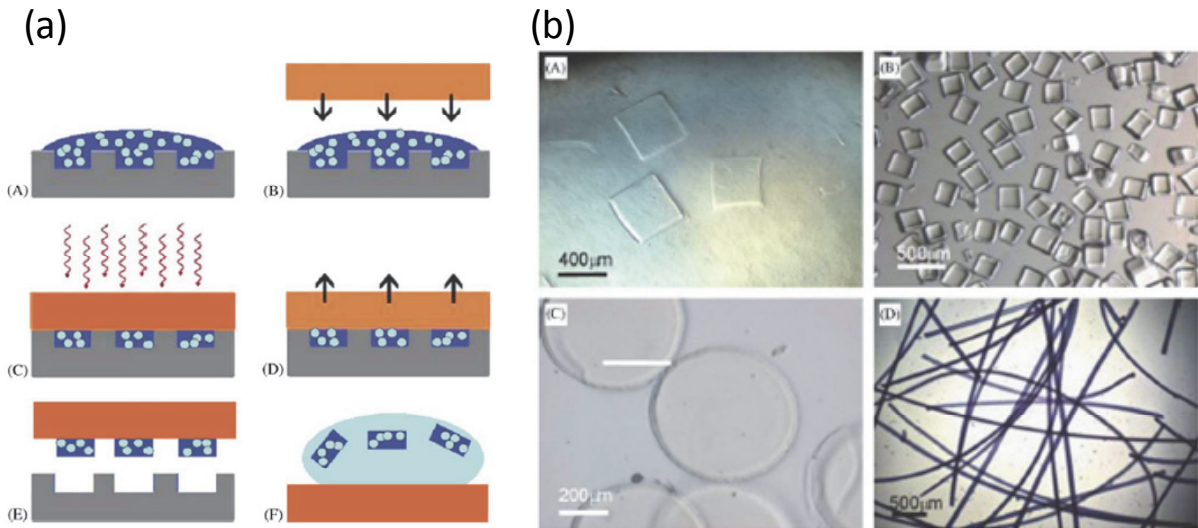


Figure 1.31 : (a) Fabrication de microgels de HA par micromoulage pour l'encapsulation cellulaire. Les cellules sont suspendues dans une solution de HA modifié par des méthacrylates. Le mélange est ensuite micromoulé puis photopolymérisé. Enfin, les micro-objets (taille=200μm) sont isolés des empreintes et utilisés comme support de croissance cellulaire. (b) Diversité des formes fabriquées par micromoulage.

Cependant, ces techniques souffrent de deux limitations dans le contexte de notre projet :

- elles nécessitent l'utilisation d'empreintes lithographiques ou de moules qui peuvent se révéler coûteux.
- la gamme de taille des objets préparés dépasse le micromètre dans la plupart des cas.

III.3.3. Conclusion intermédiaire

Comme résumé en Tableau 1.3, ce bilan dresse l'étendue des techniques applicables pour la préparation de nano/microgels de biopolymères et démontrent la diversité des combinaisons précurseur/réticulation/méthodes de préparation.

Tableau 1.3 : Bilan : fabrication de nanogels à partir de précurseurs hydrophiles.

Méthode	Sous Classification	Précurseur	Réticulant	Moyen de réticulation	Taille nanogels	Applications	Réf(s)
Polymérisation en milieu hétérogène		HA-ADH	HA-ALD	chimique	10 µm	Régénération corde vocale ou encapsulation ADN plasmide	169, 170
		HA-GMA	GMA	Amorçage thermique	300 nm	Etudes rhéologiques	171
		Dextran-MA	MA ou HEMA	Photopolymérisation	180-260 nm	Sensibles au pH (dégradation) ; encapsulation si-RNA	174
	Emulsion inverse (Ultrasons)	AAm	Dex-MA	Amorçage thermique ou redox	200 nm	Dégradation dextranase	176, 177
		OEDMA	-SH	ATRP	145-260 nm	Encapsulation RITC-dex, dégradation DTT ou GSH, internalisation cellules	183-186
		AAm/DMAEMA	Vinylique/-SH	RAFT	200 nm	/	187, 188
		PEG	-SH	Réaction redox	230-350 nm	Etudes de cytotoxicité	189
		Glycérol/ dérivé acide lactique	-SH	ROP ou thiol-ène	50-170	Etudes dégradation	190, 192
		Dextran-MA	HEMA	Photopolymérisation	10 µm	Microgels biodégradables	163
	Emulsion inverse (microfluidique)	Alginate	Ca ₂	Ionique=Complexation Ca ²⁺	70 µm	Encapsulation billes de PS	162
		Chitosan	Glutaraldéhyde	Chimique	40-300 µm	Encapsulation actifs	167
		Alginate	Ca ₂	Ionique	100 nm	/	173
	Emulsion inverse : (PIT)	Dextran-GMA	GMA	Photopolymérisation	1-1.75 µm	Estimation taille pores ; études de dégradation	198
		NIPAM	vinylique	Photopolymérisation	1 µm (+ micelles)	/	199
		Dextran-HEMA	HEMA	Photopolymérisation	450 nm	Internalisation cellules (épithélium du rein) ; études dégradation	200, 201

Méthode	Sous Classification	Précurseur	Réticulant	Moyen de réticulation	Taille nanogels	Applications	Réf(s)
Polymérisation en milieu hétérogène	Liposomes	AAm	BIS	Photopolymérisation	1 µm (+ micelles)	/	202
		HA	Pa-Py (peptide)	Couplage peptidique	200-285 nm	Etudes de dégradation Encapsulation et délivrance 5-fluorouracil	203
	Microémulsion inverse	HA-SH	-SH	Réaction redox	150 nm	Encapsulation particules Fe ou Si ; doubles réseaux	130
		HA	DVS/GMA	vinylique	900 nm ou plus	Encapsulation particules Fe ou Si ; doubles réseaux ; estimation taille de pores	204, 206, 209, 210
		Cellulose/ Alginate/chitosan	/	/	> 1µm	/	
		AETMAC/HEA	PEGDA	Amorçage thermique	50-100 nm	Délivrance oligonucléotides	214
		CBMA	BIS	Amorçage thermique	110-120 nm	Interactions cellules avec/sans cyclo-RGD	219
		HA-acétyl	/	/	125 nm	Encapsulation anticancéreux + protéines	222
		HA-cholestéryl ou pulullan-cholestéryl	/	/	20-70 nm	Association protéines	224, 225
		Mannan-alkyl _{C16} Dextran-lauryl	/	/	100-500 nm 120-150 nm	/	226 227
Micromoulage/lithographie	HA-MA	MA/PEGDA	Photopolymérisation	> 10 µm	Encapsulation de cellules	230	

Abréviations : ALD : aldéhyde; ADH : adipique hydrazide; GMA : glycidyl méthacrylate; HEMA : hydroxyéthyl méthacrylate; MA : méthacrylate; BIS : bisacrylamide; PEGDA : PEG diacrylate; -SH : thiol ; AAm : acrylamide ; OEDMA : oligo(éthylène glycol) de monoéthyl éther méthacrylate; DMAEMA ; AETMAC : chlorure de 2-acryloxyéthyltriméthylammonium; HEA : hydroéthyl acrylate ; CBMA : carboxybétaine méthacrylate; DVS : divinylsulfone ; DTT : dithioréitol ; GSH : glutathion

IV. Projet MEDICIN

Ce travail de thèse s'inscrit dans le projet MEDICIN, financé par l'Agence nationale de la Recherche. Ce projet résulte de la collaboration de plusieurs unités, listées ci-dessous avec le(s) responsable(s) associé(s):

- **L'Institut des Sciences Moléculaires (ISM, T2)**, au sein duquel ce travail de thèse est effectué; Valérie Ravaine
- **Le Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV, T1)**; Rachel Auzély-Velty
- **Le Laboratoire de Pharmacocinétique (Bordeaux 2, T3)**; Bogdan Catargi
- **Sanofi-Aventis, T4**; Gudrun Wildegger et Bernd Rosenstock

La Figure 1.32 illustre les objectifs scientifiques de chaque partenaire.

Comme représenté dans la bulle bleue, le but de cette thèse est d'élaborer des nanogels sensibles au glucose à partir d'un précurseur biocompatible et biodégradable, l'acide hyaluronique en s'inspirant des connaissances listées dans ce chapitre :

- sur les systèmes sensibles au glucose, en particulier sur les microgels synthétiques sensibles au glucose (Thèse Christophe Ancla, 2007-2010).
- sur la préparation des nano/microgels de polysaccharide par polymérisation en milieu hétérogène.

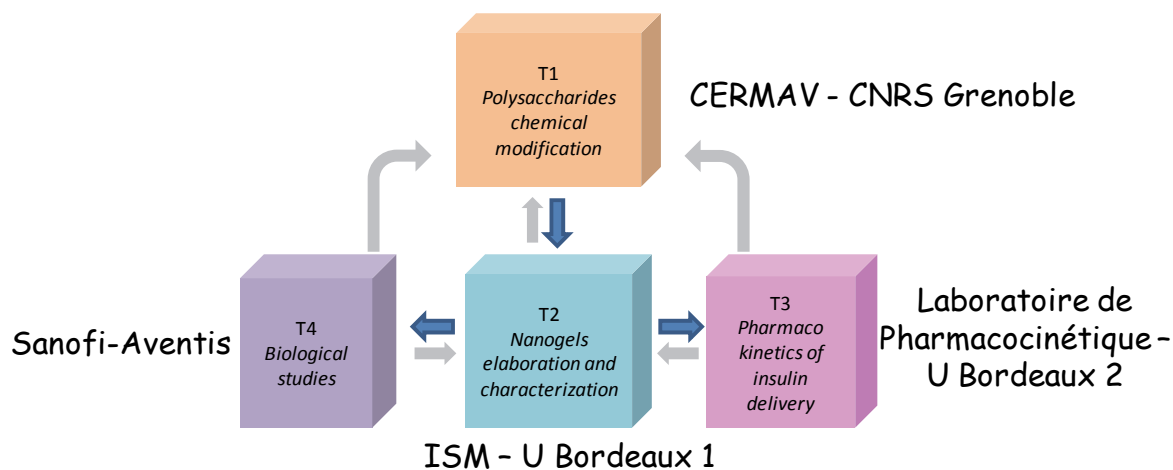


Figure 1.32 : Liste des partenaires du projet et tâches associées.

A Bordeaux nous avons divisé notre problématique en plusieurs sous problématiques :

Question1 : comment préparer des nanogels d'acide hyaluronique de taille et porosité contrôlée ?

Question 2 : Comment leur conférer une sensibilité au glucose ?

Question 3: Quelles sont les perspectives de ces vecteurs pour l'encapsulation d'insuline ?

Ces trois questions seront discutées successivement dans les chapitres 2, 3 et 4.

Références:

1. Almdal, K.; Dyre, J.; Hvidt, S.; Kramer, O., Towards a phenomenological definition of the term 'gel'. *Polymer Gels and Networks* **1993**, 1, (1), 5.
2. Hoare, T. R.; Kohane, D. S., Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* **2008**, 49, (8), 1993.
3. Vermonden, T.; Censi, R.; Hennink, W. E., Hydrogels for protein delivery. *Chemical Reviews* **2012**, 112, (5), 2853.
4. Wang, C.; Stewart, R. J.; Kopecek, J., Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains. *Nature* **1999**, 397, (6718), 417-420.
5. Petka, W. A.; Harden, J. L.; McGrath, K. P.; Wirtz, D.; Tirrell, D. A., Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins. *Science* **1998**, 281, (5375), 389-392.
6. Hennink, W. E.; Van Nostrum, C. F., Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (1), 13.
7. Kavanagh, G. M.; Ross-Murphy, S. B., Rheological characterisation of polymer gels. *Progress in Polymer Science* **1998**, 23, (3), 533.
8. Dusek, K., *Responsive Gels: Volume Transitions*. *Advances in Polymer Science* **1993**, 109-110.
9. Tanaka, T.; Fillmore, D.; Sun, S. T.; Nishio, I.; Swislow, G.; Shah, A., Phase Transitions in Ionic Gels. *Physical Review Letters* **1980**, 45, (20), 1636.
10. Tanaka, T.; Nishio, I.; Sun, S. T.; Ueno-Nishio, S., Collapse of gels in an electric field. *Science* **1982**, 218, (4571), 467.
11. Filipcsei, G.; Fehér, J.; Zrínyi, M., Electric field sensitive neutral polymer gels. *Journal of Molecular Structure* **2000**, 554, (1), 109.
12. Miyata, T.; Uragami, T.; Nakamae, K., Biomolecule-sensitive hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (1), 79.
13. Flory, P. J., *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. **1969**.
14. Rubinstein, M.; Colby, R. H., *Polymer Physics* **2003**.
15. Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R., Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials* **2006**, 18, (11), 1345.
16. Langer, R.; Peppas, N. A., *AICHE J.* **2003**, 49, 2990.
17. Siegel, R. A., Hydrophobic weak polyelectrolyte gels: Studies of swelling equilibria and kinetics. *Advances in Polymer Science* **1993**, 109, 233-267.
18. Katchalsky, A.; Michaeli, I., Polyelectrolyte gels in salt solutions. *Journal of Polymer Science* **1955**, 15, (79), 69.
19. Oh, J. K.; Lee, D. I.; Park, J. M., Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress In Polymer Science* **2009**, 34, (12), 1261-1282.
20. Tanaka, T.; Fillmore, D. J., Kinetics Of Swelling Of Gels. *Journal Of Chemical Physics* **1979**, 70, (3), 1214-1218.
21. Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H., Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care* **2004**, 27, (5), 1047-1053.
22. Stumvoll, M.; Goldstein, B. J.; van Haefen, T. W., Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet* **2005**, 365, (9467), 1333-1346.
23. Kahn, C. R., Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* **1994**, 43, (8), 1066-1084.
24. 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), 297-303.
25. Lacy, P. E., TREATING DIABETES WITH TRANSPLANTED CELLS. *Scientific American* **1995**, 273, (1), 50-&.
26. Soon-Shiong, P., Treatment of type I diabetes using encapsulated islets. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, 35, (2-3), 259-270.
27. Opara, E. C.; Kendall, W. F., Immunoisolation techniques for islet cell transplantation. *Expert Opinion on Biological Therapy* **2002**, 2, (5), 503-511.

28. Klonoff, D. C., Continuous Glucose Monitoring. *Diabetes Care* **2005**, 28, (5), 1231-1239.
29. Hovorka, R., Continuous glucose monitoring and closed-loop systems. *Diabetic Medicine* **2006**, 23, (1), 1-12.
30. Renard, E.; Place, J.; Cantwell, M.; Chevassus, H.; Palerm, C. C., Closed-Loop Insulin Delivery Using a Subcutaneous Glucose Sensor and Intraperitoneal Insulin Delivery Feasibility study testing a new model for the artificial pancreas. *Diabetes Care* **2010**, 33, (1), 121-127.
31. Hovorka, R.; Acerini, C. L.; Allen, J. M.; Chassin, L. J.; Kollman, C.; Elleri, D.; Harris, J.; Hovorka, T.; Larsen, A. M. F.; Nodale, M.; De Palma, A.; Wilinska, M. E.; Xing, D. Y.; Dunger, D. B., Overnight Closed-Loop (CL) Insulin Delivery in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes (T1D): Towards Home Testing. *Diabetes* **2009**, 58, A54.
32. Hovorka, R.; Allen, J. M.; Elleri, D.; Chassin, L. J.; Harris, J.; Xing, D.; Kollman, C.; Hovorka, T.; Larsen, A. M. F.; Nodale, M.; De Palma, A.; Wilinska, M. E.; Acerini, C. L.; Dunger, D. B., Manual closed-loop insulin delivery in children and adolescents with type 1 diabetes: a phase 2 randomised crossover trial. *The Lancet* **2010**, 375, (9716), 743-751.
33. Breton, M.; Farret, A.; Bruttomesso, D.; Anderson, S.; Magni, L.; Patek, S.; Man, C. D.; Place, J.; Demartini, S.; Del Favero, S.; Toffanin, C.; Hughes-Karvetski, C.; Dassau, E.; Zisser, H.; Doyle, F. J.; De Nicolao, G.; Avogaro, A.; Cobelli, C.; Renard, E.; Kovatchev, B., Fully Integrated Artificial Pancreas in Type 1 Diabetes: Modular Closed-Loop Glucose Control Maintains Near Normoglycemia. *Diabetes* **2012**, 61, (9), 2230-2237.
34. Renard, E., Closed-loop insulin delivery: is the holy grail near? *The Lancet* **2010**, 375, (9716), 702-703.
35. Hovorka, R., Closed-loop insulin delivery: from bench to clinical practice. *Nature Reviews Endocrinology* **2011**, 7, (7), 385-395.
36. Benhamou, P. Y.; Catargi, B.; Delenne, B.; Guerci, B.; Hanaire, H.; Jeandidier, N.; Leroy, R.; Meyer, L.; Penfomis, A.; Radermecker, R. P.; Renard, E.; Baillot-Rudoni, S.; Riveline, J. P.; Schaepelynck, P.; Sola-Gazagnes, A.; Sulmont, V.; Tubiana-Rufi, N.; Durain, D.; Mantovani, I., Real-time continuous glucose monitoring (CGM) integrated into the treatment of type 1 diabetes: Consensus of experts from SFD, EVADIAC and SFE. *Diabetes & Metabolism* **2012**, 38, S67-S83.
37. Saunders, B. R., On the structure of poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles. *Langmuir* **2004**, 20, (10), 3925.
38. Wu, Q.; Wang, L.; Yu, H.; Wang, J.; Chen, Z., Organization of Glucose-Responsive Systems and Their Properties. *Chemical Reviews* **2011**, 111, (12), 7855.
39. Ravaine, V.; Ancla, C.; Catargi, B., Chemically controlled closed-loop insulin delivery. *Journal of Controlled Release* **2008**, 132, (1), 2.
40. Cambre, J. N.; Sumerlin, B. S., Biomedical applications of boronic acid polymers. *Polymer* **2011**, 52, (21), 4631-4643.
41. Holtz, J. H.; Asher, S. A., Polymerized colloidal crystal hydrogel films as intelligent chemical sensing materials. *Nature* **1997**, 389, (6653), 829-832.
42. Steiner, M. S.; Duerkop, A.; Wolfbeis, O. S., Optical methods for sensing glucose. *Chemical Society Reviews* **2011**, 40, (9), 4805-4839.
43. Matsumoto, A.; Ishii, T.; Nishida, J.; Matsumoto, H.; Kataoka, K.; Miyahara, Y., A Synthetic Approach Toward a Self-Regulated Insulin Delivery System. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51, (9), 2124.
44. Ishihara, K.; Kobayashi, M.; Ishimaru, N.; Shinohara, I., Glucose Induced Permeation Control of Insulin through a Complex Membrane Consisting of Immobilized Glucose Oxidase and a Poly(amine). *Polymer Journal* **1984**, 16, (8), 625.
45. Klumb, L. A.; Horbett, T. A., Design of insulin delivery devices based on glucose sensitive membranes. *Journal of Controlled Release* **1992**, 18, (1), 59.
46. Traitel, T.; Cohen, Y.; Kost, J., Characterization of glucose-sensitive insulin release systems in simulated in vivo conditions. *Biomaterials* **2000**, 21, (16), 1679.
47. 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.

48. 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.
49. 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.
50. Zhang, K.; Wu, X. Y., Modulated insulin permeation across a glucose-sensitive polymeric composite membrane. *Journal of Controlled Release* **2002**, 80, 169.
51. Gordijo, C. R.; Koulajian, K.; Shuhendler, A. J.; Bonifacio, L. D.; Huang, H. Y.; Chiang, S.; Ozin, G. A.; Giacca, A.; Wu, X. Y., Nanotechnology-enabled closed loop insulin delivery device: In vitro and in vivo evaluation of glucose-regulated insulin release for diabetes control. *Advanced Functional Materials* **2011**, 21, (1), 73.
52. Chu, M. K. L.; Chen, J.; Gordijo, C. R.; Chiang, S.; Ivovic, A.; Koulajian, K.; Giacca, A.; Wu, X. Y.; Sun, Y., In vitro and in vivo testing of glucose-responsive insulin-delivery microdevices in diabetic rats. *Lab On A Chip* **2012**, 12, (14), 2533-2539.
53. 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.
54. 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.
55. 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), 1085-1098.
56. 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 & Functional Polymers* **2006**, 66, (7), 757-767.
57. Yin, R.; Han, J.; Zhang, J.; Nie, J., Glucose-responsive composite microparticles based on chitosan, concanavalin A and dextran for insulin delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, 76, (2), 483.
58. Yin, R.; Tong, Z.; Yang, D.; Nie, J., Glucose and pH dual-responsive concanavalin A based microhydrogels for insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2011**, 49, (5), 1137.
59. Miyake, K.; Tanaka, T.; McNeil, P. L., Lectin-Based Food Poisoning: A New Mechanism of Protein Toxicity. *PLoS ONE* **2007**, 2, (8), e687.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Kuivila, H. G.; Keough, A. H.; Soboczanski, E. J., Areneboronates from diols and polyols¹. *The Journal of Organic Chemistry* **1954**, 19, (5), 780.
64. Springsteen, G.; Wang, B., A detailed examination of boronic acid-diol complexation. *Tetrahedron* **2002**, 58, (26), 5291.
65. Lorand, J. P.; Edwards, J. O., Polyol Complexes and Structure of the Benzeneboronate Ion. *The Journal of Organic Chemistry* **1959**, 24, (6), 769.
66. Van Duin, M.; Peters, J. A.; Kieboom, A. P. G.; Van Bekkum, H., Studies on borate esters 1: The ph dependence of the stability of esters of boric acid and borate in aqueous medium as studied by ¹¹B NMR. *Tetrahedron* **1984**, 40, (15), 2901.
67. Palit, D. K.; Pal, H.; Mukherjee, T.; Mittal, J. P., Photodynamics of the S1 state of some hydroxy- and amino-substituted naphthoquinones and anthraquinones. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1990**, 86, (23), 3861.

68. 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), 3322-3329.
69. 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.
70. 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)-phenylboronic acid] in Physiological Saline. *Macromolecules* **1994**, 27, (4), 1061.
71. Shiino, D.; Murata, Y.; Kataoka, K.; Koyama, Y.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y., Preparation and characterization of a glucose-responsive insulin-releasing polymer device. *Biomaterials* **1994**, 15, (2), 121.
72. 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.
73. 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.
74. Kondo, K.; Shiomi, Y.; Saisho, M.; Harada, T.; Shinkai, S., Specific complexation of disaccharides with diphenyl-3,3'-diboronic acid that can be detected by circular dichroism. *Tetrahedron* **1992**, 48, (38), 8239.
75. Norrild, J. C.; Eggert, H., Evidence for Mono- and Bidentate Boronate Complexes of Glucose in the Furanose Form. Application of ¹JC-C Coupling Constants as a Structural Probe. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, (5), 1479.
76. 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), 2316-2323.
77. 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* **2010**, 46, (13), 2203-2205.
78. 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.
79. 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.
80. Zhang, Y.; Guan, Y.; Zhou, S., Synthesis and Volume Phase Transitions of Glucose-Sensitive Microgels. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (11), 3196.
81. Hoare, T.; Pelton, R., Engineering Glucose Swelling Responses in Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Microgels. *Macromolecules* **2007**, 40, (3), 670.
82. Wu, W.; Mitra, N.; Yan, E. C. Y.; Zhou, S., Multifunctional Hybrid Nanogel for Integration of Optical Glucose Sensing and Self-Regulated Insulin Release at Physiological pH. *ACS Nano* **2010**, 4, (8), 4831.
83. Wu, W. T.; Shen, J.; Li, Y. X.; Zhu, H. B.; Banerjee, P.; Zhou, S. Q., Specific glucose-to-SPR signal transduction at physiological pH by molecularly imprinted responsive hybrid microgels. *Biomaterials* **2012**, 33, (29), 7115-7125.
84. Lapeyre, V.; Gosse, I.; Chevreux, S.; Ravaine, V., Monodispersed Glucose-Responsive Microgels Operating at Physiological Salinity. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (12), 3356.
85. Ancla, C., Microgels sensibles au glucose pour la délivrance d'insuline. *Thèse Université Bordeaux I* **2010**.
86. Ancla, C.; Lapeyre, V.; Gosse, I.; Catargi, B.; Ravaine, V., Designed glucose-responsive microgels with selective shrinking behavior. *Langmuir* **2011**, 27, (20), 12693.
87. 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.

88. Lapeyre, V.; Renaudie, N.; Dechezelles, J.-F. o.; Saadaoui, H.; Ravaine, S.; Ravaine, V., Multiresponsive Hybrid Microgels and Hollow Capsules with a Layered Structure. *Langmuir* **2009**, 25, (8), 4659.
89. Ding, Z.; Guan, Y.; Zhang, Y.; Zhu, X. X., Layer-by-layer multilayer films linked with reversible boronate ester bonds with glucose-sensitivity under physiological conditions. *Soft Matter* **2009**, 5, (11).
90. 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.
91. 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).
92. Yao, Y.; Wang, X. M.; Tan, T. W.; Yang, J., A facile strategy for polymers to achieve glucose-responsive behavior at neutral pH. *Soft Matter* **2011**, 7, (18), 7948-7951.
93. De Geest, B. G.; Jonas, A. M.; Demeester, J.; De Smedt, S. C., Glucose-responsive polyelectrolyte capsules. *Langmuir* **2006**, 22, (11), 5070-5074.
94. Levy, T.; Déjugnat, C.; Sukhorukov, G. B., Polymer Microcapsules with Carbohydrate-Sensitive Properties. *Advanced Functional Materials* **2008**, 18, (10), 1586.
95. Yao, Y.; Zhao, L. Y.; Yang, J. J.; Yang, J., Glucose-Responsive Vehicles Containing Phenylborate Ester for Controlled Insulin Release at Neutral pH. *Biomacromolecules* **2012**, 13, (6), 1837-1844.
96. 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.
97. Hoeg-Jensen, T.; Ridderberg, S.; Havelund, S.; Schäffer, L.; Balschmidt, P.; Jonassen, I.; Vedsø, P.; H. Olesen, P.; Markussen, J., Insulins with built-in glucose sensors for glucose responsive insulin release. *Journal of Peptide Science* **2005**, 11, (6), 339-346.
98. Oussoren, C.; Storm, G., Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 50, (1-2), 143-156.
99. Wu, Z. M.; Zhang, S. M.; Zhang, X. G.; Shu, S. J.; Chu, T. C.; Yu, D. M., Phenylboronic Acid Grafted Chitosan as a Glucose-Sensitive Vehicle for Controlled Insulin Release. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* **2011**, 100, (6), 2278-2286.
100. Yang, J.-A.; Kim, H.; Park, K.; Hahn, S. K., Molecular design of hyaluronic acid hydrogel networks for long-term controlled delivery of human growth hormone. *Soft Matter* **2011**, 7, (3), 868.
101. Menzel, E. J.; Farr, C., Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: Biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Letters* **1998**, 131, (1), 3.
102. Meyer, K.; Palmer, J. W., The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *Journal of Biological Chemistry* **1934**, 107, (3), 629-634.
103. Weissmann, B.; Meyer, K., Structure of hyaluronic acid. The glucuronic linkage. *Journal of the American Chemical Society* **1952**, 74, (18), 4729.
104. Meyer, K., Chemical structure of hyaluronic acid. *Federation proceedings* **1958**, 17, (4), 1075.
105. Jeanloz, R. W.; Flowers, H. M., The Isolation and Synthesis of the Methyl Ester-Methyl α -Glycoside of 3-O- β -D-Glucuronosyl-N-Acetyl-D -Glucosamine (Hyalobiuronic Acid). *Journal of the American Chemical Society* **1962**, 84, (15), 3030.
106. Fraser, J. R. E.; Laurent, T. C.; Laurent, U. B. G., Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine* **1997**, 242, (1), 27.
107. Peach, R. J.; Hollenbaugh, D.; Stamenkovic, I.; Aruffo, A., Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *Journal of Cell Biology* **1993**, 122, (1), 257.
108. Xu, X.; Jha, A. K.; Harrington, D. A.; Farach-Carson, M. C.; Jia, X., Hyaluronic acid-based hydrogels: From a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter* **2012**, 8, (12), 3280.
109. Prehm, P., Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Characterization of the synthase. *Biochemical Journal* **1983**, 211, (1), 181.
110. Prehm, P., Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Mechanism of chain growth. *Biochemical Journal* **1983**, 211, (1), 191.
111. Prehm, P., Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochemical Journal* **1984**, 220, (2), 597.

112. Lapcik, L.; Lapcik, L.; De Smedt, S.; Demeester, J.; Chabreček, P., Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. *Chemical Reviews* **1998**, 98, (8), X1.
113. O'Regan, M.; Martini, I.; Crescenzi, F.; De Luca, C.; Lansing, M., Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* **1994**, 16, (6), 283.
114. Garg, H. G.; Hales, C. A., *Chemistry and biology of hyaluronan*. Elsevier Science: NL, 2004.
115. Prestwich, G. D., Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *Journal of Controlled Release* **2011**, 155, (2), 193.
116. Schanté, C. E.; Zuber, G.; Herlin, C.; Vandamme, T. F., Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 85, (3), 469.
117. Segura, T.; Anderson, B. C.; Chung, P. H.; Webber, R. E.; Shull, K. R.; Shea, L. D., Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: A strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* **2005**, 26, (4), 359.
118. Hahn, S. K.; Jelacic, S.; Maier, R. V.; Stayton, P. S.; Hoffman, A. S., Anti-inflammatory drug delivery from hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2004**, 15, (9), 1111.
119. Tomihata, K.; Ikada, Y., Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *Journal of Biomedical Materials Research* **1997**, 37, (2), 243.
120. Kuo, J. W.; Swann, D. A.; Prestwich, G. D., Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. *Bioconjugate Chemistry* **1991**, 2, (4), 232.
121. Pouyani, T.; Harbison, G. S.; Prestwich, G. D., Novel hydrogels of hyaluronic acid: Synthesis, surface morphology, and solid-state NMR. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, (17), 7515.
122. Bulpitt, P.; Aeschlimann, D., New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research* **1999**, 47, (2), 152.
123. Jia, X.; Colombo, G.; Padera, R.; Langer, R.; Kohane, D. S., Prolongation of sciatic nerve blockade by in situ cross-linked hyaluronic acid. *Biomaterials* **2004**, 25, (19), 4797.
124. Luo, Y.; Kirker, K. R.; Prestwich, G. D., Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: New biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2000**, 69, (1), 169.
125. Ossipov, D. A.; Piskounova, S.; Varghese, O. P.; Hilborn, J., Functionalization of hyaluronic acid with chemoselective groups via a disulfide-based protection strategy for in situ formation of mechanically stable hydrogels. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (9), 2247.
126. Luo, Y.; Kobler, J. B.; Heaton, J. T.; Jia, X.; Zeitel, S. M.; Langer, R., Injectable hyaluronic acid-dextran hydrogels and effects of implantation in ferret vocal fold. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **2010**, 93, (2), 386.
127. Gurski, L. A.; Jha, A. K.; Zhang, C.; Jia, X.; Farach-Carson, M. C., Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. *Biomaterials* **2009**, 30, (30), 6076.
128. Kadi, S.; Cui, D.; Bayma, E.; Boudou, T.; Nicolas, C.; Glinel, K.; Picart, C.; Auzély-Velty, R., Alkylamino hydrazide derivatives of hyaluronic acid: Synthesis, characterization in semidilute aqueous solutions, and assembly into thin multilayer films. *Biomacromolecules* **2009**, 10, (10), 2875.
129. Jha, A. K.; Hule, R. A.; Jiao, T.; Teller, S. S.; Clifton, R. J.; Duncan, R. L.; Pochan, D. J.; Jia, X., Structural analysis and mechanical characterization of hyaluronic acid-based doubly cross-linked networks. *Macromolecules* **2009**, 42, (2), 537.
130. Lee, H.; Mok, H.; Lee, S.; Oh, Y. K.; Park, T. G., Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels. *Journal of Controlled Release* **2007**, 119, (2), 245.
131. Vercruyse, K. P.; Marecak, D. M.; Marecek, J. F.; Prestwich, G. D., Synthesis and in vitro degradation of new polyvalent hydrazide cross-linked hydrogels of hyaluronic acid. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, 8, (5), 686.
132. Vercruyse, K. P.; Prestwich, G. D.; Kuo, J. W., Hyaluronate derivatives in drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **1998**, 15, (5), 513.
133. Shu, X. Z.; Liu, Y. C.; Luo, Y.; Roberts, M. C.; Prestwich, G. D., Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules* **2002**, 3, (6), 1304-1311.

134. Shu, X. Z.; Liu, Y.; Palumbo, F. S.; Luo, Y.; Prestwich, G. D., In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **2004**, *25*, (7-8), 1339.
135. Zhang, J.; Skardal, A.; Prestwich, G. D., Engineered extracellular matrices with cleavable crosslinkers for cell expansion and easy cell recovery. *Biomaterials* **2008**, *29*, (34), 4521.
136. Ghosh, K.; Shu, X. Z.; Mou, R.; Lombardi, J.; Prestwich, G. D.; Rafailovich, M. H.; Clark, R. A. F., Rheological characterization of in situ cross-linkable hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, (5), 2857.
137. Shu, X. Z.; Liu, Y.; Palumbo, F.; Prestwich, G. D., Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: A covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. *Biomaterials* **2003**, *24*, (21), 3825.
138. Hosack, L. W.; Firpo, M. A.; Scott, J. A.; Prestwich, G. D.; Peattie, R. A., Microvascular maturity elicited in tissue treated with cytokine-loaded hyaluronan-based hydrogels. *Biomaterials* **2008**, *29*, (15), 2336.
139. Vanderhooft, J. L.; Alcoutlabi, M.; Magda, J. J.; Prestwich, G. D., Rheological properties of cross-linked hyaluronan-gelatin hydrogels for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience* **2009**, *9*, (1), 20.
140. Liu, Y.; Shu, X. Z.; Gray, S. D.; Prestwich, G. D., Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin sponge: Growth of fibrous tissue in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2004**, *68*, (1), 142.
141. Leach, J. B.; Bivens, K., A.; Patrick, J., Charles, W.; Schmidt, C., E., Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, *82*, (5), 578-589.
142. Jia, X.; Burdick, J. A.; Kobler, J.; Clifton, R. J.; Rosowski, J. J.; Zeitels, S. M.; Langer, R., Synthesis and characterization of in situ cross-linkable hyaluronic acid-based hydrogels with potential application for vocal fold regeneration. *Macromolecules* **2004**, *37*, (9), 3239.
143. Bencherif, S. A.; Srinivasan, A.; Horkay, F.; Hollinger, J. O.; Matyjaszewski, K.; Washburn, N. R., Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials* **2008**, *29*, (12), 1739.
144. Smeds, K. A.; Grinstaff, M. W., Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, *54*, (1), 115.
145. Masters, K. S.; Shah, D. N.; Walker, G.; Leinwand, L. A.; Anseth, K. S., Designing scaffolds for valvular interstitial cells: Cell adhesion and function on naturally derived materials. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2004**, *71*, (1), 172.
146. Hachet, E.; Van Den Berghe, H.; Bayma, E.; Block, M. R.; Auzély-Velty, R., Design of biomimetic cell-interactive substrates using hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, (6), 1818.
147. Sawhney, A. S.; Pathak, C. P.; Hubbell, J. A., Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly(α -hydroxy acid) diacrylate macromers. *Macromolecules* **1993**, *26*, (4), 581.
148. Anseth, K. S.; Metters, A. T.; Bryant, S. J.; Martens, P. J.; Elisseeff, J. H.; Bowman, C. N., In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2002**, *78*, (1-3), 199.
149. Burdick, J. A.; Chung, C.; Jia, X.; Randolph, M. A.; Langer, R., Controlled Degradation and Mechanical Behavior of Photopolymerized Hyaluronic Acid Networks. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, (1), 386.
150. Masters, K. S.; Shah, D. N.; Leinwand, L. A.; Anseth, K. S., Crosslinked hyaluronan scaffolds as a biologically active carrier for valvular interstitial cells. *Biomaterials* **2005**, *26*, (15), 2517.
151. Leach, J. B.; Schmidt, C. E., Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **2005**, *26*, (2), 125.
152. Sahoo, S.; Chung, C.; Khetan, S.; Burdick, J. A., Hydrolytically degradable hyaluronic acid hydrogels with controlled temporal structures. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, (4), 1088.
153. Chung, C.; Beecham, M.; Mauck, R. L.; Burdick, J. A., The influence of degradation characteristics of hyaluronic acid hydrogels on in vitro neocartilage formation by mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **2009**, *30*, (26), 4287.

154. Burdick, J. A.; Prestwich, G. D., Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials* **2011**, 23, (12), H41.
155. Censi, R.; Fieten, P. J.; Di Martino, P.; Hennink, W. E.; Vermonden, T., In-situ forming hydrogels by simultaneous thermal gelling and Michael addition reaction between methacrylate bearing thermosensitive triblock copolymers and thiolated hyaluronan. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* **2010**, 148, (1), e28.
156. Mason, T. G.; Wilking, J. N.; Meleson, K.; Chang, C. B.; Graves, S. M., Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2006**, 18, (41), R635.
157. Antonietti, M.; Landfester, K., Polyreactions in miniemulsions. *Progress in Polymer Science* **2002**, 27, (4), 689.
158. McClements, D. J., Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* **2012**, 8, (6), 1719.
159. Dendukuri, D.; Doyle, P. S., The synthesis and assembly of polymeric microparticles using microfluidics. *Advanced Materials* **2009**, 21, (41), 4071.
160. Tumarkin, E.; Kumacheva, E., Microfluidic generation of microgels from synthetic and natural polymers. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, (8), 2161.
161. Omi, S.; Ma, G. H.; Nagai, M., Membrane emulsification - a versatile tool for the synthesis of polymeric microspheres. *Macromolecular Symposia* **2000**, 151, 319-330.
162. Zhang, H.; Tumarkin, E.; Peerani, R.; Nie, Z.; Sullan, R. M. A.; Walker, G. C.; Kumacheva, E., Microfluidic production of biopolymer microcapsules with controlled morphology. *Journal Of The American Chemical Society* **2006**, 128, (37), 12205-12210.
163. De Geest, B. G.; Urbanski, J. P.; Thorsen, T.; Demeester, J.; De Smedt, S. C., Synthesis of monodisperse biodegradable microgels in microfluidic devices. *Langmuir* **2005**, 21, (23), 10275.
164. Marquis, M.; Renard, D.; Cathala, B., Microfluidic generation and selective degradation of biopolymer-based Janus microbeads. *Biomacromolecules* **2012**, 13, (4), 1197.
165. Nakashima, T.; Shimizu, M.; Kukizaki, M., Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, 45, (1), 47-56.
166. Charcosset, C.; Fessi, H., Membrane emulsification and microchannel emulsification processes. *Reviews In Chemical Engineering* **2005**, 21, (1), 1-32.
167. Wang, L. Y.; Gu, Y. H.; Zhou, Q. Z.; Ma, G. H.; Wan, Y. H.; Su, Z. G., Preparation and characterization of uniform-sized chitosan microspheres containing insulin by membrane emulsification and a two-step solidification process. *Colloids And Surfaces B-Biointerfaces* **2006**, 50, (2), 126-135.
168. Landfester, K.; Willert, M.; Antonietti, M., Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. *Macromolecules* **2000**, 33, (7), 2370.
169. Yun, Y. H.; Goetz, D. J.; Yellen, P.; Chen, W., Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials* **2004**, 25, (1), 147.
170. Jia, X.; Yeo, Y.; Clifton, R. J.; Jiao, T.; Kohane, D. S.; Kobler, J. B.; Zeitels, S. M.; Langer, R., Hyaluronic acid-based microgels and microgel networks for vocal fold regeneration. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (12), 3336.
171. Prata, J. E.; Barth, T. A.; Bencherif, S. A.; Washburn, N. R., Complex fluids based on methacrylated hyaluronic acid. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (3), 769.
172. Jameela, S. R.; Kumary, T. V.; Lal, A. V.; Jayakrishnan, A., Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. *Journal of Controlled Release* **1998**, 52, (1-2), 17.
173. Machado, A. H. E.; Lundberg, D.; Ribeiro, A. n. J.; Veiga, F. J.; Lindman, B. r.; Miguel, M. G.; Olsson, U., Preparation of Calcium Alginate Nanoparticles Using Water-in-Oil (W/O) Nanoemulsions. *Langmuir* **2012**, 28, (9), 4131.
174. Raemdonck, K.; Naeye, B.; Buyens, K.; Vandenbroucke, R. E.; Høgset, A.; Demeester, J.; Smedt, S. C. D., Biodegradable dextran nanogels for RNA interference: Focusing on endosomal escape and intracellular siRNA delivery. *Advanced Functional Materials* **2009**, 19, (9), 1406.
175. Raemdonck, K.; Naeye, B.; Hogset, H.; Demeester, J.; De Smedt, S. C., Biodegradable dextran nanogels as functional carriers for the intracellular delivery of small interfering RNA. *Journal Of Controlled Release* **2010**, 148, (1), E95-E96.

176. Klinger, D.; Aschenbrenner, E. M.; Weiss, C. K.; Landfester, K., Enzymatically degradable nanogels by inverse miniemulsion copolymerization of acrylamide with dextran methacrylates as crosslinkers. *Polymer Chemistry* **2012**, 3, (1), 204.
177. Klinger, D.; Landfester, K., Enzymatic- and light-degradable hybrid nanogels: Crosslinking of polyacrylamide with acrylate-functionalized Dextrans containing photocleavable linkers. *Journal Of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **2012**, 50, (6), 1062-1075.
178. Doherty, E. A. S.; Kan, C. W.; Paegel, B. M.; Yeung, S. H. I.; Cao, S.; Mathies, R. A.; Barron, A. E., Sparsely cross-linked "nanogel" matrixes as fluid, mechanically stabilized polymer networks for high-throughput microchannel DNA sequencing. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (18), 5249.
179. Medeiros, S. F.; Santos, A. M.; Fessi, H.; Elaissari, A., Synthesis of Biocompatible and Thermally Sensitive Poly(N-vinylcaprolactam) Nanogels via Inverse Miniemulsion Polymerization: Effect of the Surfactant Concentration. *Journal Of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **2010**, 48, (18), 3932-3941.
180. Marek, S. R.; Conn, C. A.; Peppas, N. A., Cationic nanogels based on diethylaminoethyl methacrylate. *Polymer* **2010**, 51, (6), 1237.
181. Cao, Z. H.; Wang, Z.; Herrmann, C.; Landfester, K.; Ziener, U., Synthesis of Narrowly Size-Distributed Metal Salt/Poly(HEMA) Hybrid Particles in Inverse Miniemulsion: Versatility and Mechanism. *Langmuir* **2010**, 26, (23), 18008-18015.
182. Cao, Z. H.; Walter, C.; Landfester, K.; Wu, Z. Y.; Ziener, U., Synthesis of Silver/Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Particles via a Combination of Inverse Miniemulsion and Silver Ion Reduction in a "Nanoreactor". *Langmuir* **2011**, 27, (16), 9849-9859.
183. Oh, J. K.; Tang, C. B.; Gao, H. F.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K., Inverse miniemulsion ATRP: A new method for synthesis and functionalization of well-defined water-soluble/cross-linked polymeric particles. *Journal Of The American Chemical Society* **2006**, 128, (16), 5578-5584.
184. Oh, J. K.; Siegwart, D. J.; Lee, H. I.; Sherwood, G.; Peteanu, L.; Hollinger, J. O.; Kataoka, K.; Matyjaszewski, K., Biodegradable nanogels prepared by atom transfer radical polymerization as potential drug delivery carriers: Synthesis, biodegradation, in vitro release, and bioconjugation. *Journal Of The American Chemical Society* **2007**, 129, (18), 5939-5945.
185. Oh, J. K.; Siegwart, D. J.; Matyjaszewski, K., Synthesis and biodegradation of nanogels as delivery carriers for carbohydrate drugs. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (11), 3326-3331.
186. Siegwart, D. J.; Srinivasan, A.; Bencherif, S. A.; Karunanidhi, A.; Oh, J. K.; Vaidya, S.; Jin, R.; Hollinger, J. O.; Matyjaszewski, K., Cellular Uptake of Functional Nanogels Prepared by Inverse Miniemulsion ATRP with Encapsulated Proteins, Carbohydrates, and Gold Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2009**, 10, (8), 2300-2309.
187. Qi, G. G.; Jones, C. W.; Schork, F. J., RAFT inverse miniemulsion polymerization of acrylamide. *Macromolecular Rapid Communications* **2007**, 28, (9), 1010-1016.
188. Oliveira, M. A. M.; Boyer, C.; Nele, M.; Pinto, J. C.; Zetterlund, P. B.; Davis, T. P., Synthesis of Biodegradable Hydrogel Nanoparticles for Bioapplications Using Inverse Miniemulsion RAFT Polymerization. *Macromolecules* **2011**, null.
189. Groll, J.; Singh, S.; Albrecht, K.; Moeller, M., Biocompatible and Degradable Nanogels via Oxidation Reactions of Synthetic Thiomers in Inverse Miniemulsion. *Journal Of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **2009**, 47, (20), 5543-5549.
190. Steinhilber, D.; Sisson, A. L.; Mangoldt, D.; Welker, P.; Licha, K.; Haag, R., Synthesis, reductive cleavage, and cellular interaction studies of biodegradable, polyglycerol nanogels. *Advanced Functional Materials* **2010**, 20, (23), 4133.
191. Zhou, H.; Steinhilber, D.; Schlaad, H.; Sisson, A. L.; Haag, R., Glycerol based polyether-nanogels with tunable properties via acid-catalyzed epoxide-opening in miniemulsion. *Reactive and Functional Polymers* **2011**, 71, (3), 356.
192. Zou, J.; Hew, C. C.; Themistou, E.; Li, Y. K.; Chen, C. K.; Alexandridis, P.; Cheng, C., Clicking Well-Defined Biodegradable Nanoparticles and Nanocapsules by UV-Induced Thiol-Ene Cross-Linking in Transparent Miniemulsions. *Advanced Materials* **2011**, 23, (37), 4274-4277.
193. Ghugare, S. V.; Mozetic, P.; Paradossi, G., Temperature-Sensitive Poly(vinyl alcohol)/Poly(methacrylate-co-N-isopropyl acrylamide) Microgels for Doxorubicin Delivery. *Biomacromolecules* **2009**, 10, (6), 1589.

194. Li, B.-z.; Wang, L.-j.; Li, D.; Adhikari, B.; Mao, Z.-h., Preparation and characterization of crosslinked starch microspheres using a two-stage water-in-water emulsion method. *Carbohydrate Polymers* **2012**, 88, (3), 912.
195. Capron, I.; Costeux, S.; Djabourov, M., Water in water emulsions: phase separation and rheology of biopolymer solutions. *Rheologica Acta* **2001**, 40, (5), 441-456.
196. Stenekes, R. J. H.; Franssen, O.; van Bommel, E. M. G.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E., The preparation of dextran microspheres in an all-aqueous system: Effect of the formulation parameters on particle characteristics. *Pharmaceutical Research* **1998**, 15, (4), 557-561.
197. Franssen, O.; Hennink, W. E., A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents. *International Journal Of Pharmaceutics* **1998**, 168, (1), 1-7.
198. Ghugare, S. V.; Chiessi, E.; Cerroni, B.; Telling, M. T. F.; Sakai, V. G.; Paradossi, G., Biodegradable dextran based microgels: a study on network associated water diffusion and enzymatic degradation. *Soft Matter* **2012**, 8, (8), 2494.
199. Kazakov, S.; Kaholek, M.; Teraoka, I.; Levon, K., UV-induced gelation on nanometer scale using liposome reactor. *Macromolecules* **2002**, 35, (5), 1911.
200. Van Thienen, T. G.; Lucas, B.; Flesch, F. M.; Van Nostrum, C. F.; Demeester, J.; De Smedt, S. C., On the synthesis and characterization of biodegradable dextran nanogels with tunable degradation properties. *Macromolecules* **2005**, 38, (20), 8503.
201. Van Thienen, T. G.; Raemdonck, K.; Demeester, J.; De Smedt, S. C., Protein release from biodegradable dextran nanogels. *Langmuir* **2007**, 23, (19), 9794.
202. Schillemans, J. P.; Flesch, F. M.; Hennink, W. E.; Van Nostrum, C. F., Synthesis of bilayer-coated nanogels by selective cross-linking of monomers inside liposomes. *Macromolecules* **2006**, 39, (17), 5885.
203. Pitarresi, G.; Craparo, E. F.; Palumbo, F. S.; Carlisi, B.; Giammona, G., Composite nanoparticles based on hyaluronic acid chemically cross-linked with alpha,beta-polyaspartylhydrazide. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (6), 1890-1898.
204. Sahiner, N.; Jia, X., One-step synthesis of hyaluronic acid-based (sub)micron hydrogel particles: Process optimization and preliminary characterization. *Turkish Journal of Chemistry* **2008**, 32, (4), 397.
205. Sahiner, N.; Jha, A. K.; Nguyen, D.; Jia, X., Fabrication and characterization of cross-linkable hydrogel particles based on hyaluronic acid: Potential application in vocal fold regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2008**, 19, (2), 223.
206. Ilgin, P.; Avci, G.; Silan, C.; Ekici, S.; Aktas, N.; Ayyala, R. S.; John, V. T.; Sahiner, N., Colloidal drug carries from (sub)micron hyaluronic acid hydrogel particles with tunable properties for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 82, (3), 997.
207. Ekici, S.; Ilgin, P.; Yilmaz, S.; Aktas, N.; Sahiner, N., Temperature and magnetic field responsive hyaluronic acid particles with tunable physical and chemical properties. *Applied Surface Science* **2011**, 257, (7), 2669-2676.
208. Ekici, S.; Ilgin, P.; Butun, S.; Sahiner, N., Hyaluronic acid hydrogel particles with tunable charges as potential drug delivery devices. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 84, (4), 1306.
209. Sahiner, N.; Silan, C.; Sagbas, S.; Ilgin, P.; Butun, S.; Erdugan, H.; Ayyala, R. S., Porous and modified HA particles as potential drug delivery systems. *Microporous and Mesoporous Materials* **2012**, 155, 124.
210. Jha, A. K.; Malik, M. S.; Farach-Carson, M. C.; Duncan, R. L.; Jia, X., Hierarchically structured, hyaluronic acid-based hydrogel matrices via the covalent integration of microgels into macroscopic networks. *Soft Matter* **2010**, 6, (20), 5045.
211. Butun, S.; Ince, F. G.; Erdugan, H.; Sahiner, N., One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86, (2), 636.
212. Yu, Y.; Cui, S. X., Facile Preparation of Chemically Cross-Linked Microgels by Irradiation of Visible Light at Room Temperature. *Langmuir* **2009**, 25, (19), 11272-11275.
213. Zhao, J.; Luo, C.; Chen, Y.; Wu, D.; Shen, C.; Han, W.; Tu, M.; Zeng, R., Preparation, structure and BMP-2 controlled release of heparin-conjugated hyaluronan microgels. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86, (2), 806.

214. McAllister, K.; Sazani, P.; Adam, M.; Cho, M. J.; Rubinstein, M.; Samulski, R. J.; DeSimone, J. M., Polymeric nanogels produced via inverse microemulsion polymerization as potential gene and antisense delivery agents. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (51), 15198.
215. Murthy, N.; Xu, M.; Schuck, S.; Kunisawa, J.; Shastri, N.; Fréchet, J. M. J., A macromolecular delivery vehicle for protein-based vaccines: Acid-degradable protein-loaded microgels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, (9), 4995.
216. Kaneda, I.; Sogabe, A.; Nakajima, H., Water-swallowable polyelectrolyte microgels polymerized in an inverse microemulsion using a nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, 275, (2), 450.
217. Sahiner, N., Hydrogel nanonetworks with functional core-shell structure. *European Polymer Journal* **2007**, 43, (5), 1709.
218. Shi, L.; Khondee, S.; Linz, T. H.; Berkland, C., Poly(N-vinylformamide) nanogels capable of pH-sensitive protein release. *Macromolecules* **2008**, 41, (17), 6546.
219. Cheng, G.; Mi, L.; Cao, Z.; Xue, H.; Yu, Q.; Carr, L.; Jiang, S., Functionalizable and Ultrastable Zwitterionic Nanogels. *Langmuir* **2010**, 26, (10), 6883.
220. Du, J.-Z.; Sun, T.-M.; Song, W.-J.; Wu, J.; Wang, J., A Tumor-Acidity-Activated Charge-Conversional Nanogel as an Intelligent Vehicle for Promoted Tumoral-Cell Uptake and Drug Delivery. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, (21), 3621.
221. Shen, X.; Zhang, L.; Jiang, X.; Hu, Y.; Guo, J., Reversible Surface Switching of Nanogel Triggered by External Stimuli. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46, (37), 7104.
222. Li, F.; Bae, B. C.; Na, K., Acetylated hyaluronic acid/photosensitizer conjugate for the preparation of nanogels with controllable phototoxicity: Synthesis, characterization, autophotoquenching properties, and in vitro phototoxicity against hela cells. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, 21, (7), 1312.
223. Park, W.; Kim, K. S.; Bae, B. C.; Kim, Y. H.; Na, K., Cancer cell specific targeting of nanogels from acetylated hyaluronic acid with low molecular weight. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, 40, (4), 367.
224. Nakai, T.; Hirakura, T.; Sakurai, Y.; Shimoboji, T.; Ishigai, M.; Akiyoshi, K., Injectable Hydrogel for Sustained Protein Release by Salt-Induced Association of Hyaluronic Acid Nanogel. *Macromolecular Bioscience* **2012**, 12, (4), 475.
225. Akiyoshi, K.; Kobayashi, S.; Shichibe, S.; Mix, D.; Baudys, M.; Wan Kim, S.; Sunamoto, J., Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin. *Journal of Controlled Release* **1998**, 54, (3), 313.
226. Ferreira, S. A.; Coutinho, P. J. G.; Gama, F. M., Self-assembled nanogel made of mannan: Synthesis and characterization. *Langmuir* **2010**, 26, (13), 11413.
227. Daoud-Mahammed, S.; Couvreur, P.; Gref, R., Novel self-assembling nanogels: Stability and lyophilisation studies. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 332, (1-2), 185.
228. Helgeson, M. E.; Chapin, S. C.; Doyle, P. S., Hydrogel microparticles from lithographic processes: Novel materials for fundamental and applied colloid science. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2011**, 16, (2), 106.
229. Merkel, T. J.; Herlihy, K. P.; Nunes, J.; Orgel, R. M.; Rolland, J. P.; DeSimone, J. M., Scalable, Shape-Specific, Top-Down Fabrication Methods for the Synthesis of Engineered Colloidal Particles. *Langmuir* **2010**, 26, (16), 13086-13096.
230. Khademhosseini, A.; Eng, G.; Yeh, J.; Fukuda, J.; Blumling Iii, J.; Langer, R.; Burdick, J. A., Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2006**, 79, (3), 522.

Chapitre 2.

Synthèse de nanogels à base d'acide hyaluronique

Introduction au chapitre

Le but de ce chapitre est de mettre au point une méthode générique permettant de préparer des réseaux d'acide hyaluronique de taille nanométrique. Cette méthode pourrait se généraliser à la préparation de nanogels à partir de tout polymère hydrophile, et par la suite du projet, à la fabrication de nanovecteurs sensibles au glucose. Il est primordial de fabriquer ces vecteurs avec une connaissance et un contrôle de leur structure, leur taille et leur comportement en solution.

Nous avons choisi de travailler avec l'acide hyaluronique (HA), polysaccharide linéaire composé d'unités répétitives d'acide D-glucuronique et de *N*-acétyl-D-glucosamine, car il est biocompatible et surtout biodégradable par la l'hyaluronidase, enzyme présente *in vivo*. Cependant, comme nous l'avons invoqué dans le chapitre 1, la formation de réseaux de HA passe par une étape initiale de greffage de fonctions réticulables. Le HA possède plusieurs groupes fonctionnels telles que les fonctions hydroxyles et acides carboxyliques, sur lesquels il est possible d'introduire ces fonctions par des chimies bien connues¹. Par la suite (chapitre 3), les groupes fonctionnels du HA seront également modifiés par les récepteurs au glucose afin de rendre le réseau sensible au glucose, mais dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à l'élaboration contrôlée de nanogels de HA, réticulés chimiquement par polymérisation radicalaire des fonctions méthacrylates en milieu confiné.

I. Stratégie de synthèse des nanogels et concepts de formulation

I.1. Stratégie générale de synthèse

La Figure 2.1 représente la stratégie générale de synthèse pour la fabrication de nanogels de HA. Cette stratégie se divise en deux étapes majeures.

- 1) Modification chimique du HA par des groupes réticulables tels que les méthacrylates.

Nous avons choisi les méthacrylates car cette voie de réticulation permet d'élaborer des réseaux aux propriétés variées, et est utilisée dans de nombreuses études². Les méthacrylates

peuvent être polymérisés par voie radicalaire selon différents types d'amorçage allant de l'amorçage thermique à la photopolymérisation. Il existe deux façons d'introduire ces groupements méthacrylates, par modification soit de l'acide carboxylique soit de(s) hydroxyles. Le greffage des méthacrylates sur le HA (HA-MA) a été étudié par l'équipe de R. Auzély, ce qui a permis d'optimiser cette étape³. Ce savoir-faire a ensuite été transféré à notre équipe.

2) Réticulation chimique en milieu confiné afin d'obtenir un réseau de taille nanométrique.

Comme nous l'avons vu en chapitre 1, deux stratégies majeures peuvent être envisagées pour fabriquer un réseau de taille nanométrique à partir de polysaccharide :

(i) le polysaccharide, préalablement modifié par des groupes hydrophobes, s'auto-assemble en structure micellaire⁴⁻⁶.

(ii) le polysaccharide est confiné dans des nanoréacteurs, qui peuvent être générés par microémulsion inverse⁷, émulsion inverse⁸, émulsion eau-dans-eau⁹ ou par voie liposome¹⁰. Rappelons que, sous la dénomination 'émulsion inverse', il existe plusieurs systèmes, dénommés respectivement macroémulsions, miniémulsions et nanoémulsions. Ces systèmes varient l'un par rapport à l'autre par la taille des nanoréacteurs (rayon des gouttes¹¹), allant de la centaine de microns à la centaine de nanomètres en passant par le micromètre.

Nous avons choisi de confiner le précurseur de HA modifié en utilisant des **mini/nano émulsions inverses** d'une part, pour des critères de taille de gouttes permettant d'obtenir des nanogels et non des macro/microgels, d'autre part pour une généralisation plus facile que :

- l'auto-assemblage. En effet les mini/nano émulsions ne nécessitent pas le caractère amphiphile du HA généré par les groupes hydrophobes, groupes qui pourraient altérer la structure du HA.
- les microémulsions inverses qui reposent sur des critères thermodynamiques de composition.

Ainsi, les miniémulsions présentent l'avantage d'être moins sensibles à des changements de composition ou environnementaux (elles supportent la dilution), et permettent de moduler la taille des nanoréacteurs lors de l'étape de fragmentation.

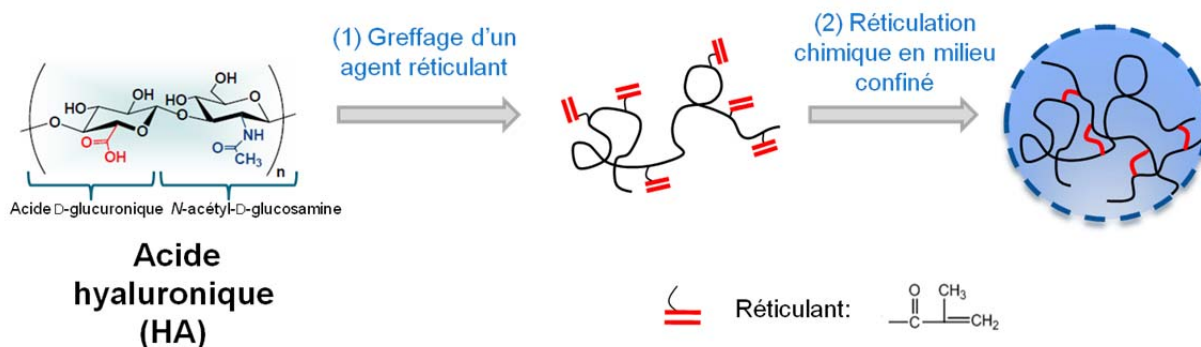


Figure 2.1 : Stratégie de synthèse envisagée pour l'élaboration de nanogels de HA. La première étape consiste à introduire des groupes réticulables par modification chimique du HA. La deuxième étape permet de fabriquer des réseaux de taille nanométrique par confinement du HA modifié.

1.2. Réticulation en milieu confiné

La réticulation chimique en milieu confiné, en utilisant les mini/nano émulsions inverses comme matrice, se subdivise en trois sous étapes jalons, détaillées en Figure 2.2 :

(2a) Le précurseur HA-MA est confiné dans les gouttes d'eau d'une émulsion inverse, en présence d'un amorceur. La phase organique contient l'huile et les tensioactifs.

(2b) Le réseau est ensuite réticulé de façon covalente par polymérisation radicalaire des fonctions méthacrylates au sein des gouttes d'eau. Comme énoncé en introduction, la polymérisation peut être amorcée de plusieurs façons, nous choisirons l'amorçage sous UV (photopolymérisation) car il permet non seulement un bon contrôle spatial et temporel de la réaction, mais aussi des taux de conversion souvent élevés¹². De plus, contrairement à l'amorçage thermique, il s'affranchit du chauffage de l'émulsion, évitant la dégradation du HA-MA par la température.

(2c) Après photopolymérisation, les nanogels sont purifiés de l'huile et des tensioactifs puis redispersés en milieu aqueux.

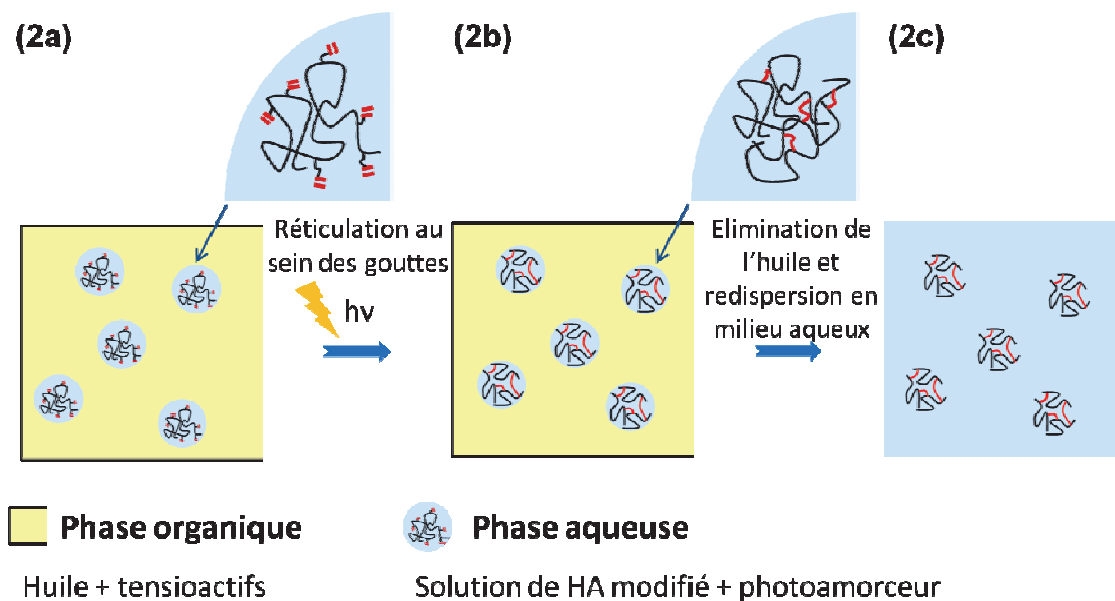


Figure 2.2 : Représentation schématique de la synthèse des nanogels de HA-MA.

- (2a) Confinement de HA-MA dans les gouttes par fabrication de l'émulsion
 (2b) Réticulation au sein des gouttes : photopolymérisation des méthacrylates
 (2c) Récupération des nanogels en milieu aqueux.

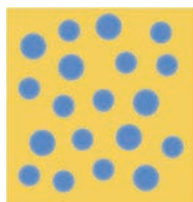
Comme résumé en Tableau 1.3 du chapitre 1, l'élaboration de nanogels de polysaccharide réticulés chimiquement par miniémulsion inverse se résume à 2 études.

- l'étude récente de nanogels de HA réticulés en miniémulsion inverse par des groupements glycidyl méthacrylates⁸.
- l'élaboration de nanogels cationiques de dextrans-MA réticulés par photopolymérisation en miniémulsion inverse¹³.

Cependant, dans ces études, le contrôle de la distribution en taille et de la stabilité des émulsions préparées n'est pas soulevé. Notre objectif étant d'obtenir des nanogels de HA avec une taille et une porosité contrôlée, il est primordial de contrôler la fabrication des nanoréacteurs (stabilité, taille).

1.3. Cahier des charges pour les nanoréacteurs

L'émulsion **inverse** formulée devra respecter les critères suivants afin de produire des nanogels de taille nanométrique avec une distribution en taille la meilleure possible :



- (i) Emulsion **fine** en taille, monodisperse avec un diamètre de gouttes $D < 1\mu\text{m}$
- (ii) Emulsion cinétiquement **stable** à l'échelle de temps du procédé
- (iii) Emulsion **diluée** : fraction volumique Φ , définie comme le ratio du volume de la phase dispersée sur le volume total de l'émulsion, inférieure à 10%, pour éviter d'interconnecter les gouttes lors de photopolymérisation

La finesse de l'émulsion a ici deux objectifs : d'une part, confiner les hydrogels dans des compartiments fixant leur taille finale, mais aussi diminuer la turbidité de l'émulsion. En effet, l'étape de photopolymérisation requiert une transparence du milieu irradié. Or, les émulsions diffusent la lumière. Leur turbidité τ s'écrit selon l'équation suivante : $\tau = KNV^2$, où K est une constante optique qui dépend de la différence d'indice de réfraction entre l'eau et l'huile, N le nombre de gouttes et V le volume de chaque goutte¹⁴. Ainsi, il sera indispensable de chercher à diminuer le volume des gouttes pour minimiser l'impact de la turbidité. Des émulsions transparentes sont généralement obtenues dans le cas des nanoémulsions.

Ainsi, pour bien comprendre les choix adoptés pour la fabrication de ces nanoréacteurs, il convient de rappeler quelques concepts sur la fabrication d'une émulsion.

1.4. Concepts de fabrication d'une émulsion

La fabrication d'une émulsion (inverse ou non) doit tenir compte de différents paramètres. Après avoir listé les différentes instabilités colloïdales que peut subir une émulsion, nous discuterons des paramètres mis en jeu pour maîtriser ces instabilités.

1.4.1. Stabilité des émulsions

Une émulsion est un système métastable résultant d'un mélange de deux phases immiscibles entre elles. Formuler une émulsion consiste à créer de l'interface entre les deux phases, il faut donc fournir une énergie pour créer cette interface. Cette notion se traduit par la tension de surface notée γ_{int} , qui caractérise la variation d'énergie libre associée à une variation de la surface entre les deux milieux.

Une fois formulé, le système demeure néanmoins thermodynamiquement instable et tend à revenir à la séparation de phases¹⁵. Ainsi, les émulsions peuvent évoluer selon divers modes de vieillissement, qui conduisent soit à une distribution inhomogène des gouttes (floculation et pesanteur), soit à une diminution de la quantité d'interface dans le système (coalescence et mûrissement). Ces mécanismes sont résumés sur la Figure 2.3.

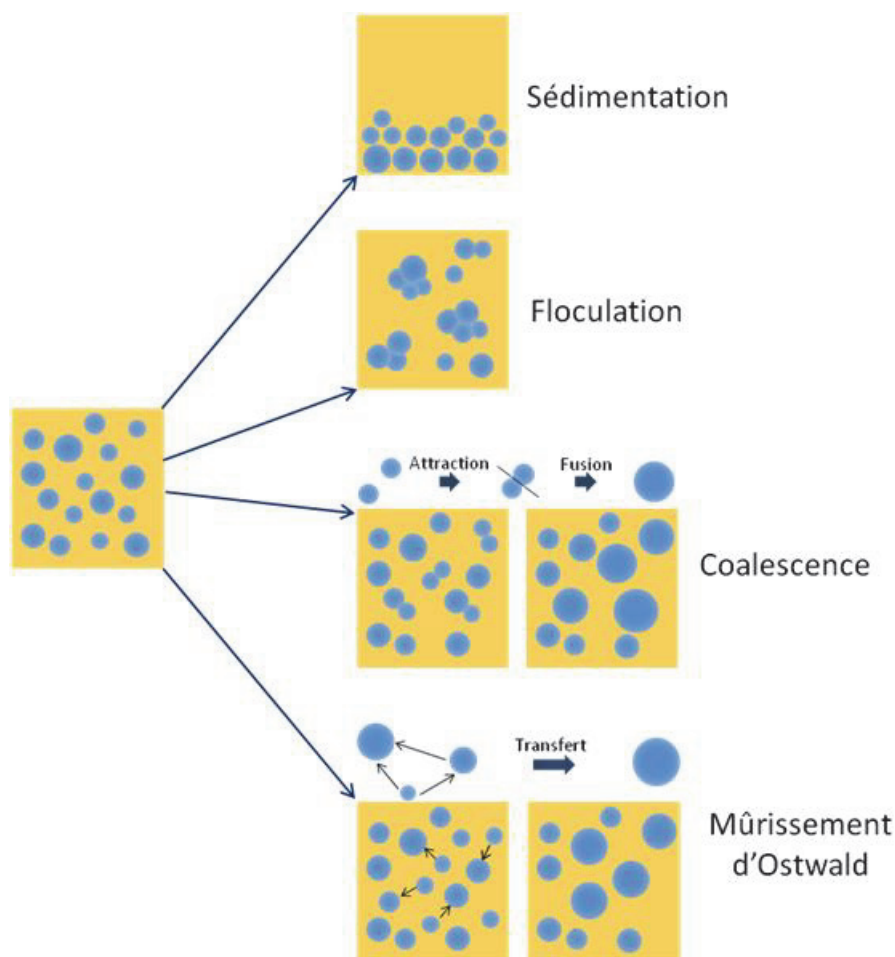


Figure 2.3 : Mécanismes de déstabilisation et de vieillissement d'une émulsion, ici inverse.

- **La sédimentation/crémage** est un mécanisme réversible qui provient de la différence de densité entre la phase dispersée et la phase continue. Les gouttes se déposent au fond du contenant si elles ont une densité supérieure à celle de la phase continue (sédimentation) ou migrent vers le haut dans le cas contraire (crémage).
- **La floculation** résulte des interactions entre les gouttelettes. Ces interactions peuvent être des interactions de Van der Waals (attractives), des interactions électrostatiques ou stériques (répulsives) des interactions par déplétion (attractives). Lorsque la somme des interactions est de nature attractive, il se forme des flocons en suspension dans la phase continue¹⁶.
- **La coalescence** est un phénomène irréversible issu de la rupture du film interfacial entre les gouttes. Deux ou plusieurs gouttes se rapprochent *via* leurs interactions puis fusionnent pour former une goutte de taille plus grande. Le processus se répétant, l'aire interfaciale devient de plus en plus petite et la phase dispersée démixte, conduisant à terme au système diphasique. La coalescence se produit d'autant plus facilement que l'aire de contact entre les gouttes est grande. Elle est donc défavorisée lorsque les gouttes sont de petite taille. En pratique, toutes les émulsions obtenues par simple mélange d'eau et d'huile coalescent immédiatement. Seul l'ajout d'agents de surface (tensioactifs, protéines, polymères ou particules) permet de retarder ce phénomène. Ils sont donc responsables de la stabilité cinétique des émulsions.
- **Le mûrissement. Le mûrissement d'Ostwald**¹⁷ ou diffusion moléculaire des gouttes est un phénomène de vieillissement irréversible. Le mûrissement d'Ostwald est une conséquence de la tension interfaciale γ existant entre deux milieux non miscibles. La différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur d'une goutte sphérique de rayon R , appelée pression de Laplace P_l est égale à $P_l = \frac{2\gamma}{R}$. Or dans une émulsion, la distribution en taille des gouttes n'est pas homogène : la pression de Laplace au sein des gouttes diffère selon leur taille. Ainsi, il existe un flux de matière des petites gouttes vers les grosses au travers de la phase continue résultant de cette différence de pression de Laplace (Figure 2.4). Notons que ce phénomène se produit car il existe une solubilité partielle de la phase dispersée et de la phase continue favorisant le transfert de matière.

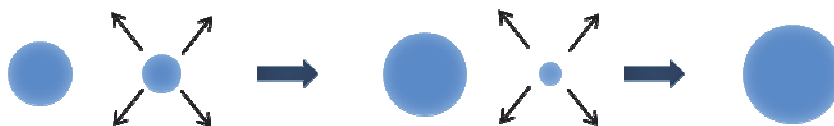


Figure 2.4 : Représentation schématique du mûrissement d'Ostwald.

A l'inverse, lorsqu'une émulsion est constituée de gouttes de compositions différentes, un transfert de matière entre les gouttes peut s'effectuer pour rétablir l'équilibre osmotique. On parle alors de **mûrissement de composition**.

La sédimentation et la floculation sont en général considérées comme des phénomènes d'instabilités cinétiques, conduisant au bout d'un certain temps à la démixtion en deux phases (une phase riche en gouttes, une phase pauvre en gouttes). Cependant, contrairement à la coalescence et au mûrissement d'Ostwald, ces phénomènes ne mettent pas en jeu un mécanisme de destruction des gouttes, caractérisé par une évolution progressive de leur taille. Ainsi, un bon contrôle de la stabilité de l'émulsion consiste à limiter son vieillissement induit par les phénomènes de destruction irréversible de l'émulsion, *i.e.* la coalescence et le mûrissement d'Ostwald.

1.4.2. Enjeux pour la préparation d'une émulsion de taille contrôlée

Pour préparer une émulsion de taille de gouttes contrôlée, et ce de façon reproductible, plusieurs paramètres doivent être pris en compte : d'une part, le procédé d'émulsification doit permettre de contrôler l'étape de fragmentation, d'autre part le diamètre des gouttes ne doit pas évoluer après fabrication.

1.4.2.1 Fragmentation

La fabrication d'une émulsion requiert un apport d'énergie permettant de compenser l'énergie de surface engendrée par l'augmentation de l'interface eau-huile. Ces systèmes étant métastables, le chemin suivi est crucial pour contrôler la taille des gouttes et donc les propriétés de l'émulsion qui en découlent. Plusieurs méthodes de production existent et font généralement l'objet d'une utilisation empirique. Néanmoins, il est possible de s'appuyer sur des connaissances plus fondamentales de l'étape de fragmentation, comme celles établies par Taylor au niveau d'une goutte isolée soumise à une déformation dans un flux laminaire^{18, 19}.

Ces travaux ont permis d'établir que la goutte se déforme et se fragmente si le **nombre capillaire** C_a est supérieur à une valeur critique. Le nombre capillaire est défini comme le ratio entre la **contrainte visqueuse** $= \eta_c \dot{\gamma}$, où η_c est la viscosité de la phase continue et $\dot{\gamma}$ le gradient de cisaillement, et la **pression de Laplace** $\frac{2\gamma_{int}}{R}$, où γ_{int} est la tension interfaciale entre les deux liquides et R le rayon de la goutte. Ainsi, C_a quantifie la compétition entre le cisaillement qui tend à déformer la goutte et la pression de Laplace qui tend à préserver la goutte sphérique et s'oppose à cette déformation. En écoulement laminaire, la fragmentation a lieu quand $C_a > C_{a,critique}$. Cette dernière valeur dépend du rapport des viscosités entre la phase dispersée et la phase continue et de bien d'autres facteurs expérimentaux liés au mode de cisaillement.

Différents mécanismes de rupture peuvent se produire. Le plus commun est l'instabilité de Rayleigh, qui provoque la rupture d'un cylindre en plusieurs gouttes filles pour minimiser l'énergie de surface du système, la surface des gouttes-filles étant moindre par rapport à celle du cylindre²⁰.

Retenons ici l'essence des travaux de Taylor, à savoir que le diamètre des gouttes obtenues varie comme $\frac{\gamma_{int}}{\eta_c \dot{\gamma}}$. On peut alors estimer les taux de cisaillement requis pour obtenir des gouttes de taille nanométrique ($R= 100$ nm). En prenant comme ordre de grandeur 10 mN /m pour la tension interfaciale, 10^{-3} Pa.s pour la viscosité de la phase continue, il faut fournir un taux de cisaillement de 10^8 s⁻¹.

Ces valeurs, comparées à celles des macroémulsions en Tableau 2.1, démontrent que de tels taux de cisaillement ne peuvent être obtenus que dans des conditions particulières de fragmentation, comme les **dispositifs à ultra-sons** ou encore certains **systèmes microfluidiques sous très forte pression**^{11, 21}.

Tableau 2.1: Caractéristiques physiques des gouttes d'émulsion. Les caractéristiques des nano/mini émulsions sont reflétées en gras violet par rapport à celles des macroémulsions. Hypothèse de calcul: tension interfaciale $\gamma_{int} = 10$ mN/m; viscosité de la phase continue $\eta_c = 10^{-3}$ Pa.s. Extrait de ¹¹.

Rayon (nm)	Volume (L)	Pression de Laplace (atm)	Taux de cisaillement permettant la rupture des gouttes (s ⁻¹)
10	4 x 10⁻²¹	20	10⁹
100	4 x 10⁻¹⁸	2	10⁸
1000	4 x 10 ⁻¹⁵	0.2	10 ⁷
10000	4 x 10 ⁻¹²	0.02	10 ⁶

I.4.2.2 Contrôle de la stabilité

Comme nous l'avons mentionné, seuls deux mécanismes de vieillissement affectent la taille des gouttes du système, et donc l'aire interfaciale : ce sont le mûrissement et la coalescence. Nous allons décrire comment contrôler chacun de ces aspects par la formulation.

(i) *Mûrissement d'Ostwald*

Ce processus met en jeu un transfert de matière entre les gouttes, par diffusion à travers la phase continue. Si la phase dispersée est légèrement soluble dans la phase continue, ce phénomène existe. L'eau étant légèrement soluble dans beaucoup d'huiles, nous allons être amenés à le maîtriser dans nos systèmes. Une façon de contrer cette instabilité, consiste à introduire un agent soluble dans la phase dispersée, mais insoluble dans la phase continue^{22, 23}. Ainsi, il existe une pression osmotique au sein des gouttes, en plus de la pression de Laplace. Le potentiel chimique de la phase dispersée est alors constitué d'un terme entropique supplémentaire et peut s'écrire :

$$\mu_e = \mu_{eau}^0 + \frac{2\gamma_{int}}{R} V_{m(eau)} + R_{gp} T \ln x_d \quad (\text{Équation 2.1})$$

Où x_d est la fraction molaire de la phase dispersée, $V_{m(eau)}$ le volume molaire de la phase dispersée, R_{gp} la constante des gaz parfait et T la température. Le premier terme dépend du rayon des gouttes, le deuxième de la fraction molaire en gouttes. Dans ce contexte, l'évolution du rayon des gouttes est bloquée. En effet, le mûrissement se traduit par la diminution du rayon des gouttes et s'accompagne également d'un transfert d'eau uniquement. Ainsi, x_d diminue quand le rayon diminue : les deux termes du potentiel chimique s'opposent donc.

En pratique, on peut utiliser du sel pour bloquer le mûrissement d'Ostwald dans les émulsions inverses. Le sel ne pouvant migrer à travers la phase continue, il permet de diminuer l'activité de l'eau par la présence d'une pression osmotique, contrebalançant la pression de Laplace.

(ii) *Coalescence*

Lors du processus de coalescence, deux gouttes s'approchent et fusionnent. La rupture du film qui les sépare se fait *via* la création d'un canal de quelques nanomètres, de très forte courbure ($C \cong \frac{1}{R} \sim 10^9 \text{ m}^{-1}$), pour laquelle l'énergie de courbure joue un rôle prépondérant²⁴. Ainsi, la coalescence des émulsions stabilisées par des tensioactifs met en jeu la stabilité des films de tensioactifs. Celle-ci dépend de deux critères : 1) la **densité de tensioactif à l'interface** eau-huile et 2) **leur courbure spontanée**.

- La **densité de surface** est contrôlée par la concentration en tensioactif en solution. Celui-ci, généralement soluble dans la phase continue, doit avoir une concentration supérieure à la concentration micellaire critique (CMC), pour que la composition de l'interface reste à son taux de couverture maximal (on sature l'interface).
- La **courbure spontanée C_0** du tensioactif va être primordiale pour contrôler l'énergie élastique de courbure liée à la formation du canal. La courbure spontanée d'un tensioactif correspond à l'énergie minimale de courbure d'une monocouche de ce tensioactif. C'est donc la courbure idéale que devrait prendre cette monocouche, et est obtenue lors de l'autoassociation des tensioactifs en solution. Aussi, lorsque les tensioactifs forment des micelles directes dans l'eau, cette courbure C_0 est positive. Elle décroît au fur et à mesure que les auto-assemblages sont moins courbés. Ce critère est relié à la géométrie du tensioactif, décrit par son **paramètre de forme**. Selon Tanford²⁵ et Israelachvili²⁶, l'association des tensioactifs en solution dépend de la surface optimale par tête polaire a_0 , de la longueur de chaîne aliphatique et du volume v de la molécule. Selon le rapport $\frac{v}{a_0 l_c}$, on peut passer de micelles directes à des micelles inverses, en passant par des micelles cylindriques ou des plans.

Ces mêmes paramètres moléculaires sont responsables de la solubilité des tensioactifs, traduite par l'évolution de la balance hydrophile-lipophile (HLB) de ceux-ci. Ainsi, plus la HLB est élevée, plus le tensioactif est soluble dans l'eau, le tensioactif forme des micelles directes. Il a une courbure spontanée C_0 grande devant 0. Un tensioactif soluble dans l'huile, de faible HLB, a au contraire une courbure spontanée négative.

Dans le cas d'une émulsion inverse, la coalescence entre deux gouttes nécessite la formation d'un canal de courbure spontanée positive (tournée vers l'eau). Si on utilise un tensioactif de courbure spontanée négative, *i.e.* le tensioactif est soluble dans l'huile, l'énergie élastique de courbure associée à la formation du canal est élevée, et la probabilité pour qu'il se forme est faible (Figure 2.5, à droite). A l'inverse, si le tensioactif a une courbure spontanée positive, *i.e.* il est plutôt soluble dans l'eau, la coalescence se fera facilement (Figure 2.5, à gauche).

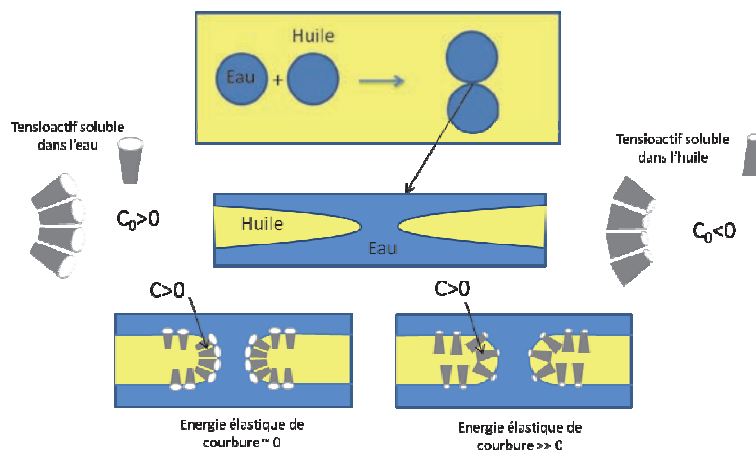


Figure 2.5 : Influence de la courbure spontanée sur l'énergie d'activation pour un évènement de coalescence au sein d'une émulsion inverse. Adapté de²⁷.

Ainsi, pour stabiliser durablement une émulsion inverse, il est préférable d'utiliser un tensioactif soluble dans l'huile. C'est ce que préconise la règle de Bancroft²⁸ ou encore la règle de la HLB^{29, 30} selon le schéma de la Figure 2.6.

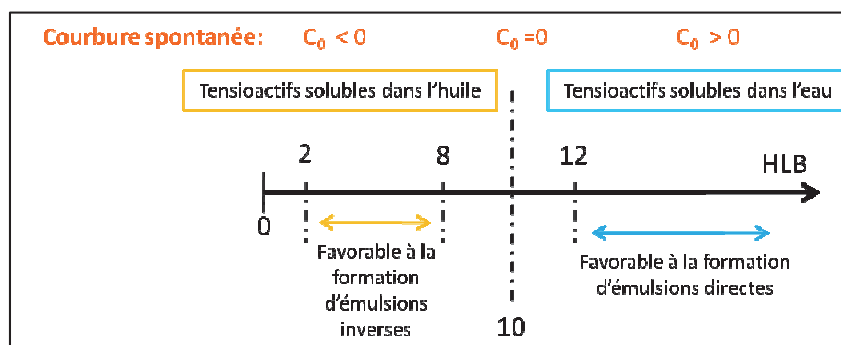


Figure 2.6 : Propriétés des tensioactifs en fonction de sa HLB et courbure spontanée associée.

II. Synthèse des précurseurs de HA-MA

II.1. Voie de synthèse

La voie de synthèse utilisée pour les précurseurs de HA-MA consiste à faire réagir le(s) fonctions hydroxyles du HA avec l'anhydride méthacrylique (AMA) par une réaction d'estérification. Due à une réactivité de l'alcool primaire légèrement meilleure que celle des alcools secondaires, le greffage se fera en majorité sur l'hydroxyle en position C6 du motif *N*-acétyl-D-glucosamine. Le greffage de l'AMA sur le HA a été reporté en 2001 par l'équipe de

Grinstaff³¹. Cette synthèse était effectuée dans l'eau à pH=8 à T=4°C pendant 16 heures. Elle présentait deux limitations majeures :

- les taux de fonctionnalisation étaient relativement faibles.
- la synthèse mettait en œuvre un très large excès d'anhydride par rapport au HA (ratio AMA/HA de 20).

Il a été montré par Bencherif *et al*³² que, dans le cas du greffage du glycidyl méthacrylate (GMA) sur le HA, l'addition d'un solvant organique dans le milieu réactionnel tel que le DMF permettait d'obtenir de meilleurs taux de fonctionnalisation. Cette astuce a donc été utilisée pour le greffage de l'AMA sur le HA (Figure 2.7).

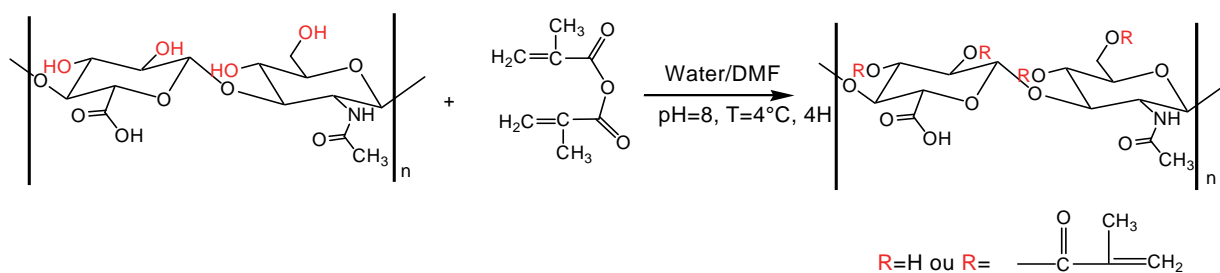


Figure 2.7 : Voie de synthèse optimisée pour la synthèse des précurseurs de HA-MA (adaptée de³).

II.2. Résultats

Ainsi, différents précurseurs avec des taux de fonctionnalisation variant de 0.1 à 0.5 ont été synthétisés. Le protocole détaillé de cette synthèse est décrit en partie expérimentale. Les précurseurs utilisés pour la fabrication des nanogels sont reportés en Tableau 2.2. Le greffage des méthacrylates a été suivi par ¹H-RMN. A titre d'exemple, le spectre ¹H-RMN du HA-MA₂ est reporté en Figure 2.8. Les pics à 5.7 ppm et 6.1 ppm sont caractéristiques des protons =CH₂ du groupe méthacrylate. Les pics à 4.5 et 4.6 ppm sont attribuables aux protons anomériques. Les neuf protons non échangeables portés par l'acide D-glucuronique et la N-acétyl-D glucosamine apparaissent sous forme d'un large signal entre 3.3 et 3.9 ppm. Enfin, les groupes méthyles présents sur les méthacrylates et sur le groupement acétyle sortent respectivement à 1.9 ppm et 2 ppm. De ce spectre, le degré de méthacrylation (DM), défini comme le ratio des intégrations des pics correspondant au méthacrylate =CH₂ à 5.7 et 6.1 ppm et des pics des protons anomériques à 4.5 et 4.6 ppm, a été calculé. Le DM du HA-MA₂ est de 0.25. Or, pour cette synthèse, le nombre d'équivalents molaires d'AMA était de 1 par rapport au HA (cf. Tableau 2.2). Ainsi le pourcentage de fonctionnalisation du HA par rapport au nombre d'équivalents d'AMA de départ est de 25%.

Tableau 2.2 : Conditions expérimentales des synthèses de HA-MA.

	M _w of HA (kDa)	AMA ^a	Temps d'ajustement du pH (h)	DM ^b	Rendement (%) ^c
HA-MA ₁	100	1	3	0.15	82
HA-MA ₂	100	1	4	0.25	90
HA-MA ₃	100	2	4	0.4	92
HA-MA ₄	200	2	4	0.3	86
HA-MA ₅	20	1	4	0.16	90

^a : Nombre d'équivalent d'anhydride méthacrylate par rapport au HA. ^c : Défini comme le ratio de la masse de HA-MA obtenue sur la masse de HA de départ.

^b : Degré de méthacrylation (DM) calculé par ¹H-RMN.

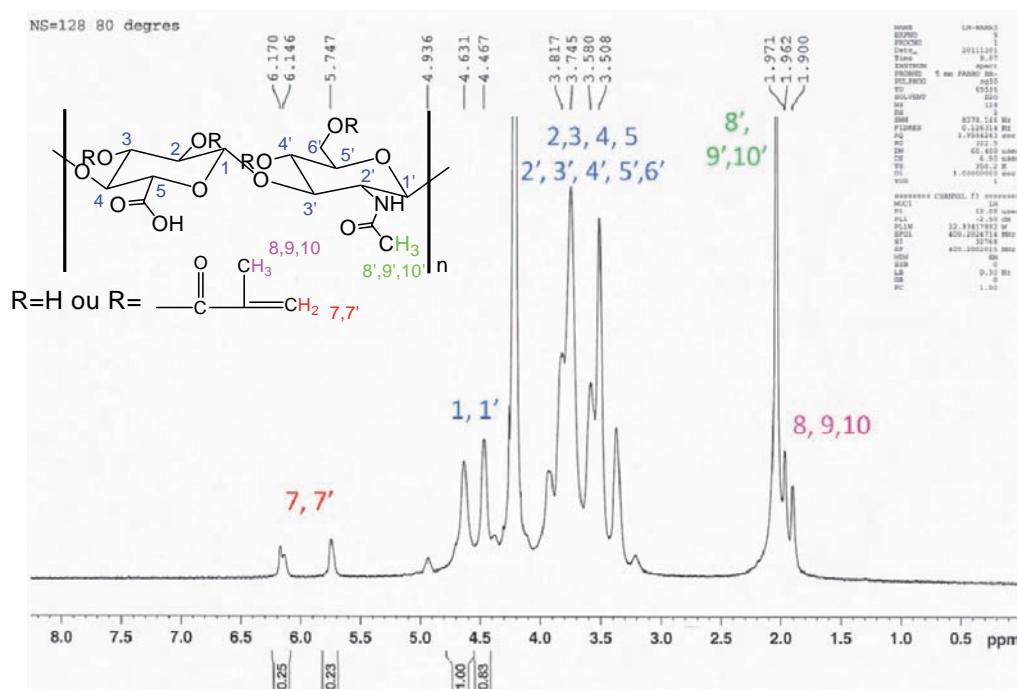


Figure 2.8 : Spectre ¹H-RMN du précurseur de HA-MA₂, 100K, DM=0.25.

¹H NMR (400 MHz, D₂O, 80°C) : δ (ppm) : 1.90 (s, 3H, CH₃(MA)), 1.96 (s, 3H, CH₃(MA)), 2.10 (s, 3H, CH₃(CO)), 3.9-3.3 (br, 9H), 4.47 (d, J=7.7 Hz, 1H'), 4.63 (d, J=8.3 Hz, 1H), 5.75 (d, J=7.8 Hz, 1H, CH₂=), 6.15 (d, J=14Hz, 1H CH₂=).

Pour chaque précurseur, le DM a été calculé. La Figure 2.9 compare les spectres ¹H-RMN du HA non fonctionnalisé et des précurseurs de HA-MA₁ à HA-MA₃, dont les synthèses ont été réalisées avec un nombre d'équivalents croissant en méthacrylate. On voit clairement que le degré de méthacrylation augmente en fonction du nombre d'équivalents utilisé pour la synthèse.

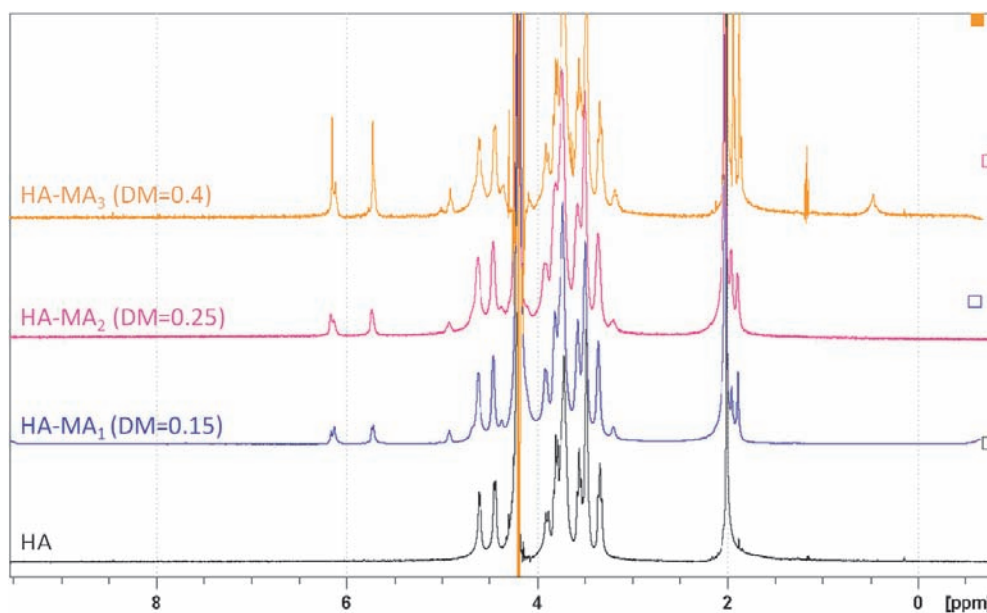


Figure 2.9 : Spectres ^1H -RMN de l'acide hyaluronique avant et après fonctionnalisation par les méthacrylates pour les précurseurs de DM variable ($[\text{HA}] = 4 \text{ g/L}$).

L'incorporation des fonctions méthacrylates a également été vérifiée qualitativement par spectroscopie infra-rouge pour chaque précurseur. En Figure 2.10 a), le spectre du HA-MA₂, (100 kDa, DM=0.25) est comparé à celui du HA linéaire, 100 kDa et à l'anhydride méthacrylate. L'anhydride présente une bande caractéristique des liaisons =CH₂ à 1636 cm⁻¹ (flèche bleue, Figure 2.10 a). Cette bande n'apparaît pas distinctement sur le HA-MA₂, probablement du fait qu'une bande large, présente sur le HA recoupe cette zone (pic principal de la bande à 1604 cm⁻¹). L'anhydride présente également deux bandes à 1700-1775 cm⁻¹ caractéristiques des fonctions C=O des anhydrides. Après greffage, il se forme un ester : ainsi ces bandes devraient se déplacer à 1700-1750 cm⁻¹. Une légère bande, non présente sur le HA, apparaît à 1700 cm⁻¹ (flèche verte, Figure 2.10 a) sur le spectre du HA-MA₂. Cette signature pourrait correspondre à la formation de l'ester. Afin de confirmer cette analyse, nous avons également comparé les spectres IR des précurseurs de HA-MA de degré de méthacrylation variable. Les spectres du HA-MA₁ et HA-MA₃ sont comparés aux spectres du HA et du HA-MA₂ en Figure 2.10 b). Pour chaque précurseur, cette bande apparaît à 1700 cm⁻¹ (fléchée en vert, Figure 2.10 b). Cependant, il est impossible d'extraire l'évolution de cette bande en fonction du DM, dus à la largeur et au recouvrement des bandes. Ainsi, l'analyse IR reste difficilement interprétable pour les précurseurs HA-MA.

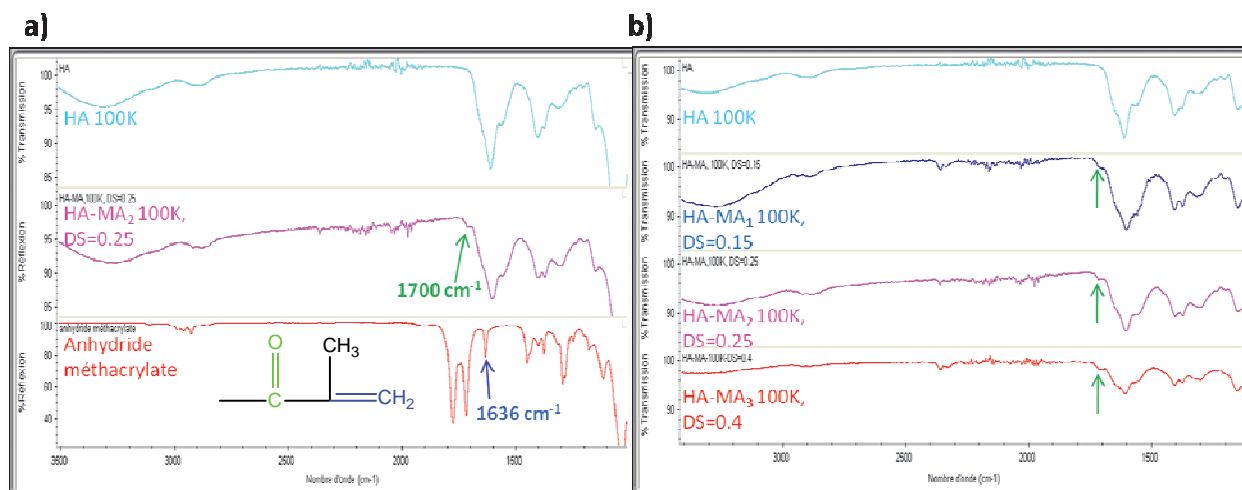


Figure 2.10 : a) Vérification du greffage des méthacrylates par spectroscopie infra-rouge ; b) Evolution du spectre IR en fonction du degré de méthacrylation.

II.3. Quelques commentaires sur les hydrogels issus de ces précurseurs

Comme nous l'avons souligné en chapitre 1, nos partenaires du CERMAV se sont attelés à la fabrication de précurseurs de HA et à l'étude des réseaux macroscopiques. Afin de comparer nos résultats avec ceux des réseaux macroscopiques, il convient de résumer les résultats obtenus dans leur étude. La préparation des macrogels à partir précurseurs de HA-MA a été étudiée, par suivi des propriétés rhéologiques pendant la photopolymérisation (photorhéologie). La photorhéologie permet d'enregistrer les grandeurs rhéologiques G' et G'' , respectivement dénommées module élastique et module de perte. Lorsqu'un gel se forme, le module élastique devient supérieur au module de perte, indiquant la formation du réseau (Figure 2.11 a). Dans ce cas, les réseaux obtenus sont transparents, après photopolymérisation pendant quelques minutes (10 min) à une puissance d'irradiation de $50 \text{ mW}/\text{cm}^2$. Le module élastique de ces réseaux, enregistré par rhéologie dynamique, peut être modulé de 600 à 2500 Pa en fonction du taux de méthacrylation (Figure 2.11 b).

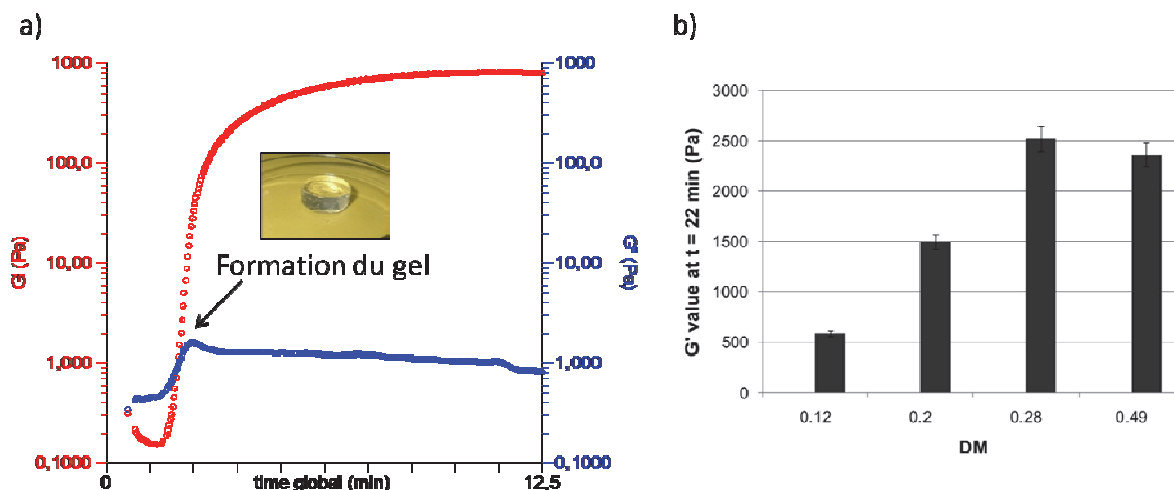


Figure 2.11 : a) Propriétés des gels de HA-MA obtenus par photorhéologie. Au bout de 5 min le module élastique devient supérieur au module visqueux, témoignant la formation d'un gel. b) Le module élastique des gels formés dépend du degré de méthacrylation du macromère³.

III. Fabrication des nanogels par miniémulsion inverse

Nous montrerons en section III.1 et III.2 respectivement, les démarches qui ont permis de contrôler la fabrication des nanoréacteurs afin d'obtenir de façon reproductible des nanogels de taille contrôlée.

III.1. Miniémulsion inverse fragmentée par ultra-sons

Nous avons d'abord préparé des nanogels de HA-MA par réticulation en miniémulsion fragmentée aux ultra-sons. L'**ultrasonication** (US) a été choisie pour les raisons suivantes.

- (1) ce procédé est simple à mettre en œuvre
- (2) il est bien décrit dans la littérature^{33, 34} pour la fabrication de nanogels de polymère hydrophile par miniémulsion inverse.

III.1.1. Emulsification

III.1.1.1 Choix de la composition du système

Le système est constitué d'une phase dispersée et d'une phase continue, dont les caractéristiques respectives sont listées ci-dessous :

- La **phase dispersée** est aqueuse et contient :
 - (i) le précurseur HA-MA à une concentration $C_p = 1.5$ ou 3 wt%. Dans tous les cas, C_p est supérieure à la concentration critique de recouvrement des chaînes C^* (calculs reportés en partie expérimentale). Dans le cas du HA de 100 kDa, la concentration C^* estimée théoriquement est de 1.8 g/L. Cette concentration est en accord avec la littérature³⁵. Ces concentrations s'inscrivent également dans les gammes de concentration utilisées par nos partenaires sur les macrogels³.
 - (ii) le photoamorceur, le 1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phényl]-2-hydroxy-2-méthyl-1-propane-1-one (Irgacure 2959), dont la formule développée est représentée en partie expérimentale. Ce photoamorceur est bien soluble dans l'eau et ne présente pas de toxicité avérée envers les cellules³⁶⁻³⁸. Sa concentration a été fixée 0.05 wt%, concentration qui, dans le cas des macrogels, assure une gélification rapide et efficace³.
 - (iii) du chlorure de sodium, à une concentration $[NaCl] = 0.15$ M. Comme nous l'avons discuté en section précédente, l'introduction d'une espèce très soluble dans les gouttes d'eau et complètement insoluble dans la phase continue tel que NaCl, permet de limiter le phénomène de mûrissement³⁹.

- La **phase continue** est organique et contient :
 - (i) une huile assez volatile : nous avons choisi l'hexane ou l'octane.
 - (ii) un tensioactif de faible HLB pour stabiliser l'émulsion inverse : le Span 80 (HLB =4.3), ou un mélange de tensioactifs, le Span 80 et le Tween 80 (HLB =15). Ce couple de tensioactifs est connu pour donner un effet synergique pour la production d'émulsions inverses⁴⁰. La concentration totale en tensioactifs ($[TA]$), en quantité suffisante pour être au dessus de la CMC (de 1.8×10^{-5} mol/L pour le Span 80)⁴¹, sera soit de 2 wt%, soit de 8 wt% par rapport à la masse d'huile (concentrations molaires de 0.03 mol/L et 0.13 mol/L respectivement). Les formules développées de ces tensioactifs sont données en partie expérimentale.

III.1.1.2 Fragmentation de l'émulsion-Essais sur une émulsion blanche

Nous avons d'abord fait un essai sur une émulsion ne contenant pas de macromère HA-MA (émulsion blanche). Les constituants des deux phases sont homogénéisés séparément puis pré-émulsifiés par agitation magnétique. La fraction volumique en gouttes Φ est de 10% .

La pré-émulsion est constituée de grosses gouttes aqueuses supérieures à 10 μm , et non homogènes en taille. Elle est ensuite fragmentée par ultra-sons.

Le temps d'US a été optimisé afin d'obtenir une distribution en taille la plus étroite possible. L'évolution de la distribution en taille de l'émulsion, mesurée par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS), en fonction du temps d'US est résumée en Figure 2.12. La distribution en taille de l'émulsion est identique quel que soit le temps d'US. Un temps d'émulsification de 2 min est suffisant pour atteindre une distribution caractéristique relativement étroite. Compte-tenu de ce résultat, le temps d'émulsification a été fixé à 2 min, afin d'éviter un amorçage prématuré des radicaux et une dégradation des chaînes de HA-MA⁴².

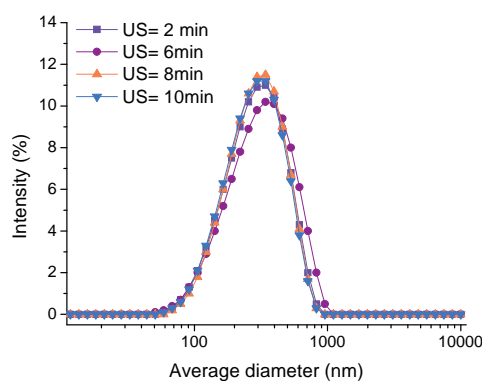


Figure 2.12 : Evolution de la distribution en taille des émulsions en fonction du temps d'ultrasonication. Conditions : $[TA]=2\%$ dans l'hexane, avec TA=mélange Span 80/Tween 80 de 3/1 ; $\Phi=10\%$.

III.1.1.3 Caractéristiques de l'émulsion obtenue au stockage

Nous avons donc renouvelé l'expérience en présence de macromère dans la phase dispersée (précurseur HA-MA₁). La Figure 2.13 représente les caractéristiques typiques d'une émulsion inverse (EM1) fragmentée aux US. La taille caractéristique de l'émulsion a été déterminée de façon qualitative par microscopie optique (Figure 2.13 b) et de façon quantitative par DLS (Figure 2.13 c). Une dispersion turbide est obtenue, avec une distribution relativement homogène en taille centrée autour de 310 nm. On constate cependant l'apparition d'un pic à 5 μm au cours de la mesure de DLS, indiquant une évolution rapide de la taille des gouttes ou l'apparition d'agrégats. De plus, une couche plus opaque au fond du pilulier est rapidement observée, liée à la sédimentation rapide de ces gros objets.

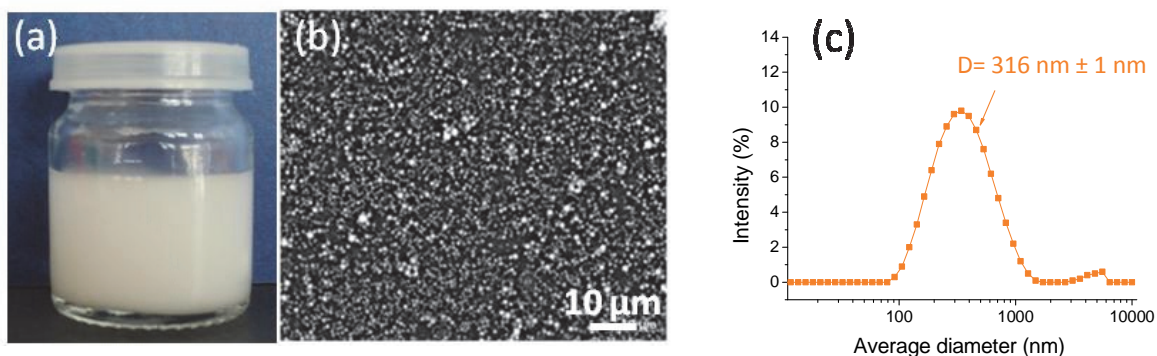


Figure 2.13 : Caractéristiques de l'émulsion inverse EMI: (a) vue macroscopique ; (b) vue microscopique ; diamètre hydrodynamique moyen déterminé par DLS. Conditions : précurseur HA-MA₁, DM=0.15, Cp=1.5 wt%; concentration en tensioactifs de 2 wt%, ratio 3/1 Span 80 / Tween 80.

Afin de contrer ce phénomène et améliorer la stabilité colloïdale de l'émulsion, nous avons modifié certains paramètres de formulation. En particulier, si ces gros objets proviennent de la coalescence, celle-ci peut avoir deux origines :

- les gouttes ne sont pas assez couvertes de tensioactif
- la courbure spontanée des tensioactifs utilisés n'est pas adaptée pour stabiliser durablement les gouttes.

Un défaut lors de la fragmentation peut aussi expliquer la réminiscence de grosses gouttes, qui dans ce cas seraient présentes dès le début. La diminution de la tension interfaciale du système devrait permettre de faciliter cette étape.

III.1.1.4 Limitation de la sédimentation

Plusieurs efforts ont donc été dédiés à la réduction de cette couche de sédiment, par changement de composition du/des tensioactif(s).

Des essais préliminaires ont d'abord été réalisés sur des émulsions blanches *i.e.* sans macromère dans les gouttes. Ces essais ont été réalisés sur deux niveaux :

- 1) A concentration totale en tensioactifs (TA) constante, le ratio entre le Span 80 et le Tween 80 a été modulé (pas de Tween 80, 3/1 et 1/1), ce qui permet de diminuer la tension interfaciale et la courbure spontanée.
- 2) La concentration totale a également été variée de 2 wt% à 8 wt% pour compenser la large quantité d'interface créée.

Le Tableau 2.3 résume les caractéristiques des émulsions blanches B1 à B6 préparées. Toutefois, toutes les formulations sont sujettes à de la sédimentation, en moyenne au bout de 30 min.

Tableau 2.3 : Composition en tensioactifs des émulsions B1-B6 et sédimentation.

Emulsion	[TA] (wt%)	[Span 80] (wt%)	[Tween 80] (wt%)	Temps de Sédimentation (min)
B1	2	2	0	10 min
B2	2	0.5	1.5	30 min
B3	2	1	1	30 min
B4	8	8	0	15 min
B5	8	2	6	30 min
B6	8	4	4	30 min

Nous avons également vérifié ces observations sur les émulsions contenant du HA-MA₁. Les mêmes observations que pour les émulsions blanches ont été obtenues, bien que le temps de sédimentation soit à l'échelle de l'heure.

De ces observations, nous tirons les conclusions suivantes.

- Les émulsions constituées de mélange Span 80 / Tween 80 sont constituées de gouttes plus fines, elles sédimentent moins vite que celles obtenues avec le Span 80 pur. Cela peut s'expliquer par la tension interfaciale qui est plus faible pour le mélange Span 80 / Tween 80 que pour le Span 80 pur^{24, 27}.
- L'augmentation de la concentration en tensioactif n'apporte pas d'amélioration significative. Le vieillissement n'est donc pas lié à un mauvais taux de couverture des interfaces. Au contraire, l'excès de tensioactif peut parfois conduire à la floculation par déplétion, à cause de la pression osmotique exercée par les micelles sur les gouttes. Nous n'avons pas élucidé cet aspect de choses. Néanmoins, ayant abouti à la formulation d'émulsions certes inhomogènes, mais suffisamment fines pour une partie des gouttes, nous avons choisi de passer à l'étape de polymérisation.

Dans cette partie, la composition de l'émulsion retenue par la suite est la suivante, baptisée EM1 :

- **Phase continue** : concentration en tensioactifs de 2 wt% dans l'hexane, avec un mélange 3/1 de Span 80 / Tween 80.
- **Phase dispersée** : $\Phi = 10\%$. Macromère + amorceur dans 0.15 M d'eau salée.

III.1.2. Photopolymérisation

La préparation d'hydrogels de HA par photopolymérisation des méthacrylates (cf. chapitre 1) a été largement développée pour les applications médicales, car elle offre un bon contrôle spatial (position de la lampe) et temporel (moment d'irradiation) de la polymérisation^{3, 31, 43-45}. Par irradiation sous UV des précurseurs en solution, le taux de conversion des méthacrylates est quasi-total et les hydrogels résultants sont transparents. Ainsi, leurs propriétés rhéologiques est fonction du taux de réticulation, qui ne dépend alors que du degré de méthacrylation. Les méthacrylates sont des groupements résiduels potentiellement toxiques en vue d'une injection *in vivo*. Il est donc primordial de déterminer les conditions d'irradiation permettant une conversion en méthacrylate optimale. Ces conditions sont vraisemblablement différentes de celles appliquées pour la formulation d'hydrogels car les miniémulsions fabriquées sont turbides et absorbent une partie du rayonnement reçu. Par conséquent, afin de réticuler quantitativement le HA-MA au sein des gouttes, les conditions d'irradiation de l'émulsion ont été examinées.

III.1.2.1 Irradiation à puissance maximale de la lampe

Un aliquot d'émulsion EM1 est placé 1 heure sous UV avec une puissance de 4500 mW/cm² (puissance maximale). La cuve est maintenue sous agitation afin d'assurer une polymérisation homogène des gouttes. Le dispositif détaillé est reporté en partie expérimentale. En Figure 2.14, la vue macroscopique de cette émulsion avant et après UV est reportée. On constate qu'après irradiation sous UV, un mélange diphasique est obtenu, composé d'une phase légèrement trouble au fond de la cuve (phase aqueuse) et d'une phase transparente (huile au dessus). L'émulsion s'est déstabilisée sous ces conditions d'irradiation, conduisant à la séparation de phase.

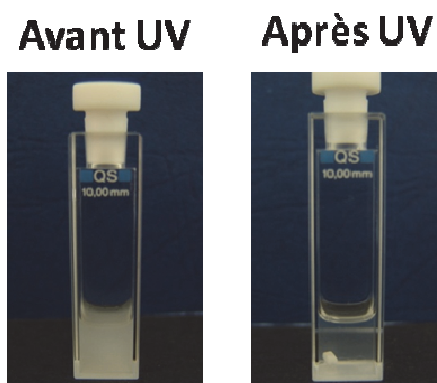


Figure 2.14 : Vue macroscopique de l'émulsion inverse EM1 avant et après UV (Puissance=4500 mW/cm²).

Afin de confirmer cette observation inattendue, 1 mL de l'émulsion EM1 a ensuite été irradié à une puissance maximale de 4500 mW/cm² (Pmax), en augmentant progressivement le temps d'irradiation sous UV. Au fur et à mesure que le temps d'irradiation augmente, l'émulsion passe progressivement d'une dispersion homogène à un mélange diphasique, signe d'une séparation de phase. Ces résultats indiquent que non seulement les émulsions fabriquées aux US évoluent au repos par la sédimentation, mais aussi évoluent très rapidement en fonction des conditions d'irradiation.

III.1.2.2 Modulation de la puissance d'irradiation

La lampe utilisée permet de moduler la puissance émise de 450 mW/cm² (10% Pmax) à 4500 mW/cm² (Pmax). On décide alors d'irradier 1 mL d'émulsion EM1 à une puissance de 450 mW/cm². Les résultats obtenus sont reportés en Figure 2.15. Avant et après irradiation, une dispersion homogène blanchâtre est obtenue. Son diamètre hydrodynamique augmente légèrement après irradiation mais on ne constate pas de déstabilisation sous UV. L'effet de confinement du HA-MA au sein des gouttes est donc préservé après irradiation à cette puissance.

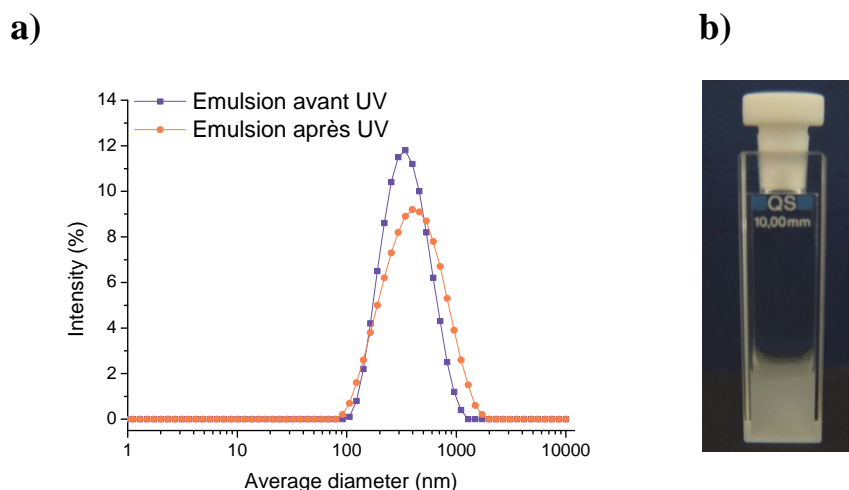


Figure 2.15 : (a) Distribution en taille caractéristique de l'émulsion EMI avant et après irradiation sous UV, (b) Vue macroscopique après irradiation sous UV, $P=450 \text{ mW/cm}^2$.

Ainsi, les émulsions formulées par ultrasonication seront irradiées par la suite à une puissance $P= 10\% P_{\text{max}}$.

III.1.3. Purification de l'huile et redispersion en milieux aqueux

III.1.3.1 Méthode de purification

Les nanogels confinés après réticulation sous UV sont ensuite immédiatement purifiés de l'huile et des tensioactifs. Cette étape est assurée par centrifugation de l'émulsion (Figure 2.16 a), puis par 2 cycles de redispersion dans l'hexane-centrifugation, comme décrit en Figure 2.16, étapes (b)-(c). Après retrait du surnageant, les dernières traces d'hexane sont évaporées pendant la nuit (d) et le culot (phase aqueuse contenant les nanogels) est redispersé dans l'eau (e).

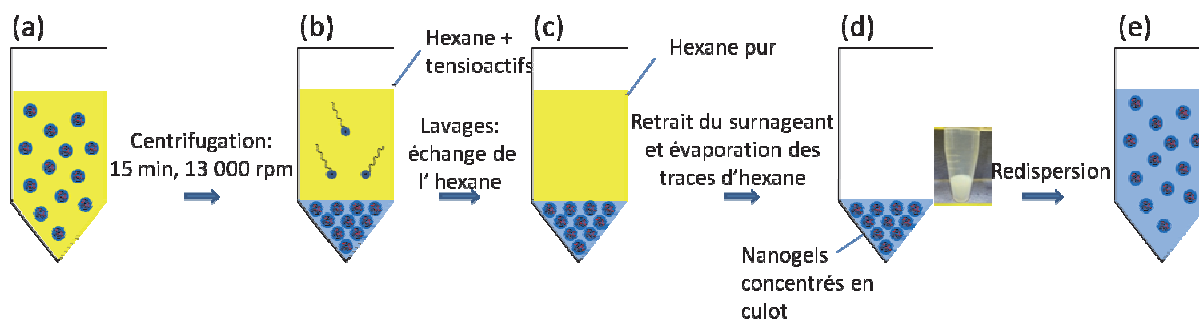


Figure 2.16 : (1) Procédé adopté pour la purification des nanogels. L'huile et les tensioactifs sont éliminés par deux étapes de centrifugation redispersion dans l'hexane, puis une redispersion finale en milieu aqueux.

III.1.3.2 Résultats obtenus

Les nanogels ainsi purifiés sont analysés en détail d'un point de vue granulométrique (Figure 2.17 1) et morphologique (Figure 2.17 2). La mesure du diamètre hydrodynamique par DLS montre une taille moyenne de 203 ± 6 nm. Cependant, une population d'objets de $3 \mu\text{m}$ est décelée. Elle semble liée à l'agrégation des plus gros objets. La morphologie des particules obtenues (en présence d'agent de contraste) est ensuite analysée par microscopie électronique à transmission (TEM). On constate la présence de particules sphériques, de surface rugueuse, caractéristiques de nanogels à l'état sec. La taille des nanogels est relativement homogène centrée autour de 200 nm.

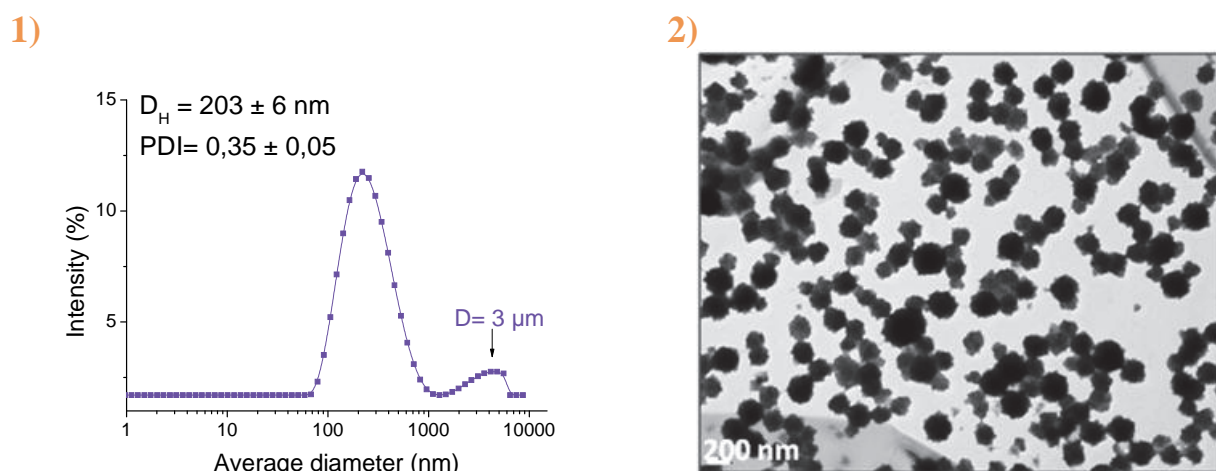


Figure 2.17 : Après redispersion en milieux aqueux, les nanogels sont caractérisés par (1) DLS afin d'obtenir leur distribution en taille, 2) TEM afin d'obtenir leur morphologie.

Cependant, les nanogels observés sont peu nombreux sur la grille d'observation. Cela peut s'expliquer du fait que pour plusieurs lots de nanogels étudiés, il a été observé des amas collés entre eux (Figure 2.18 a), ce qui confirme la présence d'agrégats observés par DLS. Nous avons également observé les structures affichées en Figure 2.18 b). Les nanogels, pointés par des flèches violettes se retrouvent emprisonnés dans des tâches de plus faible contraste, pointées par une flèche orange. Il semble que ces tâches correspondent à des restes d'huile dans la dispersion. Cette hypothèse peut également expliquer la mauvaise qualité des films déposés sur la grille, prompts à de nombreuses fissures (non illustré).

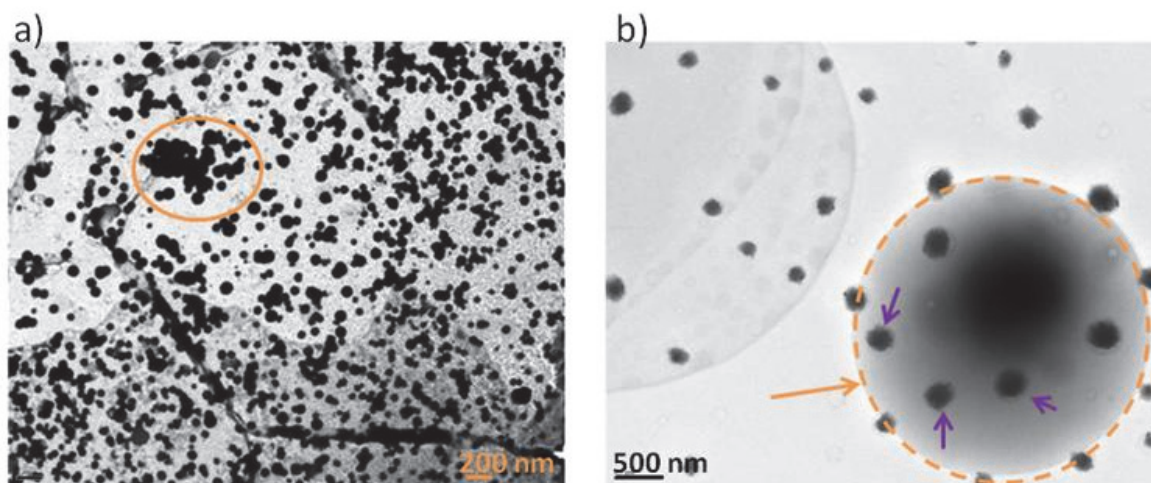


Figure 2.18 : Illustration des nanogels de HA-MA observés par TEM et structures atypiques associées: a) présence d'agrégats ; b) goutte d'huile dans laquelle sont emprisonnés les nanogels. Ces structures résultent de leur observation en présence d'un agent de contraste (acétate d'uranyle), révélant leur faible densité électronique.

(i) Influence du milieu de redispersion

En vue de s'affranchir de la contribution de la diffusion de lumière de gouttes d'huile résiduelles en DLS, les nanogels ont également été redispersés dans un mélange 80/20 d'eau/acétone (visant à obtenir un milieu de dispersion homogène). En Figure 2.19, la distribution caractéristique des nanogels ainsi redispersés est comparée à celle des nanogels redispersés dans l'eau. On remarque que la distribution en taille des nanogels dans un mélange Eau/Ac est plus étroite que dans l'eau. L'acétone permet de solubiliser les traces de solvant organique qui peuvent contribuer au signal de diffusion de lumière, et par conséquent améliore la distribution en taille. Cependant, quel que soit le milieu de redispersion, le pic d'agrégation n'est pas totalement éliminé. Un des verrous est donc d'obtenir une dispersion de nanogels homogène en taille et stable contre l'agrégation.

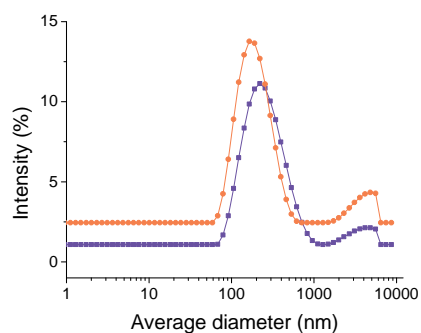


Figure 2.19 : Distributions en taille obtenues pour des nanogels de HA-MA redispersés après purification: dans l'eau (-■-) ou dans un mélange 80/20 eau/acétone (-●-).

(ii) Influence d'autres paramètres

D'autres paramètres ont alors été testés dans le but de limiter l'agrégation des nanogels mais ces expériences ne se sont pas révélées concluantes.

- Purification par d'autres méthodes telles que la précipitation à l'éthanol (ratio 70/30 éthanol/eau) ou au THF (ratio 80/20 THF/eau). Les distributions caractéristiques (non illustrées) se sont également révélées très larges.
- La concentration en HA-MA dans les gouttes d'émulsion, initialement de 1.5 wt% (EM1) a été augmentée à 3 wt% (EM2). Les distributions en taille des nanogels résultant de ces deux formulations sont comparées en Figure 2.20 a). Ces deux distributions affichent les mêmes caractéristiques : un pic autour de 300 nm attribué aux nanogels individualisés et un pic entre 1 et 3 μm correspondant à de l'agrégation.
- Différents précurseurs de HA-MA de degrés de substitution variables ont été confinés en émulsion inverse (EM1 et EM3). A titre d'exemple, les distributions en taille des nanogels préparés à partir du HA-MA₁ = 0.15 et du HA-MA₃, DM=0.4 sont représentées en Figure 2.20 b). Alors que l'on pouvait s'attendre à une diminution du diamètre hydrodynamique des nanogels de HA-MA₃, on constate que les distributions sont identiques.
- La composition en tensioactifs a été modulée, de [TA] = 2 %, ratio span80/tween 80 = 3/1 (EM1) à [TA] = 2% de Span 80 (EM4) (Figure 2.20 c). Rappelons que la composition en tensioactifs permet d'agir sur la tension interfaciale eau/huile ce qui conditionne la taille des gouttes. Bien que l'on constate une évolution du diamètre hydrodynamique en fonction de la composition en tensioactifs, la distribution en taille des nanogels résultant de ces formulations reste bimodale avec un pic important d'agrégation (20% de l'intensité mesurée).

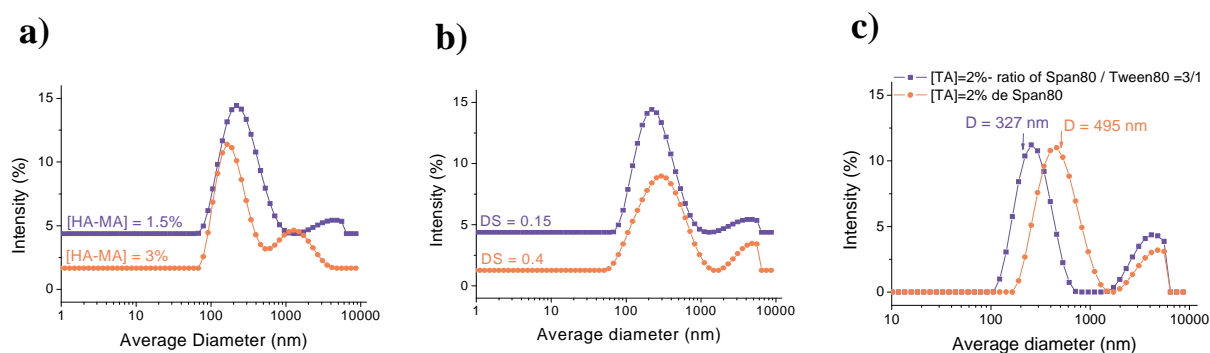


Figure 2.20 : Evolution de la distribution en taille de nanogels en fonction : a) de la concentration en HA-MA dans les gouttes ; b) du degré de méthylation (DM) ; c) de la composition en tensioactifs. Acquisition des données par DLS.

III.1.4. Bilan

La fabrication de nanogels de HA-MA par miniémulsion inverse fragmentée aux ultra-sons souffrent des limitations suivantes :

- (a) **Etape d'émulsification aux ultrasons.** Les émulsions vieillissent rapidement, comme en témoigne leur sédimentation au bout d'1h. Le temps disponible pour la polymérisation est donc très court.
- (b) **Etape de photopolymérisation.** Les émulsions sont sensibles à la puissance d'irradiation. La photopolymérisation engendre une coalescence accélérée de l'émulsion.
- (c) **Etape de purification de l'huile et des tensioactifs.** Dans toutes les configurations, la distribution typique des nanogels de HA-MA résultant du procédé présente les mêmes caractéristiques, à savoir une distribution large autour de 300 nm et un pic d'agrégation.

Face à ces limitations, nous nous sommes orientés vers la fabrication des miniémulsions par **dispositif microfluidique à haute pression.**

III.2. Miniémulsion inverse fragmentée par dispositif microfluidique

III.2.1. Préparation de l'émulsion

Les homogénéiseurs à haute pression ou microfluidizer (MF), contrairement aux sondes ultra-sons, s'avèrent moins pratiques d'utilisation mais permettent la préparation d'émulsions très fines en taille *via* plusieurs cycles de circulation dans des canaux micrométriques (~100 μm) à des pressions de l'ordre de 100 kPa. Ces dispositifs peuvent être utilisés pour la formulation de miniémulsions inverses mais la communauté scientifique reporte surtout la formulation de nano/miniémulsions directes⁴⁶.

III.2.1.1 Choix de la composition du système

Le choix de la technique d'émulsification ne doit pas, *a priori*, engendrer de modification majeure de la composition de l'émulsion. Quelques critères sont cependant à respecter.

- Choix du tensioactif : comme nous l'avons discuté précédemment, le tensioactif doit avoir une courbure spontanée négative, soit une HLB faible, pour stabiliser l'émulsion de manière durable. Le vieillissement de l'émulsion sous irradiation observé précédemment en présence de Tween 80 nous a conduits à éliminer ce tensioactif de la composition.
- Concentration en tensioactif : l'émulsification par MF conduit souvent à des émulsions de taille nanométrique, inférieure à celle des émulsions fragmentées aux US. La grande quantité d'interface présente dans ce genre de système nécessite d'ajuster la quantité de tensioactif de manière à « saturer » totalement la surface. Une quantité en Span 80 de 1 à 8 wt% par rapport à la masse d'huile a été choisie.
- Choix de l'huile : Un dernier changement a été opéré. Nous avons choisi d'utiliser une huile un peu moins volatile que l'hexane (choix de l'octane) pour des questions purement pratiques de compatibilité avec le matériel.

III.2.1.2 Etude préliminaire sur les émulsions blanches

Nous avons donc mené des études préliminaires sur des émulsions blanches. La concentration en tensioactifs dans la phase continue a été augmentée progressivement, de 1 wt% à 8 wt% en Span 80. Chaque miniémulsion résulte d'une étape de pré-émulsification, par mélange des deux phases sous agitation magnétique pendant 15 min, puis d'une étape d'homogénéisation par passage dans les canaux microfluidiques afin d'obtenir une émulsion fine. La pression de l'homogénéiseur et le nombre de passages (en continu) de la pré-émulsion dans les canaux ont été fixés à 400 kPa et 50 cycles respectivement. Les émulsions ainsi formulées (B7 à B10) ont été caractérisées par granulométrie (Tableau 2.4) et par microscopie optique (Figure 2.21). On remarque que l'émulsion formulée avec 1 wt% en Span 80 forme une dispersion hétérogène, constituée de gouttes de 300 nm mais aussi de grosses gouttes de 1 μm à 10 μm . Au contraire, l'émulsion formulée à 8 wt% en Span 80 permet de former une dispersion homogène et fine en taille. Bien que l'émulsion à 4 wt% en Span 80 semble aussi satisfaisante, son évolution s'est avérée beaucoup plus rapide que celle à 8 wt% en Span 80 avec la présence de grosses gouttes de taille supérieure au micromètre après 48 heures.

Tableau 2.4 : Résultats obtenus pour des émulsions blanches B7-B10 avec des quantités croissantes en tensioactifs.

	[Span80] (wt%)	D_H à t_0 (nm) ^a	PDI ^b	D_H à $t=24H$ (nm) ^a	PDI ^b	Observations
B7	1	X	X	X	X	Déstabilisation rapide
B8	4	228	0,09	x	X	Gouttes en culot
B9	6	277	0,07	626	0,27	Gouttes en culot
B10	8	237	0,08	380	0,09	Dispersion homogène

a : Diamètre hydrodynamique moyen, mesuré par DLS.

b : Indice de polydispersité obtenu par DLS.

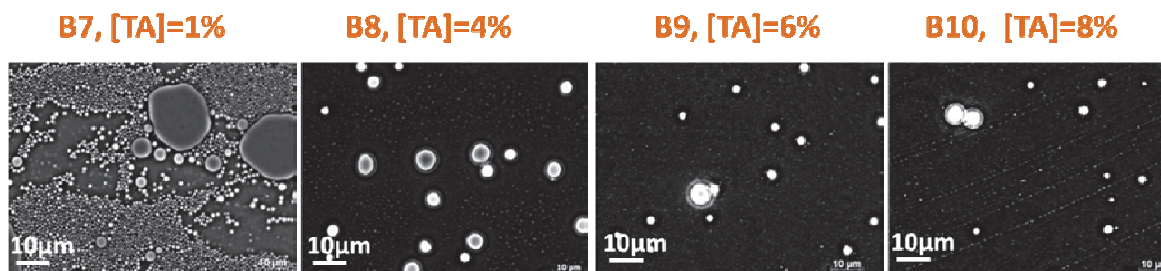


Figure 2.21 : Vues microscopiques des émulsions B7 à B10 à t_0 . A noter que la taille des gouttes obtenues se trouve en limite de résolution pour la microscopie optique.

Pour ces raisons, nous avons sélectionné une concentration en Span 80 de 8 wt% dans la phase continue.

III.2.1.3 Préparation et caractéristiques des émulsions contenant du HA-MA

(i) Préparation de l'émulsion

Une nanoémulsion contenant du HA-MA (EM5) dans la phase dispersée a ensuite été formulée selon les critères énoncés ci-dessus. Le confinement du HA-MA₂, DM=0.25 a d'abord été testé mais les tendances dressées dans cette section sont applicables aux autres HA-MA de degré de méthacrylation variable.

- **La phase dispersée, aqueuse**, contient le HA-MA₂, DM=0.25, à une concentration C_p=1.5 wt%., le photoamorceur (Irgacure 2959), à une concentration de 0.05 wt% et du chlorure de sodium, à une concentration [NaCl] = 0.15M.
- **La phase continue**, contient 8 wt% de Span 80 dans l'octane.

Les deux phases sont pré-émulsionnées ($\Phi=10\%$) puis la nanoémulsion est obtenue après 50 passages dans les canaux microfluidiques à une pression de 400 kPa. Les caractéristiques macroscopiques et granulométriques de cette émulsion sont détaillées en Figure 2.22. L'analyse granulométrique des gouttes a été obtenue par DLS :

- Une première mesure de l'émulsion concentrée (pas de dilution préalable, $\Phi=10\%$)
- Une deuxième mesure de l'émulsion diluée dans l'octane ($\Phi=0.2\%$).

(ii) *Caractéristiques de l'émulsion*

Une dispersion blanche translucide avec de légers reflets bleus est obtenue. Ces observations indiquent que les gouttes sont probablement de taille homogène nanométrique. La mesure du diamètre hydrodynamique de l'émulsion concentrée confirme ces observations et montre que les gouttes ont une taille uniforme centrée autour de 130 nm. Lorsque la mesure est réalisée sur l'émulsion diluée, on constate que la taille caractéristique des gouttes est légèrement plus faible, centrée autour de 110 nm. On peut expliquer cette différence en rappelant la définition du diamètre hydrodynamique. La mesure du diamètre hydrodynamique dérive du mouvement brownien des nanoobjets ($D < 1 \mu\text{m}$). Le mouvement brownien des particules est d'autant plus rapide que leur taille est petite. Ce mouvement dépend de plusieurs critères tels que la viscosité du milieu (ici phase continue) de la température mais aussi de la mobilité des particules dans le milieu. La mobilité des gouttes de l'émulsion concentrée peut être diminuée du fait d'un grand nombre de gouttes et leur taille peut être surestimée. Par la suite, les mesures du diamètre hydrodynamique seront présentées sur les dispersions concentrées, $\Phi=10\%$. A noter que ce diamètre est plus petit que celui de l'émulsion blanche : une suggestion possible est le rôle stabilisant du HA-MA.

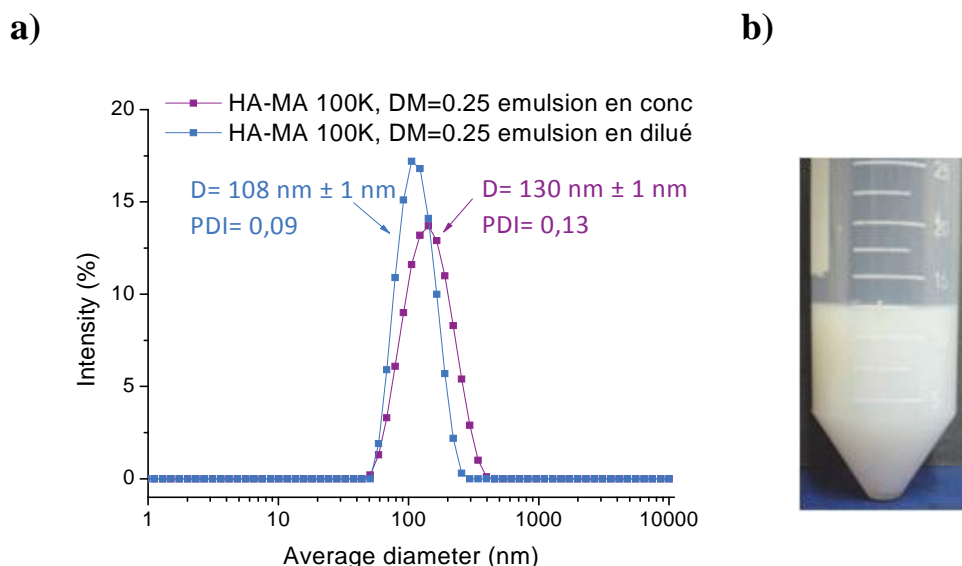


Figure 2.22 : Caractéristiques de l'émulsion EM5 préparée par homogénéisation haute pression ($P=400$ kPa, 50 cycles). a) Distribution en taille de l'émulsion concentrée ($\Phi=10\%$) et diluée dans l'octane ($\Phi=0.2\%$). b) Vue macroscopique de l'émulsion. Composition EM5 : **phase continue** : 8 wt% de Span 80 dans l'octane; **phase dispersée** : $\Phi=10\%$ ou $\Phi=0.2\%$, solution aqueuse contenant [HA-MA₂]=1.5 wt%, [NaCl]=0.15M, [Irgacure 2959]=0.05 %.

Ici, une très grande quantité de tensioactif (TA) est utilisée, permettant d'obtenir des distributions fines en taille. Nous avons estimé la quantité de TA requise pour saturer les interfaces, afin de connaître la proportion adsorbée vis-à-vis de celle restant en solution. Connaissant l'aire moléculaire du tensioactif qui est de 35 \AA^2 à l'interface octane-eau⁴¹, on calcule l'aire interfaciale et on en déduit que 0.022 mol/L de Span 80 sont nécessaires pour saturer l'interface, soit 0.9 wt%. Ce facteur est peut-être légèrement sous estimé car la présence de sel tend à rapprocher les têtes polaire pour les tensioactifs non ioniques⁴⁷. Néanmoins, même avec cette incertitude, la quantité de Span 80 utilisée est largement excédentaire. On peut calculer la quantité de tensioactifs restante en solution : sachant qu'on utilise 8 wt% de Span 80 par rapport à la masse de l'huile, soit 50 g/L ou 0.131 mol/L, il en reste 0.109 mol/L en solution. La CMC du Span 80 dans l'octane étant de 1.8×10^{-5} mol/L ou 0.008 g/L⁴¹, on est à une concentration ~ 6000 fois supérieure.

Ainsi, la surface eau-huile est saturée et il coexiste dans le milieu des gouttes aqueuses stabilisées par le tensioactif et des micelles.

(iii) Comparaison émulsion US versus émulsion MF

Afin de comparer *de visu* les émulsions formulées aux US et celles formulées au MF, les caractéristiques typiques des deux formulations EM1 et EM5 sont résumées en Figure 2.23. Les émulsions formulées au MF affichent une taille caractéristique inférieure à celle des émulsions formulées aux US. Cette diminution s'accompagne d'une amélioration de la distribution qui devient très étroite avec un PDI proche de 0.10. La population des gouttes supérieures au micromètre pour l'émulsion préparée aux US a maintenant disparu.

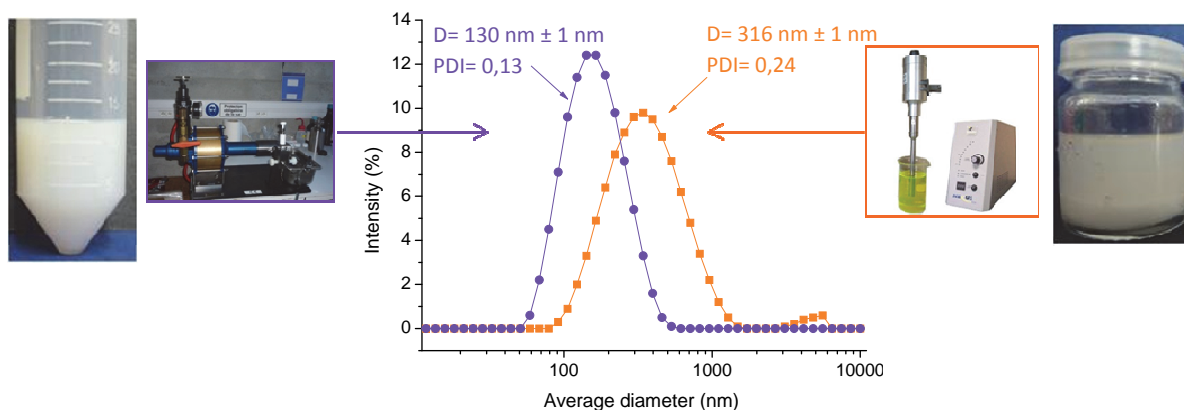


Figure 2.23 : Vue macroscopique et distribution en taille des émulsions formulées par *ultrasons* (EM1) et par *homogénéiseur haute pression* (EM5).

III.2.1.4 Etude du vieillissement de l'émulsion

(i) *Mécanisme de vieillissement*

En vue de mieux comprendre les instabilités qui gouvernent ces systèmes, le diamètre hydrodynamique et le PDI de l'émulsion EM5 ont été suivis sur 5 jours (Figure 2.24 b). Les distributions en taille associées sont également reportées en Figure 2.24 a). Le diamètre hydrodynamique de l'émulsion EM5, initialement de 130 nm atteint une valeur de 290 nm après 5 jours au repos. Parallèlement, son PDI décroît de 0.16 à t_0 à 0.11 après 5 jours, reflétant une amélioration de la distribution en taille. Ces données suggèrent que l'émulsion est prompte à du mûrissement d'Ostwald. Comme mentionné en section I.4.1, le mûrissement d'Ostwald reflète un transfert de matière des petites gouttes dans les plus grosses *via* la phase continue. Il est le fruit de la différence de potentiel existante entre l'huile et les gouttes d'eau, différence d'autant plus grande que les gouttes sont petites, due à l'augmentation de la Pression de Laplace. Pour les nanoémulsions, la pression de Laplace au sein des gouttes peut excéder l'atmosphère, ce qui explique la prédominance du phénomène⁴⁸.

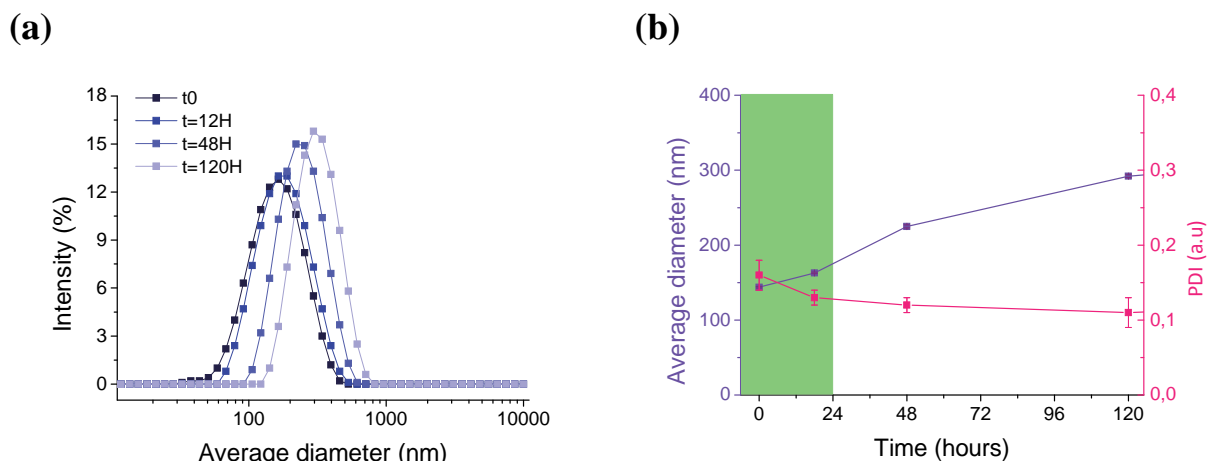


Figure 2.24 : (a) Distribution en taille initiale et après, 12 h, 48 h et 120 h de l'émulsion EM5. (b) Evolution de son diamètre hydrodynamique et de son PDI en fonction du temps. La fenêtre verte correspond à la fenêtre ciblée de temps, durant laquelle la photopolymérisation est généralement effectuée. Composition EM5 : **phase continue** : 8 wt% de Span 80 dans l'octane; **phase dispersée** : $\Phi=10\%$, solution aqueuse contenant $[HA-MA_2]=1.5$ wt%, $[NaCl]=0.15M$, $[Irgacure\ 2959]=0.05$ %.

Ce mécanisme peut être également décrit par la théorie de Lifshitz-Slezov-Wagner (LSW) qui prédit l'évolution du rayon moyen des gouttes r avec le temps (ici en seconde) :

$$\frac{dr^3}{dt} = \frac{8 c' \gamma_{int} V_m D}{9 R_{gp} T} = cste \quad (\text{Équation 2.2})$$

Où :

c' est la solubilité limite de la phase dispersée dans la phase continue au voisinage d'une interface macroscopique plane, γ_{int} la tension interfaciale, V_m le volume molaire de la phase dispersée, D le coefficient de diffusion de l'espèce dissoute dans la phase continue R_{gp} , la constante des gaz parfaits et T la température.

Ainsi, l'évolution du rayon cubique des gouttes en fonction du temps est une droite dont la pente reflète la vitesse de mûrissement. Nous avons donc examiné l'évolution du rayon cubique des gouttes en fonction du temps (Figure 2.25). L'évolution est linéaire, ce qui prouve que le vieillissement est bien lié à du mûrissement. De la pente, on peut extraire une vitesse de mûrissement de 4.8 nm³/s. Jiao *et al* avait déterminé une vitesse de mûrissement théorique et expérimentale, respectivement de $1.7 \cdot 10^3$ nm³/s et $2.3 \cdot 10^3$ nm³/s pour des émulsions inverses eau/décane stabilisées par du Span 83⁴⁹. Notre système évolue 1000 fois plus lentement, grâce à la présence de sel, qui joue le rôle d'agent osmotique très soluble dans les gouttes et complètement insoluble dans l'huile^{22, 46}.

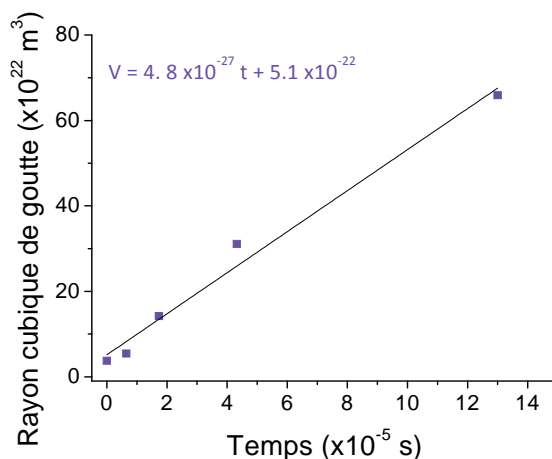


Figure 2.25 : Evolution du volume des gouttes en fonction du temps de l'émulsion EM5. Composition EM5 : **phase continue** : 8 wt% de Span 80 dans l'octane; **phase dispersée** : $\Phi=10\%$, solution aqueuse contenant $[HA-MA_2]=1.5$ wt%, $[NaCl]=0.15M$, $[Irgacure\ 2959]=0.05$ %.

(ii) Influence de la concentration en sel

Nous avons vérifié ces affirmations en formulant une émulsion ne contenant pas de sel (EM6). L'évolution sur 24 h des distributions en taille de cette émulsion est détaillée en Figure 2.26. On constate que l'émulsion EM6 formulée en l'absence de sel présente une distribution bimodale à t_0 avec un pic à 800 nm et une population de grosses gouttes ou agrégats de 3 μm . Cette distribution évolue rapidement avec le temps. Dans ces conditions, une vitesse de mûrissement de l'ordre de 10^4 nm³/s (9.4×10^3 nm³/s) a été déterminée, ce qui est plus proche des valeurs obtenues dans la littérature⁴⁹.

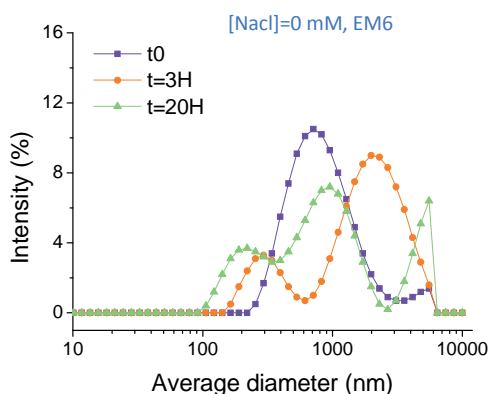


Figure 2.26 : Evolution de la distribution en taille de l'émulsion EM6, en absence de sel dans la phase dispersée. Composition EM6 : **phase continue** : 8 wt% de Span 80 dans l'octane; **phase dispersée** : $\Phi=10\%$, solution aqueuse contenant $[HA-MA_2]=1.5$ wt%, $[Irgacure\ 2959]=0.05$ %.

Nous avons également tenté de limiter le mûrissement d'Ostwald en augmentant la concentration en sel dans la phase dispersée à 0.5M (émulsion EM7). En Figure 2.27, la distribution en taille et le PDI de l'émulsion EM7 sont comparés à ceux de l'émulsion EM5. L'émulsion EM7 montre une évolution similaire au cours du temps à celle de l'émulsion EM5, il n'est donc pas nécessaire d'aller à ces concentrations en sel pour limiter le mûrissement.

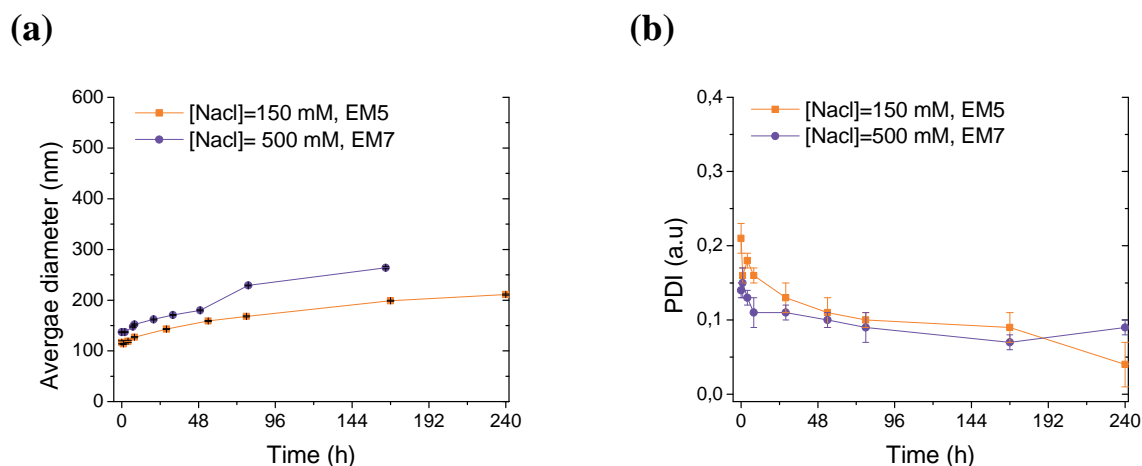


Figure 2.27 : Evolution de diamètre hydrodynamique (a) et de l'indice de polydispersité (b) au cours du temps en fonction de la concentration en NaCl dans la phase dispersée : $[NaCl]=150\text{ mM}$ (■) ; $[NaCl]=500\text{ mM}$ (●). Composition EM5 et EM7: **phase continue** : 8 wt% de Span 80 dans l'octane; **phase dispersée** : $\Phi=10\%$, solution aqueuse contenant $[HA-MA_2]=1.5\text{ wt\%}$, $[NaCl]=0.15M$ (EM5) ou $0.5M$ (EM7), $[Irgacure\ 2959]=0.05\%$.

(iii) Influence de la concentration en HA-MA

L'acide hyaluronique étant un polyélectrolyte, il pourrait également jouer le rôle d'agent osmotique. Nous avons examiné cette hypothèse en formulant une nouvelle émulsion (EM8) dont la phase dispersée contient une concentration en HA-MA de $C_p=3\text{ wt\%}$. Bien que l'évolution du diamètre hydrodynamique et du PDI de l'émulsion EM8 soit similaire à celle de l'émulsion EM5, contenant 1.5 wt% de HA-MA (Figure 2.28), cette évolution semble plus lente. Cependant, l'évolution du PDI ne semble pas affectée. Ainsi le HA-MA semble se comporter comme agent osmotique. Cependant, en comparant ces évolutions avec celles reportées en Figure 2.27, nous constatons que les différences restent minimales. Le sel a un rôle prépondérant d'agent osmotique limitant le mûrissement, et cet effet est légèrement accentué pour un C_p plus grand.

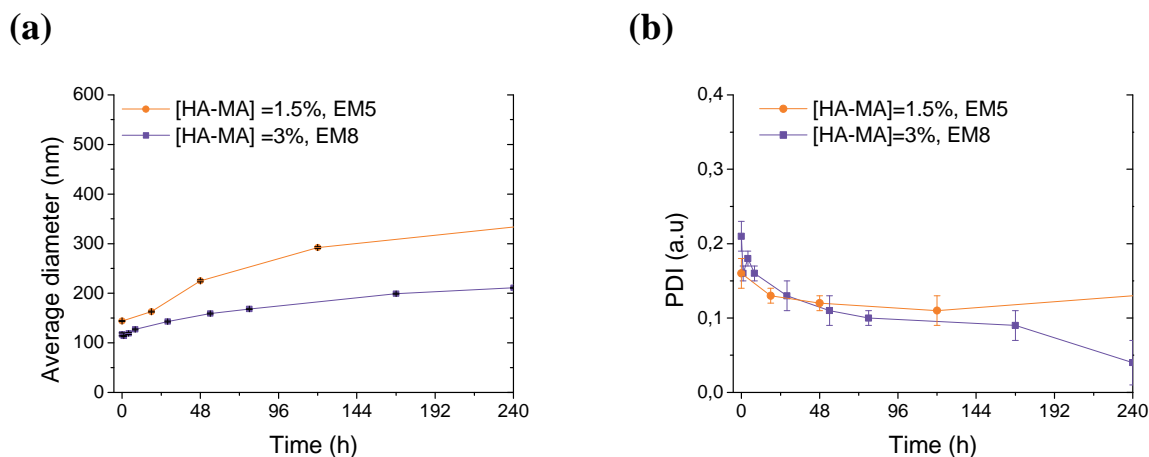


Figure 2.28 : Evolution du diamètre hydrodynamique (a) et de l'indice de polydispersité (b) au cours du temps en fonction de la concentration en HA-MA dans la phase dispersée : $C_p = 1.5 \text{ wt\%}$ (—●—) ; $C_p = 3 \text{ wt\%}$ (—■—). Composition EM5 et EM8 : **phase continue** : 8 wt% de Span 80 dans l'octane; **phase dispersée** : $\Phi = 10\%$, solution aqueuse contenant $[\text{HA-MA}_2] = 1.5 \text{ wt\%}$ (EM5) ou 3 wt\% (EM8), $[\text{NaCl}] = 0.15\text{M}$, $[\text{Irgacure 2959}] = 0.05 \%$.

(iv) Evolution sur de plus longues échelles de temps

L'évolution de l'émulsion EM5 a également été suivie sur de plus longues échelles, allant jusqu'à la quinzaine de jours. La Figure 2.29 reporte cette évolution par suivi du diamètre hydrodynamique et du PDI sur cette échelle de temps. On constate que cette évolution se découpe en deux parties. Dans un premier temps, la taille de l'émulsion augmente continuellement au cours du temps alors que le PDI tend à diminuer (régime de mûrissement). Dans un deuxième temps, le PDI et la taille de l'émulsion augmente. Ce deuxième régime s'apparente à de la coalescence. Rappelons que la coalescence résulte de la fusion des gouttes entre elles. Ce phénomène met en jeu la rupture du film interfacial entre deux gouttes adjacentes, et se produit de façon statistique. Une grosse goutte de surface plus grande aura plus de chances de coalescer qu'une petite goutte. Ainsi, l'écart de taille entre les grosses gouttes et les petites se creuse, ce qui a pour effet d'élargir la distribution en taille. Toutefois, on constate que la coalescence au sein des émulsions de HA-MA apparaît sur des temps très longs, ou du moins bien supérieurs au moment de l'étape suivante, la photopolymérisation.

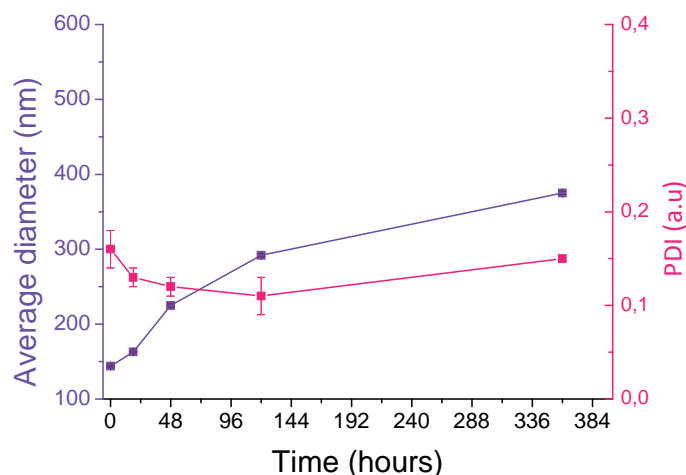


Figure 2.29 : Evolution du diamètre hydrodynamique et du PDI de l'émulsion EM5 sur des temps longs. Composition EM5 : **phase continue** : 8 wt% de Span 80 dans l'octane; **phase dispersée** : $\Phi=10\%$, solution aqueuse contenant $[HA-MA_2]=1.5$ wt%, $[NaCl]=0.15M$, $[Irgacure\ 2959]=0.05$ %.

Ainsi, les émulsions préparées par homogénéisation haute pression sont suffisamment stables, et possèdent les tailles des nanoréacteurs recherchées pour la fabrication de nanogels de HA-MA.

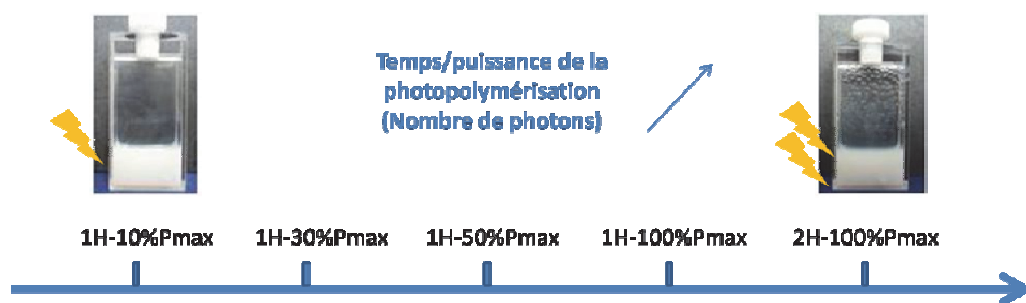
III.2.2. Photopolymérisation

III.2.2.1 Essais réalisés et caractéristiques granulométriques

En section III.1.2, nous avons montré que les émulsions formulées aux US ne résistaient pas aux fortes puissances d'irradiation. Cette observation a donc été examinée dans le cas des émulsions formulées par homogénéisation à haute pression. L'émulsion EM5 a été photopolymérisée en variant progressivement les conditions en temps-puissance d'irradiation, de 1H-10% Pmax à 2H-100% Pmax. Chaque lot (2.3 mL) a été irradié suivant le protocole détaillé en partie expérimentale. Une agitation constante a été maintenue tout au long de l'irradiation afin d'obtenir une réticulation homogène des gouttes. Les différentes conditions appliquées sont résumées en (Figure 2.30 a). Les vues macroscopiques des émulsions irradiées 1H-10% Pmax et 2H-100% Pmax sont également reportées. On constate qu'à faible puissance d'irradiation, l'émulsion EM5 conserve un aspect blanc translucide, bien que légèrement plus turbide. De façon surprenante, les lots irradiés à plus forte puissance affichent les mêmes caractéristiques macroscopiques comme le témoigne le lot 2H-100%. Ces observations indiquent que l'émulsion reste stable sous UV, en particulier stable sous forte

irradiation. Nous avons également vérifié la stabilité des lots irradiés par mesure du diamètre hydrodynamique par DLS (Figure 2.30 b). L'émulsion avant irradiation affiche une distribution en taille centrée autour de 130 nm avec un PDI=0.18. Après irradiation à faible puissance, cette distribution est presque identique avec une légère augmentation du diamètre hydrodynamique à 140 nm. Pour les plus fortes puissances, le diamètre hydrodynamique augmente et la distribution en taille devient plus étroite. Ces observations témoignent d'un vieillissement de l'émulsion sous l'effet de l'irradiation. Cependant, la distribution en taille de chaque lot reste monomodale à l'image des observations macroscopiques.

a)



b)

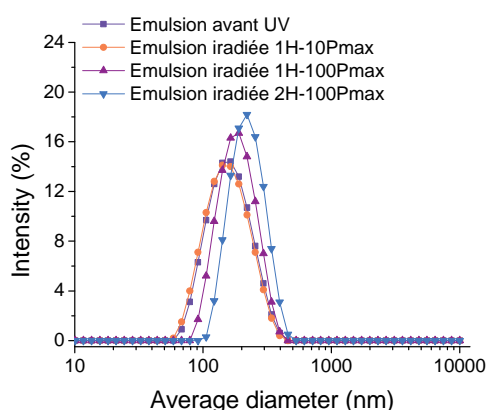


Figure 2.30 : a) Conditions de photopolymérisation testées et vues macroscopiques associées. b) Distribution en taille de l'émulsion EM5 avant irradiation (■) et après irradiation sous UV ; Conditions d'irradiation: 1H-10% Pmax (■), 1H-100% Pmax (■) et 2H-100% Pmax (■).

Ainsi, le confinement du précurseur de HA-MA après irradiation sous UV est préservé.

III.2.2.2 Caractéristiques microscopiques

Les objets ont également été caractérisés d'un point de vue morphologique, par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et à Transmission (TEM). Dans un premier temps, les objets sont maintenus en suspension dans la phase organique, qui est purifiée du tensioactif par plusieurs cycles de centrifugation – redispersion dans le cyclohexane. La Figure 2.31 affiche les clichés obtenus après séchage d'un aliquot de la dispersion, déposé sur

le support de microscopie. Les particules obtenues sont sphériques et relativement uniformes, avec une taille inférieure à la centaine de nanomètres.

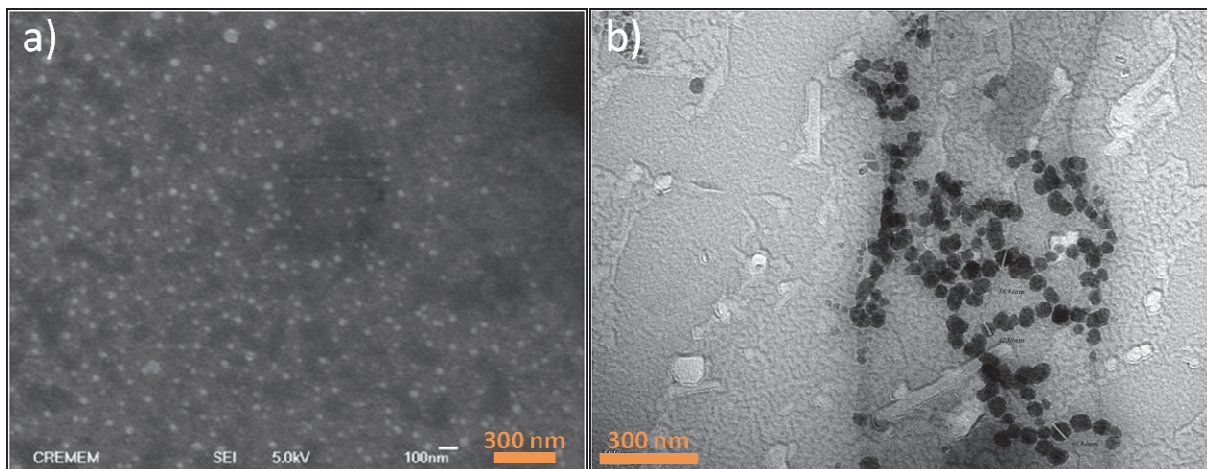


Figure 2.31 : Clichés de a) MEB et b) TEM, obtenus pour des particules dans le cyclohexane. Conditions : HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, C_p=3 wt%, irradiation sous UV 1H-100% Pmax.

III.2.3. Purification des nanogels et redispersion en milieu aqueux

III.2.3.1 Purification par élimination du tensioactif et évaporation de l'huile

Afin de purifier les nanogels de la phase continue, le même protocole que celui détaillé en section III.1.3.1, Figure 2.16, a été appliqué. Chaque lot (irradié à une puissance variable) a été centrifugé, puis deux lavages à l'hexane ont été effectués. Le culot final, après évaporation de l'hexane est redispersé dans l'eau ultrapure. Les nanogels ainsi purifiés sont analysés en détail d'un point de vue granulométrique et morphologique. A titre d'exemple, la Figure 2.32 reporte les caractéristiques des nanogels photopolymérisés 2H-100% Pmax, après purification de l'huile (Figure 2.32 a), nanogels en culot), et redispersion dans l'eau (Figure 2.32 b) et c), nanogels dispersés). Avant l'étape de redispersion finale, on observe la formation d'un culot translucide aux reflets bleutés, indiquant la présence de particules uniformes et de taille nanométrique. Cette observation est vérifiée par la mesure du rayon hydrodynamique après redispersion dans l'eau, centré autour de 280 nm avec un PDI de 0.11. Les clichés de microscopie électronique montrent la présence de particules sphériques dont la taille relativement homogène oscille autour de 100 nm. La surface des particules observées est diffuse, caractéristique de structures molles à l'état sec. De plus, le cliché à plus fort grossissement indique que les nanogels ont tendance à coller entre eux.

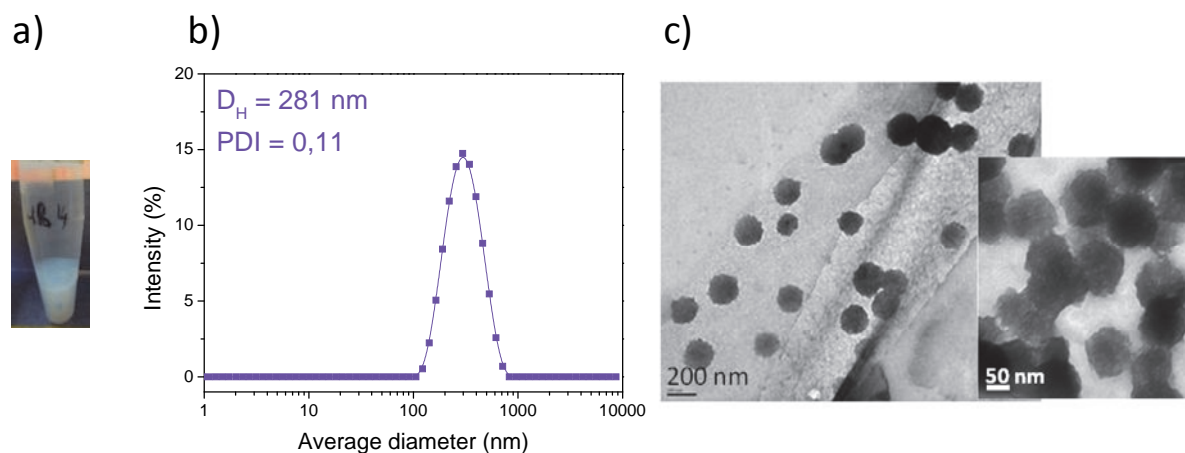


Figure 2.32 : Caractéristiques des nanogels de HA-MA irradiés pendant 2H, $P=100\%$ P_{max} après purification de la phase organique. a) nanogels en culot ; b) distribution en taille dans l'eau ; c) morphologies observées sur les clichés de TEM, en présence d'acétate d'uranyle comme agent de contraste.

Cependant, nos observations microscopiques ont été perturbées par:

- la présence d'agrégats (cf. section III.1.3.2, Figure 2.18 a).
- la fragilité des films aqueux déposés : de nombreuses cassures apparaissent lors de l'observation *in situ* (cf. section III.1.3.2, Figure 2.18 b).
- La difficulté à fixer les nanogels sur la grille de TEM (on les repère seulement sur les zones périphériques).

Ces divers problèmes indiquent qu'une espèce de meilleure affinité avec la grille qu'avec l'eau vient altérer la qualité des observations. Très certainement, les restes d'huile mal évaporés faussent l'étude systématique par microscopie TEM. Ainsi, bien que les émulsions formulées à l'homogénéisateur à haute pression soient plus stables, la purification de la phase organique reste une question récurrente.

III.2.3.2 Purification par précipitation au THF

Il convient alors de mentionner que le procédé de purification précédent est communément utilisé, notamment pour la préparation de nanogels de polysaccharide par (mini)émulsion inverse^{8, 50}, mais demeure très peu discuté du point de vue de la qualité des images de TEM. A titre d'exemple, rappelons l'étude de Park sur les nanogels de HA-SH⁵⁰. L'observation des nanogels est réalisée par microscopie à force atomique (AFM) mais seules quelques particules sont perceptibles. Nous avons alors étendu nos recherches expérimentales en considérant les études menées sur les nanogels de précurseurs synthétiques hydrophiles

(cf. chapitre 1). Parmi celles-ci, les études de Matyjaszewski sur la préparation de nanogels d'oligo(éthylène glycol) (OEOMA) de monoéthyl éther méthacrylate sont pertinentes^{51, 52}. Dans leurs études, un très large excès de THF est utilisé pour précipiter les nanogels confinés en émulsion. L'immiscibilité des polymères hydrophiles dans le THF, alors que l'huile et l'eau s'y solubilise permet de purifier complètement l'huile et les tensioactifs. Ainsi, une masse sèche est obtenue après centrifugation finale et purification des traces de THF résiduelles.

(i) *Méthode*

Nous avons adapté ce procédé aux nanogels de HA-MA selon le protocole expérimental dont les grandes lignes sont décrites en Figure 2.33. Un excès de THF (ratio 4/1 THF/émulsion) est ajouté à la dispersion (a). Le mélange, devenu transparent, est centrifugé pendant 60 min à 16058 g (b) puis le surnageant est retiré. Les lavages sont réitérés 4 fois puis, après retrait du surnageant, les traces de THF sont évaporées sous vide (d). Enfin, les nanogels secs sont redispersés en milieu aqueux à faible agitation pendant 12 heures (e).

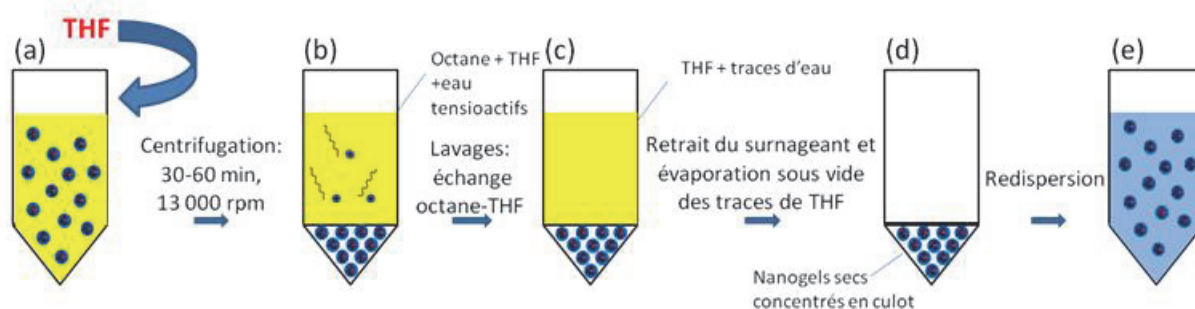


Figure 2.33 : Procédé adopté pour la purification des nanogels de HA-MA. L'ajout d'un excès de THF (a) permet de précipiter les nanogels en culot après centrifugation (b). Les cycles de lavages sont réitérés 4 fois (c) puis les traces de THF sont séchées sous vide (d). Les nanogels secs sont redispersés en milieu aqueux à faible agitation pendant 12 h (e).

(ii) *Résultats obtenus*

Nous avons observé que la plupart des culots se redispersaient dans l'eau, à l'exception des lots irradiés pendant 1H à des puissances intermédiaires, i.e. 30% et/ou 50% de la puissance maximale. Comme illustré en Figure 2.34, dans ces conditions particulières, la masse sèche récupérée gonfle légèrement en milieu aqueux mais demeure sous forme de gel macroscopique, insoluble dans l'eau. Nous avons émis l'hypothèse que les nanogels partiellement polymérisés continueraient de réagir entre eux lors de la précipitation, du fait de leur proximité. Un macrogel chimique de nanogel serait alors obtenu.

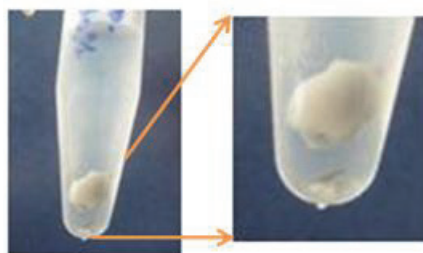


Figure 2.34 : « Dispersion » résultant de l'émulsion EM5, irradiée pendant 1H à une puissance $P=30\% P_{max}$.

Les nanogels se redispersant en milieu aqueux (conditions 1H-10%, 1H-100% et 2H-100% de la puissance maximale) ont été analysés à l'état sec, en présence d'agent de contraste, par TEM (Figure 2.35). A titre d'exemple, les caractéristiques microscopiques des nanogels photopolymérisés 1H-10% P_{max} (Figure 2.35 a) et 2H-100% P_{max} (Figure 2.35 b) sont reportées. La qualité des films déposés sur la grille de carbone permet une bonne observation des nanogels pour chaque condition d'irradiation. Ainsi, des particules sphériques, uniformes en taille et de contour diffus, sont observées. Leur aspect est typique de nanogels à l'état sec. Le contour diffus des structures semble particulièrement prononcé pour les nanogels irradiés 1H-10% P_{max} , indiquant peut-être une plus faible densité électronique que les nanogels irradiés 2H-100% P_{max} .

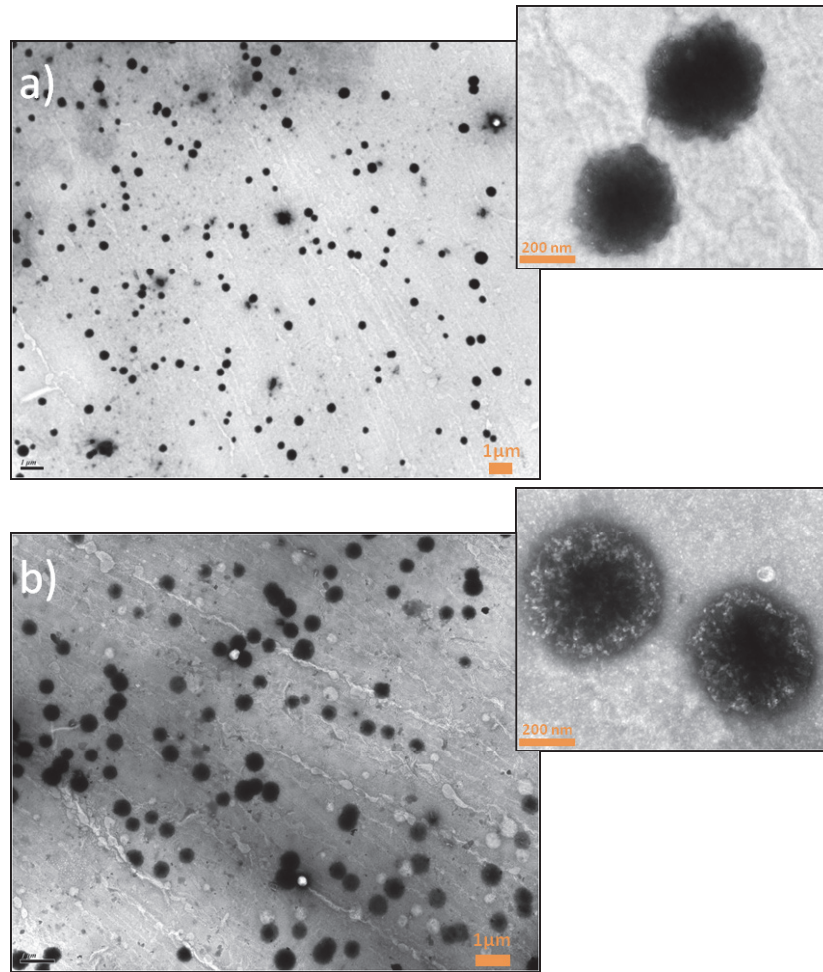


Figure 2.35 : Clichés de TEM des nanogels de HA-MA à l'état sec, résultant d'une irradiation sous UV: a) à 1H-10% de la puissance maximale de la lampe, b) à 2H-100% de la puissance maximale de la lampe. Présence d'acétate d'uranyle comme agent de contraste.

Les nanogels ont également été observés en Microscopie à Force Atomique (AFM) Comme illustré en Figure 2.36, les nanogels affichent une structure sphérique pleine de 200 nm de diamètre, dont la hauteur atteint 3 nm.

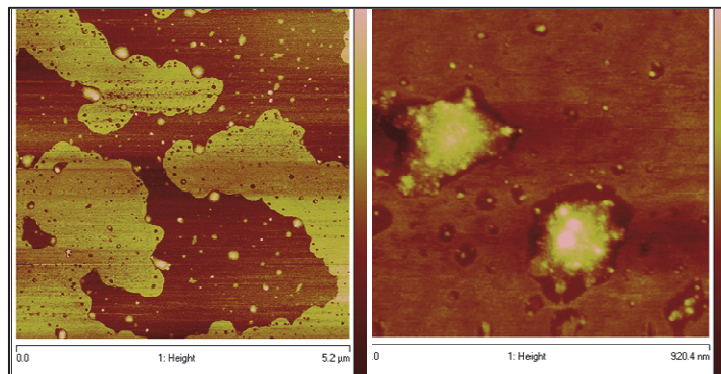


Figure 2.36 : Clichés AFM des nanogels de HA-MA₃, 100 kDa, DM=0.4, photopolymérisés 1H-100% Pmax.

IV. Comportement des nanogels en solution- Contrôle de la photopolymérisation

IV.1. Présentation de l'étude

Par application du procédé de fabrication décrit en section III.2, plusieurs séries de nanogels ont été préparées. Les paramètres tels que le degré de méthacrylation, la masse molaire et la concentration du précurseur ont été variés. Afin de visualiser l'étude globale, les caractéristiques de chaque lot sont résumées dans le Tableau 2.5. L'influence de chacun de ces paramètres sera discutée dans la section V. Cette section est dédiée à analyser le comportement en milieu aqueux des nanogels préparés afin de le relier aux conditions d'irradiation sous UV testées. Notons que les conditions de photopolymérisation intermédiaires (1H-30%, 1h-50% de la puissance maximale de la lampe) ont été abandonnées puisque la plupart des nanogels ne sont pas redispersibles (cf. III.2.3.2 (ii)).

Tableau 2.5 : Bilan des nanogels préparés en fonction du précurseur utilisé et des conditions de photopolymérisation appliquées. Diamètres hydrodynamiques correspondants à l'émulsion avant et après photopolymérisation, et aux nanogels dans l'eau et dans l'eau salée.

Nanogel	Numéro Emulsion	Caractéristiques Précurseur		Pression MF (kPa)	Conditions de Photopolymérisation (temps-puissance)	D _H ^b émulsion (nm)		D _H ^b Nanogels (nm)		
		M _w (kDa)	DM ^a C _p (wt%)			avant UV	après UV	dans l'eau	dans l'eau salée	
1	EM5	100	0.25	1.5	400	1H-10%Pmax	135±2	144±1	804±23	381±20
						1H-100%Pmax	135±2	174±1	435±40	297±26
2	EM8	100	0.25	3.0	400	2H-100%Pmax	150±2	211±1	402±7	327±56
						1H-10%Pmax	142±1	135±1	796±68	495±25
3	EM9	100	0.15	1.5	400	1H-100%Pmax	145±2	154±1	452±63	391±42
						2H-100%Pmax	142±1	185±2	447±107	297±43
4	EM10	100	0.40	1.5	400	1H-10%Pmax	130±1	143±2	884±57	592±57
						1H-100%Pmax	125±1	185±1	568±82	508±76
5	EM11	200	0.3	1.5	400	2H-100%Pmax	140±1	236±2	526±37	473±47
						1H-10%Pmax	130±1	154±1	655±34	370±14
6	EM12	20	0.16	1.5	400	1H-100%Pmax	150±1	219±1	376±15	223±34
						2H-100%Pmax	140±1	247±2	311±13	184±25
5	EM11	200	0.3	1.5	400	1H-10%Pmax	170±1	183±2	866±27	424±21
						1H-100%Pmax	159±3	277±5	355±20	287±31
6	EM12	20	0.16	1.5	400	2H-100%Pmax	132±3	306±2	373±21	275±14
						1H-10%Pmax	129±1	138±1	426±26	394±32
6	EM12	20	0.16	1.5	400	1H-100%Pmax	139±1	219±1	430±48	383±60
						2H-100%Pmax	130±1	247±2	408±31	417±69

^a : Degré de méthacrylation déterminé par ¹H-RMN ; ^b Diamètre hydrodynamique mesuré par DLS.

IV.2. Comportement en solution

IV.2.1. Influence des conditions de photopolymérisation sur les propriétés des nanogels

Les nanogels étant des structures poreuses et fortement hydratées, leurs propriétés en solution reflètent le degré de gonflement et la réticulation du réseau. Nous avons évalué ces propriétés par mesure du diamètre hydrodynamique des nanogels dans l'eau. Pour chaque condition d'irradiation, celui-ci a été systématiquement comparé au diamètre hydrodynamique de l'émulsion matricielle, avant et après photopolymérisation. Pour le précurseur HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, Cp=1.5 wt%, la Figure 2.37 compare ces trois distributions pour les conditions d'irradiation respectives, 1H-10% Pmax (a), 1H-100% (b) et 2H-100% (c). Afin d'approfondir l'analyse, tous les diamètres hydrodynamiques sont rassemblés en Figure 2.37 d). Pour chaque condition, la distribution de taille des nanogels, confinés dans les gouttes après photopolymérisation, et après redispersion dans l'eau reste monodisperse. Cette observation, en accord avec les observations par microscopie TEM, constitue une nette amélioration par rapport aux observations sur les nanogels formulés par miniémulsion par ultrasons. Pour chaque condition d'irradiation en temps-puissance, le diamètre hydrodynamique des nanogels dans l'eau est bien supérieur à celui de l'émulsion matricielle, avant et après photopolymérisation. Cette divergence de taille indique que lorsque les nanogels sont confinés en émulsion, leur gonflement est perturbé par le volume restreint des gouttes. C'est seulement après rupture de l'émulsion qu'ils gonflent jusqu'à leur état d'équilibre dans l'eau.

En outre, alors que la taille de l'émulsion avant photopolymérisation reste à peu près constante, on observe que l'augmentation du temps et de la puissance de photopolymérisation ont un effet :

- 1) Le diamètre hydrodynamique de l'émulsion matricielle après photopolymérisation (nanogels confinés) croît.
- 2) Le diamètre hydrodynamique des nanogels dans l'eau décroît.

Cependant, la différence de ces deux diamètres diminue avec l'augmentation du temps-puissance de photopolymérisation. Ces tendances antagonistes montrent que l'influence des conditions de photopolymérisation sur le diamètre des nanogels n'a pas de lien avec leur confinement en émulsion. Au contraire, le diamètre hydrodynamique des nanogels traduit leur

gonflement dans l'eau. Celui-ci tend vers un état d'équilibre qui est régi par les lois physico-chimiques du gonflement. Ainsi, comme énoncé en chapitre 1, le gonflement dépend principalement de trois facteurs :

- l'affinité polymère solvant
- la densité de réticulation
- la densité de charge sur le polymère et les forces ioniques du milieu.

Dans le cas de la photopolymérisation, il est vraisemblable que la réticulation change au cours de l'avancement de la polymérisation radicalaire des méthacrylates. Ainsi, nous allons vérifier cette hypothèse en examinant le comportement en milieu salé ($[\text{NaCl}] = 0.15 \text{ M}$). Des analyses complémentaires en RMN du proton viendront conforter cette hypothèse.

Le lien direct entre la taille des nanogels et leur taux de gonflement est confirmé par la mesure du diamètre hydrodynamique des nanogels en conditions salines ($[\text{NaCl}] = 0.15\text{M}$). En effet, la Figure 2.37 d) montre que le diamètre des nanogels dans l'eau salée est toujours plus faible que dans l'eau ultrapure. Il est bien connu que le taux de gonflement d'hydrogels faits de polyélectrolytes peu chargés tel que le HA est moindre en solution électrolytique qu'en milieu désionisé. L'état de gonflement de ces réseaux est gouverné par la pression osmotique exercée par les contre-ions mobiles, présents à l'intérieur *versus* à l'extérieur de la matrice. En solution électrolytique, la différence de pression osmotique est moins marquée, et le réseau est de taille plus faible que dans l'eau pure. Par conséquent, son taux de gonflement diminue (passage d'un réseau chargé à « non chargé »). Cette tendance s'applique aux nanogels de HA-MA, indiquant une variation du diamètre hydrodynamique en accord avec leur taux de gonflement.

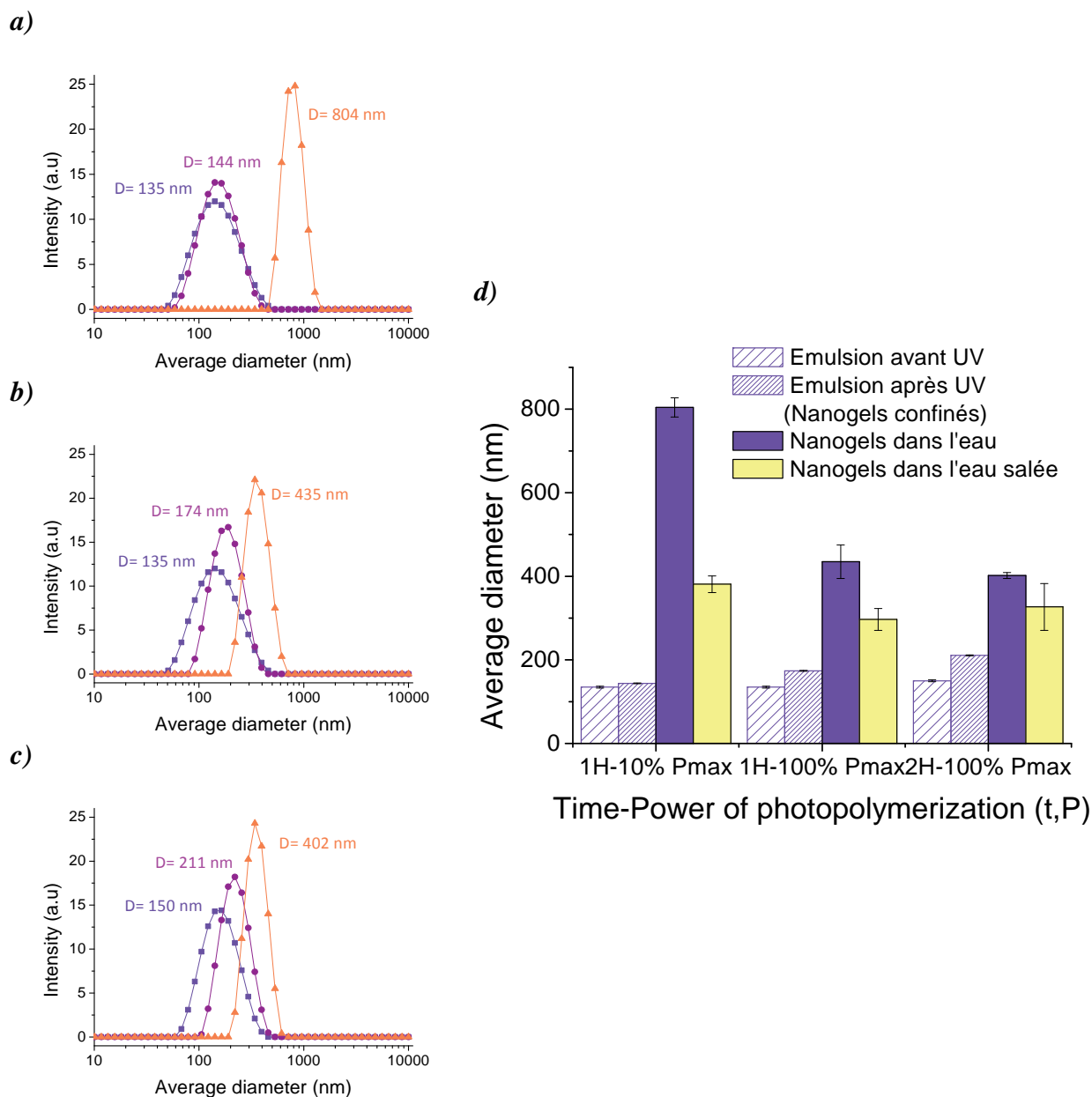


Figure 2.37 : Distributions en taille des émulsions avant irradiation (■), après irradiation (●) et après redispersion dans l'eau des nanogels résultants (▲). Conditions d'irradiation : a) 1H-10% de la puissance maximale ; b) 1H-100% de la puissance maximale ; c) 2H-100% de la puissance maximale. d) Bilan : évolution de la taille de l'émulsion (avant et après photopolymérisation) et des nanogels redispersés en milieu aqueux et salin en fonction des conditions de photopolymérisation pour le précurseur HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, C_p=1.5 wt%.

Ces tendances ont également été observées:

- Pour une **concentration en macromère** dans la phase dispersée de C_p=3 wt%. En Figure 2.38, les caractéristiques de l'émulsion avant et après photopolymérisation, et des nanogels

dispersés dans l'eau pour chaque condition d'irradiation pour le précurseur HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, C_p= 3wt% sont reportées.

- Pour les précurseurs de **degré de méthacrylation** variable, avec M_w=100 kDa et C_p=1.5 wt% (Figure 2.39). Il convient de souligner que pour le précurseur de DM=0.40 la taille des nanogels redispersés dans l'eau salée atteint celle de l'émulsion après photopolymérisation.
- Pour le précurseur HA-MA₄ de **masse molaire** proche M_w=200 kDa, DM=0.30, C_p=1.5 wt% (Figure 2.40). Pour les nanogels résultant du précurseur HA-MA₅, 20 kDa, DM=0.16, les tendances seront discutées en section V.3.

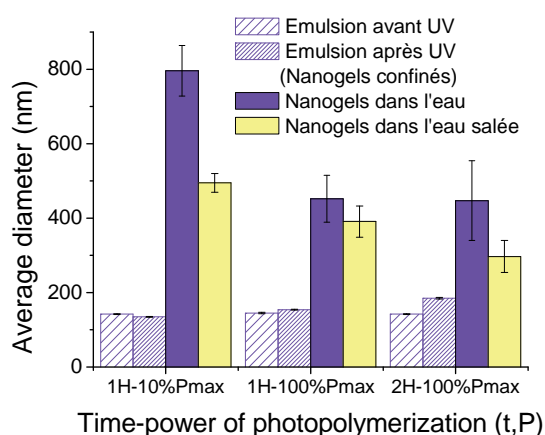
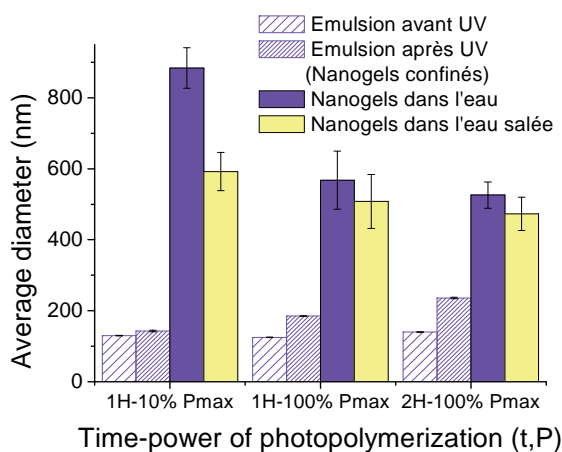


Figure 2.38 : Résumé de l'évolution de la taille de l'émulsion (avant et après photopolymérisation) et des nanogels redispersés en milieu aqueux et en milieu salin en fonction des conditions de photopolymérisation pour le précurseur HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, C_p=3 wt%.

a) DM=0.15



b) DM=0.40

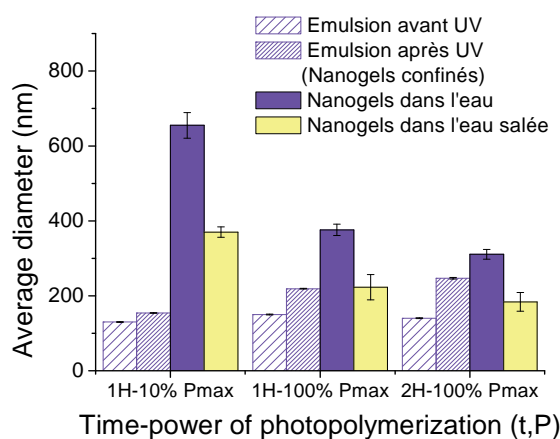
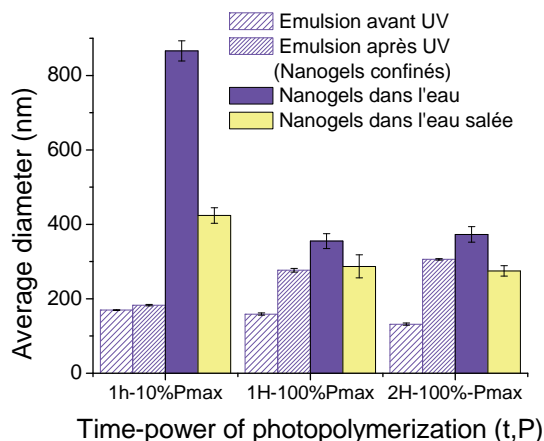


Figure 2.39 : Résumé de l'évolution de la taille de l'émulsion (avant et après photopolymérisation) et des nanogels redispersés en milieu aqueux et en milieu salin en fonction des conditions de photopolymérisation pour : a) le précurseur HA-MA₁, 100 kDa, DM=0.15, C_p=1.5 wt% ; b) le précurseur HA-MA₃, 100 kDa, DM=0.40, C_p=1.5 wt%.

Figure 2.40 : Résumé de l'évolution de la taille de l'émulsion (avant et après photopolymérisation) et des nanogels redispersés en milieu aqueux et en milieu salin en fonction des conditions de photopolymérisation pour le précurseur HA-MA₄, 200 kDa, DM=0.30, C_p=1.5 wt%.



IV.2.2. Commentaires sur les conditions de photopolymérisation intermédiaires

Comme reporté en Figure 2.34, les lots irradiés dans les conditions intermédiaires affichent un comportement particulier, avec la présence d'un macrogel en culot. Nous avons néanmoins analysé le reste de la solution contenant ce bloc (Figure 2.41). L'analyse par DLS nous prouve que des nanogels sont contenus dans ce milieu. Ces nanogels ont des propriétés semblables à celles de leurs homologues polymérisés dans des conditions différentes. On voit alors que ces conditions permettent d'obtenir des nanogels avec des propriétés modulées finement. La présence du bloc pose tout de même la question de la fraction des nanogels qui se récupère. Nous aborderons ce point ultérieurement.

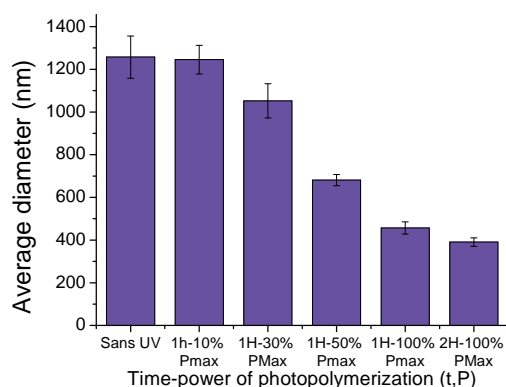


Figure 2.41 : Evolution du diamètre hydrodynamique des nanogels redispersés dans l'eau ([HA-MA]= 3g/L), en fonction de la puissance et du temps de photopolymérisation. Pour les conditions intermédiaires de 1H-30% Pmax et 1H-50% Pmax, seule la dispersion surnageant le bloc macroscopique a été analysée.

IV.2.3. Notion de taux de gonflement

Nous avons évalué les taux de gonflements Q des différents lots, en utilisant l'équation suivante:

$$Q = \left\{ \frac{D_{H(\text{solution aqueuse})}}{D_{H(\text{particules sèches})}} \right\}^3 \quad (\text{Équation 2.3})$$

Où $D_{H(\text{solution aqueuse})}$ est le diamètre hydrodynamique à l'état gonflé, et $D_{H(\text{particules sèches})}$ celui à l'état sec. En prenant l'hypothèse que chaque goutte d'émulsion donne lieu à un nanogel, il est possible d'estimer le diamètre à l'état sec $D_{H(\text{particules sèches})}$ de chaque nanogel. Nous connaissons la masse de polymère au sein de chaque goutte puisque nous connaissons la concentration en polymère dans la phase aqueuse. On en déduit la masse sèche de chaque particule. Connaissant la masse volumique du HA ($\rho = 1.6 \text{ g/m}^3$ ³⁵), on en déduit le volume, puis le rayon des particules à l'état sec. Ainsi, un rayon de 43 nm a été estimé, ce qui corrobore les tailles à l'état sec des nanogels confinés visualisés par MEB et TEM (cf. Figure 2.31).

Par application de l'équation 2.3, les taux de gonflement ont ensuite été évalués et sont reportés en Tableau 2.6. Ceux-ci oscillent entre 94 à 3120 en fonction des conditions de polymérisation appliquées, et sont en accord avec les ordres de grandeur obtenus pour les macrogels⁵³.

Tableau 2.6 : Taux de gonflement des nanogels dans l'eau. Conditions : HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, C_p= 3 wt.%.

Conditions de photopolymérisation (t,P)	Diamètre des nanogels dans l'eau (nm)	Diamètre des particules sèches (nm)	Taux de gonflement
Sans UV	1257	86	3120
1H-10% Pmax	1245	86	3030
1H-30% Pmax	1052	86	1830
1H-50% Pmax	681	86	500
1H-100% Pmax	457	86	150
2H-100% Pmax	391	86	94

IV.2.4. Difficultés rencontrées lors de la caractérisation

Bien que la DLS reste un outil privilégié pour mesurer la taille de particules, elle présente quelques particularités quand il s'agit de l'utiliser pour les nanogels. En effet, les dimensions de ces objets doivent être impérativement mesurées *in situ* (en solution),

puisque'ils sont constitués d'eau + polymère. Cette particularité les rend aussi difficiles à analyser car leur diffusion est faible. En effet, la diffusion de lumière provient du contraste d'indice optique entre l'objet et le milieu dispersant. Dans le cas des nanogels, ce contraste est faible, d'autant plus faible que les nanogels sont gonflés. Ainsi, afin de garantir la reproductibilité des mesures, il est nécessaire d'utiliser des quantités de nanogels parfois élevées. Nous discuterons ci-dessous de l'impact de cette concentration sur les mesures. Les distributions typiques des émulsions diluées avant et après photopolymérisation, et des nanogels dilués dans l'eau sont reportées pour chaque condition d'irradiation en temps et en puissance en Figure 2.42 a)-c). La distribution en taille des nanogels, confinés avant et après photopolymérisation, et après redispersion dans l'eau reste monodisperse à ces dilutions. En outre, les tendances des diamètres hydrodynamiques correspondants sont encore observées pour chaque condition d'irradiation et confortent ainsi les mesures précédentes.

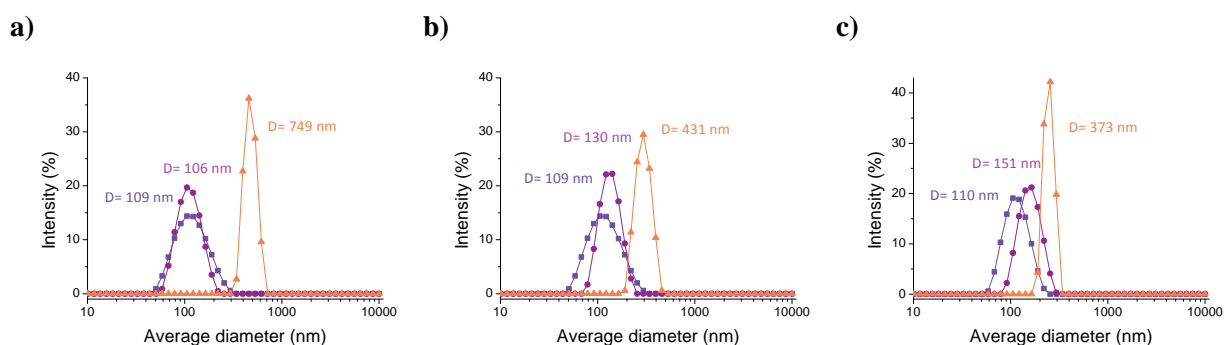


Figure 2.42 : Distributions en taille des émulsions diluées ($\Phi=0.2\%$) avant irradiation (\blacksquare) et après irradiation (\bullet), et des nanogels résultants dilués ($C_p=0.1$ g/L) après redispersion dans l'eau (\blacktriangle). Conditions d'irradiation : a) 1H-10% de la puissance maximale ; b) 1H-100% de la puissance maximale ; c) 2H-100% de la puissance maximale.

IV.3. Contrôle de la réticulation par les méthacrylates

Afin d'identifier précisément l'influence de la puissance d'irradiation (nombre de photons incidents) sur la structure des nanogels, nous avons conduit une étude systématique par ^1H -RMN sur les lots de nanogels issus des différents précurseurs, et ce pour chaque condition d'irradiation (aussi les conditions intermédiaires). Les spectres ^1H -RMN des nanogels ont été enregistrés après leur lyophilisation et redispersion dans l'eau deutérée.

IV.3.1. Taux de conversion des méthacrylates

Sur les spectres reportés en Figure 2.43, les pics correspondant aux méthacrylates à 5.8 et 6.2 ppm (cf. pointés en a et b) disparaissent au fur et à mesure que les conditions d'irradiation augmentent. Qualitativement, cela indique que l'avancement de la réaction de polymérisation augmente progressivement. Cette analyse est confirmée par l'apparition d'un pic supplémentaire à 0.9 ppm (pointé en c) et d'un massif entre 1.1 à 1.7 ppm (pointé en d), qui progressent avec les conditions d'irradiation croissantes : ces signatures sont attribuables respectivement à un CH₂ et à 6 protons des CH₃ des méthacrylates polymérisés. Cette attribution semble en accord avec les études sur les p-NIPAM⁵⁴. A travers cette étude, nous mettons donc en évidence que la réticulation progresse en fonction des conditions d'irradiation. A 1H-100%, les méthacrylates ont disparu et se sont transformés en nœuds de réticulation. Le pic pointé à 8.5 ppm (pointé en e) sera commenté dans le paragraphe suivant (IV.3.2).

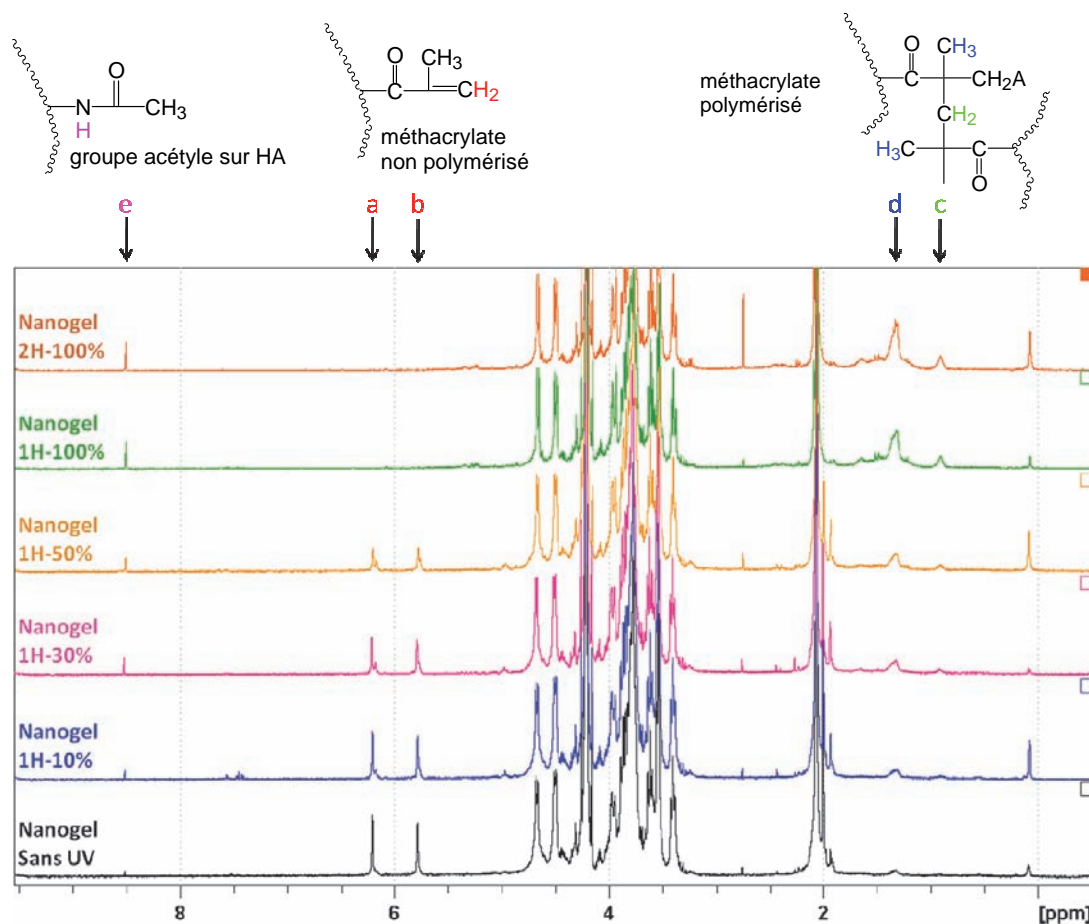


Figure 2.43 : Spectres ¹H-RMN des nanogels non irradiés sous UV), et irradiés à des temps-puissance variables. Précurseur : HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, Cp=3 wt.% ; conditions : 256 scans, T=80°C, C=6g/L.

Nous avons intégré chacun de ces pics (a, b, c et d) en les calibrant par rapport à ceux des protons anomériques à 4.4 et 4.5 ppm. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 2.7, et s'accompagne des mesures DLS. L'intégration des pics de méthacrylates non polymérisés à 5.8 ppm et 6.2 ppm décroît avec les conditions de photopolymérisation tandis que celle des méthacrylates polymérisés à 1.3 ppm augmente.

Tableau 2.7 : Intégrations relatives des différents pics caractéristiques pour les nanogels de HA-MA. Le diamètre hydrodynamique dans le D₂O est également reporté. Conditions : HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, Cp= 3 wt% :

		Intégration pics a et b à 5.8 et 6.2 ppm ^b	Intégration pic d à 1.3 ppm ^b	Intégration pic c à 0.9 ppm ^b	Intégration pic e à 8.5 ppm ^b	Taux de conversion (%)	D _H (nm) ^a	PDI ^a
<i>Précurseur de HA-MA₂</i>	X	0.25	0	0	0	0	X	X
<i>Nanogels</i>	sans UV	0.31	0.79	0	0.05	0	1257 ± 99	0.32
	1H-10%Pmax	0.28	1.07	0.23	0.05	7	1245 ± 67	0.31
	1H-30%Pmax	0.26	1.24	0.21	0.06	20	1052 ± 80	0.36
	1H-50%Pmax	0.23	1.48	0.22	0.05	30	681 ± 26	0.27
	1H-100%Pmax	0	2.29	0.35	0.11	100	457 ± 29	0.37
	2H-100%Pmax	0	2.71	0.37	0.08	100	391 ± 20	0.34

^a Diamètre hydrodynamique et PDI des nanogels dans D₂O déterminé par DLS.

^b Déterminées par ¹H-RMN.

Le taux de conversion $\frac{x_0 - x}{x_0}$ a ensuite été calculé des intégrations trouvées pour les méthacrylates non polymérisés à 5.8 et 6.2 ppm. Pour x₀ l'intégration des nanogels non irradiés a été choisie. A noter qu'il se peut que ce choix sous estime les taux de conversion obtenus car on remarque une légère apparition du pic à 1.3 ppm pour les nanogels non photopolymérisés. Cependant, nous avons quand même choisi cette valeur pour x₀ car elle est de 6% supérieure à celle du précurseur de HA-MA. Malgré le soin apporté à l'acquisition des spectres, il peut y avoir une barre d'erreur sur les intégrations. La Figure 2.44 montre que le taux de conversion en méthacrylate augmente clairement avec le temps et la puissance de photopolymérisation jusqu'à atteindre 100% au bout d'1H-100% Pmax.

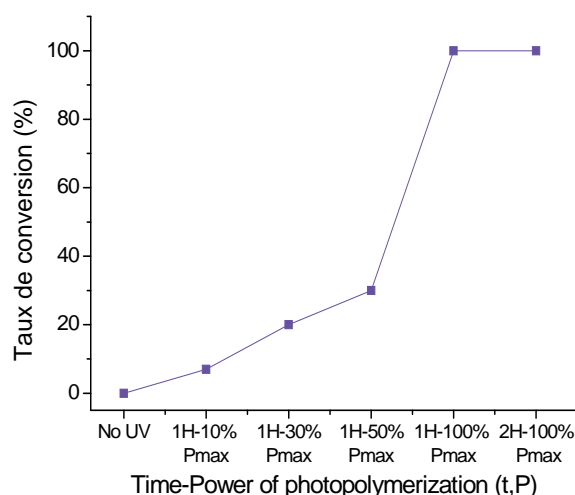


Figure 2.44 : Evolution du taux de conversion en méthacrylate des nanogels en fonction des conditions de photopolymérisation. Précurseur HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, Cp= 3 wt%.

D'après le Tableau 2.7 et la Figure 2.44, on voit clairement que le diamètre des nanogels diminue quand le taux de réticulation augmente, ce qui confirme que le taux de gonflement des nanogels diminue à cause de l'augmentation de leur réticulation.

IV.3.2. Effet du confinement

Sur les spectres ¹H-RMN en Figure 2.43, un pic étroit à 8.5 ppm apparaît et progresse au cours de l'avancement de la réaction. Ce pic correspond aux protons de l'amide sur le groupe acétyle (pointé en e). A faible taux de conversion, ce pic n'est pas visible car le proton s'échange avec le deutérium du solvant. En revanche, à plus fort taux de conversion, il est clairement distinct, et ce d'autant plus que le taux de conversion augmente, traduisant ainsi une perte de l'échange avec le deutérium. Nous avons également intégré ce pic (cf. Tableau 2.7). Malgré son augmentation relative, nous constatons que les valeurs restent faibles, largement inférieure à 1. Cela confirme qu'il s'agit d'un proton en échange avec le solvant. La perte d'échange au fur et à mesure par la réticulation progresse est une conséquence du confinement dans les nanogels. Ainsi, la spectroscopie RMN se révèle un outil capable de retranscrire l'effet de la structure des nanogels.

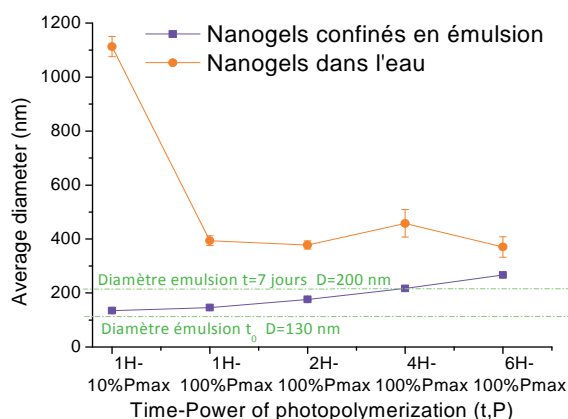
IV.3.3. *Avancement de la photopolymérisation dans une émulsion*

A travers cette étude RMN, nous avons montré que le temps d'irradiation et la puissance de la lampe permettaient de contrôler le taux de conversion en méthacrylate. Ce résultat n'est pas surprenant d'un point de vue qualitatif mais mérite quelques commentaires quant aux conditions d'irradiation utilisées ici. En effet, la puissance de la lampe que nous avons utilisée (entre 450 et 4500 mW/cm²) est largement supérieure à celle classiquement utilisée pour photopolymériser des macrogels (~ 50 mW/cm²)^{3, 32, 55}. Malgré cela, le temps d'irradiation utilisé est lui aussi long, comparé à un temps de quelques minutes reporté pour les macrogels de HA-MA. Ceci est lié à la turbidité de l'émulsion, qui, bien que la taille des gouttes d'émulsion soit nanométrique, ne contrebalance par la différence d'indice entre la phase dispersée et la phase continue (cf. section I.3). Dans le cas présent, nous avons estimé que l'émulsion utilisée absorbe 99% du rayonnement sur une distance de 1 cm. Selon la distance à la paroi, les gouttes ne reçoivent pas le même nombre de photons. Cependant, l'utilisation de l'agitation magnétique durant l'irradiation devrait permettre à toutes les gouttes de subir le même sort. L'utilisation d'une cellule plus fine devrait permettre de diminuer les conditions d'irradiation.

IV.3.4. *Limite de réticulation*

D'après les analyses RMN, il suffit d'une irradiation de 1H-100% Pmax pour atteindre un taux de conversion maximal (calculé des méthacrylates restants). Cependant, le taux de gonflement dans ces conditions s'est avéré supérieur à celui de l'échantillon irradié pendant 2H. Il semble donc que les données RMN permettent de sonder le taux de conversion mais des informations plus fines peuvent être extraites des mesures DLS. Cette affirmation est tout de même à nuancer car l'évolution du nombre de méthacrylates polymérisés (pic à 1.3 ppm) semble en augmentation continue, tout comme le pic de l'amide à 8.5 ppm. Afin de vérifier ces tendances, nous avons formulé une nouvelle série de nanogels en augmentant les conditions de photopolymérisation jusqu'à 6H-100% Pmax. Comme le montre la Figure 2.45 a), le taux de gonflement maximal des nanogels atteint un plateau au bout de 2H. Ces résultats sont confirmés par RMN du proton, au regard du taux de conversion mais encore une fois, l'évolution du massif à 1.3 ppm et le pic de l'amide à 8.5 ppm sont en perpétuelle augmentation.

a)



b)

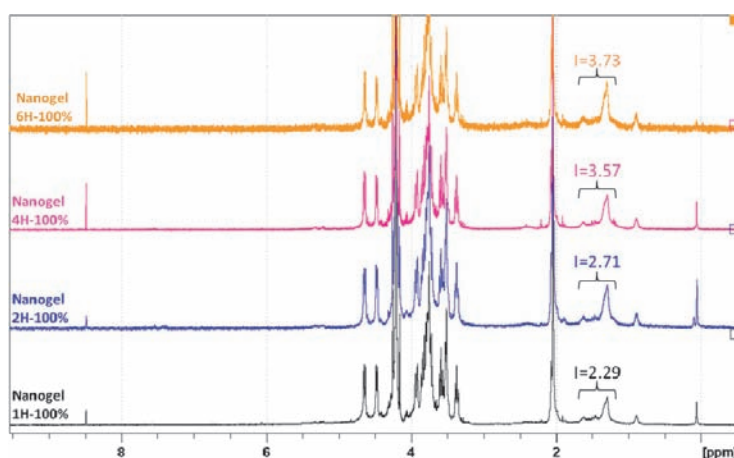


Figure 2.45 : a) Evolution du diamètre hydrodynamique des nanogels confinés en émulsion après photopolymérisation et après redispersion dans l'eau en fonction des conditions de photopolymérisation, jusqu'à 6H-100% Pmax. Précurseur : HA-MA 100 kDa, DM=0.25, $C_p=3$ wt.%. b) Spectres ^1H -RMN de ces nanogels, et intégrations des méthacrylates polymérisés. Conditions : 256 scans, $T=80^\circ\text{C}$, $C=6\text{g/L}$.

IV.4. Influence de la taille de l'émulsion matricielle

IV.4.1. Influence de l'état de l'émulsion sur la photopolymérisation

Comme évoqué en paragraphe précédent, nous avons observé que le gonflement atteint un plateau au bout de 2H mais que le vieillissement de l'émulsion aux UV demeure continu. Pour toutes ces expériences, les nanogels résultaient d'émulsions fraîchement préparés dont les tailles oscillent autour de 130 nm (moyenne réalisée sur 10 émulsions). Leur taux de gonflement dépend des conditions de photopolymérisation appliquées pour réticuler les gouttes.

Une autre façon de moduler les propriétés de gonflement est de moduler la taille initiale de l'émulsion matricielle. Dans cette optique, nous avons laissé l'émulsion EM5 fraîchement préparée vieillir au repos pendant 7 jours, $T=4^{\circ}\text{C}$. Comme le montre la Figure 2.46, la taille initiale de l'émulsion est de 127 nm ; elle augmente de 90 nm après 7 jours. De façon surprenante, l'émulsion pré-vieillie n'évolue pas sous l'effet de l'irradiation. Les deux émulsions ayant la même taille après irradiation, il n'est pas étonnant que les nanogels résultants aient la même taille. En revanche, cette expérience nous renseigne sur l'origine du vieillissement sous irradiation. Celui-ci semble avoir la même origine que le vieillissement de l'émulsion au repos. En effet, l'émulsion pré-vieille ayant atteint un plateau, elle n'évolue plus sous UV. Nous concluons que l'irradiation accélère le vieillissement par mûrissement. Ceci peut s'expliquer par la température légèrement élevée dans la cellule, mesurée jusqu'à 35°C lors de l'irradiation, alors que celle de l'émulsion au repos est de 4°C (émulsion stockée au réfrigérateur).

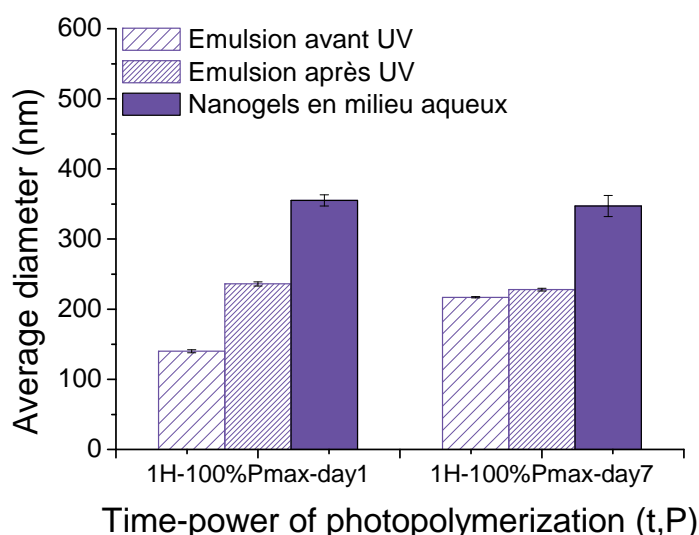


Figure 2.46 : Evolution des diamètres hydrodynamiques de l'émulsion avant et après photopolymérisation (mêmes conditions d'irradiation), et des nanogels correspondants après redispersion dans l'eau, pour une émulsion fraîchement préparée et laissée 7 jours au repos. Précurseur HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, C_p=1.5 wt%.

IV.4.2. Modulation de la taille des gouttes lors de la fabrication de l'émulsion

La taille des gouttes peut également être contrôlée par la pression au sein des canaux microfluidiques ou par le nombre de cycles de circulation de l'émulsion. Le dispositif dont nous disposons balaye une gamme de pression entre 200 kPa et 800 kPa. Nous avons fragmenté deux nouvelles émulsions à une pression de 300 kPa (EM13) et 800 kPa (EM14) respectivement. Pour les deux émulsions, nous n'avons pas obtenu de différence significative, comme en témoigne l'évolution du diamètre hydrodynamique au cours du temps de l'émulsion EM13 (Figure 2.47). Les nanogels obtenus ont les mêmes caractéristiques que ceux obtenus à P= 400 kPa.

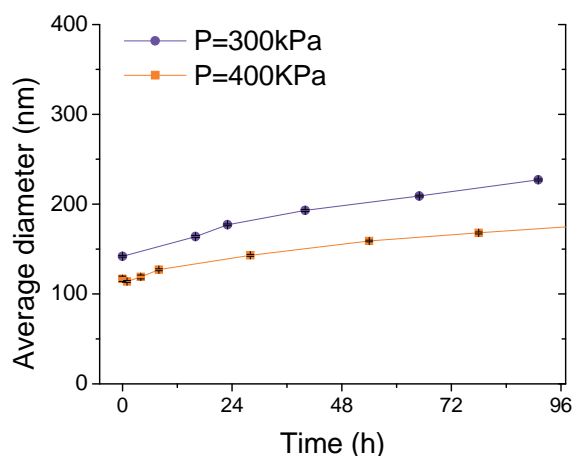


Figure 2.47 : Evolution du diamètre hydrodynamique de l'émulsion avant irradiation sous UV en fonction de la pression de l'homogénéiseur à haute pression. Composition : **phase continue** : 8 wt% de Span 80 dans l'octane; **phase dispersée** : $\Phi=10\%$, solution aqueuse contenant $[HA-MA_2]=1.5$ wt%, $[NaCl]=0.15M$, $[Irgacure\ 2959]=0.05\%$. Fragmentation à P= 400 kPa (EM5) ou P=300 kPa (EM13).

V. Contrôle du taux de gonflement des nanogels

Dans cette section, nous comparons l'influence de plusieurs paramètres sur les taux de gonflement des nanogels de HA-MA : soit des paramètres structuraux des nanogels, en modulant la structure des macromères (leur taux de méthacrylation, leur concentration et leur masse molaire), mais également des facteurs environnementaux comme le pH.

V.1. Contrôle du taux de gonflement via le DM

L'influence du degré de méthacrylation (DM) sur les propriétés de gonflement a été examinée. La quantité de méthacrylate présente sur la chaîne de HA détermine le nombre de points de réticulation potentiellement présents sur le réseau, et donc sa densité de réticulation. Nous avons comparé les propriétés de gonflement des nanogels résultant des macromères HA-MA₁ à HA-MA₃ entre eux. Ces trois précurseurs ont une masse molaire identique, mais leur degré de méthacrylation diffère, de 0.15 à 0.4. L'étude a été menée pour une concentration en macromère dans la phase dispersée de $C_p = 1.5$ wt%. Comme illustré en Figure 2.48 a), pour chaque condition en temps-puissance d'irradiation, le diamètre hydrodynamique des nanogels dans l'eau diminue lorsque le degré de méthacrylation augmente, indiquant une augmentation de la densité de réticulation avec les DM croissants. Cette tendance est également observée dans l'eau salée (Figure 2.48 b), bien que la taille des nanogels soit toujours plus faible que dans l'eau.

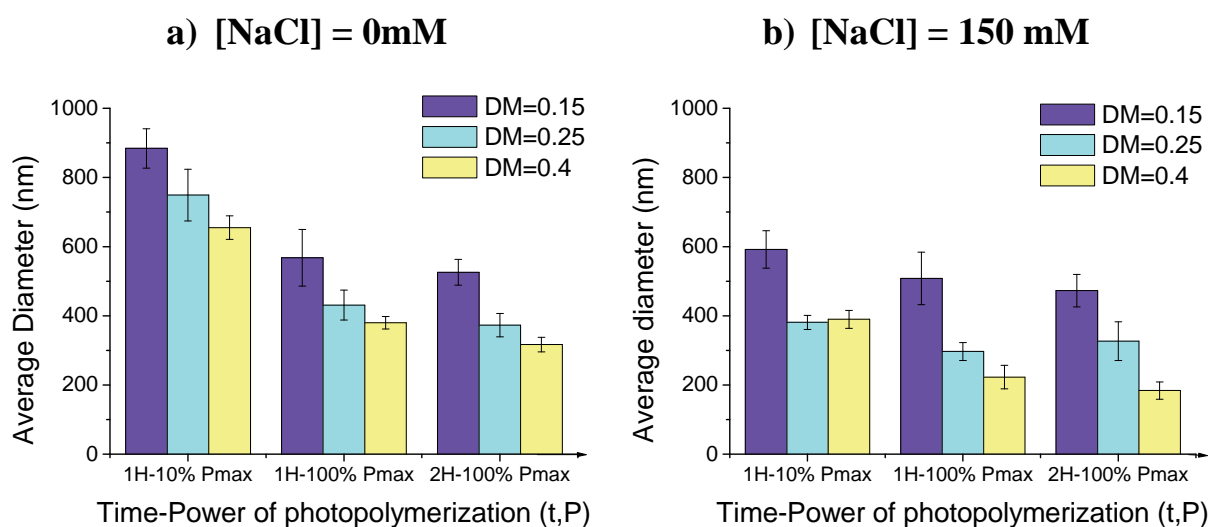


Figure 2.48 : Evolution du diamètre hydrodynamique des nanogels pour différents temps-puissance d'irradiation en fonction du degré de méthacrylation du précurseur de HA-MA ; mesures a) en milieu aqueux ; b) en milieu salin, $[NaCl]=0.15M$. Précurseurs HA-MA₁, HA-MA₂ et HA-MA₃, 100 kDa, DM=0.15, 0.25 et 0.40 respectivement, $C_p = 1.5$ wt%.

Cette étude montre que le taux de méthacrylation et le contrôle du taux de conversion *via* les conditions de photopolymérisation sont deux paramètres clés influant sur les propriétés de gonflement des nanogels de HA-MA.

V.2. Influence de la concentration en macromère C_p dans la phase dispersée

L'influence de la concentration en macromère sur les propriétés de gonflement a également été testée. La Figure 2.49 recense les diamètres hydrodynamiques des nanogels résultant d'émulsions contenant respectivement 1.5 wt% et 3 wt% en précurseur de HA-MA. Nous pouvons espérer une diminution du taux de gonflement lié à l'augmentation de la densité de polymère par unité de volume, et donc une concentration deux fois plus importante de la densité de nœuds par unité de volume. Cependant, il semble que la densité de nœud du réseau soit le seul critère gouvernant le gonflement car les diamètres obtenus sont similaires, indiquant plutôt la versatilité de la méthode.

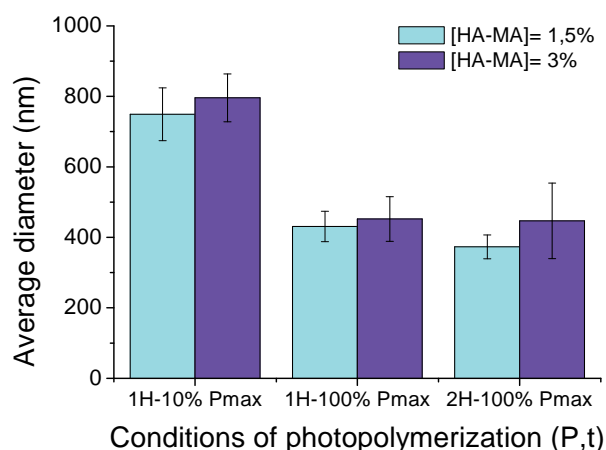


Figure 2.49 : Evolution du diamètre hydrodynamique des nanogels obtenus pour des concentrations en macromère dans la phase dispersée de $C_p = 1.5 \text{ wt}\%$ et de $C_p = 3 \text{ wt}\%$. Mesures DLS à une concentration en nanogels de $C = 3 \text{ g/L}$.

V.3. Influence de la masse molaire du macromère

Les propriétés de gonflement des nanogels sont en lien direct avec la densité de réticulation du réseau. La densité de réticulation est modulable *via* les conditions de photopolymérisation ou, le DM, mais également selon la distribution des points de réticulation sur la chaîne de HA. Cette distribution peut être affectée par la masse molaire du précurseur. Dans cette optique, nous avons formulé une nouvelle série de nanogels à partir du précurseur HA-MA₅ dont la masse molaire est plus faible (EM12). Les tendances obtenues en fonction des conditions de photopolymérisation sont reportées en Figure 2.50 a). L'évolution

du diamètre hydrodynamique de l'émulsion avant et après photopolymérisation, et des nanogels après redispersion suit la même tendance que précédemment observée pour les précurseurs de masse molaire différente. En revanche, le nombre de photons incidents semble peu influencer sur le taux de gonflement de nanogels obtenus. Cette évolution est confirmée par comparaison avec celle des nanogels issus du précurseur HA-MA₂ (Figure 2.50 b). En outre, il apparaît que le taux des gonflement des nanogels de HA-MA₅ ($M_w = 20$ kDa) est bien plus faible que celui des nanogels de HA-MA₂ ($M_w = 100$ kDa). Nous avons vérifié par ¹H-RMN que le taux de conversion suivait les mêmes tendances que pour les plus grandes masses molaires. Ainsi, il semblerait qu'il n'est pas possible de moduler le taux de gonflement des nanogels obtenus à partir de petites masses molaires en modulant le taux de conversion. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il faut atteindre une densité de réticulation plus importante pour préserver la structure des nanogels dans le cas de petites masses molaires. En effet, dans le cas de grandes masses molaires, l'enchevêtrement des chaînes associé à quelques nœuds de réticulation covalent permet d'obtenir des structures très peu réticulées mais extrêmement gonflées. Dans le cas des petites chaînes, il est nécessaire de réticuler plus densément le système pour préserver sa structure. Ainsi, bien que le taux de conversion augmente globalement, le diamètre des objets observés n'évolue pas. Cela peut s'expliquer par le fait que seul les objets bien réticulés sont visibles par DLS, les autres pouvant se redissoudre.

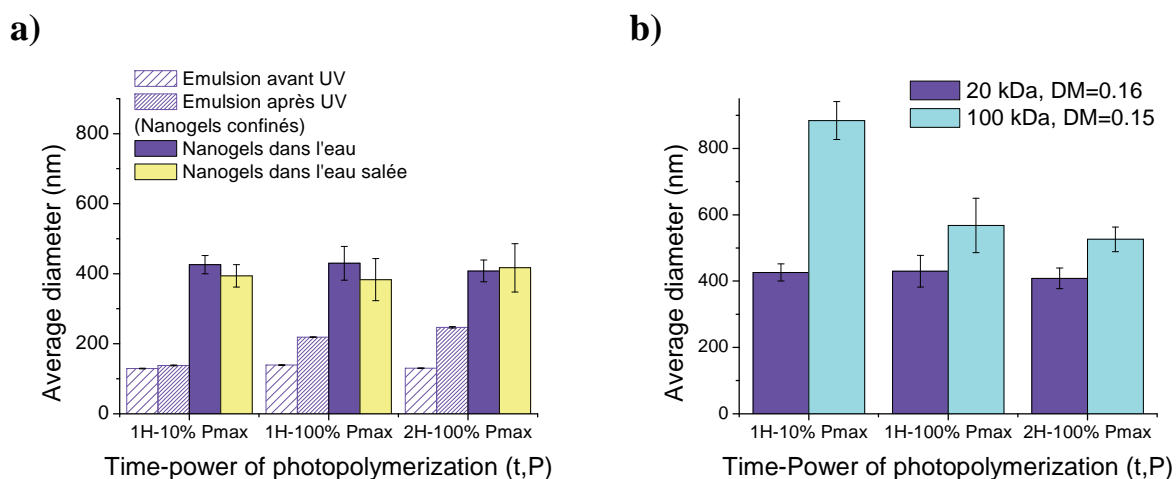


Figure 2.50 : a) Résumé de l'évolution de la taille de l'émulsion (avant et après photopolymérisation) et des nanogels redispersés en milieu aqueux et en milieu salin en fonction des conditions de photopolymérisation pour le précurseur HA-MA₅, 20 kDa, DM=0.16, C_p=1.5 wt%. b) Comparaison du diamètre hydrodynamique des nanogels dans l'eau en fonction des conditions de photopolymérisation pour les précurseurs de masse molaire différente (même DM, même C_p).

V.4. Influence du pH de la dispersion

Nous avons montré que le gonflement des nanogels de HA-MA dépend leur densité de réticulation mais aussi des conditions environnementales telle que la présence de sel. La modulation du pH peut également être utilisée pour induire des variations du taux de gonflement (Figure 2.51). Grâce à la présence des acides carboxyliques sur la chaîne, les nanogels de HA-MA gonflent à des pH supérieurs au pK_A de l'acide, où ils se comportent comme des faibles électrolytes. Des contre-ions mobiles sont présents dans le milieu réactionnel où ils exercent une pression osmotique. A faible pH ($<pK_A$), cette pression osmotique est inexistante car l'acide est protoné. La sensibilité au pH est cependant nuancée en fonction de la densité de réticulation du réseau. Ainsi, on remarque que les nanogels de faible densité de réticulation (1H-10% P_{max}) présentent une meilleure sensibilité au pH que les nanogels de forte densité de réticulation.

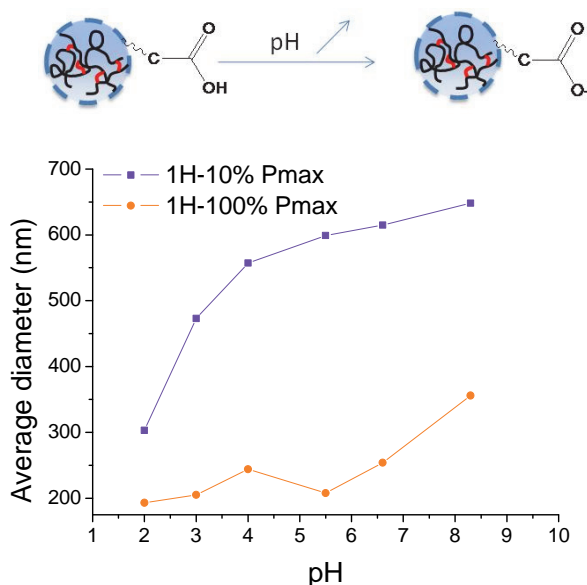


Figure 2.51 : Influence du pH sur le taux de gonflement pour des nanogels de densité de réticulation différente. Nanogels de HA-MA₃, 100 kDa, DM=0.40, photopolymérisés à un temps et une puissance de 1H-10% P_{max} (■) et de 1H-100% P_{max} , (●).

VI. Changement d'échelle du procédé

Afin de montrer l'utilisation potentielle de ce procédé sur de plus grandes échelles, un volume de 10 mL d'émulsion (au lieu de 2.3 mL) a été irradié pendant 1H, $P=100\%$ P_{max} . L'utilisation de cellules en quartz étant désormais impossible, un pilulier en verre adapté au volume de l'émulsion a été choisi, avec une irradiation de haut au lieu d'une irradiation latérale. Les tailles caractéristiques de l'émulsion avant et après photopolymérisation et des nanogels redispersés dans l'eau sont représentées en Figure 2.52 a). Bien que de fortes conditions d'irradiation aient été utilisées, le diamètre hydrodynamique des nanogels dans l'eau est de 900 nm ce qui correspondrait à une faible puissance d'irradiation pour de plus faibles volumes (cf. Figure 2.40). Ces observations sont corroborées par les clichés de TEM, révélant la présence de particules sphériques de 600 nm de diamètre. Ainsi, en vue d'une mise à l'échelle du procédé, il sera primordial de réajuster la puissance reçue par l'émulsion, voire de mettre en place une procédure de photopolymérisation en continu.

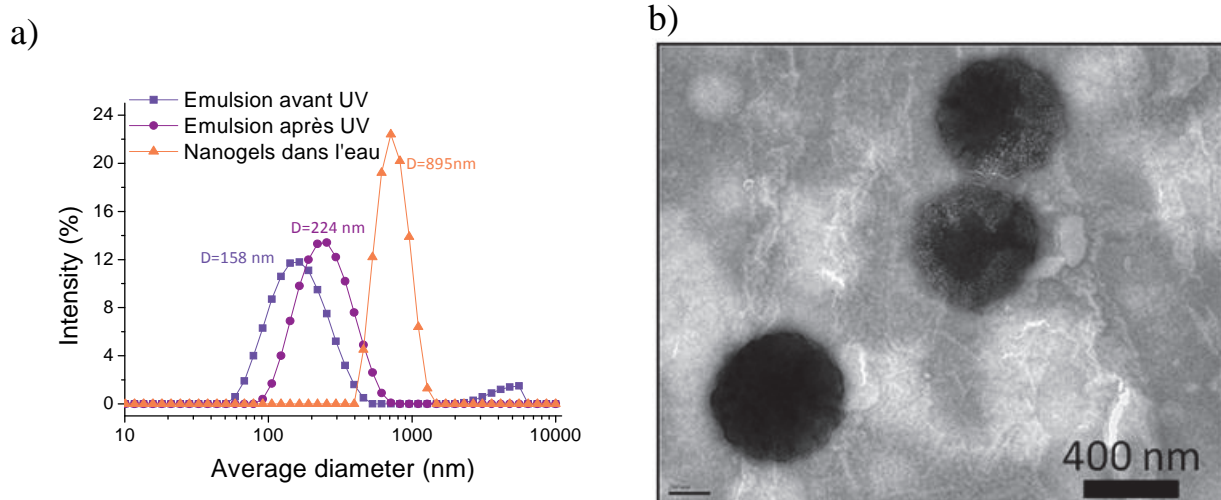


Figure 2.52 : a) Diamètre hydrodynamique de l'émulsion avant et après photopolymérisation et des nanogels redispersés dans l'eau ; b) Cliché de TEM des nanogels à l'état sec obtenu en présence d'un agent de contraste. Précurseur : HA-MA₄, 200 kDa, DM=0.3, C_p= 1.5 wt%.

Conclusion

Au terme de ces études, nous avons mis en place une méthode générique pour la synthèse de nanogels d'acide hyaluronique.

La polymérisation radicalaire en miniémulsion nécessite une préparation contrôlée et reproductible de nanoréacteurs stables, qui a été assurée par l'utilisation des homogénéiseurs haute pression.

Des nanogels de taille et porosité contrôlées ont ainsi été obtenus, dont le taux de gonflement est fonction des conditions de photopolymérisation (taux de conversion en méthacrylate), du degré de méthacrylation et de la masse molaire du macromère, mais aussi des conditions environnementales (pH).

Références:

1. Schanté, C. E.; Zuber, G.; Herlin, C.; Vandamme, T. F., Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 85, (3), 469.
2. Burdick, J. A.; Prestwich, G. D., Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials* **2011**, 23, (12), H41.
3. Hachet, E.; Van Den Berghe, H.; Bayma, E.; Block, M. R.; Auzély-Velty, R., Design of biomimetic cell-interactive substrates using hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties. *Biomacromolecules* **2012**, 13, (6), 1818.
4. Akiyoshi, K.; Kobayashi, S.; Shichibe, S.; Mix, D.; Baudys, M.; Wan Kim, S.; Sunamoto, J., Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin. *Journal of Controlled Release* **1998**, 54, (3), 313.
5. Li, F.; Bae, B. C.; Na, K., Acetylated hyaluronic acid/photosensitizer conjugate for the preparation of nanogels with controllable phototoxicity: Synthesis, characterization, autophotoquenching properties, and in vitro phototoxicity against hela cells. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, 21, (7), 1312.
6. Yang, X.; Kootala, S.; Hilborn, J.; Ossipov, D. A., Preparation of hyaluronic acid nanoparticles via hydrophobic association assisted chemical cross-linking - An orthogonal modular approach. *Soft Matter* **2011**, 7, (16), 7517.
7. Sahiner, N.; Jha, A. K.; Nguyen, D.; Jia, X., Fabrication and characterization of cross-linkable hydrogel particles based on hyaluronic acid: Potential application in vocal fold regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2008**, 19, (2), 223.
8. Prata, J. E.; Barth, T. A.; Bencherif, S. A.; Washburn, N. R., Complex fluids based on methacrylated hyaluronic acid. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (3), 769.
9. Ghugare, S. V.; Chiessi, E.; Cerroni, B.; Telling, M. T. F.; Sakai, V. G.; Paradossi, G., Biodegradable dextran based microgels: a study on network associated water diffusion and enzymatic degradation. *Soft Matter* **2012**, 8, (8), 2494.
10. An, E.; Jeong, C. B.; Cha, C.; Kim, D. H.; Lee, H.; Kong, H.; Kim, J.; Kim, J. W., Fabrication of microgel-in-liposome particles with improved water retention. *Langmuir* **2012**, 28, (9), 4095.
11. Mason, T. G.; Wilking, J. N.; Meleson, K.; Chang, C. B.; Graves, S. M., Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2006**, 18, (41), R635.
12. Decker, C., Photoinitiated crosslinking polymerisation. *Progress in Polymer Science* **1996**, 21, (4), 593.
13. Raemdonck, K.; Naeye, B.; Buyens, K.; Vandenbroucke, R. E.; Høgset, A.; Demeester, J.; Smedt, S. C. D., Biodegradable dextran nanogels for RNA interference: Focusing on endosomal escape and intracellular siRNA delivery. *Advanced Functional Materials* **2009**, 19, (9), 1406.
14. Zou, J.; Hew, C. C.; Themistou, E.; Li, Y. K.; Chen, C. K.; Alexandridis, P.; Cheng, C., Clicking Well-Defined Biodegradable Nanoparticles and Nanocapsules by UV-Induced Thiol-Ene Cross-Linking in Transparent Miniemulsions. *Advanced Materials* **2011**, 23, (37), 4274-4277.
15. Brochette, P., Émulsification - Élaboration et étude des émulsions. *Techniques de l'Ingénieur* **1999**.
16. Leal-Calderon, F.; Gerhardi, B.; Espert, A.; Brossard, F.; Alard, V.; Tranchant, J. F.; Stora, T.; Bibette, J., Aggregation Phenomena in Water-in-Oil Emulsions. *Langmuir* **1996**, 12, (4), 872.
17. Ostwald, W., *Z. Phys. Chem.* **1901**, 37, 385.
18. Taylor, G. I., The Viscosity of a Fluid Containing Small Drops of Another Fluid. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A* **1932**, 138, (834), 41-48.
19. Taylor, G. I., The Formation of Emulsions in Definable Fields of Flow. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A* **1934**, 146, (858), 501-523.
20. Rayleigh, L., On The Instability Of Jets. *Proceedings of the London Mathematical Society* **1878**, s1-10, (1), 4-13.

21. Mabile, C.; et al., Monodisperse fragmentation in emulsions: Mechanisms and kinetics. *EPL (Europhysics Letters)* **2003**, 61, (5), 708.
22. Higuchi, W. I.; Misra, J., Physical degradation of emulsions via the molecular diffusion route and the possible prevention thereof. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1962**, 51, (5), 459.
23. Webster, A. J.; Cates, M. E., Osmotic Stabilization of Concentrated Emulsions and Foams. *Langmuir* **2001**, 17, (3), 595.
24. Kabalnov, A.; Wennerström, H., Macroemulsion Stability: The Oriented Wedge Theory Revisited. *Langmuir* **1996**, 12, (2), 276.
25. Tanford, C., The Hydrophobic Effect. **1976**.
26. Israelachvili, J. N., *Intermolecular and Surface Forces* **2010**.
27. Schmitt, V.; Arditty, S.; Leal-Calderon, F., Emulsions: Structure, Stability and Interactions, chapter 17. **2004**.
28. Bancroft, W. D., The Theory of Emulsification, V. *The Journal of Physical Chemistry* **1912**, 17, (6), 501.
29. Griffin, W. C., Classification of surface-active agents by "HLB". *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1949**, Vol. 1, (5), 311-326.
30. Davies, J. T.; Rideal, E. K., *Interfacial Phenomena* **1961**.
31. Smeds, K. A.; Grinstaff, M. W., Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, 54, (1), 115.
32. Bencherif, S. A.; Srinivasan, A.; Horkay, F.; Hollinger, J. O.; Matyjaszewski, K.; Washburn, N. R., Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials* **2008**, 29, (12), 1739.
33. Antonietti, M.; Landfester, K., Polyreactions in miniemulsions. *Progress in Polymer Science* **2002**, 27, (4), 689.
34. Oh, J. K.; Tang, C. B.; Gao, H. F.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K., Inverse miniemulsion ATRP: A new method for synthesis and functionalization of well-defined water-soluble/cross-linked polymeric particles. *Journal Of The American Chemical Society* **2006**, 128, (16), 5578-5584.
35. Fouissac, E.; Milas, M.; Rinaudo, M., Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules* **1993**, 26, (25), 6945.
36. Allen, N. S.; Marin, M. C.; Edge, M.; Davies, D. W.; Garrett, J.; Jones, F.; Navaratnam, S.; Parsons, B. J., Photochemistry and photoinduced chemical crosslinking activity of type I & II co-reactive photoinitiators in acrylated prepolymers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1999**, 126, (1-3), 135.
37. Bryant, S. J.; Nuttelman, C. R.; Anseth, K. S., Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2000**, 11, (5), 439.
38. Williams, C. G.; Malik, A. N.; Kim, T. K.; Manson, P. N.; Elisseff, J. H., Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials* **2005**, 26, (11), 1211.
39. Kabalnov, A. S.; Pertzov, A. V.; Shchukin, E. D., Ostwald Ripening In 2-Component Disperse Phase Systems - Application To Emulsion Stability. *Colloids And Surfaces* **1987**, 24, (1), 19-32.
40. Fu, Z.; Liu, M.; Xu, J.; Wang, Q.; Fan, Z., Stabilization of water-in-octane nano-emulsion. Part I: Stabilized by mixed surfactant systems. *Fuel* **2010**, 89, (10), 2838.
41. Peltonen, L.; Hirvonen, J.; Yliruusi, J., The Behavior of Sorbitan Surfactants at the Water-Oil Interface: Straight-Chained Hydrocarbons from Pentane to Dodecane as an Oil Phase. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, 240, (1), 272.
42. Dřímalová, E.; Velebný, V.; Sasinková, V.; Hromádková, Z.; Ebringerová, A., Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 61, (4), 420.
43. Pitarresi, G.; Pierro, P.; Palumbo, F. S.; Tripodo, G.; Giammona, G., Photo-cross-linked hydrogels with polysaccharide-poly(amino acid) structure: New biomaterials for pharmaceutical applications. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (4), 1302.
44. Ifkovits, J. L.; Burdick, J. A., Review: Photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Engineering* **2007**, 13, (10), 2369.

45. Anseth, K. S.; Metters, A. T.; Bryant, S. J.; Martens, P. J.; Elisseeff, J. H.; Bowman, C. N., In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2002**, 78, (1-3), 199.
46. Taisne, L.; Walstra, P.; Cabane, B., Transfer of Oil between Emulsion Droplets. *Journal of Colloid and Interface Science* **1996**, 184, (2), 378.
47. Aronson, M. P.; Petko, M. F., Highly Concentrated Water-in-Oil Emulsions: Influence of Electrolyte on Their Properties and Stability. *Journal of Colloid and Interface Science* **1993**, 159, (1), 134.
48. Delmas, T.; Piraux, H.; Couffin, A.-C.; Texier, I.; Vinet, F.; Poulin, P.; Cates, M. E.; Bibette, J., How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions. *Langmuir* **2011**, 27, (5), 1683.
49. Jiao, J.; Burgess, D. J., Ostwald ripening of water-in-hydrocarbon emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, 264, (2), 509.
50. Lee, H.; Mok, H.; Lee, S.; Oh, Y.-K.; Park, T. G., Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels. *Journal of Controlled Release* **2007**, 119, (2), 245.
51. Oh, J. K.; Siegwart, D. J.; Lee, H. I.; Sherwood, G.; Peteanu, L.; Hollinger, J. O.; Kataoka, K.; Matyjaszewski, K., Biodegradable nanogels prepared by atom transfer radical polymerization as potential drug delivery carriers: Synthesis, biodegradation, in vitro release, and bioconjugation. *Journal Of The American Chemical Society* **2007**, 129, (18), 5939-5945.
52. Oh, J. K.; Siegwart, D. J.; Matyjaszewski, K., Synthesis and biodegradation of nanogels as delivery carriers for carbohydrate drugs. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (11), 3326-3331.
53. Hachet, E.; Auzély, R., Unpublished Results, CERMAV. **2012**.
54. Nolan, C. M.; Reyes, C. D.; Debord, J. D.; García, A. J.; Lyon, L. A., Phase Transition Behavior, Protein Adsorption, and Cell Adhesion Resistance of Poly(ethylene glycol) Cross-Linked Microgel Particles. *Biomacromolecules* **2005**, 6, (4), 2032.
55. Burdick, J. A.; Chung, C.; Jia, X.; Randolph, M. A.; Langer, R., Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules* **2005**, 6, (1), 386.

Chapitre 3.
**Application à la préparation de
nanogels sensibles au glucose**

Introduction au chapitre

L'objectif de ce chapitre vise à montrer la potentialité d'utilisation des nanogels de HA comme matériaux sensibles au glucose. Comme mentionné dans le chapitre 1, un matériau sensible au glucose peut être obtenu en incorporant un récepteur moléculaire au glucose dans la matrice polymérique. Il existe différents récepteurs permettant de conférer cette sensibilité au glucose. Notre choix s'est porté sur les dérivés de l'acide boronique qui offrent une bonne stabilité, contrairement à leurs homologues naturels, et qui potentiellement présentent une faible toxicité *in vivo*. La complexation du glucose met en jeu l'équilibre rappelé en Figure 3.1, et déjà expliqué au chapitre I.

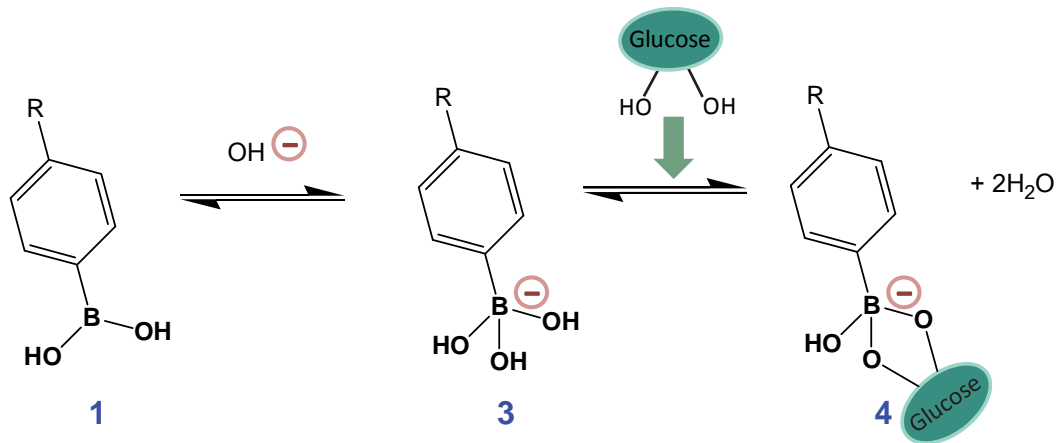


Figure 3.1 : Equilibre de complexation entre l'acide phénylboronique et le glucose.

A l'heure actuelle, le choix de la matrice polymérique s'est majoritairement porté vers les dérivés acrylamides, à l'instar des travaux réalisés dans notre équipe^{1, 2}. Pour ces matériaux, plusieurs systèmes ont été étudiés, dont le gonflement ou la contraction est induit(e) par les mécanismes suivants, décrits au chapitre 1 :

- (i) Gonflement basé sur l'augmentation de charge du réseau³
- (ii) Gonflement basé sur la variation de solubilité du polymère⁴
- (iii) Contraction basé sur l'augmentation de la densité de réticulation, par complexation 2 : 1 du glucose avec les boronates⁵.

Pour les systèmes acrylamides à LCST, le gonflement est généré de la manière suivante. Les dérivés acrylamides à LCST comme le pNIPAM sont des polymères amphiphiles : l'introduction des boronates augmente l'hydrophobie du système. En présence de glucose,

l'équilibre des boronates est déplacé vers la forme chargée. De ce fait, le gonflement est induit par un changement de l'état de charge (i) du réseau mais aussi par une augmentation de son hydrophilie (ii). Dans le cas des polysaccharides, et précisément du HA, l'hydrophilie est difficilement modulable pour générer le gonflement. De plus, le HA est un polyanion et le changement d'état de charge pourrait être masqué par les charges déjà existantes. Ainsi, nous avons élaboré l'idée d'un gel de polysaccharide sensible au glucose grâce au mécanisme basé sur une variation de la densité de réticulation, par compétition du glucose libre avec les unités saccharidiques des chaînes (cf. chapitre 1, section II.3.2.2.2.). Les fonctions diols du HA pourraient être utilisées pour former des jonctions esters avec les boronates. En présence de glucose, ces jonctions seraient rompues au profit des jonctions PBA–glucose libre, induisant le gonflement du réseau. Cependant, bien que le HA possède de nombreuses fonctions diols, leur configuration s'avère peu favorable à une complexation efficace avec les PBA. Pour cette raison, nous proposons tout d'abord de combiner l'acide hyaluronique modifié par des fonctions PBA (précurseur hôte) avec un autre polysaccharide dont les fonctions diols présentent une meilleure constante de complexation avec les boronates (précurseur invité). Par exemple, le guar ou l'hydroxypropyl guar (Hp-guar), polysaccharides constitués d'unités répétitives dérivées du mannose et du galactose, pourraient être utilisés comme précurseur invité (cf. chapitre 1, section II.3.2.1.2)⁶. La représentation schématique de ce concept est résumée en Figure 3.2. Avant l'ajout de glucose, l'espèce boronate se complexe avec le précurseur invité. Par ajout du glucose dans le milieu réactionnel, cette complexation se rompt au profit de la complexation précurseur hôte-glucose libre. L'intégrité du gel est maintenue par une réticulation permanente, *e.g.* par des liens méthacrylates (en rouge). Sans cette réticulation, l'ajout du glucose conduirait à la dissolution du réseau. En partie I, nous montrerons la validité de ce mécanisme, en testant la faisabilité des macrogels synthétiques sensibles au glucose. Ces macrogels sont constitués d'acide polyacrylique modifié par des fonctions boronates comme précurseur hôte, et d'alcool polyvinylique comme précurseur invité. A noter que dans cette étude, aucune réticulation permanente n'a été greffée sur les chaînes. L'adaptation du concept aux macrogels de HA interpénétrés a été conduite en parallèle par nos partenaires du CERMAV. Ces travaux nécessitent un travail conséquent sur la synthèse des précurseurs suivant ce concept.

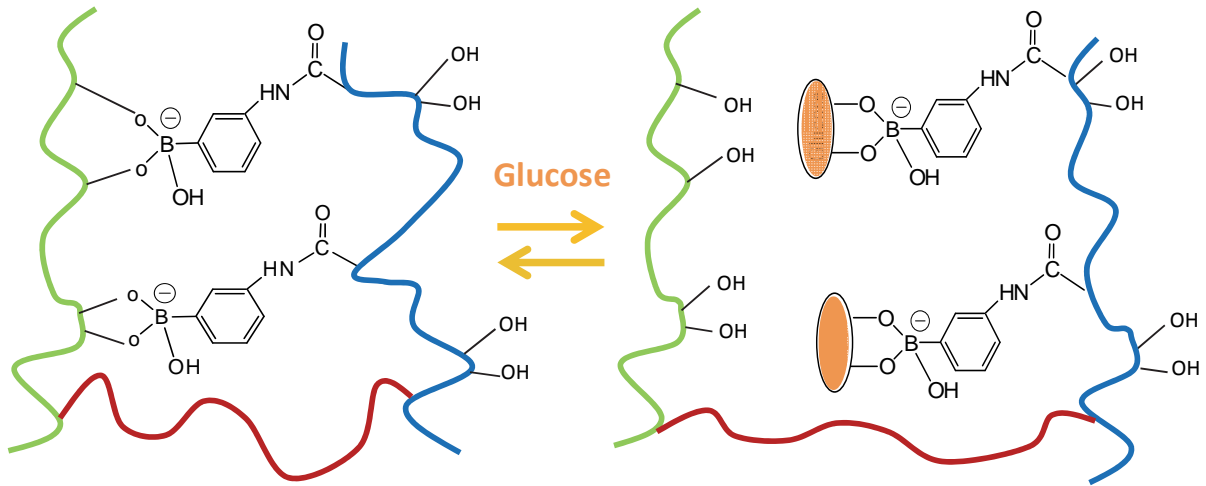


Figure 3.2 : Représentation schématique du mécanisme de compétition appliqué aux réseaux interpénétrés. En bleu, le HA est modifié par des fonctions boronates (précurseur hôte) ; en vert, le précurseur invité possède des fonctions diols dont la constante de complexation avec les boronates est efficace. Le maintien sous forme de réseau est assuré par une réticulation permanente (en rouge) ; dans notre cas, cette réticulation représente les fonctions méthacrylates.

Aussi, dans cette thèse, le concept d'hydrogel interpénétré doublement réticulé développé à Grenoble n'a pas pu être mis en œuvre à l'échelle des nanogels. En revanche, nous avons testé l'introduction du ligand boronate sur les nanogels de HA, afin d'étudier l'impact des autres mécanismes éliminés a priori : (i) la modification de la densité de charge, (ii) la variation d'hydrophobie ou encore (iii) la modification de la densité de réticulation par complexation 2 : 1.

Ainsi, ce chapitre se divisera deux sections majeures :

- l'étude des macrogels synthétiques sensibles au glucose et quelques résultats sur l'adaptation du concept aux macrogels de HA ;
- la stratégie envisagée pour la préparation de nanogels de HA sensibles au glucose.

I. Macrogels sensibles au glucose par un mécanisme par compétition

I.1. Choix du système – constantes de complexation

L'objectif de cette section est de valider le concept de l'utilisation des réseaux interpénétrés pour générer une réponse au glucose. Nous avons choisi de travailler avec de polymères synthétiques modèles.

- Pour le **précurseur hôte**, l'acide polyacrylique (PAA) a été préféré car, outre sa structure simple, il présente de nombreuses similitudes avec le HA. Le PAA est un (poly)électrolyte chargé négativement, et il présente également des fonctions carboxyliques sur sa chaîne, sur lesquelles le PBA sera greffé. Pour cette étude, un PAA de faible masse molaire ($M_w = 15$ kDa) a été choisi.
- Pour le **précurseur invité**, nous avons choisi l'alcool polyvinylique (PVA). Celui-ci présente des fonctions diols pendantes sur sa chaîne, capables de former une complexation réversible avec les ions borates⁷⁻⁹. La constante de complexation avec le borate ($B(OH)_4^-$) a été déterminée à $4 M^{-1}$ ^{10, 11}. La constante entre le PVA avec la forme chargée de l'acide phénylboronique (boronate) a été estimée à $1.9 M^{-1}$ par la méthode de diminution du pH (cf. chapitre 1, section II.3.2.1.2.).

La formation d'un réseau macroscopique, réticulé physiquement par les liens PBA-PVA, a été examinée en fonction de plusieurs paramètres, à savoir:

- (i) la structure du dérivé PBA
- (ii) le degré de substitution en PBA (DS)
- (iii) le ratio entre les chaînes PAA-PBA et PVA
- (iv) le pH du mélange interpénétré
- (v) la présence de glucose

1.2. Synthèse des précurseurs PAA-PBA

1.2.1. Sélection des dérivés phénylboroniques

La synthèse des précurseurs de PAA-PBA est effectuée par greffage d'un dérivé amine de l'acide phénylboronique (PBA) sur la chaîne de PAA, portant des fonctions acides. Pour ce faire, il s'agit de sélectionner les dérivés PBA adaptés (*c.à.d.* portant de fonctions amines). Deux dérivés du PBA ont été sélectionnés : l'acide 3-aminophénylboronique (APBA) (Figure 3.3 a) et l'acide 4-[(2-aminoéthyl)carbamoyl]phénylboronique (AECPPBA) (Figure 3.3 b). L'APBA est disponible commercialement mais possède un pK_A de 8.37³. Comme la complexation avec des saccharides se fait majoritairement à un pH au dessus du pK_A de l'espèce boronate, l'étude sera menée à $pH = 8.5$, et non à pH physiologique. Cependant, il a été montré par Singhal *et al.* que l'introduction de groupements attracteurs sur les dérivés PBA permettait d'augmenter l'acidité du bore, et par conséquent de diminuer le pK_A de l'espèce boronate¹². Dans un but d'élaborer des systèmes sensibles au glucose à pH physiologique, il est indispensable de réviser la structure du composé commercial. A ces fins, l'AECPPBA, dont la synthèse a été mise au point par Matsumoto *et al*¹³, a été fabriqué. Ce composé présente un pK_A de 7.8, proche du pH physiologique.

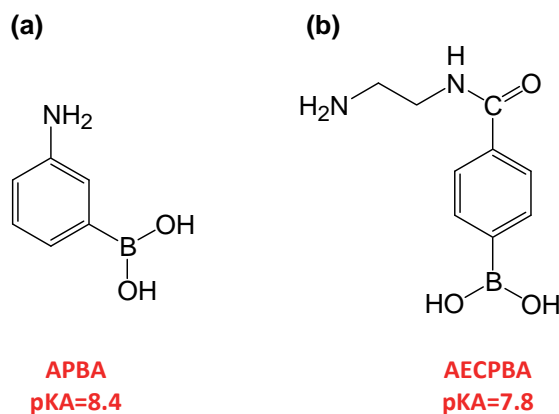


Figure 3.3 : Formules développées des récepteurs au glucose : (a) l'acide 3-aminophénylboronique (APBA) et (b) acide 4-[(2-aminoéthyl)carbamoyl]phénylboronique (AECPPBA).

1.2.2. Synthèse de l'AECPBA

La synthèse de l'AECPBA a été réalisée selon le schéma réactionnel décrit en Figure 3.4. Elle consiste tout d'abord à faire réagir le 4-carboxyphénylboronique (**5**) avec le chlorure de thionyle pour obtenir le chlorure d'acide (**6**) correspondant. Une fois séché, ce composé est redispersé dans le THF. De l'éthylène diamine en excès en présence de triéthylamine est ajoutée au mélange réactionnel permettant la formation de l'amide (**7**). Après purification, l'AECPBA est caractérisé par ^1H -RMN (détails en partie expérimentale). Le produit obtenu est pur, mais avec un rendement relativement faible de 35%. Pour cette raison, l'APBA a été utilisé en premier lieu pour déterminer les conditions de synthèse.

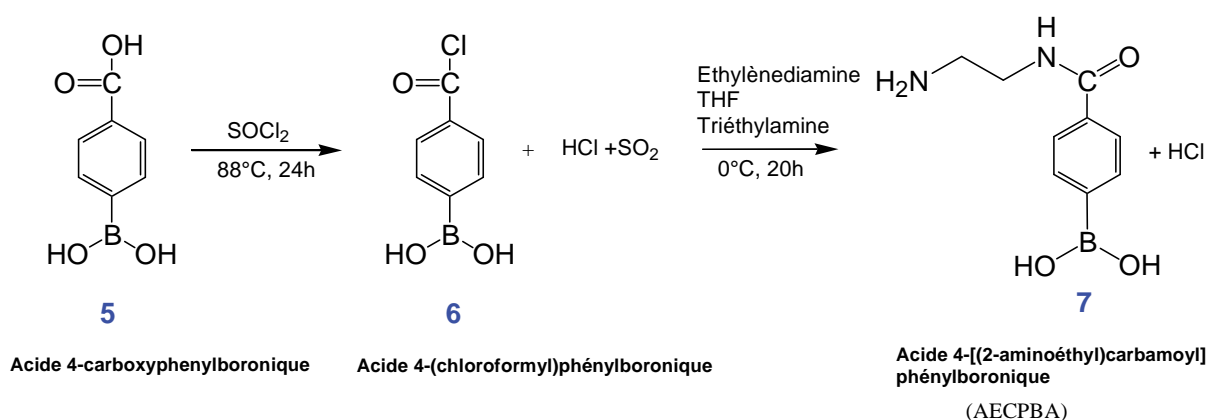


Figure 3.4 : Schéma réactionnel de la synthèse de l'acide 4-[(2-aminoéthylcarbamoyl]phénylboronique (AECPBA). ^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ : 3.3 (2H, t, $J=5.9$ Hz, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 3.7 (2H, t, $J=5.9$ Hz, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 7.8 (4H, dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=23.0$ Hz $\text{NH-CO-C}_6\text{H}_4\text{-B(OH)}_2$).

1.2.3. Synthèse des PAA-PBA

Le schéma réactionnel de la synthèse des dérivés PAA-PBA, avec PBA = APBA (voie a) ou PBA = AECPBA (voie b) est résumé en Figure 3.5. La synthèse s'effectue par couplage peptidique des fonctions amines des PBA sur les fonctions acides du PAA. La réaction est couplée par le 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), afin d'activer les fonctions acides carboxyliques.

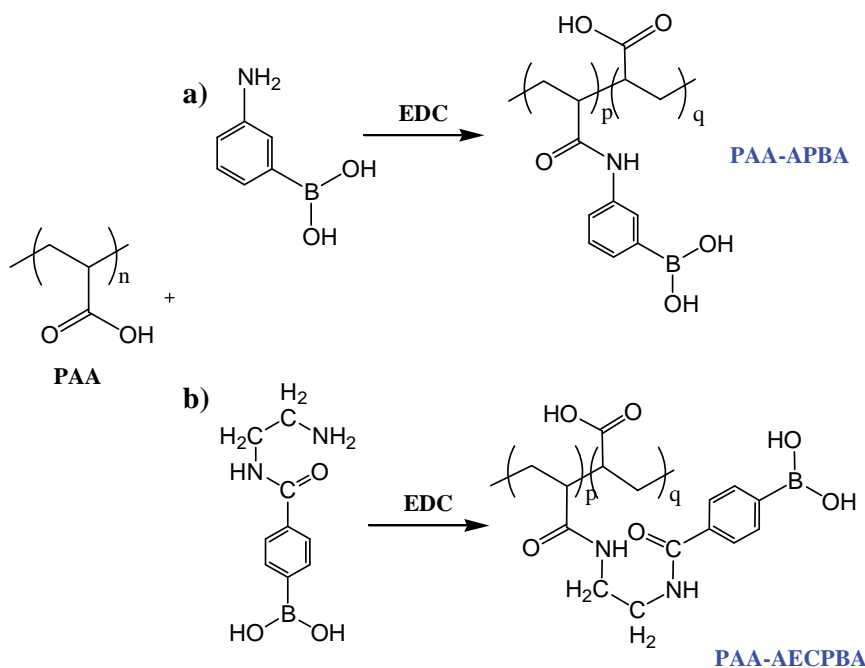


Figure 3.5 : Stratégie de synthèse des précurseurs de PAA-PBA : a) L'espèce phénylboronique est l'APBA, $pK_A=8.4$; b) l'espèce phénylboronique est l'AECPBA, $pK_A=7.8$.

I.2.3.1. Conditions expérimentales : résultats antérieurs

Bien que de nombreuses études utilisent ces couplages pour greffer les boronates, les conditions expérimentales varient d'une étude sur l'autre. A titre d'exemple, l'équipe de Pelton a greffé le 4-carboxyphénylboronique sur des microgels d'isopropyl-acrylamide-co-acrylique acide¹⁴. La synthèse était effectuée en milieu tampon MES à $\text{pH}=4.8$ et divers ratios PBA/EDC étaient utilisés. Par contre, Reddy *et al*¹⁵ et Kanayama *et al*¹⁶ ont réalisé ce greffage dans l'eau ultrapure. Des études préliminaires menées au laboratoire ont permis de sélectionner quelques paramètres comme la salinité et le pH du milieu réactionnel, et le ratio des équivalents entre chaque espèce. Les conditions testées sont résumées en Tableau 3.1. Ainsi, nous avons choisi le protocole expérimental 3, car il conduit à une solution translucide en fin de réaction (pas de précipitation du précurseur).

Tableau 3.1 : Résultats préliminaires obtenus pour la synthèse de PAA-PBA, avec l'APBA comme dérivé phénylboronique.

Numéro Protocole	T (°C)	n PAA (mmol)	Solvant	pH	EDC/PBA (/PAA)	Résultats
1 ¹⁵	16	1.25	MES	4.8	3/3	Précipitation polymère
2 ¹⁴	16	1.25	Eau mQ	4-5	3/3	Précipitation polymère
3 ¹⁴	TA	4.25	Eau mQ	6	0.94/0.48	Pas de précipitation
4	TA	4.25	Eau mQ	6	0.8/0.48	Précipitation polymère

I.2.3.2. Résultats obtenus

Nous avons alors appliqué ces conditions expérimentales, en variant la nature du dérivé phénylboronique et le nombre d'équivalent PBA. De plus, le ratio EDC/PBA a été légèrement modifié. En Tableau 3.2, les conditions expérimentales pour la synthèse de ces précurseurs sont résumées. Plusieurs techniques ont été testées pour purifier ces précurseurs et les rendements associés sont également reportés (tableau, dernière colonne). Selon le procédé de purification, on remarque que les rendements varient considérablement. Une purification par dialyse (MWCO = 3500 g/mol) avait été initialement utilisée pour les précurseurs PAA-PBA₁ à PAA-PBA₃, mais il semble que ce procédé conduit à des rendements relativement faibles, entre 17 et 50%. Au contraire, la précipitation du polymère utilisée pour les précurseurs PAA-PBA₅ et PAA-PBA₆, soit par diminution du pH, soit par précipitation à l'acétone conduit à des rendements très acceptables autour de 60%. Ce nouveau procédé améliore donc la synthèse.

Tableau 3.2 : Conditions de synthèse et résultats obtenus pour les précurseurs PAA-PBA synthétisés.

PAA-PBA _x	Récepteur greffé	Eq PBA (/PAA)	Eq EDC (/PBA)	DS ^a	DS ^b	Rendement (%)
PAA-PBA ₁	APBA	0.1	1.94	18	7	17 ^c
PAA-PBA ₂	APBA	0.2	1.94	25	13	37 ^c
PAA-PBA ₃	APBA	0.4	1.94	42	13	51 ^c
PAA-PBA ₄	AIECPBA	0.2	0.94	15	6	71 ^d
PAA-PBA ₅	AIECPBA	0.4	0.94	23	9	59 ^d

^a: Degré de substitution en boronate PBA déterminé par ¹H-RMN.

^b: Degré de substitution en boronate PBA déterminé par ICP.

Pour chaque précurseur, l'incorporation des groupements PBA sur la chaîne PAA a été vérifiée par ^1H -RMN, en comparant le spectre obtenu à l'APBA pour les composés PAA-PBA₁ à PAA-PBA₃ et à l'AECBPBA pour les composés PAA-PBA₅ et PAA-PBA₆. A titre d'exemple, le spectre proton du PAA-PBA₂ est reporté en Figure 3.6. Ce spectre présente un pic à 7.1 ppm relativement large correspondant aux 4 protons aromatiques du groupement phényle. De ce spectre, le degré de substitution en PBA (DS), défini comme le ratio entre l'intégration relative du pic du phényle de l'espèce phénylboronique à 7.1 ppm et du pic de l'éthyle de la chaîne PAA à 1.0 ppm, a été calculé. Les DS ainsi calculés sont reportés dans le Tableau 3.2. L'évolution du DS augmente en fonction du nombre d'équivalents PBA. De plus, il semble que, pour un même nombre d'équivalents utilisés, les DS des précurseurs fonctionnalisés par l'AECBPBA (PAA-PBA₅ et PAA-PBA₆) sont plus faibles que ceux des précurseurs fonctionnalisés avec l'APBA (PAA-PBA₂ et PAA-PBA₃). Cette divergence est probablement due à la différence de réactivité de la fonction amine, aromatique en α du cycle pour l'APBA, ou aliphatique pour l'AECBPBA. Il est bien connu que les amines greffées en α d'un cycle aromatique ont un pK_A légèrement plus acide. Ces données ont été comparées à celles obtenues par analyse ICP (Induced Plasma Coupling), qui permet de doser quantitativement l'atome de bore. Bien que les DS obtenus par ICP soient plus faibles que ceux obtenus par ^1H -RMN, les mêmes tendances sont observées. Ces différences pourraient provenir des faibles masses requises pour les mesures ICP, de l'ordre de 3 mg.

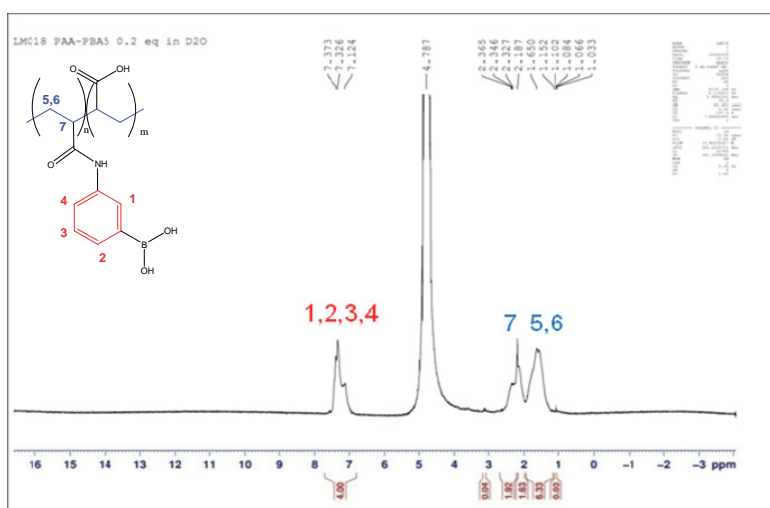


Figure 3.6 : Spectre ^1H -RMN du PAA-PBA₂ obtenu dans le D_2O , 128 scans.

La spectroscopie infra-rouge permet également de vérifier le greffage des dérivés d'acide phénylboronique sur le PAA. La Figure 3.7 reporte les spectres IR du PAA (en bleu), de l'APBA (en rouge) et du PAA-PBA₂ (en vert). L'APBA est caractérisé par une bande à 1330 cm⁻¹ attribuée à la vibration de la liaison C_{phen}-B. Cette bande, non observée sur le PAA, est présente sur le spectre du PAA-PBA₂ (flèche violette), ce qui permet de confirmer le greffage des dérivés PBA. De plus, on constate l'apparition d'une bande à 1650 cm⁻¹ (flèche orange) sur le PAA-PBA₂, non présente sur le PAA. Cette bande correspond à la vibration de valence (stretching) de l'amide. Il est à noter que la bande à 1540 cm⁻¹ a été attribuée à la vibration de valence (stretching) du C=O de l'acide car elle est présente à la fois sur le PAA et sur le PAA-APBA₂. Cependant, cette bande pourrait également recouvrir celle de vibration de déformation (bending) de l'amide N-H puisque la bande de vibration de déformation du N-H est présente à 1520 cm⁻¹ pour l'APBA (forme amine). Ces analyses confirment que le greffage de l'APBA sur le PAA est validé. Les mêmes résultats ont été obtenus pour le greffage de l'AIECPBA, à une différence près. La bande de vibration de valence est déjà présente sur l'AIECPBA puisqu'il présente une fonction amide (cf. partie expérimentale).

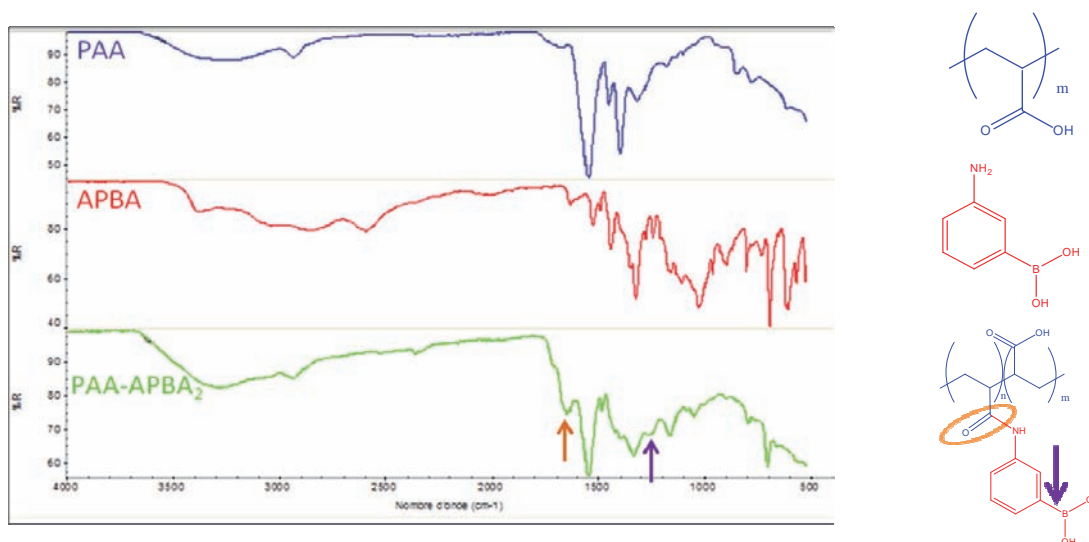


Figure 3.7 : Spectres infra-rouge du PAA (en bleu), de l'APBA (en rouge) et du PAA-PBA₂ (en vert).

1.3. Comportement en solution

Les acides phénylboroniques sont relativement hydrophobes, mais cette hydrophobie s'atténue voire disparaît à un pH > pK_A(ACPBA) puisqu'ils deviennent chargés (pK_A = 8.4 ou 7.8 selon le PBA utilisé). La chaîne de PAA, malgré un squelette éthylénique, possède une

certaine hydrophilie due à la présence des fonctions acides, et ce, pour un pH au dessus du pK_A de l'acide ($pK_A \sim 4$). Ainsi, greffer des groupements PBA sur la chaîne de PAA peut avoir une forte influence sur la solubilité du précurseur final, en particulier dans la zone $4 < \text{pH} < pK_{A(\text{PBA})}$. Dans cette zone de pH, le PAA non greffé serait parfaitement soluble, mais en présence de PBA, on suppose que sa solubilité serait en outre gouvernée par la présence des fonctions PBA. Nous avons donc étudié le comportement en solution des polymères PAA-PBA.

I.3.1.1. Etude des PAA-PBA₁ à PAA-PBA₃ (PBA=APBA)

Les précurseurs ont été solubilisés à $C = 2 \text{ g/L}$ dans l'eau ultrapure, $\text{pH}=5$. A titre d'exemple, le comportement en solution du PAA-PBA est illustré en Figure 3.8. A $\text{pH}=5$, la solution est translucide avec des amas en suspension. Une diminution du pH à 2 conduit à la formation d'un précipité blanchâtre assez pulvérulent. *A contrario*, lorsqu'on augmente le pH à respectivement 7 puis 9, la solution devient progressivement translucide puis complètement transparente, indiquant la solubilisation du PAA-PBA₂. Ces variations de solubilité sont dues à la présence des groupes fonctionnels COOH et PBA sur le PAA, possédant chacun une forme neutre et chargée. L'illustration schématique de l'état de charge de ces groupes est également reportée en Figure 3.8. A pH acide, les groupements COOH et PBA existent sous leur forme neutre et le précurseur est hydrophobe, conduisant à sa précipitation. Entre $4 < \text{pH} < 8$, la solubilité du précurseur est améliorée, du fait de la déprotonation du PAA ($pK_{A(\text{PAA})} \sim 4$). Les chaînes de PAA étant déprotonées, elles exercent des répulsions électrostatiques entre elles, ce qui engendre une meilleure dispersion de chaînes. Ce phénomène est accentué pour des $\text{pH} > 8$ et la solution devient transparente. Le changement de comportement en solution à $\text{pH} \sim 8-9$ est alors dû à l'APBA dont le pK_A est de 8.4. À un pH inférieur au pK_A , le PBA se trouve dans sa forme neutre alors que pour un pH supérieur au pK_A , la forme chargée est majoritaire ce qui permet d'augmenter l'hydrophilie du PAA-PBA et ainsi faciliter sa solubilisation. Les mêmes tendances ont été obtenues pour le PAA-PBA₁. En revanche, la solubilisation totale du PAA-PBA₃ a été plus difficile, observée pour un $\text{pH} > 9$, due au DS supérieur en PBA.

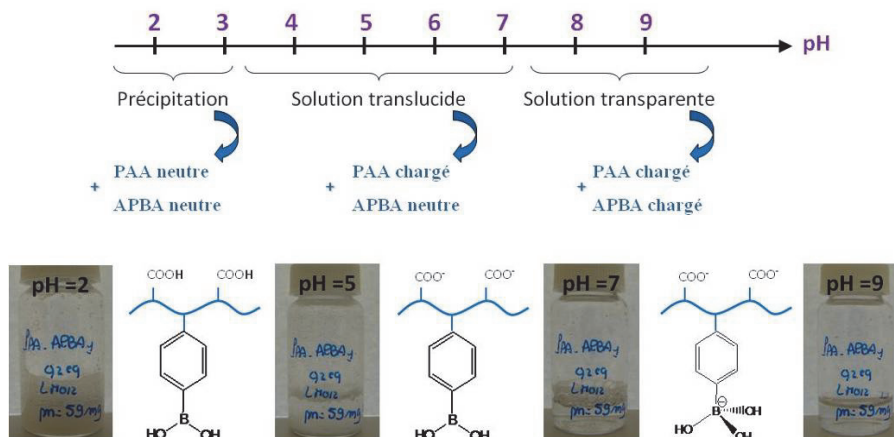


Figure 3.8 : Comportement en solution du PAA-PBA₂ en fonction du pH, et représentation schématique de l'état de charge des groupements -COOH et -PBA.

I.3.1.2. Etude des PAA-PBA₄ et PAA-PBA₅ (PBA=AIECPBA)

La même expérience a été réalisée pour les précurseurs PAA-PBA₅ et PAA-PBA₆. Globalement, le même comportement est observé pour ces deux précurseurs mais la transition est décalée vers des pH plus faibles. À pH=6-7 la solubilité est meilleure (la solution est transparente). Comme pour le PAA greffé avec de l'APBA, il y a un changement de comportement en solution dû au dérivé d'acide phénylboronique. Le pK_A de l'AIECPBA étant de 7,8, il est plus faible que celui de l'APBA, expliquant la transition à des pH plus acides. Les solutions sont parfaitement transparentes à partir de pH=7.

I.4. Etudes de complexation des PAA-PBA avec le PVA

Comme indiqué en introduction, la complexation du PAA-PBA avec le PVA devrait aboutir à la formation d'un réseau tridimensionnel, entre le PBA et les fonctions hydroxyles formant des liaisons covalentes réversibles. Ainsi, le mélange de deux solutions concentrées de PAA-PBA et de PVA devrait former un macrogel. Nous avons donc mené des études de complexation entre les PAA-PBA synthétisés avec le PVA. Des solutions à 8 wt% en PVA et à y wt% en PAA-PBA_x ont été préparées séparément dans l'eau salée. Puis 500 µL de chaque solution ont été placés dans un tube à hémolyse (ratio molaire PBA/PVA = 0.059). Le pH du mélange se situe initialement entre 5 et 6. A ce mélange, 20 µL d'une solution de NaOH à 1M sont ajoutés. L'aspect macroscopique des mélanges, avant et après ajout de NaOH a été étudié. A titre d'exemple, les vues macroscopiques des mélanges ainsi formés le PAA-PBA₅ (pK_A = 7,8) sont représentées en Figure 3.9. A un pH inférieur au pK_A du PBA, le réseau

interpénétré à l'aspect d'une solution visqueuse. Lorsque que le pH augmente, les chaînes se complexent entre elles, formant un gel macroscopique transparent et de texture à pH physiologique. L'ajout de glucose permet de rompre la complexation entre les chaînes, par compétition avec celle entre le glucose libre et le PAA-PBA₅, et une solution liquide est obtenue.

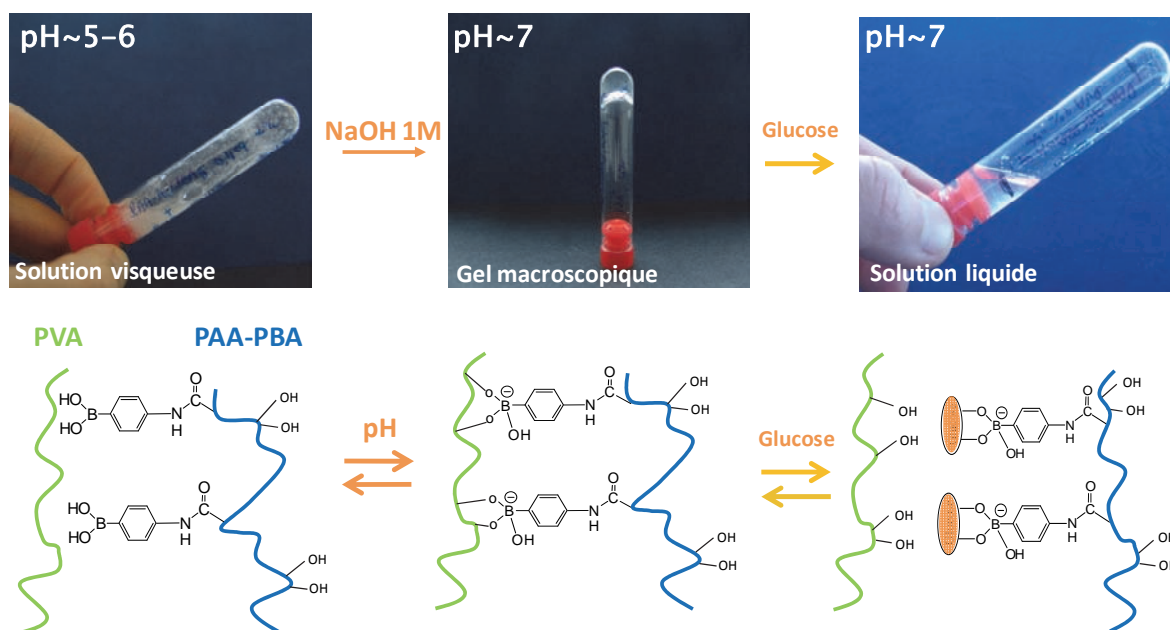


Figure 3.9 : En haut : Observations macroscopiques du mélange PAA-PBA₅ et du PVA dans l'eau salée, à pH=5-6 et à pH=7, et après addition de glucose. En bas : Représentation schématique du mécanisme de complexation entre les chaînes, avant et après addition du glucose. Conditions : mélange 1/1 de PAA-PBA₅ à 4 wt% et PVA à 8 wt%, soit un ratio molaire de 0.059.

Ces mêmes tests ont été réalisés pour les autres PAA-PBA_x, et une étude en fonction du ratio molaire PBA/PVA a également été menée. Les résultats obtenus, après ajout de la solution de NaOH, sont rassemblés en Tableau 3.3. Un gel transparent est obtenu pour des ratios molaires PBA/PVA de 0.042, 0.038 et 0.059 respectivement. Bien que pour un ratio PBA/PVA de 0.063, un gel soit obtenu, celui-ci est trouble, due à la mauvaise solubilité du précurseur utilisé (PAA-PBA₃), même à pH basique. A l'opposé, quel que soit le ratio PBA/PVA, le mélange précurseur PAA-PBA₁ et PVA conduit à un mélange liquide. Il semble qu'un ratio molaire de 0.03 soit minimum pour obtenir une gélification.

Tableau 3.3 : résultats obtenus pour la complexation du PVA avec le PAA-PBA_x, en fonction du ratio molaire PBA/PVA.

PAA-PBA _x	PBA greffé	Ratio molaire PBA/PVA	Observations	pH du mélange
PAA-PBA ₁ (0.1 eq)	APBA	0.026	Solution liquide	9
PAA-PBA ₂ (0.2 eq)	APBA	0.01	Liquide visqueux	9
		0.021	Liquide visqueux	9
		0.042	Gel transparent	9
PAA-PBA ₃ (0.4eq)	APBA	0.016	Liquide visqueux	9
		0.032	Gel transparent	9
		0.063	Gel trouble	9
PAA-PBA ₄ (0.2 eq)	AACPBA	0.038	Gel transparent	7.4
PAA-PBA ₅ (0.4 eq)	AACPBA	0.01	Liquide visqueux	7.4
		0.029	Liquide visqueux	7.4
		0.059	Gel transparent	7.4

Ces résultats indiquent que la formation des réseaux interpénétrés dépend à la fois de la quantité PBA greffée sur le polymère hôte, et de son ratio relatif par rapport au polymère invité. Ainsi, ces concepts observés pour des polymères synthétiques constituent une bonne preuve du mécanisme de réponse au glucose par compétition.

1.5. Adaptation aux réseaux d'acide hyaluronique

Cette étude a été adaptée par nos partenaires du CERMAV pour la préparation de macrogels interpénétrés d'acide hyaluronique. Le concept général de leur étude est résumé en Figure 3.10. Sans entrer dans les détails de la chimie, le HA a été modifié par des fonctions PBA par greffage d'un PBA-thiol sur un HA-alcène *via* la réaction photoinduite. En parallèle, le précurseur invité consiste en du HA modifié par des fonctions maltose. Le HA-maltose présente des fonctions glucose pendantes sur sa chaîne. En mélangeant ces deux précurseurs, un gel macroscopique est obtenu (cf. Figure 3.10), résultant de la complexation entre les PBA et les diols 1,2 du glucose. De façon très intéressante, les réponses au glucose ont été modulées en fonction du ratio entre le HA-PBA et le HA-maltose. Comme montré en Figure 3.10, l'ajout du glucose conduit ici à une rupture des liens résultant de la complexation entre les chaînes interpénétrées et l'élasticité dynamique du gel diminue. Ce comportement a

été observé lorsque le HA-maltose se trouvait en excès dans le milieu réactionnel. Une autre configuration a été obtenue lorsque le HA-PBA se trouvait en excès. Dans ce cas, le mélange présente des fonctions PBA résiduelles pendantes. Par ajout du glucose, il y a complexation additionnelle entre deux PBA et le glucose. Des nœuds de réticulation supplémentaires sont alors formés, les propriétés rhéologiques du réseau évoluent vers une augmentation de l'élasticité. Ainsi il a été montré que les propriétés rhéologiques de ces réseaux dynamiques peuvent être modulées intrinsèquement par le ratio entre les chaînes interpénétrées, induisant une réponse au glucose modulable.

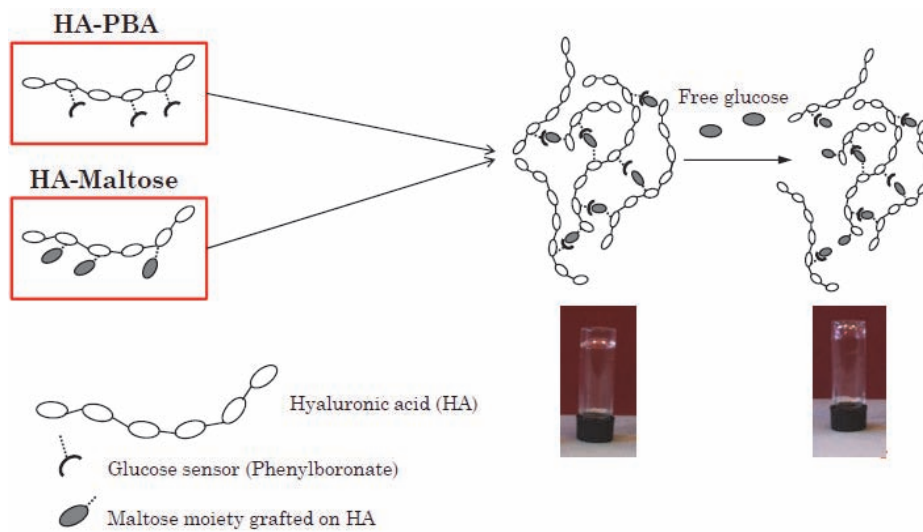


Figure 3.10 : Représentation schématique du concept de la formation des réseaux interpénétrés de HA, par complexation du HA-PBA avec du HA-maltose.

II. Préparation de nanogels de HA sensibles au glucose

Le concept de réseau interpénétré a donc été validé, mais la transposition aux gels d'acide hyaluronique a nécessité la mise au point d'une chimie beaucoup plus complexe. L'étude de leur complexation s'est révélée plus longue que prévue, les mécanismes de gonflement et de contraction dépendant du ratio entre polymère hôte et invité. Au cours de cette thèse, nous avons donc pris le parti de mener une étude parallèle à l'échelle de nanogels, visant à comprendre le rôle de la fonctionnalisation du HA par le boronate. Des précurseurs de HA modifiés par du boronate ont donc été façonnés en nanogels, et leur réponse au glucose a été étudiée. Il s'agit, en particulier, de sonder l'impact des mécanismes tels que la variation de densité de charge, d'hydrophobie ou encore de densité de réticulation par le glucose.

La stratégie globale envisagée pour la fabrication des nanogels sensibles au glucose est illustrée en Figure 3.11. De la même façon qu'en section I.2, une première étape consiste à greffer le dérivé phénylboronique sur la chaîne de HA, déjà modifié par des méthacrylates. Le précurseur ainsi préparé possédera :

- des fonctions méthacrylates, permettant d'assurer une réticulation permanente.
- des fonctions PBA, conférant au réseau une sensibilité potentielle au glucose.

Dans une deuxième étape, les précurseurs sont confinés en utilisant les miniémulsions inverses comme matrice. Le même procédé est appliqué qu'en chapitre 2, selon les conditions optimisées (concentration en sel, pression du microfluidizer, puissance-temps de photopolymérisation, purification).

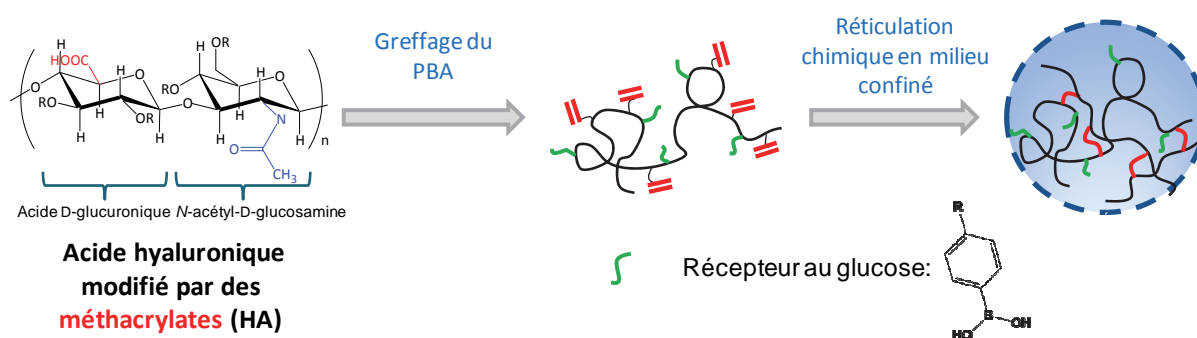


Figure 3.11 : Stratégie globale de la synthèse des nanogels de HA sensibles au glucose.

II.1. Synthèse des précurseurs HA-MA-PBA

II.1.1. Voie de synthèse

La synthèse des HA-MA-PBA est réalisée en deux étapes. Le HA est tout d'abord modifié par les fonctions méthacrylates, par une réaction d'estérification entre les fonctions hydroxyles du HA et l'anhydride méthacrylate (cf. chapitre 2). Pour tous les précurseurs synthétisés, le nombre d'équivalents de méthacrylate a été choisi de 0.2 par rapport au HA. Ce taux de réticulation intermédiaire, permet d'obtenir des nanogels suffisamment réticulés pour avoir un bon contrôle de leur morphologie (cf. chapitre 2), et des nanogels suffisamment flexibles pour atteindre des variations de gonflement importantes en présence de glucose (hypothèse émise pour une obtenir une réponse au glucose). Après purification et lyophilisation du produit final (HA-MA), le taux d'incorporation en méthacrylate est vérifié

par $^1\text{H-RMN}$. Le greffage des PBA est ensuite effectué sur ce HA-MA, par couplage peptidique de la fonction amine de l'AECPBA, $\text{pK}_\text{A} = 7.8$ (Figure 3.12 a), ou de l'APBA, $\text{pK}_\text{A} = 8.4$ (Figure 3.12 b), sur les fonctions carboxyliques du HA. Ce couplage est réalisé dans un mélange eau/EtOH, en présence d'EDC afin d'activer les fonctions carboxyliques, et d'hydroxybenzotriazole (HOBt) pour améliorer l'efficacité de cette activation. Les précurseurs HA-MA-PBA₁ et HA-MA-PBA₂ ont été synthétisés dans les conditions utilisées par nos partenaires du CERMAV. En adaptant nos conditions utilisées pour le greffage des PAA-PBA décrites en section I, nous avons synthétisé les précurseurs HA-MA-PBA₃ à HA-MA-PBA₇, mais de l'HOBt a également été utilisé afin d'améliorer l'efficacité du greffage. Ce choix peut se justifier du fait d'une masse molaire plus élevée pour le HA en comparaison au PAA utilisé précédemment.

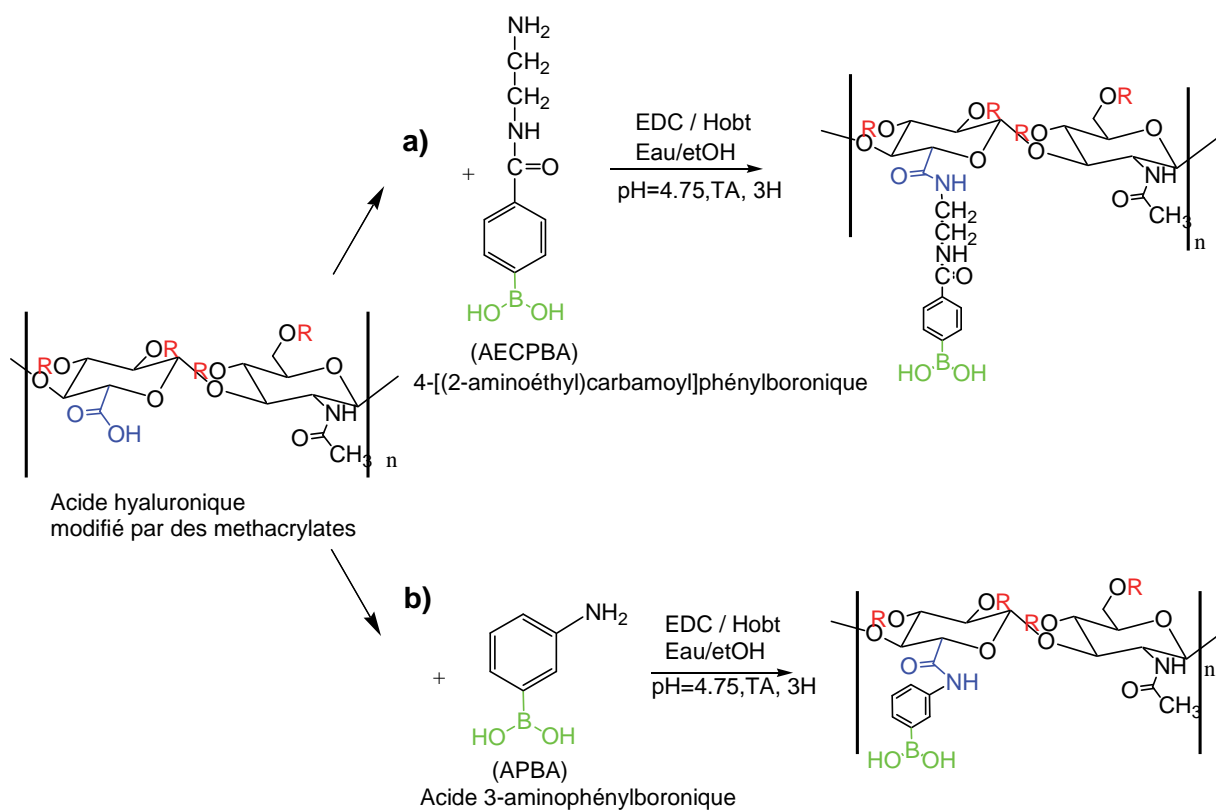


Figure 3.12 : Stratégie de synthèse envisagée pour la synthèse du HA-MA-PBA : a) PBA=AECPBA et b) PBA=APBA. .

II.1.2. Résultats obtenus

Les conditions expérimentales pour chaque synthèse sont détaillées en Tableau 3.4. Les rendements obtenus, calculés par rapport à la masse initiale de HA, sont très acceptables oscillant entre 75 et 100 %. Pour chaque précurseur, le degré de substitution en PBA (DS), déterminé comme le ratio des intégrations relatives entre le pic correspondant aux protons aromatiques du PBA à 7.8 ppm et celui des protons anomériques à 4.5 et 4.6 ppm a été calculé (Figure 3.13). Pour les précurseurs HA-MA-PBA₁ à HA-MA-PBA₃ (même nombre d'équivalents initial en PBA), les quantités d'EDC et d'HOBt utilisées ne semblent pas avoir d'influence sur l'évolution du DS. En revanche, on constate que selon le nombre d'équivalents PBA ajouté (PAA-PBA₁ et PAA-PBA₂), les taux de greffage varient, et différents précurseurs avec des DS variant entre 0.04 et 0.1 sont obtenus. Au contraire, et ce de façon générale, les taux d'incorporation du PBA, avec PBA=APBA, semblent bien meilleurs que ceux avec PBA=AACPBA. Aussi, on retrouve les mêmes tendances observées pour le greffage des PBA sur le PAA (section I.2.3), mais de façon plus prononcée. Ainsi, les précurseurs PAA-PBA₅ à PAA-PBA₇ sont obtenus avec des DS variables de 0.5 à 0.7 selon le nombre d'équivalents de PBA introduits.

Tableau 3.4 : Conditions de synthèse des précurseurs de HA-MA-PBA synthétisés.

HA-MA-PBA _x	DM ^a	Récepteur PBA greffé	Eq PBA (/HA)	Eq EDC/HOBT (/HA)	DS ^b	Rendement (%)
HA-MA-PBA ₁	0.15	AACPBA	0.5	2/3	0.04	90
HA-MA-PBA ₂	0.15	AACPBA	2	2/3	0.08	83
HA-MA-PBA ₃	0.25	AACPBA	0.48	1/0	0.04	99
HA-MA-PBA ₄	0.25	AACPBA	0.48	1/1	0.10	80
HA-MA-PBA ₅	0.22	APBA	1	1/1	0.60	93
HA-MA-PBA ₆	0.17	APBA	2	1/1	0.70	104
HA-MA-PBA ₇	0.17	APBA	1	1/1	0.50	75

^a: Degré de Méthacrylation (DM) obtenu ¹H-RMN.

^b: Degré de Substitution en en PBA (DS), déterminé par ¹H-RMN.

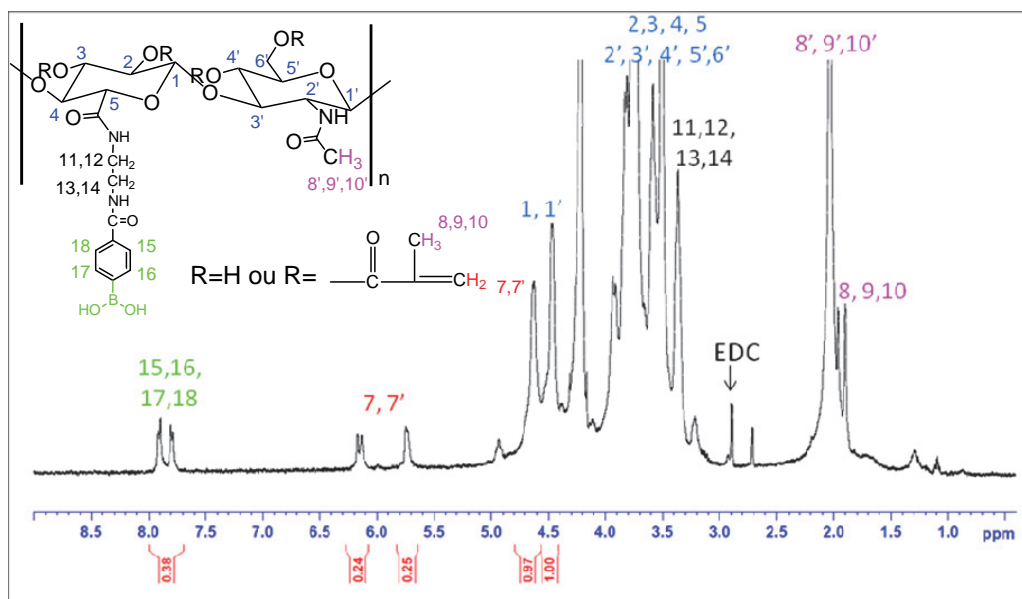


Figure 3.13 : Spectre proton obtenu pour le HA-MA-PBA₄. ¹H NMR (400 MHz, 128 scans, D₂O, 80°C) : δ (ppm): 1.87 (s, 3H, CH₃(MA)), 1.95 (s, 3H, CH₃(MA)), 2.01 (s, 3H, CH₃(CO)), 3.8-3.2 (br, 9H, protons HA), 3.30 (t, 4H, NH-CH₂-CH₂-NH), 4.48 (d, J=7.7 Hz, 1H'), 4.61 (d, J=8.3 Hz, 1H), 5.71 (d, J=7.8 Hz, 1H, CH₂=), 6.12 (d, J=14Hz, 1H CH₂=), 7.78 (4H, dd, J₁=8.4 Hz, J₂=23.0Hz NH-CO-C₆H₄-B(OH)₂).

L'incorporation du dérivé PBA a également été vérifiée par spectroscopie IR. En Figure 3.14, les spectres IR du HA-PBA₁ et du HA-PBA₂ sont comparés à ceux du HA-MA et de l'AECPBA. On constate l'apparition d'une bande à 1650 cm⁻¹, correspondant à la bande de vibration de valence de l'amide (flèche orange). L'AECPBA est caractérisé par une bande à 1330 cm⁻¹ attribuée à la vibration de la liaison C_{phen}-B ; néanmoins, cette bande est difficilement observable sur le spectre des HA, probablement dû au recouvrement avec les bandes caractéristiques du HA-MA.

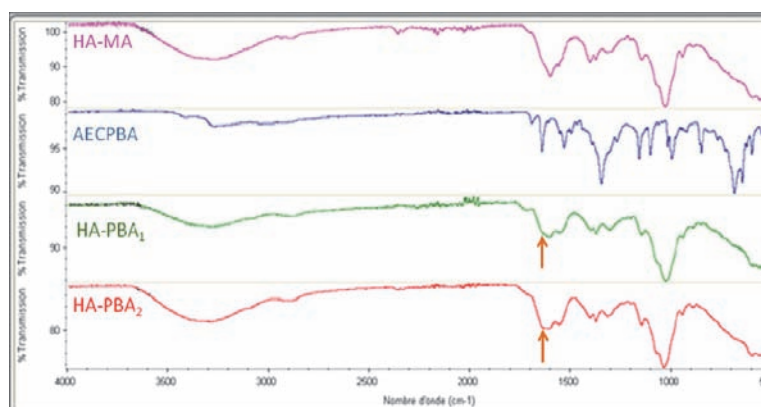


Figure 3.14 : Spectres infra-rouge du HA-MA (en magenta), de l'AECPBA (en bleu), du HA-PBA₁ (en vert) et du HA-PBA₂ (en rouge).

II.2. Nanogels de HA-MA-PBA, avec PBA=AACPBA

Bien que les taux d'incorporation en PBA soient plus faibles dans le cas où PBA=AACPBA, des nanogels du précurseur HA-MA-PBA₂ ont d'abord été formulés par miniémulsion inverse homogénéisée sous haute pression (EM15). Notre choix s'est porté sur l'AACPBA, $pK_A=7.8$ afin de potentiellement obtenir une réponse au glucose à pH physiologique.

II.2.1. Caractéristiques de l'émulsion matricielle

Suivant le même protocole qu'en chapitre 2, la phase aqueuse contient 1.5 wt% de HA-MA-PBA₂ solubilisé dans une solution saline à 0.15 M en présence d'Irgacure 2959. La phase organique de l'émulsion est constituée d'octane et de 8 wt% de Span 80. Les deux phases sont ensuite mélangées sous agitation magnétique pendant 15 min, puis la pré-émulsion est homogénéisée sous haute pression (conditions : 400 kPa, 50 cycles). Après une caractérisation macroscopique et granulométrique de l'émulsion EM15 résultante, 2.3 mL sont prélevés et placés dans une cuve en quartz, puis irradiés selon les conditions décrites en chapitre 2, *i.e.* 1H-10% Pmax, 1H-100% Pmax et 2H-100% Pmax. Pour chaque condition, le diamètre hydrodynamique est vérifié de façon systématique avant et après irradiation sous UV. En Figure 3.15 a), les caractéristiques de l'émulsion EM15 avant photopolymérisation sont rassemblées. Une dispersion turbide avec des reflets légèrement bleutés est obtenue. Ces observations indiquent que les gouttes sont de taille nanométrique, confirmées par les mesures du diamètre hydrodynamique par DLS. De plus, ces caractéristiques sont identiques à l'émulsion EM9, préparée à partir du précurseur HA-MA₁, de même DM que le précurseur HA-MA-PBA₂, mais non fonctionnalisé par des boronates. Ainsi, l'incorporation des PBA ne perturbe pas le confinement du précurseur dans les gouttes. L'évolution temporelle de la taille de l'émulsion EM15 a également été suivie sur 24 heures. Le diamètre hydrodynamique augmente de 50 nm après 24 h au repos, T=4°C. Cette évolution correspond à une vitesse de mûrissement de 7.3 nm³/s, suggérant un mûrissement un peu plus rapide que celui des émulsions ne contenant pas de PBA (cf. chapitre 2).

Après photopolymérisation, l'émulsion présente toujours un aspect blanc translucide, signe du maintien à l'état confiné du précurseur HA-MA-PBA₂ dans les gouttes (Figure 3.15 b). L'évolution du diamètre hydrodynamique de l'émulsion en fonction des conditions

d'irradiation a également été suivie. On constate que le diamètre augmente avec la puissance et le temps d'irradiation, et ce de façon identique à l'émulsion EM9. En résumé, les émulsions de HA-MA-PBA se comportent comme les émulsions de HA-MA, malgré une évolution temporelle plus rapide.

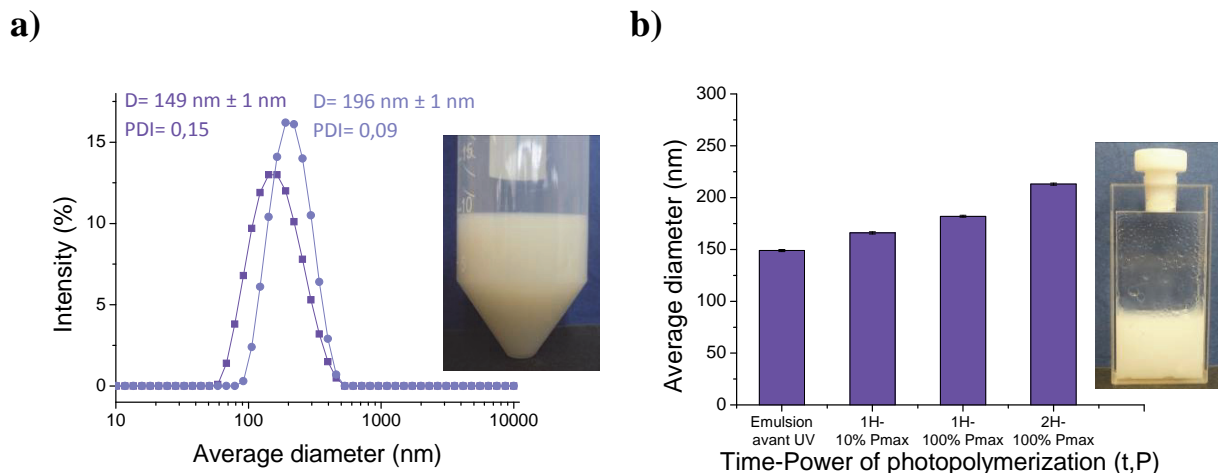


Figure 3.15 : Caractéristiques de l'émulsion EM15 préparée par homogénéisation haute pression. a) Distribution en taille initiale et après 24h au repos de l'émulsion concentrée ($\Phi=10\%$), avant photopolymérisation, et sa vue macroscopique. b) Evolution de cette distribution avec le temps et la puissance d'irradiation.

II.2.2. Caractéristiques des nanogels de HA-MA-PBA

L'émulsion EM15 a ensuite été purifiée de l'huile et des tensioactifs par plusieurs cycles de lavages au THF (cf. chapitre 2). La masse sèche ainsi récupérée est redispersée dans l'eau pendant 24H.

II.2.2.1. Morphologie des nanogels

Les nanogels (**nanogel 7**) sont ensuite analysés à l'état sec par microscopie électronique à transmission (Figure 3.16). A titre d'exemple, les caractéristiques microscopiques des nanogels photopolymérisés 1H-100% Pmax (Figure 3.16 a) et 2H-100% Pmax (Figure 3.16 b) sont illustrées. Des structures sphériques au contour relativement diffus, similaires à celles obtenues en l'absence de PBA, sont observées et cet aspect est typique de nanogels à l'état sec.

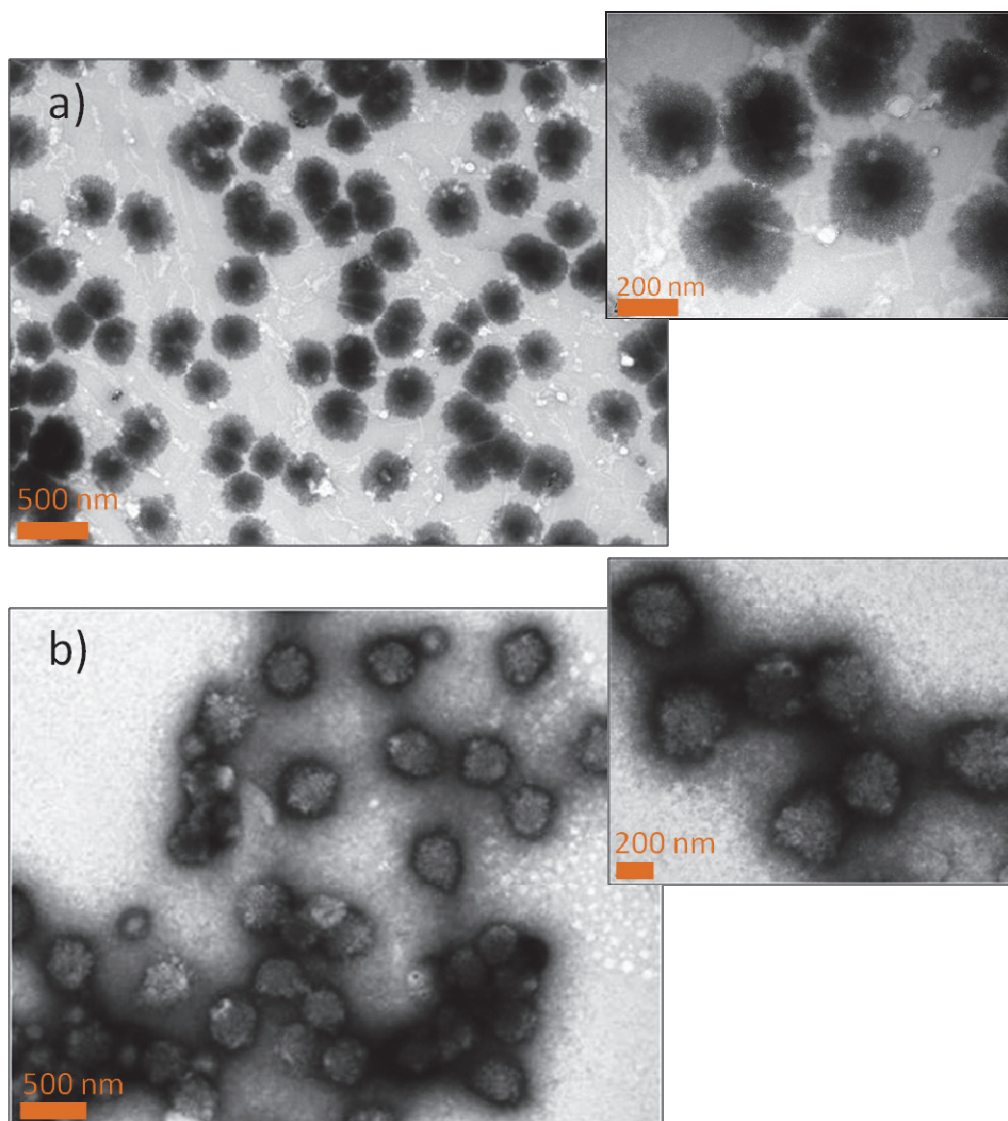


Figure 3.16 : Clichés de TEM des nanogels de HA-MA-PBA₂ (**nanogel 7**) à l'état sec, résultant d'une irradiation sous UV: a) à 1H-100% de la puissance maximale de la lampe ; b) à 2H-100% de la puissance maximale de la lampe. Les clichés sont obtenus en présence d'agent de contraste: a) avec de l'acide phosphotungstique ; b) avec de l'acétate d'uranyle.

La présence de boronates peut être révélée *via* leur complexation avec le rouge Alizarine (ARS). Comme reporté en chapitre 1, cette méthode, initialement utilisée pour déterminer les constantes d'association entre l'acide boronique avec un diol, combine l'ARS, molécule non fluorescente, qui le devient par complexation avec les acides boroniques¹⁷. Ainsi, la présence de PBA sur les nanogels peut être vérifiée par observation en microscopie de fluorescence. Comme illustré en Figure 3.17, les nanogels incubés dans une solution d'ARS à pH=8.5 (afin de promouvoir la forme chargée du PBA) fluorescent, prouvant l'incorporation du PBA dans la matrice.

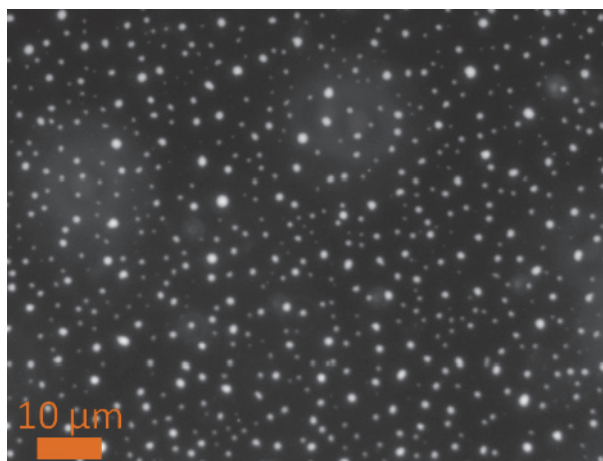


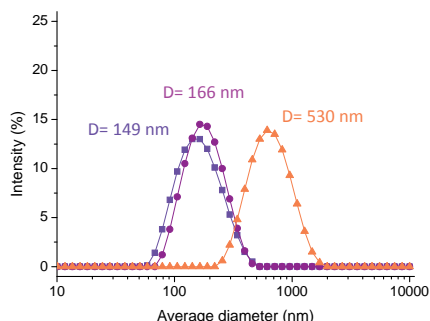
Figure 3.17 : Cliché de microscopie optique par fluorescence des nanogels de HA-MA-PBA₂ en présence d'ARS. Conditions : Filtre FITC, 0.2 mM en ARS.

II.2.2.2. Comportement en solution

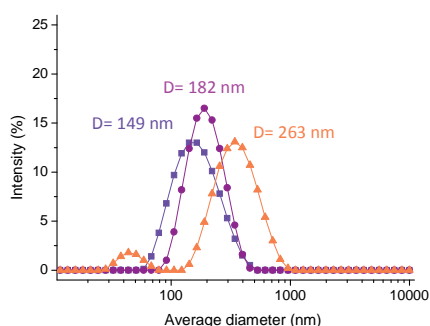
Comme discuté en chapitre 2, les nanogels sont des structures poreuses et fortement hydratées. Ainsi, leurs propriétés en solution reflètent le degré de gonflement et la réticulation du réseau. Nous avons évalué ces propriétés par mesure du diamètre hydrodynamique des nanogels dans l'eau. Pour chaque condition d'irradiation, celui-ci a été systématiquement comparé au diamètre hydrodynamique de l'émulsion matricielle, avant et après photopolymérisation. La Figure 3.18 compare ces trois distributions pour les conditions d'irradiation respectives, 1H-10% (a), 1H-100% (b) et 2H-100% (c) de la puissance maximale. Une distribution monodisperse est obtenue pour les nanogels irradiés 1H-10% P_{max}. En revanche, la présence d'un pic additionnel à 30 nm est observée pour les nanogels irradiés aux plus fortes conditions. Leur origine sera commentée ultérieurement. Tous les diamètres hydrodynamiques sont rassemblés en Figure 3.18 d). Les mêmes tendances sont observées que pour les nanogels de HA-MA. Le diamètre hydrodynamique des nanogels dans l'eau est bien supérieur à celui de l'émulsion matricielle, avant et après photopolymérisation, et ce pour chaque condition d'irradiation en temps-puissance. Ainsi, le confinement du polymère dans les nanogouttes perturbe son gonflement à l'état d'équilibre. En outre, la différence entre le diamètre hydrodynamique des nanogels confinés et celui des nanogels redispersés dans l'eau diminue avec l'augmentation du temps-puissance de photopolymérisation. Comme pour les nanogels de HA-MA, ces résultats indiquent clairement que le degré de réticulation évolue avec l'augmentation du temps et de la puissance d'irradiation. Toutefois, on constate que l'influence du sel n'est pas aussi

significative que pour les nanogels de HA-MA, indiquant une moins grande incidence du caractère électrolyte du réseau.

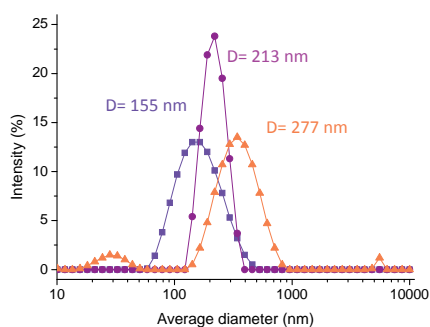
a)



b)



c)



d)

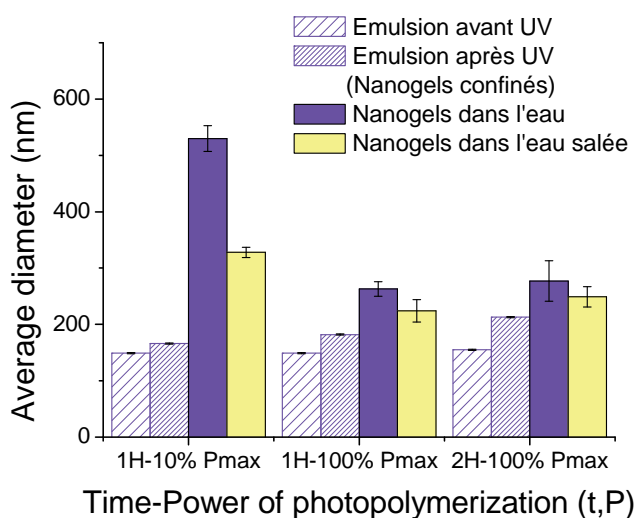


Figure 3.18 : Distributions en taille de l'émulsion EM15 avant irradiation (—■—), après irradiation (—●—) et après redispersion dans l'eau des nanogels résultants (—▲—). Conditions d'irradiation : a) 1H-10% de la puissance maximale ; b) 1H-100% de la puissance maximale ; c) 2H-100% de la puissance maximale. d) Bilan : évolution de la taille de l'émulsion (avant et après photopolymérisation) et des nanogels redispersés en milieu aqueux et salin en fonction des conditions de photopolymérisation pour le précurseur HA-MA-PBA₂, 100 kDa, DM=0.17, DS=0.08, C_p=1.5 wt%.

Afin d'évaluer l'influence de l'incorporation des PBA sur les propriétés de gonflement du réseau, les diamètres hydrodynamiques dans l'eau des nanogels de HA-MA-PBA et des nanogels de HA-MA ont été comparés. Quelles que soient les conditions d'irradiation, le diamètre hydrodynamique des nanogels de HA-MA-PBA est systématiquement plus faible que celui des nanogels de HA-MA. Cette comparaison prouve le caractère plus hydrophobe des nanogels de HA-MA-PBA.

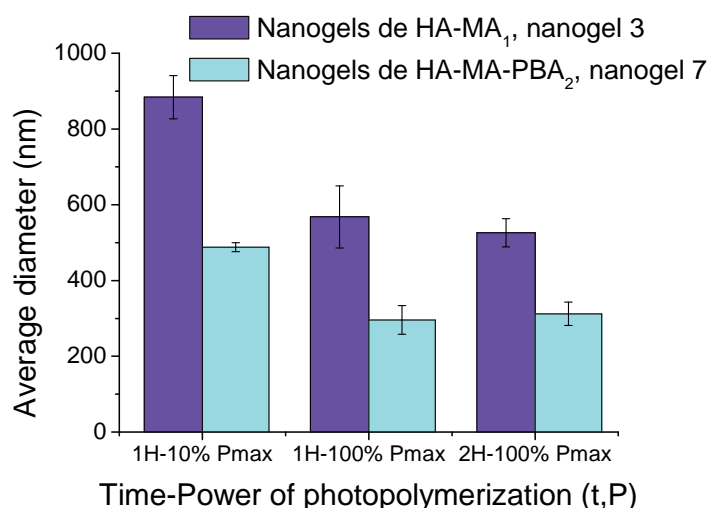


Figure 3.19 : Comparaison des diamètres hydrodynamiques dans l'eau ultrapure (pH=5.5), des nanogels de HA-MA (**nanogel 3**) avec ceux des nanogels de HA-MA-PBA (**nanogel 7**). Les lots comparés présentent le même degré de méthacrylation, $DM \sim 0.15$, et le même $C_p = 1.5$ wt%.

II.2.2.3. Comportement des précurseurs à l'interface

Le squelette du HA est très hydrophile alors que les groupements PBA sont plutôt hydrophobes. Ainsi, les précurseurs HA-MA-PBA possèdent un caractère amphiphile. On peut supposer que lorsque confinés en émulsion inverse, ces précurseurs s'adsorberont à l'interface eau-octane. Afin de vérifier cette hypothèse, des mesures de tension de surface dynamique ont été effectuées par la méthode de la goutte pendante (cf. partie expérimentale), sur une durée de 25 minutes. Comme représenté en Figure 3.20 a), la tension de surface dynamique associée à ce système diminue pendant les 500 premières secondes (~ 8 min), puis devient constante à 62 mN/m. Cette tendance montre que les précurseurs HA-MA-PBA s'adsorbent à l'interface eau-air.

Afin de vérifier que cette tendance provient bien de la contribution des PBA, le comportement à l'interface eau-air du HA-MA-PBA₆ a ensuite été comparé sur 10 min à celui de l'eau, du HA et du HA-MA dans l'eau, à l'interface avec l'air (Figure 3.20 b). Seule, la tension de surface de la solution de HA-MA-PBA diminue au cours du temps. Cette observation indique

que le HA-MA-PBA s'adsorbe progressivement à l'interface eau-air. Ainsi, lors de la formulation des émulsions inverses, une partie des précurseurs peuvent s'adsorber à l'interface eau-octane. L'impact de ce phénomène sur les morphologies observées n'est pas clair. Il ne semble pas empêcher la formation de nanogels issus de la réticulation des précurseurs en phase aqueuse. Si tous les précurseurs s'adsorbaient, on pourrait penser que leur réticulation donne lieu à des structures creuses ; pourtant celles-ci n'ont pas été mises en évidence.

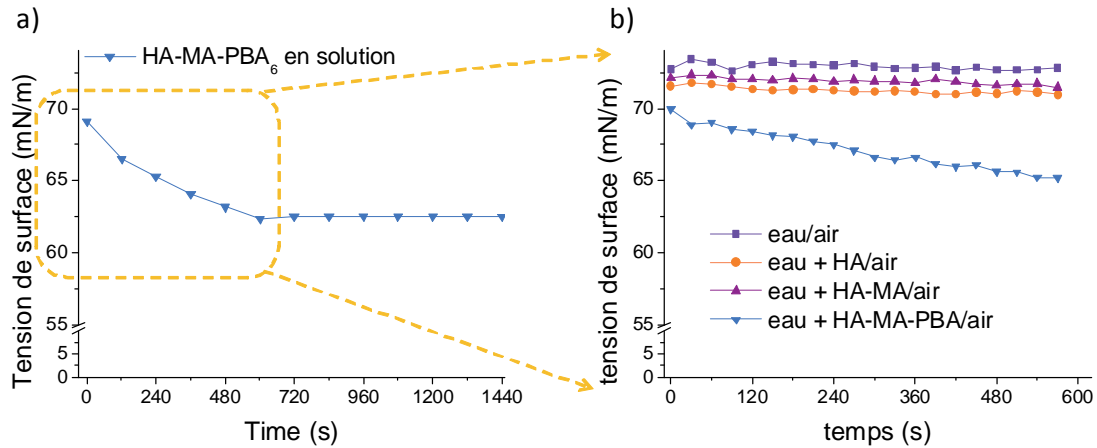


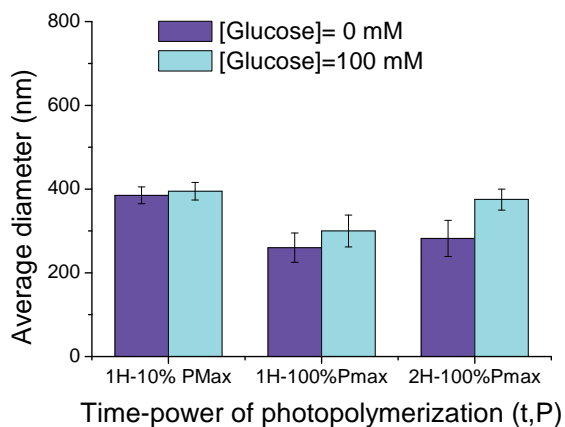
Figure 3.20 : a) Evolution sur 25 min de la tension de surface, mesurée par la méthode de la goutte pendante, d'une goutte de solution aqueuse de HA-MA-PBA (dans l'eau pure, pH=5.5) à l'interface avec l'air (—▼). b) Comparaison sur 10 min avec les tensions de surface à l'interface : (—■) eau/air (—●) ; eau + HA-air (—▲) ; eau + HA-MA/air.

II.2.3. Réponse au glucose

Les propriétés de gonflement des nanogels de HA-MA-PBA₂ (**nanogel 7**) en réponse au glucose, en fonction de leur degré de réticulation (conditions d'irradiation variable) ont ensuite été examinées. Les diamètres hydrodynamiques des nanogels à pH physiologique, à faible et forte salinité, avec et sans glucose, ont été mesurés par DLS. Comme le souligne le graphe de la Figure 3.21 a), le diamètre hydrodynamique des nanogels peu réticulés (1H-10% Pmax) augmente très peu à faible salinité en présence de 100 mM de glucose. Lorsque la réticulation du réseau augmente, les tendances s'exaltent et une augmentation de taille de 100 nm est observée en présence de glucose (nanogels 2h-100% PMax). Ainsi, cette croissance semble traduire le déplacement de l'équilibre vers la forme chargée des PBA en présence de glucose, inférant une augmentation de l'état de charge du réseau, qui gonfle. Malheureusement, à forte salinité, les diamètres hydrodynamiques sont similaires en présence

et en l'absence de glucose, et ce quel que soit le degré de réticulation du réseau (Figure 3.21 b).

a) Tampon phosphate 4mM, pH=7.4



b) PBS, pH=7.4

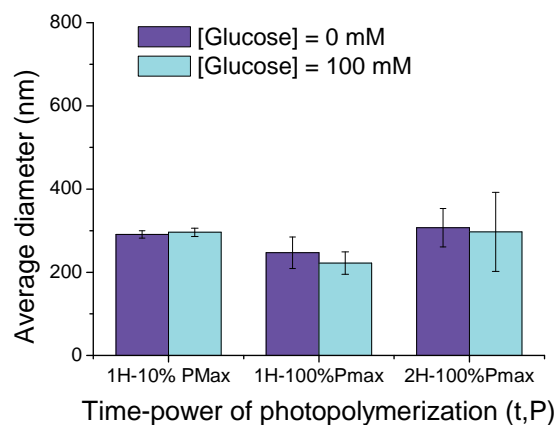


Figure 3.21 : Evolution du diamètre hydrodynamique de la série **nanogel 7** en présence et en l'absence de glucose : a) en milieu tampon phosphate 4mM, pH=7.4 ; b) en milieu Tampon Phosphate Salin (PBS), pH=7.4, T=25°C. Conditions : précurseur HA-MA-PBA₂, 100 kDa, DM=0.17, DS=0.08, C_p=1.5 wt%.

Ainsi, un gonflement en réponse au glucose est observé. Celui-ci peut avoir pour origine l'augmentation de la densité de charge, couplée à l'augmentation de l'hydrophilie de la chaîne. L'augmentation de la densité de charge conduit généralement à un gonflement lié à l'augmentation de la pression osmotique des contre-ions au sein du réseau. Un tel gonflement ne peut être observé en milieu physiologique, car la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur des nanogels, n'est pas assez prononcée. Jusqu'à présent, les gels de nature hydrophile n'ont pas permis la détection du glucose en milieu physiologique³. En revanche, le changement d'affinité pour le solvant lié au passage hydrophobe – hydrophile, peut conduire à une modification du taux de gonflement¹. Il n'est toutefois pas observé ici, probablement en raison d'un trop faible taux de substitution. Plusieurs efforts ont alors été dédiés à l'amélioration du taux de greffage de l'AECBA sur le HA (synthèse HA-MA-PBA₃ et HA-MA-PBA₄) mais comme reporté précédemment en Tableau 3.4, cette amélioration n'a pas été observée.

Nous avons alors décidé d'augmenter la concentration en précurseur dans les gouttes ($C_p = 3 \text{ wt}\%$) et de formuler deux séries de nanogels par miniémulsion inverse (EM16 et EM17), l'une à partir du précurseur HA-MA-PBA₂ (**nanogel 8**) et l'autre à partir du précurseur HA-MA-PBA₃ (**nanogel 9**). La série **nanogel 8** n'a pu être étudiée en fonction du glucose car les cinétiques de redispersion des nanogels dans l'eau se sont révélées très lentes voire *quasi* inexistantes. A noter que la redispersion s'était avérée plus difficile pour la série **nanogel 7** en comparaison à celle des séries de nanogels de HA-MA, avec une cinétique de redispersion sur 7 jours au lieu de 2 jours. Ces observations qualitatives indiquent que la présence du PBA induit un caractère cohésif des particules déshydratées, empêchant une bonne redispersion lors de la réhydratation. Ainsi, seule la série **nanogel 9** a été étudiée. Les diamètres hydrodynamiques des nanogels à pH 7.4, avec et sans glucose, sont reportés pour une faible et forte salinité en Tableau 3.5 a) et b) respectivement.

Plusieurs tendances se dessinent:

1) Vérification de l'influence du degré de réticulation

La diminution du diamètre hydrodynamique avec l'augmentation de la puissance d'irradiation est de nouveau confirmée et reproduite sur les deux séries de mesures, à forte et faible salinité.

2) Reproductibilité des mesures

La reproductibilité des mesures est vérifiée à maximum $\pm 30 \text{ nm}$ en l'absence de glucose, à faible et forte salinité, à l'exception des nanogels 1H-100% Pmax dans le PBS (différence de 40 nm entre les deux mesures). Ainsi, les mesures semblent relativement fiables en l'absence de glucose.

3) Comparaison colonne avec et sans glucose

Lors de l'ajout de glucose, des résultats antagonistes sont obtenus, selon le degré de réticulation du réseau, mais aussi à l'échelle de la mesure pour une même réticulation. A titre d'exemple, pour les nanogels réticulés dans les conditions 1H-100% Pmax, la première mesure à faible salinité traduit un gonflement du réseau en présence de glucose, alors que la deuxième révèle une contraction (Tableau 3.5 a). A forte salinité (Tableau 3.5 b), la balance penche plutôt vers une contraction (mesure 1). Ainsi, il est impossible d'esquisser une sensibilité au glucose franche, du fait des tendances antagonistes à l'échelle de la mesure. Il convient de mentionner l'observation de fluctuations notables au cours des mesures DLS en présence de glucose, induisant des réponses aléatoires, qui sont non observées en l'absence de

glucose. Peut-être ce comportement provient des effets cinétiques, mais cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée, due à la limitation du nombre de mesures par manque de matériaux (les nanogels ayant des faibles contrastes d'indice, la quantité requise pour mesurer le signal de diffusion est relativement importante ; cf. partie expérimentale).

Tableau 3.5 : Diamètres hydrodynamiques et (PDI) obtenus pour la série **nanogel 9** (conditions 1H-10%, 1H-100% et 2H-100% de la puissance maximale), en l'absence ou en présence de 100 mM de glucose : a) en milieu tampon phosphate 4 mM, pH 7.4, et b) dans le PBS. Les valeurs en rouge traduisent une contraction du gel en présence de glucose alors que celles en violet correspondent à un gonflement. Conditions : précurseur HA-MA-PBA₄, 100 kDa, DM=0.25, DS=0.10, C_p=3 wt%.

a) Phosphate 4mM, pH=7.4	1H-10%Pmax		1H-100%Pmax		2H-100%Pmax	
	Sans glucose	Glucose 100 mM	Sans glucose	Glucose 100 mM	Sans glucose	Glucose 100 mM
Mesure 1	463±23 (0.46)	371±11 (0.40)	231±15 (0.44)	318±14 (0.44)	242±25 (0.49)	252±13 (0.52)
Mesure 2	460±13 (0.46)	475±14 (0.37)	264±37 (0.48)	216±14 (0.55)	275±51 (0.51)	207±10 (0.48)

b) PBS pH=7.4	1H-10%Pmax		1H-100%Pmax		2H-100%Pmax	
	Sans glucose	Glucose 100 mM	Sans glucose	Glucose 100 mM	Sans glucose	Glucose 100 mM
Mesure 1	355±15 (0.48)	326±20 (0.49)	309±14 (0.53)	217±13 (0.50)	235±16 (0.53)	298±19 (0.55)
Mesure 2	378±27 (0.46)	365±36 (0.39)	266±30 (0.51)	273±27 (0.57)	239±49 (0.52)	212±14 (0.60)

En conclusion, malgré un réel effort d'optimisation des réponses au glucose pour les nanogels de HA-MA-PBA, avec PBA=AECPBA, aucun mécanisme de réponse au glucose ne prédomine. Ce constat provient de l'interprétation difficile des mesures due à leur non-reproductibilité. Le choix du récepteur APBA, pK_A =8.4 a alors été soulevé, puisque, comme reporté en section II.1, leur greffage sur le HA conduit à des taux d'incorporation jusqu'à 7 fois plus élevés. Ainsi, les réponses en présence de glucose pourraient être exaltées, mais cette fois-ci à un pH légèrement basique (proche du pK_A de l'APBA).

II.3. Nanogels de HA-MA-PBA, avec PBA=APBA

II.3.1. Caractéristiques des nanogels

Trois nouvelles séries de nanogels ont été formulées (EM18-EM20), à partir des précurseurs HA-MA-PBA₅, HA-MA-MBA₆ et à HA-MA-PBA₇ respectivement (**nanogel 10-12**). Pour chaque série, la concentration en précurseur dans la phase dispersée est de $C_p = 3$ wt%. Les diamètres hydrodynamiques de l'émulsion avant et après photopolymérisation, et des nanogels correspondants dans l'eau et dans l'eau salée sont résumés en Tableau 3.7. Les valeurs obtenues pour les séries de nanogels précédentes (**nanogel 7 à nanogel 9**) sont également reportées pour une meilleure comparaison. De même que pour les séries **nanogel 7 et 9**, le diamètre hydrodynamique évolue en fonction de la puissance reçue par l'émulsion pour la série **nanogel 10** (Figure 3.22 a). En Figure b), l'influence du taux d'incorporation en PBA a été confirmée, avec une diminution du diamètre hydrodynamique avec des DS en PBA croissants.

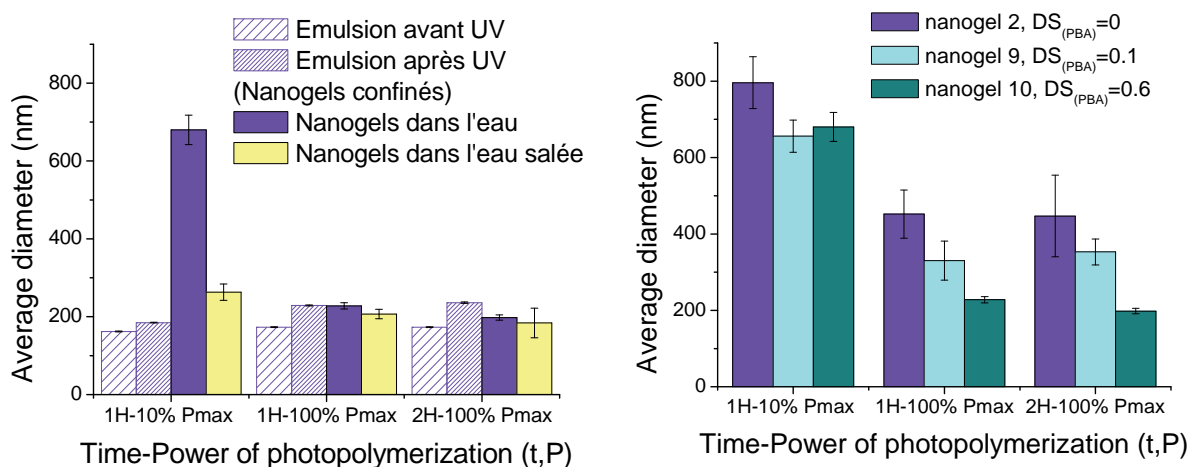


Figure 3.22 : a) Evolution de la taille de l'émulsion (avant et après photopolymérisation) et des nanogels redispersés en milieu aqueux et salin en fonction des conditions de photopolymérisation pour le précurseur HA-MA-PBA₅, 100 kDa, $DM=0.22$, $DS=0.6$, $C_p=3$ wt% (**EM18, nanogel 10**). b) Evolution du diamètre hydrodynamique dans l'eau pure (pH=5.5) des nanogels **2, 9 et 10** de même DM , $C_p = 3$ wt% en fonction du degré de fonctionnalisation en PBA.

Remarque sur les taux de gonflement : De la même façon qu'en chapitre 2, les taux de gonflement de ces 3 séries de nanogels ont été calculés (Tableau 3.6), révélant l'influence du taux d'incorporation des PBA par une diminution des taux de gonflement du réseau.

Tableau 3.6 : Taux de gonflement des séries *nanogel 2, 9 et 10*.

$C_p=3 \text{ wt\%}, DM=0.25$	1H-10% Pmax	1H-100% Pmax	2H-100% Pmax
Nanogel 2, $DS_{(PBA)}=0$	793	145	140
Nanogel 9, $DS_{(PBA)}=0.1$	444	56	59
Nanogel 10, $DS_{(PBA)}=0.6$	494	19	12

Pour la série **nanogel 11**, des tendances surprenantes sont obtenues et l'évolution de la taille du réseau en fonction de la puissance d'irradiation reçue n'est plus vérifiée. Les nanogels sont partiellement agrégés, même après une semaine de redispersion.

Tableau 3.7 : Bilan des nanogels de HA-MA-PBA préparés. Diamètres hydrodynamiques correspondants à l'émulsion avant et après photopolymérisation et aux nanogels dans l'eau et dans l'eau salée (caractéristiques principales).

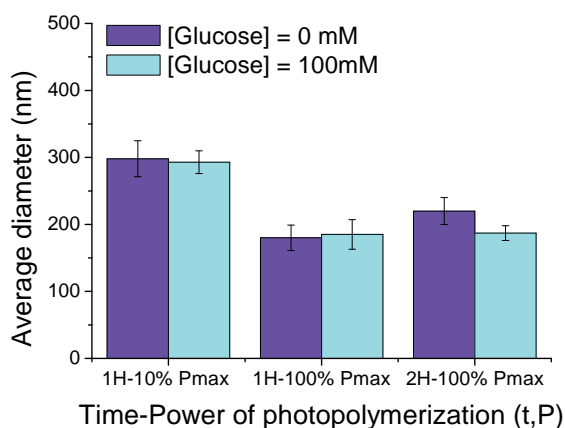
Nanogel	Numéro Emulsion	Caractéristiques Précurseur			Conditions de Photopolymérisation (temps-puissance)	D_H^b émulsion avant UV (nm)	D_H^b émulsion après UV (nm)	D_H^b Nanogels dans l'eau (nm)	D_H^b Nanogels dans l'eau salée (nm)		
		M_w (kDa)	DM^a	PBA						DS^a	C_p (wt%)
7	EM15	100	0.15	AECPBA	0.08	1.5	1H-10%Pmax	135±2	166±1	530±23	328±5
							1H-100%Pmax	149±1	182±1	263±13	224±20
							2H-100%Pmax	155±1	213±1	277±36	249±18
8	EM16	100	0.15	AECPBA	0.08	3.0	1H-10%Pmax	175±1	204±1	717±88	
							1H-100%Pmax	167±1	195±1	447±53	
9	EM17	100	0.25	AECPBA	0.1	3	1H-10%Pmax	126±1	156±1	656±42	414±23
							1H-100%Pmax	126±1	174±1	330±51	263±53
10	EM18	100	0.22	APBA	0.6	3	1H-10%Pmax	142±1	239±1	332±34	235±17
							1H-100%Pmax	162±1	185±1	680±38	
11	EM19	100	0.17	APBA	0.7	3	1H-100%Pmax	173±1	229±1	228±8	
							2H-100%Pmax	173±1	236±2	198±7	
12	EM20	100	0.17	APBA	0.5	3	1H-10%Pmax	287±1	195±1	749±49	453±40
							1H-100%Pmax	195±1	230±2	586±67	351±29
							2H-100%Pmax	192±1	257±2	850±42	623±34
							2H-100%Pmax	130±1	247±2		

^a : Degré de méthacrylation et degré de substitution en PBA déterminé par ¹H-RMN ; ^b Diamètre hydrodynamique déterminé par DLS.

II.3.2. Réponse au glucose

La réponse au glucose (concentration de 100 mM) a ensuite été examinée en milieu tampon phosphate 4mM, [NaCl]=150 mM, à pH=8.5 (pH > pK_A du PBA) et à pH physiologique de 7.4. A titre d'exemple, les tendances obtenues pour la série **nanogel 10** sont reportées en Figure 3.23. A pH 8.5, les diamètres hydrodynamiques des nanogels en présence et en l'absence de glucose restent similaires, et ce pour chaque condition d'irradiation. En revanche, à pH physiologique, certains nanogels (condition 1H-100%) semblent répondre au glucose par un mécanisme de contraction mais cette réponse reste marginale et entachée de barres d'erreur importantes.

a) Tampon phosphate 4 mM, [NaCl] = 150 mM, pH=8.5



b) Tampon phosphate 4mM, [NaCl] = 150 mM, pH=7.4

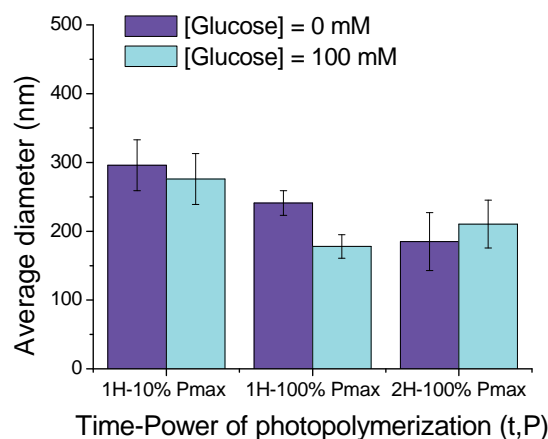


Figure 3.23 : Evolution du diamètre hydrodynamique de la série **nanogel 10** en présence et en l'absence de glucose ([Glucose]=100mM) : a) en milieu tampon phosphate 4mM, [NaCl]=150 mM, pH=7.4 ; b) en milieu tampon phosphate 4mM, [NaCl]=150 mM, pH=7.4. Conditions : précurseur HA-MA-PBA₅, 100 kDa, DM=0.22, DS=0.60, C_p=3 wt%.

En conclusion de cette étude, quelle que soit la nature du récepteur greffé et son taux d'incorporation, des réponses au glucose antagonistes sont obtenues. Aucune tendance ne se dessine réellement, en fonction du degré de réticulation du réseau, et en fonction du taux d'incorporation en PBA. La difficulté de ces études réside à évaluer correctement les mesures de DLS afin d'en extraire les réponses au glucose. Plusieurs problèmes sont venus perturber cette évaluation:

- (i) les nanogels de HA-MA-PBA révèlent des cinétiques de redispersion beaucoup plus lentes que celles des nanogels de HA-MA. Ce phénomène d'agrégation empêche la bonne réalisation des mesures.
- (ii) ces systèmes présentent une population à 30 nm, non présente pour les nanogels de HA-MA, ce qui augmente la polydispersité des dispersions.
- (iii) la reproductibilité des mesures n'est pas toujours observée, en particulier en présence de glucose (cf. **nanogel 9**).

II.4. Mécanismes envisagés

Bien que ces résultats semblent difficilement interprétables au vue des problèmes listés ci-dessus, nous avons essayé d'éclaircir l'analyse et avons supposé qu'au lieu d'un mécanisme, plusieurs mécanismes pourraient être mis en jeu pour induire une réponse au glucose.

Pour expliquer le gonflement des nanogels en présence de glucose, trois mécanismes, représentés en Figure 3.24, pourraient être envisagés pour ce système:

- 1) En présence de glucose, l'équilibre est déplacé vers la forme boronate chargée, inférant une augmentation l'état de charge (hypothèse émise au départ).
- 2) Un gonflement par compétition, comme ce qui a été observé pour les macrogels synthétiques en section 1. Bien qu'*a priori* le HA ne forme pas d'interaction avec les PBA, on ne peut pas éliminer totalement cet effet, qui peut être accentué par le confinement des nanogels.
- 3) Dans ces deux configurations, le phénomène de complexation engage une unité saccharidique pour une unité PBA, et le réseau gonfle en présence de glucose. Or, comme décrit en chapitre 1, une autre stœchiométrie de complexe existe entre le glucose et les PBA : le complexe bis-bidentate glucose-acide boronique, noté complexe 2:1. A noter que selon le pH de la solution, le deuxième site implique la complexation du PBA avec les diols 3,5 et 6 (conditions basiques, coordination tris) ou 5,6 du glucose (conditions acides, coordination bis). Pour expliquer la contraction des nanogels en présence de glucose, on peut alors envisager cette stœchiométrie 2 :1, induisant une contraction du gel par augmentation de sa densité de réticulation⁵.

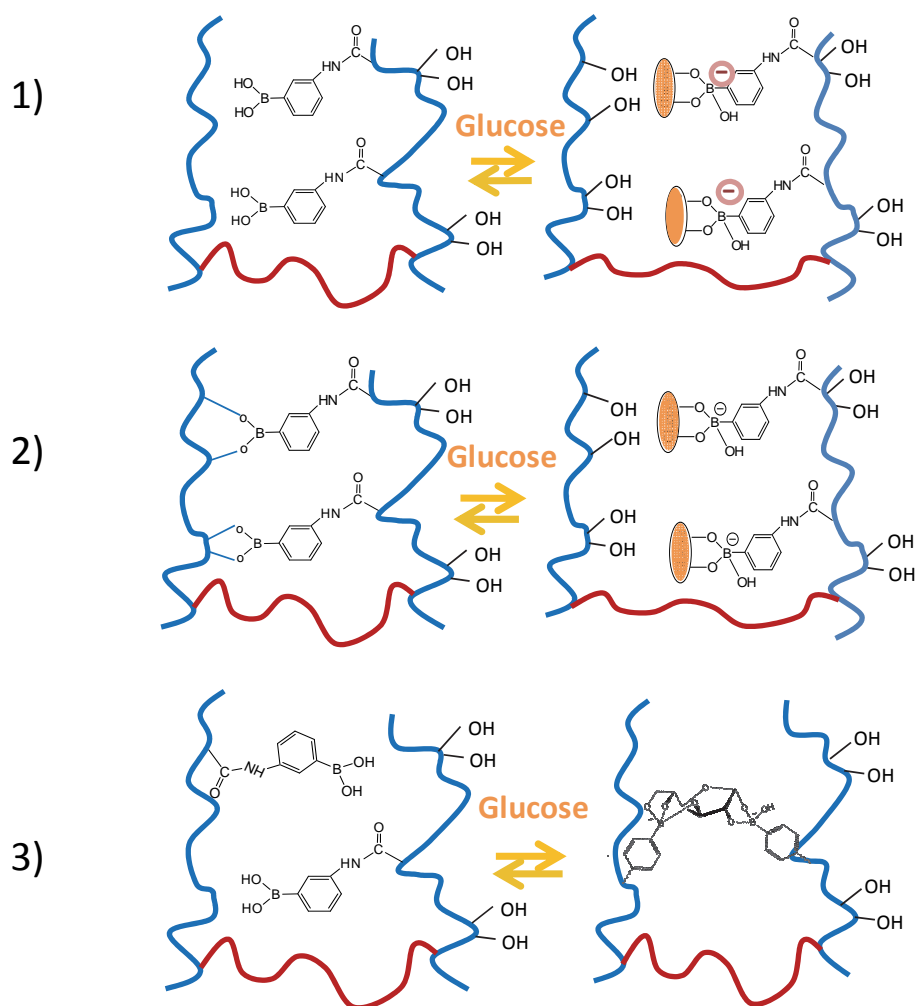


Figure 3.24 : Mécanismes de réponse au glucose envisagés pour les nanogels de HA-MA-PBA. 1) Gonflement du gel par augmentation de l'état de charge ; 2) Gonflement du gel par mécanisme de compétition ; 3) Contraction du gel induite par une complexation 2 :1.

II.4.1. Etudes rhéologiques

Afin de distinguer l'un des deux mécanismes de gonflement, nous avons mené des études rhéologiques sur le précurseur HA-MA-PBA₆, par enregistrement des grandeurs rhéologiques G' (module élastique) et G'' (module de perte). Un hydrogel est caractérisé par son comportement élastique (modèle de l'élasticité caoutchoutique), son module élastique G' étant supérieur au module visqueux G'' de manière analogue au comportement des gels de HA-MA photoréticulés (cf. chapitre 2, section II.3.).

En Figure 3.25, les mesures du G' et G'' du HA-MA-PBA₆, à pH 5.5 et 8.5 sont reportées. Quel que soit le pH du milieu réactionnel, le module élastique G' est inférieur au module visqueux G'' . Cependant, lorsque le pH augmente, passant au dessus du pK_A de l'APBA, ces

deux grandeurs s'élèvent. Ces résultats indiquent que malgré un comportement principalement visqueux des solutions de HA-MA-PBA, il semble que le HA présente de légères interactions avec la forme chargée des boronates. Cependant, ces interactions sont faibles, ce qui corrobore l'absence de gonflement détecté en présence de glucose.

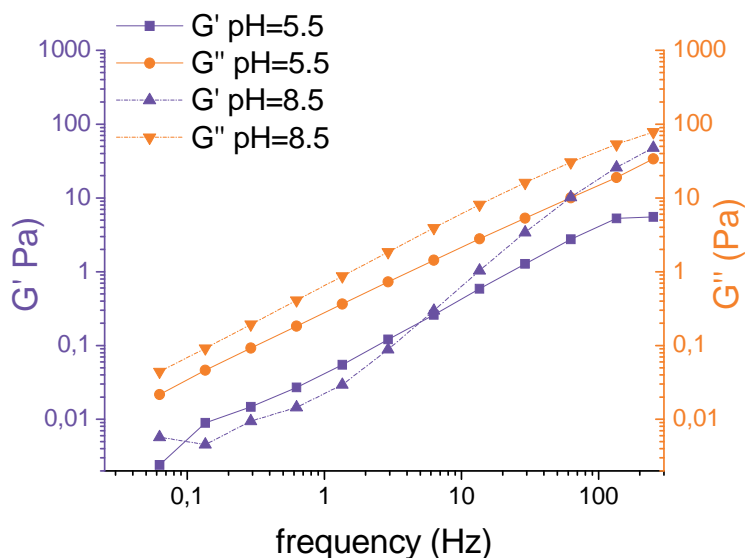


Figure 3.25 : Etudes rhéologiques pour le HA-MA-PBA₆, à 3 wt % en solution aqueuse, [NaCl]=150 mM.

II.4.2. Etudes par spectroscopie ¹H-RMN

Nous avons également mené des expériences de ¹H-RMN, avec un objectif double :

- Comme discuté dans les sections précédentes, plusieurs séries de nanogels (par exemple **nanogel 11**) ont révélé de cinétiques redispersion relativement lentes. Ainsi, le premier objectif est de vérifier que ces synthèses se sont déroulées de manière analogue à celles des HA-MA.
- En deuxième objectif, nous avons cherché à évaluer l'effet du confinement sur ces matériaux (cf. chapitre 2).

II.4.2.1. Influence des conditions d'irradiation sur les signatures ¹H-RMN

Dans cette optique, les spectres ¹H-RMN des nanogels de HA-MA-PBA₆ (**nanogel 11**), irradiés à des temps et des puissances variables, ont été enregistrés. Les spectres obtenus dans le D₂O, pH=5.5 ont été systématiquement comparés à celui du précurseur HA-MA-PBA₆. Comme représenté en Figure 3.26, deux tendances se dessinent :

- l'évolution des pics des méthacrylates à 5.8 et 5.2 ppm reste identique à celle observée pour les nanogels non fonctionnalisés par le PBA. Ainsi, les cinétiques de redispersion observées semblent reliées à la présence des PBA dans le réseau.
- De façon surprenante, il semble qu'une réticulation prononcée du réseau s'accompagne d'une évolution des déplacements des protons des aromatiques des PBA entre 7.2 ppm et 7.8 ppm. Comme reporté en Tableau 3.8, le précurseur HA-MA-PBA₆ présente pour les protons aromatiques quatre pics à respectivement 7.83, 7.60, 7.47 et 7.27 ppm (δ_1 à δ_4). Pour les nanogels réticulés 1H-100%, ces déplacements oscillent entre 6.78 et 7.60 ppm, indiquant un déplacement (blindage) vers les plus faibles déplacements chimiques. Cette tendance est d'autant plus marquée que le réseau a été irradié (2H-100%). Les déplacements chimiques des aromatiques pour les nanogels réticulés 1H-10% semblent quant à eux, résulter de la coexistence des déplacements chimiques du précurseur et des nanogels réticulés 1H-100%. Sachant que le blindage met en évidence une augmentation de la densité électronique, la signature ¹H-RMN des aromatiques des PBA semble une indication supplémentaire du degré de confinement du polymère, par suivi du déplacement des protons des aromatiques (augmentation de leur densité électronique lorsque confinés). Notons que la signature ¹H-RMN des nanogels réticulés 1H-10% peut révéler, soit un état gonflé du réseau, soit la coexistence du précurseur non confiné et de nanogels confinés.

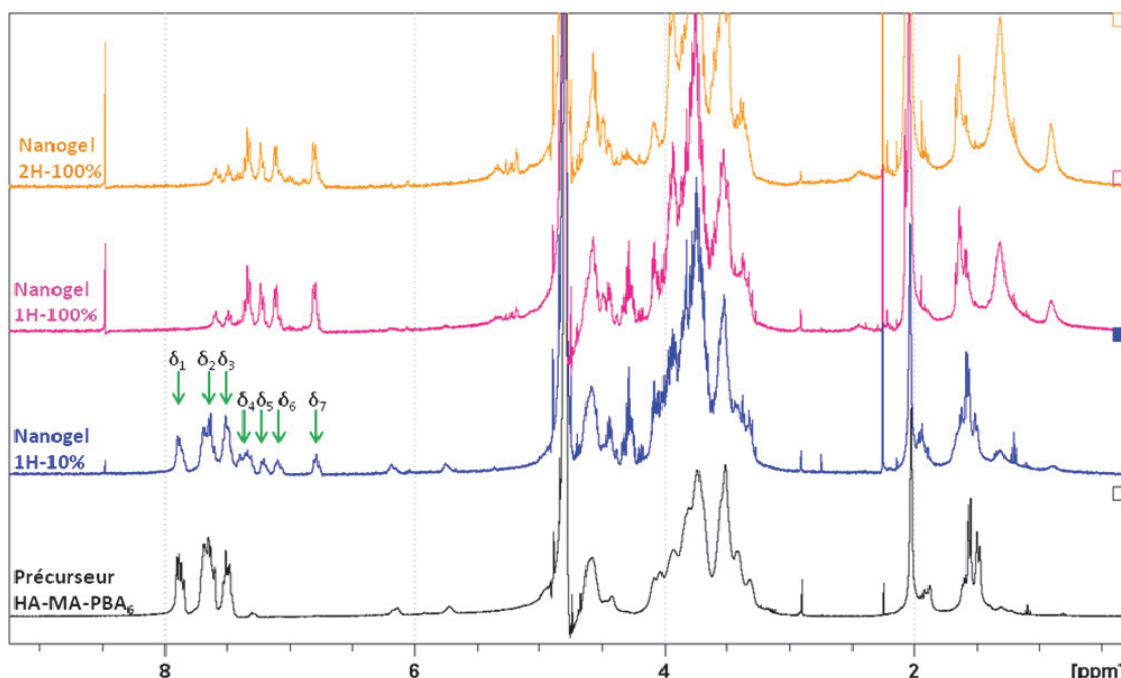


Figure 3.26 : Spectres ¹H-RMN dans le D₂O du précurseur HA-MA-PBA₆ et des nanogels résultants en fonction de leur degré de réticulation. Conditions : T=25°C, 256 scans, C=6 g/L.

Tableau 3.8 : Résumé des déplacements chimiques caractéristiques des aromatiques des boronates en fonction du degré de confinement du polymère.

	δ_1 (ppm)	δ_2 (ppm)	δ_3 (ppm)	δ_4 (ppm)	δ_5 (ppm)	δ_6 (ppm)	δ_7 (ppm)
Précurseur HA-MA-PBA₆	7.83	7.60	7.47	7.27			
nanogels 1H-10%Pmax	7.86	7.63	7.48	7.35	7.20	7.05	6.78
nanogels 1H-100%Pmax		7.60	7.46	7.31	7.20	7.09	6.78
nanogels 2H-100%Pmax		7.55	7.46	7.32	7.20	7.09	6.78

II.4.2.2. Effet du pH et de la concentration en glucose

Ces résultats ont alors aiguillés notre intérêt. Ces différences spectrales sont-elles uniquement liées au confinement du polymère, ou pourraient-elles résulter d'interactions entre les PBA et la chaîne de HA (complexation) ? Afin de répondre à ces interrogations, nous avons cherché à favoriser ces interactions par augmentation du pH et de la concentration en glucose dans la dispersion. En Figure 3.27, les spectres ¹H-RMN zoomés sur les aromatiques entre 6 et 9 ppm, à pH 5.5 (en noir), à pH 9 (en bleu), et à pH 9 en présence de 100 mM de glucose (en rose), sont représentés pour le précurseur HA-MA-PBA₆ (a) et les nanogels irradiés 2h-100% (b). Les valeurs des déplacements chimiques du précurseur et des nanogels réticulés 2H-100% sont également résumées en Tableau 3.9, afin de chiffrer leurs variations avec les conditions environnementales.

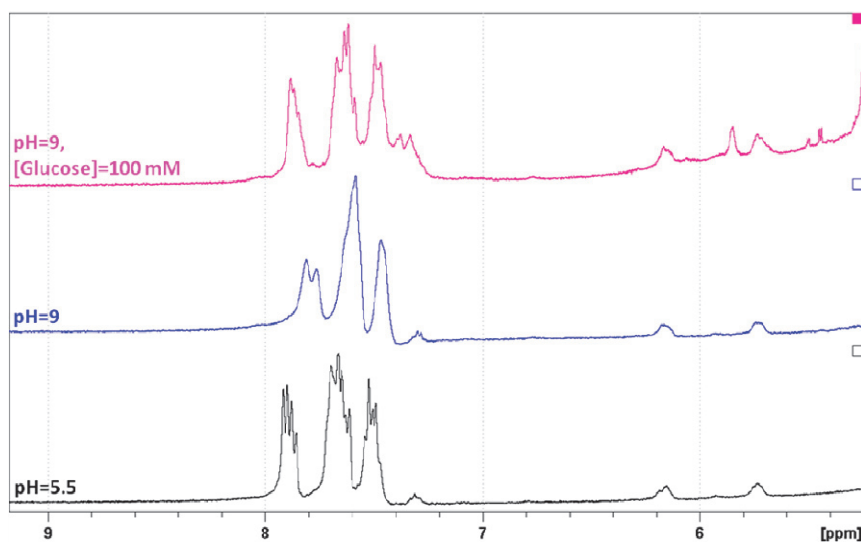
- Pour le **précurseur**, on constate que le pH ou la concentration en glucose semble avoir peu d'effet sur les déplacements chimiques.

- En revanche, pour les **nanogels réticulés 2H-100%**, l'augmentation du pH semble influencer sur les déplacements chimiques des aromatiques, qui se décalent de 0.1 à 0.3 ppm vers les plus faibles déplacements (blindage). Toutefois, en présence de glucose, ces mêmes déplacements reviennent vers les plus hauts déplacements (déblindage). Ces variations sont pointées par les flèches vertes, Figure 3.27 b).

Ces tendances suggèrent qu'il est possible de distinguer l'effet du confinement de celui de la complexation. Si l'hypothèse d'un mécanisme de gonflement par augmentation de la densité de charge était unique (mécanisme 1, Figure 3.24), on aurait pu s'attendre à ce qu'à pH=9 et à pH=9 + glucose, le passage à la forme chargée puis sa complexation avec le glucose induise un déblindage des aromatiques, traduisant une variation du gonflement du réseau. Or, à pH 9,

on blinde les déplacements alors qu'on les déblinde en présence de glucose. Ces variations pourraient plutôt suggérer qu'à pH 9, on renforce le blindage par confinement, prouvant l'apparition de réticulations supplémentaires. Ces réticulations se rompraient en présence de glucose, due à la complexation de celui-ci avec les PBA. Cette hypothèse paraît raisonnable mais demeure à confirmer par des analyses approfondies.

a)



b)

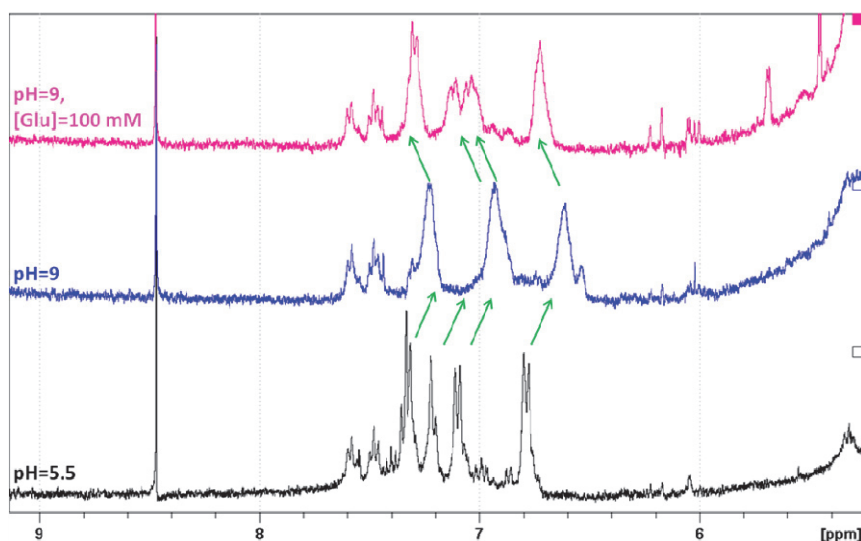


Figure 3.27 : Spectres ^1H -RMN, zoomés sur les aromatiques entre 6 et 9 ppm, en fonction du pH et de la présence de glucose pour : a) le précurseur HA-MA-PBA₆ ; b) les nanogels irradiés 2H-100% Pmax. Conditions: $T=25^\circ\text{C}$, 256 scans, $C=6\text{ g/L}$.

Tableau 3.9 : Evolution des déplacements chimiques des aromatiques en fonction du pH et de la concentration en glucose : a) pour le précurseur HA-MA-PBA₆ ; b) pour les nanogels réticulés 2H-100 Pmax.

a) Précurseur HA-MA-PBA₆	δ_1 (ppm)	δ_2 (ppm)	δ_3 (ppm)	δ_4 (ppm)	δ_5 (ppm)	δ_6 (ppm)	δ_7 (ppm)
pH=5.5	7.83	7.59	7.46	7.28			
pH=9	7.75	7.58	7.46	7.28			
pH=9, [Glucose]=100 mM	7.86	7.59	7.48	7.34			

b) Nanogels irradiés 2H-100%	δ_1 (ppm)	δ_2 (ppm)	δ_3 (ppm)	δ_4 (ppm)	δ_5 (ppm)	δ_6 (ppm)	δ_7 (ppm)
pH=5.5		7.55	7.46	7.32	7.20	7.09	6.78
pH=9		7.58	7.46	7.23	6.93	6.93	6.61
pH=9, [Glucose]=100 mM		7.56	7.42	7.26	7.09	7.01	6.71

Conclusion

En conclusion, ce chapitre valide la fabrication de macrogels sensibles au glucose par l'utilisation des réseaux interpénétrés, composés soit du système PAA-PBA/PVA, soit du système HA-PBA/HA-maltose (Grenoble). La complexation entre précurseur hôte et précurseur invité dépend de paramètres structuraux (nature du PBA, nombre d'unités PBA greffé, concentration en précurseur hôte), et de paramètres environnementaux tels que le pH et la concentration en glucose. Pour les macrogels, le mécanisme de gonflement est induit par compétition entre la complexation précurseur hôte/invité, et celle précurseur hôte/glucose libre.

L'adaptation de ce concept n'a pas été testée à l'échelle des nanogels, mais l'effet de l'introduction des fonctions boronates a été étudiée. La synthèse de nanogels de HA-MA fonctionnalisés par le PBA a été réalisée avec succès en tirant profit de la méthode mise au point au chapitre 2. Ces objets comportent de nombreuses similitudes avec leurs homologues non fonctionnels. L'introduction des fonctions acide boronique leur confère cependant un caractère hydrophobe, à l'origine de problèmes de redispersion en solution aqueuse. L'ajout de glucose ne semble pas provoquer de réponse en termes de gonflement, bien que des

interactions entre les boronates et les diols du HA puissent donner lieu à des réticulations sensibles au glucose. Cependant, nous avons montré que ces interactions étaient bien moins fortes que dans le cas des hydrogels interpénétrés. Les autres mécanismes potentiels n'ont également pas permis de provoquer une réponse au glucose, quel que soit le taux de substitution en boronate, le taux de réticulation des nanogels ou encore le pH étudié.

Références :

1. Lapeyre, V.; Gosse, I.; Chevreux, S.; Ravaine, V., Monodispersed Glucose-Responsive Microgels Operating at Physiological Salinity. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (12), 3356.
2. 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.
3. 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), 3322-3329.
4. 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)-phenylboronic acid] in Physiological Saline. *Macromolecules* **1994**, 27, (4), 1061.
5. 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), 2316-2323.
6. Pezron, E.; Ricard, A.; Lafuma, F.; Audebert, R., Reversible gel formation induced by ion complexation. 1. Borax-galactomannan interactions. *Macromolecules* **1988**, 21, (4), 1121.
7. McLaughlin, K. W.; Wyffels, N. K.; Jentz, A. B.; Keenan, M. V., The Gelation of Poly(Vinyl Alcohol) with Na₂B₄O₇ 10H₂O: Killing Slime. *Journal of Chemical Education* **1997**, 74, (1), 97.
8. Shibayama, M.; Sato, M.; Kimura, Y.; Fujiwara, H.; Nomura, S., 11B n.m.r. study on the reaction of poly(vinyl alcohol) with boric acid. *Polymer* **1988**, 29, (2), 336.
9. Keita, G.; Ricard, A.; Audebert, R.; Pezron, E.; Leibler, L., The poly(vinyl alcohol)-borate system: influence of polyelectrolyte effects on phase diagrams. *Polymer* **1995**, 36, (1), 49.
10. Leibler, L.; Pezron, E.; Pincus, P. A., Viscosity behaviour of polymer solutions in the presence of complexing ions. *Polymer* **1988**, 29, (6), 1105.
11. Lorand, J. P.; Edwards, J. O., Polyol Complexes and Structure of the Benzeneboronate Ion. *The Journal of Organic Chemistry* **1959**, 24, (6), 769.
12. Singhal, R. p.; Ramamurthy, B.; Govindraj, N.; Sarwar, Y., New ligands for boronate affinity chromatography: Synthesis and properties. *Journal of Chromatography A* **1991**, 543, (0), 17.
13. 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.
14. Reddy, R. E.; Pan, Y.; Johnson, D. D.; Chen, Y.-Y.; Datwyler, S. A.; Hauptman, M. S.; Thottathil, J. K., An efficient preparation of polyanionic affinity agent and its evaluation for the measurement of glycosylated hemoglobin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 13, (10), 3467.
15. Kanayama, N.; Kitano, H., Interfacial Recognition of Sugars by Boronic Acid-Carrying Self-Assembled Monolayer. *Langmuir* **1999**, 16, (2), 577.
16. Hoare, T.; Pelton, R., Charge-Switching, Amphoteric Glucose-Responsive Microgels with Physiological Swelling Activity. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (2), 733.
17. Springsteen, G.; Wang, B., A detailed examination of boronic acid-diol complexation. *Tetrahedron* **2002**, 58, (26), 5291.

Chapitre 4.
Perspectives pour la délivrance
d'insuline

Introduction au chapitre

L'objectif de ce chapitre est d'examiner le potentiel des systèmes fabriqués jusqu'à présent dans le cadre de l'application visée pour le traitement du diabète. Les nanogels « sensibles » au glucose synthétisés en chapitre 3 demandant des études complémentaires, nous avons d'abord étudié le potentiel des nanogels de HA-MA en termes d'encapsulation de principes actifs, en particulier d'insuline.

Le HA étant un polymère dégradable, nous nous sommes également consacrés à l'étude de la dégradabilité des structures obtenues. Cette étude s'est effectuée à plusieurs niveaux : la stabilité temporelle des nanogels a été suivie, puis les cinétiques de dégradation ont été déterminées ; enfin la dégradation sous UV des structures a été vérifiée.

I. Encapsulation *in situ* de macromolécules

I.1. Introduction au problème

Comme nous l'avons déjà mentionné, la preuve de principe de la libération d'insuline asservie à la glycémie a déjà été établie grâce aux microgels d'acrylamide fonctionnalisés par les acides phénylboroniques. Cependant, ces expériences sont restées à un niveau qualitatif, car les doses d'insuline incorporées n'ont pu être recensées avec précision. En effet, l'encapsulation d'insuline se fait par imprégnation des microgels déjà formés dans une solution d'insuline. L'imprégnation doit se faire dans des conditions où les microgels sont le plus gonflés possibles. Les microgels sont ensuite lavés pour mesurer le taux d'insuline encapsulée. Les essais réalisés ont montré que les taux incorporés étaient très faibles (de l'ordre de 2.5 mg d'insuline par mg de gel sec, soit au plus 1 à 2 unité(s) d'insuline (UI) par mL de solution de microgels). Sachant qu'un patient diabétique nécessite une dose quotidienne d'insuline de 50 UI, il faudrait lui procurer une injection faramineuse de 50 mL de microgels. Ceci peut être lié soit à la taille de pores qui est trop faible pour incorporer l'insuline, soit tient au fait que les lavages déchargent l'insuline incorporée. Afin d'améliorer le taux d'incorporation, une solution alternative consisterait à pré-encapsuler l'insuline, c'est-à-dire à introduire l'insuline au moment de la synthèse, de sorte qu'elle reste piégée dans le maillage du gel en absence de glucose, puis libérée lors du gonflement en présence de glucose. La technique de fabrication des nanogels par miniémulsion inverse paraît idéale pour

une telle approche. En effet, les polymères précurseurs et l'insuline peuvent être co-localisés dans les gouttes aqueuses pour être ensuite photopolymérisés. Une fois l'insuline encapsulée, il devrait être simple de suivre sa libération vers le milieu extérieur.

Le suivi de la libération de macromolécules de rayons hydrodynamiques différents et connus est aussi une méthode d'estimation de la taille des pores des nanogels. En effet, seules les macromolécules de taille supérieure à la taille des pores restent piégées, alors que les autres diffusent librement à travers le réseau. Les dextrans sont généralement utilisés comme molécules modèles pour ce genre d'approche. Peu d'études ont estimé la taille de pores des réseaux de polysaccharides jusqu'à présent. Très récemment, la taille des pores a été déterminée pour les nanogels de Dex-MA, fabriqués par émulsion eau dans eau, par perméation sélective de dextrans fluorescents¹. Les études ont révélé que ces systèmes étaient imperméables aux dextrans de 4 kDa, dont le rayon hydrodynamique a été mesuré à 3 nm². Pour les nanogels/microgels de HA, seule une étude recense une taille de pores de 10 nm mais les objets étudiés présentent une taille bien supérieure au micromètre³.

Ainsi nos objectifs sont doubles :

- (i) montrer les possibilités de pré-encapsulation de l'insuline ou de dextrans au sein des nanogels de HA-MA préparés par mini-émulsion inverse, comme conceptualisé en Figure 4.1. L'objectif est de confiner la biomolécule en présence de HA-MA au sein des gouttes de la miniémulsion inverse, puis de polymériser les méthacrylates au sein des gouttes. Après purification, le deuxième paramètre important est d'obtenir une dispersion finale de nanogels contenant la protéine toujours active.
- (ii) estimer la taille de pores de nos systèmes par diffusion passive en fonction du degré de réticulation des nanogels obtenus. Les dextrans ou l'insuline fluorescente seront privilégiés pour une visualisation simple par microscopie de fluorescence.

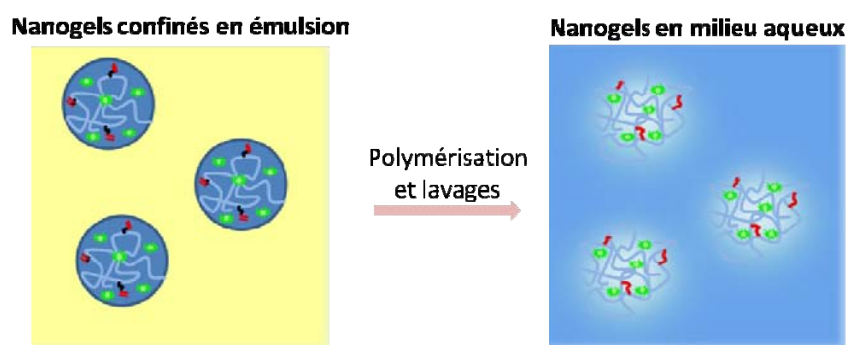


Figure 4.1 : Représentation schématique de l'encapsulation de l'insuline au sein des nanogouttes d'émulsion inverse.

1.2. Problèmes posés : limite de la photopolymérisation

La pré-encapsulation s'avère prometteuse dans le cas des nanogels de HA-MA fabriqués par miniémulsion inverse. Néanmoins, les nanogels préparés jusqu'à présent (chapitre 2 et 3) étaient obtenus par photopolymérisation radicalaire du HA-MA ou du HA-MA-PBA en présence d'un photoamorceur (Irgacure 2959), suivi d'une irradiation sous UV. Ce type de polymérisation n'est pas toujours recommandé pour l'encapsulation de protéines, en raison de leur fragilité⁴. De plus, l'irradiation sous UV des macromolécules fluorescentes en présence de radicaux générés par le photoamorceur pourrait avoir un impact sur la stabilité de la fluorescence. Ainsi il s'agit d'abord de vérifier que les molécules encapsulées résistent à une irradiation sous UV dans les conditions utilisées jusqu'à présent.

1.2.1. Encapsulation d'une macromolécule fluorescente

Nous avons mené des expériences préliminaires sur les macrogels de HA-MA, afin de sélectionner les conditions d'encapsulation de macromolécules. Une solution de HA-MA a été préparée en présence de dextran 40 kDa modifié par de la fluorescéine isothiocyanate (FITC-dextran), en présence de photoamorceur (Irgacure 2959). Avant irradiation, une solution visqueuse jaune fluorescent est observée (Figure 4.2 a). Cette solution est ensuite irradiée sous UV, P=10% P_{max}. Très rapidement, la solution perd de sa fluorescence, à l'image de la Figure 4.2 b). De façon surprenante, la gélification du HA-MA n'est également pas observée après irradiation. Or, un macrogel avait été obtenu dans ces conditions en l'absence de FITC-dextran. Une expérience de contrôle a été menée, où seul le FITC-dextran a été irradié sous UV, révélant une couleur jaune fluorescente. Nous avons alors ajouté de l'Irgacure 2959 au mélange réactionnel et placé cette dispersion sous UV. La perte de fluorescence est immédiatement observée, confirmant les résultats obtenus en Figure 4.2. Les mêmes tendances ont été observées, pour des dextrans, de masse molaire variable, et/ou fonctionnalisés par un autre fluorophore (rhodamine). Ainsi, en présence de macromolécules fluorescentes, les radicaux générés par les UV désactivent la fluorescence au lieu de polymériser les méthacrylates, ce qui inhibe la formation du macrogel. L'encapsulation d'une molécule fluorescente semble donc compromise au sein des réseaux de HA-MA photopolymérisés.

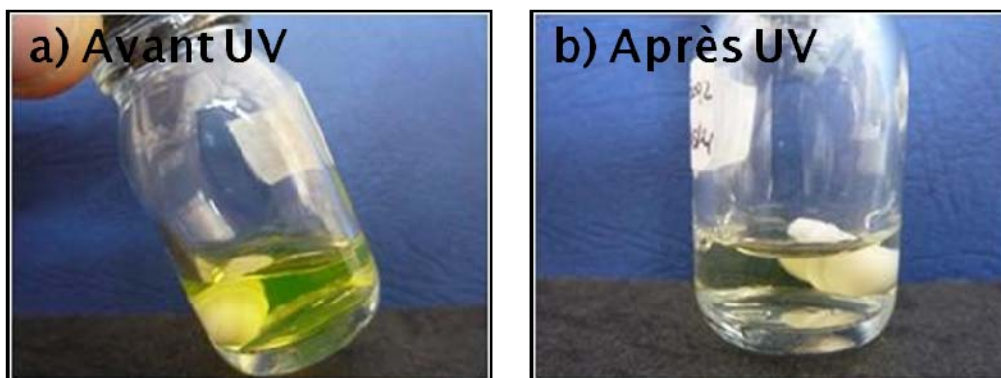


Figure 4.2 : Clichés macroscopiques d'une solution de HA-MA contenant du FITC-dextran en présence d'Irgacure 2959 : a) avant irradiation sous UV ; b) après irradiation sous UV.

1.2.2. Encapsulation de l'insuline humaine

Nous nous sommes réorientés vers l'encapsulation de molécules non-fluorescentes, en particulier d'insuline humaine non fluorescente. Avant de procéder à l'encapsulation dans un macrogel ou dans les nanogels de HA-MA, un essai préliminaire a été réalisé en irradiant une solution à 2 UI d'insuline humaine sous UV. Pour doser l'insuline non fluorescente, les techniques actuelles reposent sur des immuno-dosages, qui peuvent être spécifiques ou non. Les immuno-dosages présentent l'avantage de pouvoir être effectués en milieu complexe. Cependant, leur mise au point est passée par des dosages préliminaires chromatographiques afin de séparer chaque molécule. Dans le cadre de notre étude, le dosage est effectué en milieu simple. Dans ces conditions, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) présente une grande sensibilité et requiert de très faibles quantités⁵. Ainsi, la solution d'insuline a été analysée par HPLC avant et après irradiation sous UV pendant 1H-10% Pmax. Comme illustré en Figure 4.3, la trace HPLC de l'insuline humaine indique un pic sortant à 5 min après passage sur colonne C8 ULTRASEP. Cette signature disparaît totalement après irradiation sous UV. Cette expérience suggère que l'insuline est affectée par l'irradiation sous UV, ce qui compromet les possibilités d'encapsulation de biomolécules au sein des macro/nano gels réticulés par photopolymérisation.

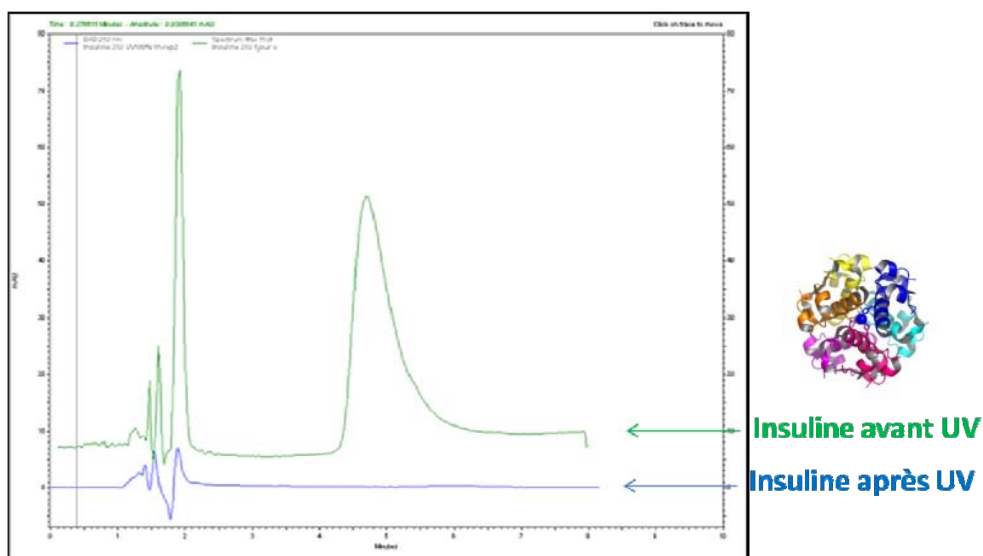


Figure 4.3 : Chromatogramme HPLC obtenu pour l'insuline humaine avant et après irradiation sous UV pendant 1H-10% de la puissance maximale de la lampe. Conditions : Colonne C8 ULTRASEP ; phase mobile : mélange Na_2SO_4 , $\text{pH}=2.3$ -acétonitrile-2-méthoxyéthanol.

1.3. Autres types d'amorçage pour les HA-MA

La combinaison des UV et du photoamorceur semble à la fois inhiber la formation du gel en présence d'une biomacromolécule fluorescente et dégrader sa structure. Une solution consisterait à modifier l'amorçage de la polymérisation radicalaire. Nous proposons de réticuler les méthacrylates par polymérisation radicalaire des méthacrylates *via* un amorçage par une réaction d'oxydoréduction (redox) ou par la température. Dans ces configurations, il est nécessaire de contrôler le déclenchement de la polymérisation après l'étape d'émulsification, afin de ne pas engager une réticulation préliminaire non contrôlée pendant la fragmentation de l'émulsion.

- La polymérisation par amorçage redox offre cette possibilité si l'ajout de chaque composant du couple redox est ajouté séparément (l'un dans l'eau, l'autre dans l'huile). Notre choix s'est porté sur le couple redox persulfate de potassium (KPS) et N,N,N',N' tétraméthyle-éthylène-diamine (TEMED) (formules développées en partie expérimentale). Bien utilisé pour la préparation de microsphères de dextrans ou d'hydrogels d'acide hyaluronique réticulés par des méthacrylates⁶⁻⁹, ce type d'amorçage repose sur la réaction entre l'ion persulfate en présence de TEMED, permettant de générer deux types de radicaux : des radicaux $\text{HO}\cdot$, et des radicaux $[(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\cdot]$.

- L'amorçage thermique peut également être envisagé grâce au choix judicieux de l'amorceur. Celui-ci doit se décomposer à relativement faible température afin d'éviter une surchauffe de l'émulsion. Le choix de l'amorceur s'effectue généralement selon deux critères: sa solubilité dans l'eau ou dans l'huile et sa température de décomposition. Nos recherches sur la fabrication de nanogels par polymérisation radicalaire amorcée thermiquement en émulsion inverse¹⁰⁻¹³ nous ont permis de sélectionner deux amorceurs, tout en respectant ces deux critères : le 2,2'-Azobis(2-méthylpropionamide)dihydrochloride (V-50) et le 2,2'-Azobis(4-méthoxy-2,4-diméthyl valeronitrile) (V-70). Le V-50 est un amorceur cationique qui présente l'avantage d'être soluble dans l'eau mais sa température de décomposition correspondant à un temps de demi-vie de 10 heures est de 56°C. En revanche, le V-70 est un amorceur soluble dans l'huile et sa température de décomposition est de 30 °C. Nous avons opté pour ce dernier qui permet d'éviter de surchauffer les polysaccharides

Ainsi deux types d'amorçage chimiques ont été testés :

- (i) Amorçage par réaction redox au KPS/TEMED
- (ii) Amorçage thermique, par décomposition homolytique du V-70 à température proche de l'ambiante.

1.3.1. Tests préliminaires sur les macrogels

Pour l'amorçage thermique, une concentration à 2 mM en V-70, soit 0.5 g/L a été utilisée. Ces conditions sont identiques à celles utilisées pour la photopolymérisation. Néanmoins, pour l'amorçage par réaction d'oxydo-réduction, il est nécessaire de déterminer le ratio des deux espèces l'une par rapport à l'autre. En s'inspirant des travaux d'Hennink⁸, des tests préliminaires ont été menés sur les macrogels de HA-MA afin de déterminer ces conditions. Une solution de HA-MA à 1.5 wt% est incubée en présence de [KPS]=14 mM, à T =30°C. Ensuite, une solution de [TEMED]=35 mM est ajoutée à la dispersion, dont la température est maintenue à T=30°C. Le mélange, liquide avant l'ajout de TEMED gélifie progressivement, atteignant l'état de macrogel au bout de 10 min (Figure 4.4 b). La comparaison entre les macrogels obtenus par photopolymérisation et par amorçage redox est illustrée en Figure 4.4, montrant que le gel obtenu par amorçage redox semble plus mou que le gel photopolymérisé.

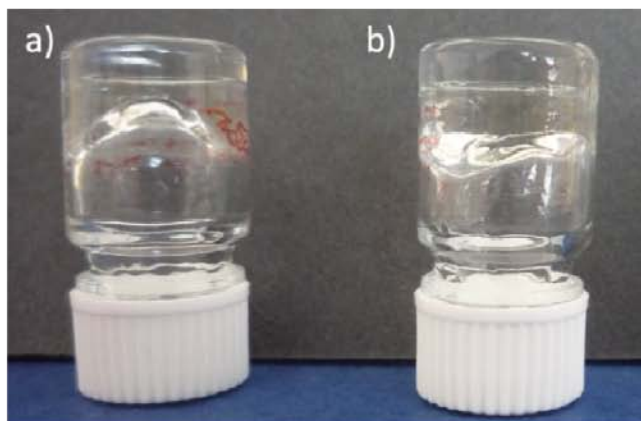


Figure 4.4 : Vues macroscopiques des macrogels obtenus : a) par photopolymérisation ; b) par amorçage via une réaction d'oxydoréduction par le KPS/TEMED.

Ces mêmes tests ont ensuite été réalisés en présence de macromolécules fluorescentes. Deux solutions de HA-MA contenant du KPS ont été préparées, l'une en présence de FITC-dextran (10 wt% par rapport au HA-MA), l'autre en présence de FITC-insuline (4 wt% par rapport au HA-MA). Les solutions, initialement visqueuses et de couleur jaune fluorescente, gélifient au bout de 15 min après l'ajout du TEMED. Les macrogels obtenus sont illustrés en présence de dextran et d'insuline fluorescents en Figure 4.5 a) et b) respectivement. Non seulement les radicaux permettent d'amorcer la gélification, mais ils n'inhibent pas la fluorescence qui demeure intacte après polymérisation.

Ces études ont permis de montrer qu'il était possible d'obtenir des macrogels encapsulant les molécules fluorescentes en changeant la voie d'amorçage. Il s'agit désormais d'adapter ces conditions pour la préparation des nanogels par polymérisation en miniémulsion inverse.

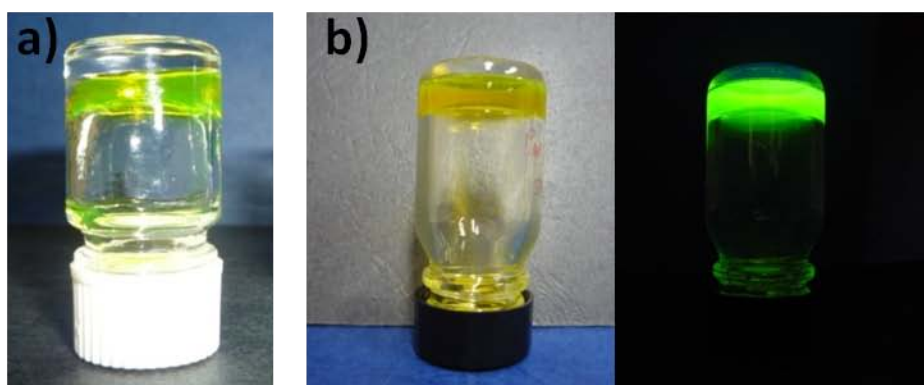


Figure 4.5 : Vues macroscopiques de macrogels de HA-MA obtenus après polymérisation par amorçage au KPS/TEMED, en présence de : a) 10 wt% de FITC-dextran $M_w = 10$ kDa ; b) 4 wt% de FITC-insuline.

I.3.2. Préparation des nanogels

Deux nouvelles séries de nanogels ont été préparées par polymérisation en miniémulsion inverse, l'une en amorçant la polymérisation par le couple redox KPS/TEMED à T=30°C (**nanogel 13**), l'autre par la décomposition homolytique du V-70 à T=37°C (**nanogel 14**). Une série de contrôle a également été préparée par photopolymérisation de la miniémulsion dans les conditions décrites en chapitre 2, *i.e.* 1H-10% P_{max}, 1H-100% P_{max} et 2H-100% P_{max} (**nanogel 15 a-c**).

I.3.2.1 Préparation des miniémulsions et conditions de polymérisation

Les miniémulsions ont été préparées par homogénéiseur haute pression, en utilisant les mêmes conditions (nombre de cycles, pression) décrites en chapitre 2. Pour les deux séries, la composition de la phase continue des miniémulsions est identique à celle utilisée précédemment (8 % de Span 80 dans l'octane). Pour la phase dispersée, le HA-MA₂, DM=0.25 à 1.5 wt% est solubilisé dans le PBS, pH=7.4. L'ajout des amorceurs (thermique et redox) se fait de la manière suivante :

- Polymérisation par voie redox (**nanogel 13**) : le KPS est solubilisé dans la phase dispersée avant fragmentation de l'émulsion; le TEMED est ajouté après fragmentation.
- Polymérisation par amorçage thermique (**nanogel 14**) : le V-70 est ajouté à l'émulsion après sa fragmentation.

Une fois l'émulsion préparée, différents essais ont été testés pour la polymérisation de chaque série.

- Polymérisation par voie redox : la polymérisation a été réalisée pendant 15 heures, sans dégazage préalable (**13b**), ou avec dégazage préalable (**13c**), et également avec une concentration différente en TEMED dans la phase organique (**13a**).
- Polymérisation par amorçage thermique : l'influence du dégazage (**14a** et **b**) a été testée pour une durée de polymérisation de 15 heures.

Les nanogels obtenus après purification de l'huile et des tensioactifs puis redispersion dans l'eau ultrapure, sont caractérisés d'un point de vue morphologique par TEM granulométrique par DLS.

I.3.2.2 Caractéristiques morphologiques

A titre d'exemple, les caractéristiques morphologiques obtenues par TEM de la série **nanogel 13a** sont rassemblées en Figure 4.6. Les particules synthétisées révèlent une structure sphérique avec un contour relativement diffus, caractéristiques propres des nanogels à l'état sec. La distribution en taille des structures obtenues semble bien homogène, centrée autour de 190 nm.

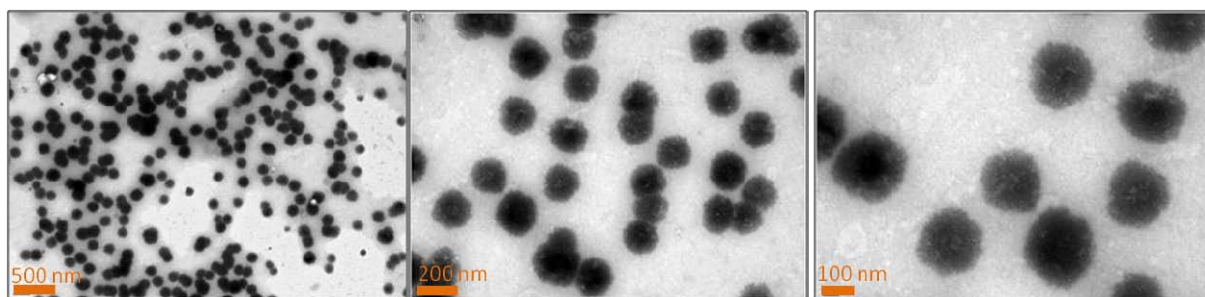


Figure 4.6 : clichés de TEM obtenus à différentes magnifications pour la série nanogel **13a** ; nanogels révélés en présence d'acide phosphotungstique comme agent de contraste. Précurseur HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25.

I.3.2.3 Comportement en solution

Le comportement en solution des nanogels correspondants a ensuite été analysé par DLS. Les valeurs obtenues sont systématiquement comparées à celle de l'émulsion avant et après polymérisation. Les distributions caractéristiques pour la série **nanogel 13a** sont reportées en Figure 4.7. L'émulsion avant polymérisation présente une taille caractéristique centrée autour de 130 nm. Ces données indiquent que le changement de type d'amorceur ne perturbe pas la fragmentation de l'émulsion. Après polymérisation pendant 15 heures, les nanogels confinés en émulsion affichent une taille caractéristique centrée autour de 200 nm, alors que l'émulsion non polymérisée laissée au repos pendant 20 h, T=4°C présente une taille de 140 nm. Cette évolution indique un vieillissement accéléré de l'émulsion lors de l'étape de polymérisation qui peut être lié au stockage de l'émulsion à température ambiante. Tout comme les nanogels obtenus par photopolymérisation, les nanogels **13a** présentent des taux de gonflement supérieurs une fois redispersés dans l'eau, l'élimination de l'interface leur permettant d'atteindre leur équilibre de gonflement.

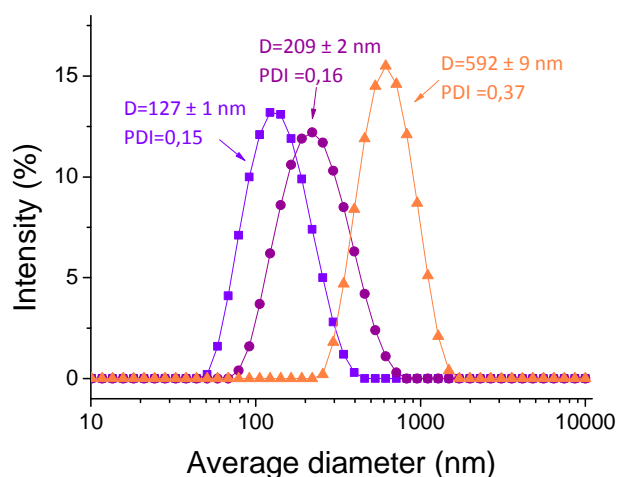


Figure 4.7 : Distributions en taille des émulsions avant polymérisation (■), après polymérisation amorcée par KPS/TEMED (●) et après redispersion dans l'eau des nanogels résultants (▲) pour la série nanogel **13a**. Précurseur HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25.

I.3.2.4 Taux de conversion en méthacrylates

Bien que les nanogels obtenus par amorçage redox présentent le même comportement général que les nanogels obtenus par photopolymérisation, leur taux de conversion pourrait différer de ceux obtenus précédemment. Rappelons que ce taux de conversion gouverne les propriétés de gonflement du réseau, *via* une modulation de son degré de réticulation. De plus, en vue de l'application *in vivo*, il est primordial d'obtenir un taux de conversion maximal, afin d'éviter les résidus MA, potentiellement toxiques. Afin de déterminer ces taux de conversion, les nanogels ont été analysés par ¹H-RMN selon le même protocole décrit en chapitre 2. Le spectre ¹H-RMN de la série **nanogel 13a** est représenté en Figure 4.8. Comme observé en chapitre 2, les méthacrylates restants ont un déplacement chimique de 5.8 ppm et 6.2 ppm (Figure 4.8, bulle violette), tandis que les méthacrylates polymérisés se trouvent à 1.3 ppm et 0.9 ppm (Figure 4.8, bulle verte). A partir de ce spectre, le taux de conversion en méthacrylates a été déterminé. Pour les nanogels **13a**, le taux de conversion en méthacrylate est 31%, révélant une polymérisation partielle des méthacrylates.

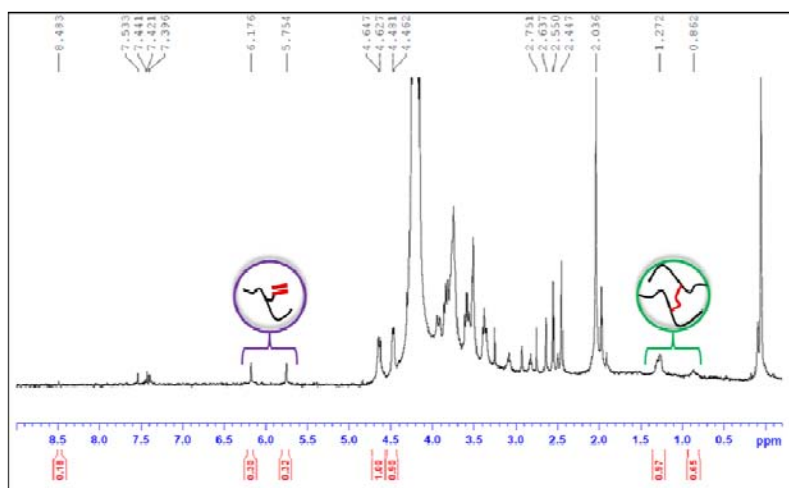


Figure 4.8 : Exemple de spectre ^1H -RMN obtenu pour les nanogels **13a** dans le D_2O , $T=80^\circ\text{C}$ ($NS=256$, $C = 6\text{g/L}$). Précurseur HA-MA₂, 100 kDa, $DM=0.25$.

Chaque lot préparé a été analysé de la même façon que le lot **13a**. Les caractéristiques détaillées des séries **nanogel 13**, **14** et **15** sont résumées en Tableau 4.1. Quelles que soient les conditions testées pour les séries **13** et **14**, les taux de conversion obtenus ne sont pas maximaux. Cependant, il semble que le dégazage sous N_2 permette d'obtenir des taux de conversion légèrement supérieurs. Ainsi, seule la photopolymérisation dans les conditions 1H-100% et 2H-100% de la puissance maximale conduit à un taux de conversion maximal en MA.

Tableau 4.1 : Résultats obtenus pour les différents lots de nanogels issus des séries **13**, **14** et **15**.

Nanogel	Type d'amorçage	[amorceur] (mM)	Condition	D_H (nm)*	Poly dispersité	Taux de conversion en MA (%)**
13a	Redox	[KPS]=14 (a) [TEMED]=35 (b)	Pas d'azote	592±9	0.23	31
13b	Redox	[KPS]=14(a) [TEMED]=4 (b)	Pas d'azote	342±35	0.15	23
13c	Redox	[KPS]=14(a) [TEMED]=4 (b)	Azote	627±36	0.35	45
14a	Thermique	[V70]=2	Pas d'azote	493±13	0.45	52
14b	Thermique	[V70]=2	Azote	431±19	0.26	65
15a	Photo-amorçage	[Irgacure]=2	1h- 10% Pmax	613±14	0.30	12
15b	Photo-amorçage	[Irgacure]=2	1h- 100% Pmax	239±21	0.33	100
15c	Photo-amorçage	[Irgacure]=2	2h- 100% Pmax	222±6	0.31	100

* : Diamètre hydrodynamique des nanogels dans l'eau déterminé par DLS. (a) : Par rapport à la phase aqueuse. (b) : Par rapport à la phase organique.

** : Déterminé par ^1H -RMN.

En conclusion, cette étude pose quelques limites en vue d'une pré-encapsulation de biomolécules, fluorescentes ou non, au sein de nanogels de HA-MA obtenus par polymérisation radicalaire en miniémulsion. Les nanogels synthétisés jusqu'à présent par photopolymérisation permettent d'obtenir des taux de conversion maximaux en MA, mais la pré-encapsulation semble compromise. Une solution alternative pourrait consister à utiliser une polymérisation radicalaire des MA par amorçage redox ou thermique, mais les taux de conversion en MA ne soient pas quantitatifs. Cependant, nous avons montré que dans le cas des macrogels, ce type d'amorçage ne perturbe pas l'encapsulation de l'insuline fluorescente.

I.3.2.5 Essai d'encapsulation

Dans cette optique, nous avons tout de même tenté d'encapsuler de l'insuline fluorescente (insuline FITC) au sein des nanogels, réticulés par polymérisation amorcée par voie redox, en choisissant les conditions utilisées pour les nanogels **13c**, qui semblent conduire à un taux de conversion en MA plus élevé. L'insuline FITC a été solubilisée à 1 g/L avec le HA-MA dans la phase dispersée avant fragmentation de l'émulsion. Après polymérisation selon le procédé **13c** et purification de l'huile et tensioactifs, les nanogels redispersés en milieu aqueux ont été observés en microscopie optique en contraste de phase, afin de vérifier leur présence (Figure 4.9 a), et en épifluorescence, afin d'examiner la présence d'insuline (Figure 4.9 b). La présence des nanogels dans leur état hydraté est révélée (petits points noirs), tout comme l'insuline FITC localisée au sein de ces petits points. Ce résultat très encourageant valide l'encapsulation de l'insuline, soulignant l'efficacité de la pré-encapsulation.

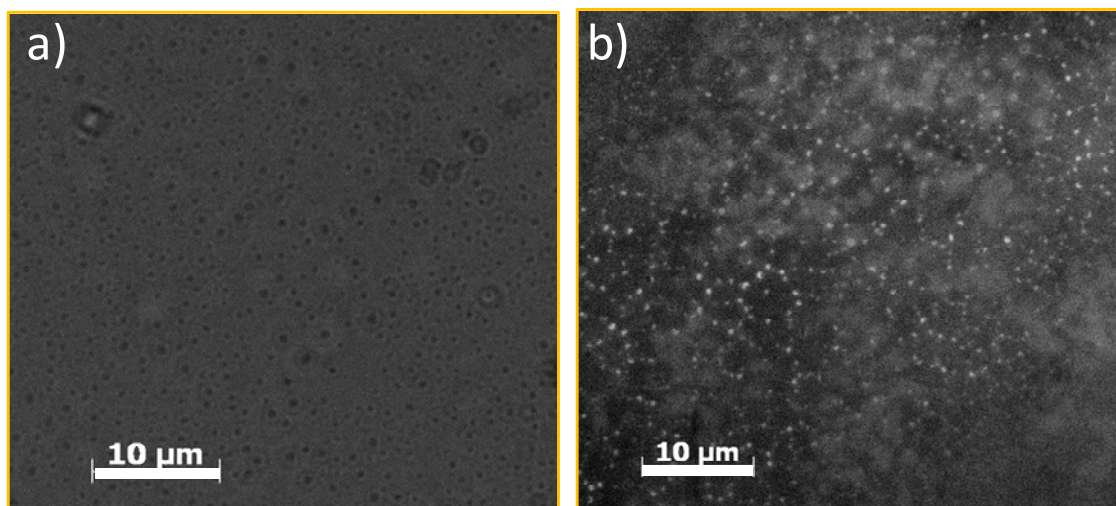


Figure 4.9 : Clichés de microscopie optique des nanogels de HA-MA en présence d'insuline FITC: a) en contraste de phase, objectif $\times 100$, révélant la présence des nanogels. b) en épifluorescence, révélant la présence d'insuline FITC au sein des nanogels.

Ainsi, notre hypothèse d'une pré-encapsulation semble envisageable, bien que nous n'ayons pas vérifié la toxicité de ces objets (expériences en cours). Dans le cas où la biocompatibilité des nanogels contenant encore des méthacrylates ne serait pas validée, une solution alternative consisterait à revenir à la post-encapsulation de l'insuline au sein des nanogels photopolymérisés, à l'instar des travaux réalisés précédemment sur les microgels d'acrylamide, bien que les taux d'encapsulation obtenus soient relativement faibles. Nous proposons, avant de revenir à cette voie d'encapsulation, de changer la nature des groupements réticulables, par utilisation de thiols au lieu des méthacrylates.

1.4. Solution alternative : introduction des thiols

Proposé non seulement comme solution alternative aux problèmes de photopolymérisation en présence de biomolécules, les ponts disulfures ont aussi été choisis pour introduire des propriétés de dégradation à long terme dans les nanogels formés. En effet, les ponts disulfures sont souvent employés dans les systèmes biologiques pour les applications thérapeutiques et pharmaceutiques, à cause de leur stabilité sous conditions oxydantes et de leur dégradation sous conditions réductrices. Les hydrogels ou les nanogels réticulés par des ponts disulfures sont connus pour leur capacité à se dégrader par clivage des ponts disulfures (-S-S-) en groupements thiols (-SH HS-) avec des réducteurs variés tels que le dithiothréitol (DTT) ou le glutathion. Le glutathion est une enzyme présente en concentration millimolaire dans le cytosol, alors que sa concentration ne dépasse le micromolaire dans le plasma¹⁴. Ainsi, la dégradation des nanogels *via* le clivage des disulfures se produirait principalement dans les cellules, après leur temps d'action dans la circulation sanguine.

Le principe de cette étude est donc de greffer dans un premier temps des groupements fonctionnels thiolés sur les chaînes d'acide hyaluronique (HA-SH). De la même façon que pour les dérivés HA-MA, le deuxième objectif est de confiner les précurseurs HA-SH par miniémulsion inverse, en conditions réductrices afin de préserver les groupements thiols. Puis, par oxydation des thiols, la création de ponts disulfures permet de réticuler le réseau. Comme représenté en Figure 4.10, les nanogels ainsi formés présentent des nœuds de réticulation qui peuvent être dégradés *in vivo* par clivage des ponts disulfures en milieu réducteur ou par réaction avec le glutathion ou le DTT.

L'introduction des thiols sur le HA a suscité l'engouement des chercheurs mais les conditions de greffage varient selon les équipes¹⁵⁻¹⁷. Il convient alors de sélectionner les conditions permettant d'obtenir des taux de greffage suffisant pour former le réseau.

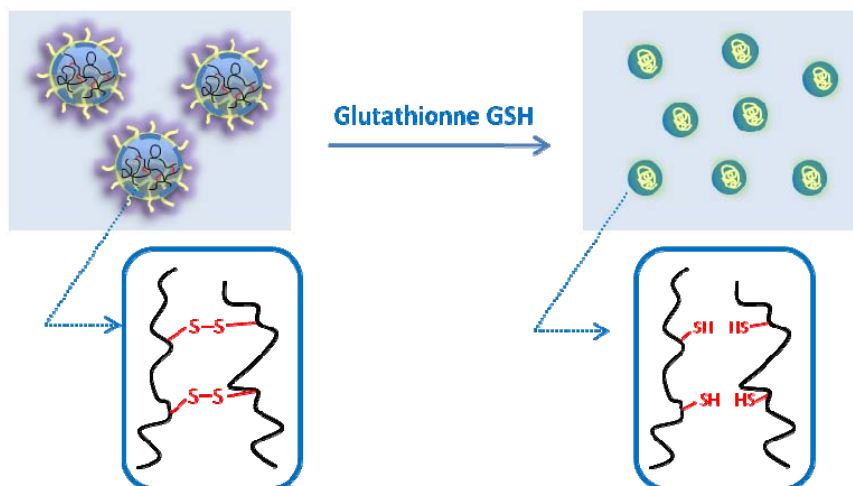


Figure 4.10 : Concept envisagé pour la réticulation des nanogels de HA par des ponts disulfures, dégradables *in vivo* par la GSH.

1.4.1. Synthèse des PAA-SH

Le HA étant un produit relativement coûteux, nous avons d'abord mis en place ces conditions sur le PAA. Le greffage de groupements thiols peut être réalisé soit en deux étapes (Figure 4.11 voie a), soit en une étape (Figure 4.11 voie b). La voie de synthèse a) consiste à d'abord greffer la cystamine sur le PAA, puis à cliver les ponts disulfures de la cystamine par le DTT pour obtenir le précurseur thiolé. La voie b) met en jeu la cystéamine, dérivé thiolé directement greffé sur le PAA après activation des fonctions carboxyles par l'EDC.

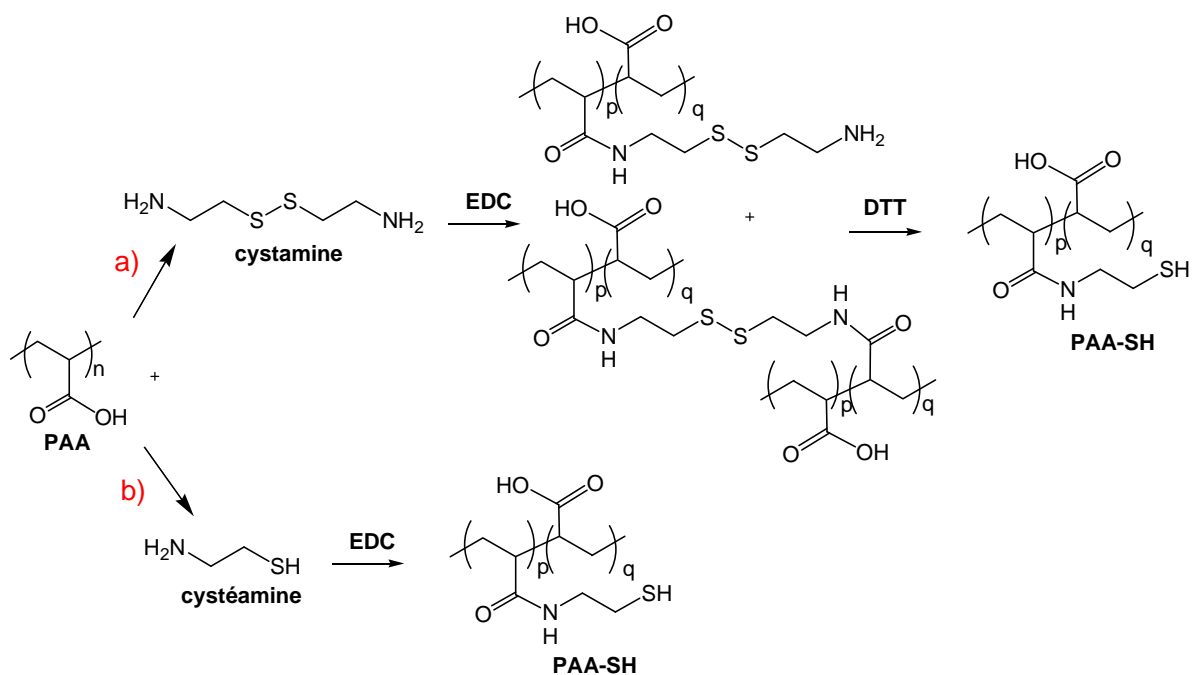


Figure 4.11 : Schéma réactionnel de la synthèse des PAA-SH : a) par greffage de la cystamine puis clivage des ponts disulfures en conditions réductrices ; b) par greffage de la cystéamine.

Les conditions détaillées des synthèses réalisées sont résumées en Tableau 4.2. Nous nous sommes d'abord attelés au greffage de la cystamine (voie a), dans les conditions utilisées par l'équipe de Park sur le HA (PAA-SH₁)¹⁷. En résumé, du PAA est solubilisé en présence de cystamine, puis un excès d'EDC est ajouté afin d'activer les acides carboxyliques du PAA (formation d'un ester activé), conduisant à la formation de l'amide. La solution est ensuite dialysée pour éliminer les réactifs non-réagis de faible masse molaire. A ce mélange, un excès de DTT est ajouté à pH basique et en absence d'oxygène afin d'éviter l'oxydation des thiols formés. Cette étape conduit à la formation d'un solide rosé collant au fond du ballon pour le PAA-SH₁. Nous avons supposé que ce solide correspondait au DTT qui précipitait progressivement mais le surnageant a révélé l'absence de polymère. Ainsi, cette précipitation impromptue du précurseur pour des raisons mal expliquées empêche la purification du produit final. Les mêmes tendances ont été obtenues en modulant les quantités d'EDC et de cystamine, pour un protocole avec ou sans étape de dialyse précédent l'ajout de DTT (PAA-SH₂ et PAA-SH₃).

Nous avons alors envisagé le greffage de la cystéamine sur le PAA, par couplage peptidique entre l'amine et les fonctions carboxyliques portées par le PAA. Cette voie a été utilisée par de nombreuses équipes^{18, 19}, mais aucune d'entre elles ne prend de précautions quant à la présence d'oxygène pendant la réaction. Le protocole général consiste à activer les

fonctions acides carboxyliques du PAA en solution en ajoutant de l'EDC, puis la cystéamine est ensuite introduite. À la fin de la réaction, la solution de PAA-SH est dialysée. L'utilisation de ce protocole (PAA-SH₄), avec ou sans dégazage du milieu réactionnel conduit à des taux de thiols greffés ou disponibles très faibles, due à une réoxydation des thiols pendant l'étape de dialyse, même en conditions optimales²⁰ (bains d'eau milliQ à pH=3, dégazés 30 min sous N₂ et placés dans un réfrigérateur à 5°C dans le noir). Une autre synthèse a donc été réalisée, en adaptant les conditions de purification à l'acétone utilisées en chapitre 3 pour le greffage des boronates sur le PAA (PAA-SH₅). Néanmoins, la précipitation à l'acétone conduit à la formation d'un précipité collant, insoluble dans l'eau après retrait du surnageant et redispersion.

Tableau 4.2 : Conditions de synthèse testées pour les précurseurs PAA-SH.

PAA-SH _x	n PAA (mmol)	Dérivé thiol greffé	Neq SH /PAA	Neq EDC /PAA	Purification	Observations
PAA-SH ₁ ¹⁷	5	Cystamine	3	3	Dialyse avant ajout DTT	Précipité collant à l'ajout de DTT, puis solide rose
PAA-SH ₂	5	Cystamine	3	6	Dialyse avant ajout DTT	Précipité collant à l'ajout de DTT, puis solide rose
PAA-SH ₃ ²¹	2.5	Cystamine	2	2	/	Précipité collant à l'ajout de DTT, puis solide rose
PAA-SH ₄	2.5	Cystéamine HCl	3	3	Dialyse, pH 3 sous N ₂ , T=4°C	Solution transparente
PAA-SH ₅	2	Cystéamine HCl	1	1	Précipitation acétone	Solide insoluble dans l'eau

Ainsi, les conditions utilisées jusqu'à présent semblent techniquement difficilement contrôlables. Nous avons émis l'hypothèse que les divers problèmes de précipitation rencontrés pouvaient être liés à la solubilité du PAA une fois modifié par des thiols. Si cette hypothèse est vraie, ces difficultés devraient être limitées par l'utilisation du HA, de nature plus hydrophile que le PAA.

1.4.2. Synthèse des HA-SH

Bien que les études préliminaires sur le PAA aient montré la difficulté du greffage par la voie a), les études recensent majoritairement cette stratégie pour le greffage des thiols sur le

HA. Un essai a donc été réalisé en adaptant les conditions utilisées pour la synthèse du PAA-SH₃ (HA-SH₁). Le schéma réactionnel de cette synthèse est résumé en partie expérimentale. Cette fois-ci, l'ajout de DTT ne perturbe pas la solubilité du précurseur qui reste dispersé dans le mélange réactionnel. Le précurseur est donc purifié, par dialyse dans les conditions optimales utilisées pour le précurseur PAA-SH₅, puis lyophilisé. Il est ensuite caractérisé qualitativement par des essais de gélification en conditions oxydantes et quantitativement par ¹H-RMN. Toutefois, le taux de greffage obtenu est faible, ne permettant pas la formation d'un macrogel par les ponts disulfures.

Nos recherches nous ont alors orientés vers le greffage des dérivés hydrazide sur le HA. Kuo *et al*²² a montré que les réactions du HA avec une amine primaire, activées par les carbodiimides tels que l'EDC, conduisaient à des taux de greffage très faibles de l'ordre du 1%, dû au réarrangement de l'acide activé (*O*-acylisourée) en amide activé (*N*-acylisourée). La forme *N*-acylisourée ne permet pas l'attaque nucléophile de l'amine. En outre, bien que l'EDC se trouve dans sa forme protonée à ce pH, permettant la formation de l'ester activé, l'amine se trouve quant à elle majoritairement protonée, limitant son attaque nucléophile sur l'ester activé. L'utilisation d'un dérivé hydrazide au lieu d'une amine primaire permet de diminuer le pK_a de l'amine à 2-3. Ainsi, à pH=4.75, l'amine est majoritairement sous sa forme neutre, favorisant son attaque nucléophile sur l'ester activé. L'équipe de Prestwich²³ a mené une étude détaillée sur les différents dérivés hydrazides qu'il est possible de greffer sur le HA²⁴. S'inspirant de leur étude, nous avons choisi d'incorporer l'hydrazide 3,3'-dithiobis propanoïque (DTP), du fait de la proximité entre les groupements thiols et amides. En effet, plusieurs exemples reportent que cette condition permet de diminuer le pK_A des thiols (normalement de 8.3), à cause des interactions électrostatiques avec des groupes ionisables^{25, 26}. Cette propriété permettrait d'accélérer la formation du réseau en conditions oxydantes. Le DTP résulte d'une réaction d'estérification entre l'acide 3,3'-dithiobis propanoïque et le méthanol, puis de la réaction de cet ester avec l'hydrazine. Cette synthèse a été réalisée au laboratoire conduisant à un rendement acceptable de 82% (détails en partie expérimentale). Comme illustré en Figure 4.12, la réaction entre le HA et la DTP est menée en présence d'EDC à pH 4.75, conduisant à la formation du HA-DTP avec un rendement de 59% (HA-SH₂).

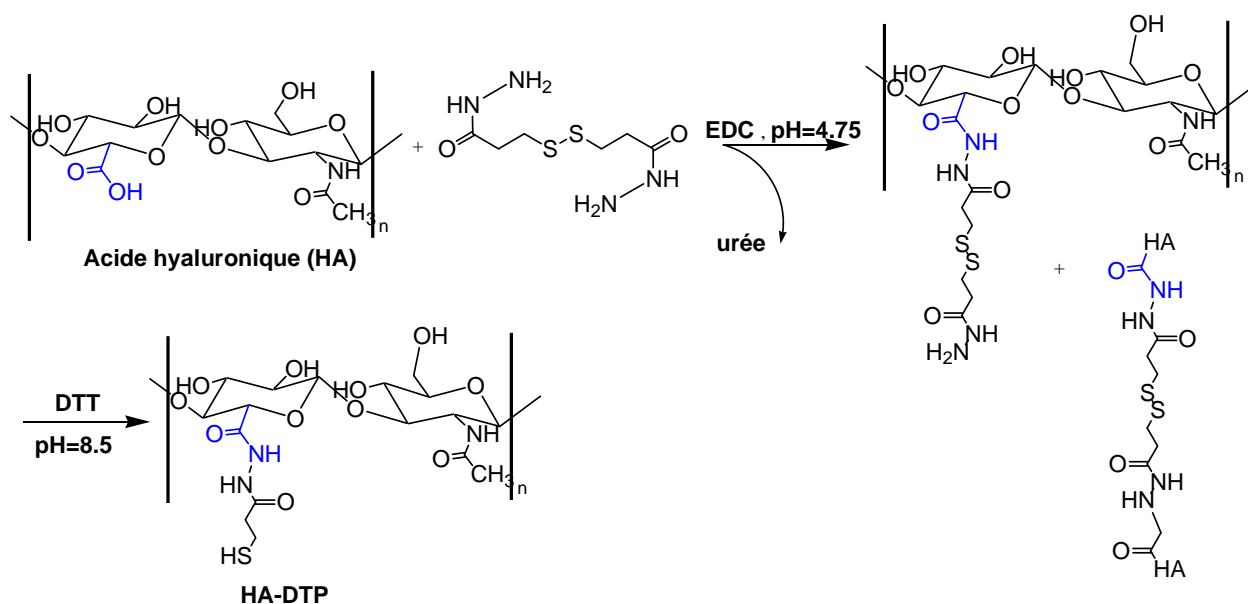


Figure 4.12 : Schéma réactionnel envisagé pour la synthèse des HA-SH, par greffage de la DTP puis clivage des ponts disulfures par le DTT.

Ce précurseur a été analysé par ^1H -RMN, révélant un taux de greffage de 71% (Figure 4.13). Ce taux de greffage important résulte du ratio des intégrations relatives entre les protons CH_2 en α des thiols à 2.7 ppm et les protons anomériques à 4.6 ppm. Ainsi, le greffage des dérivés hydrazides au lieu de la cystamine améliore considérablement la fonctionnalisation.

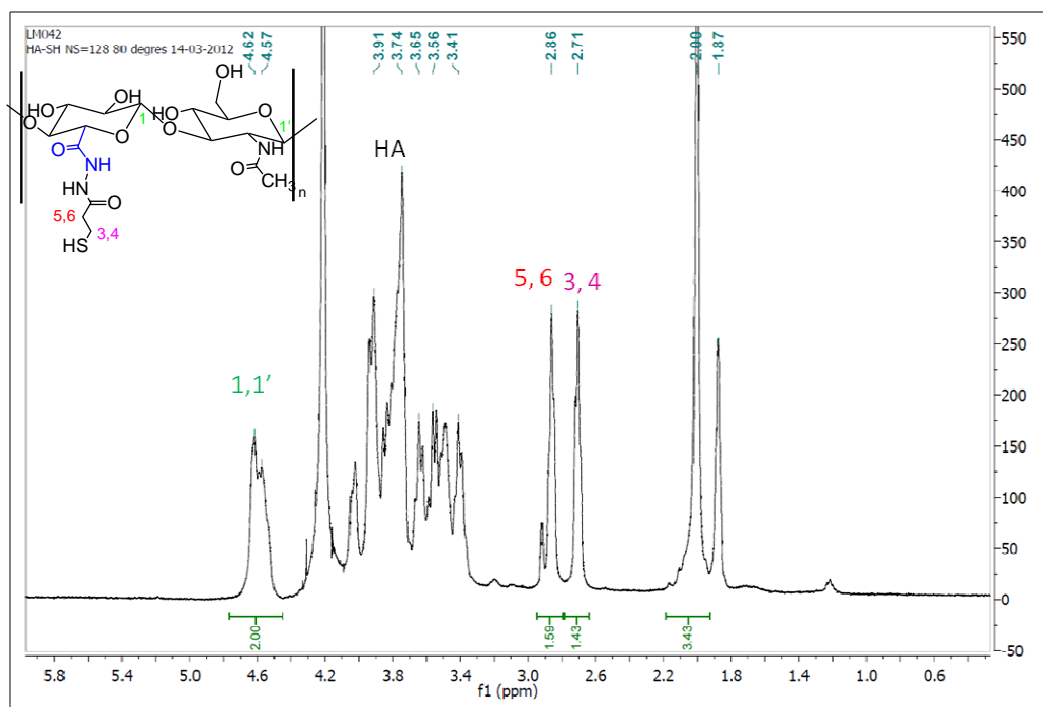


Figure 4.13 : Spectre ^1H -RMN obtenu pour le HA-SH₂. Conditions : D_2O , $T=80^\circ\text{C}$, 128 scans.

Nous avons ensuite examiné les propriétés de ce précurseur en conditions oxydantes. Le HA-SH₂ est solubilisé à 3 wt% en tampon phosphate à faible salinité, pH=7.4, puis laissé au repos à l'air. Comme reporté en Figure 4.14 c), on observe la formation d'un macrogel au bout de 2h assez dur, en comparaison aux macrogels réticulés par les méthacrylates, par amorçage sous UV ou par amorçage redox (Figure 4.14 a) et b) respectivement). Cette divergence provient certainement d'un taux de greffage des thiols plus important. Ainsi, le concept de la réticulation du HA par des ponts disulfure est validé.

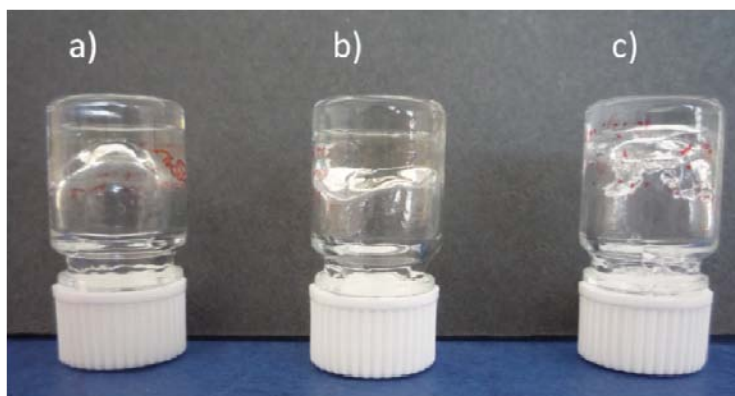


Figure 4.14 : Vues macroscopiques des macrogels obtenus : a) et b) par polymérisation des méthacrylates par amorçage UV et redox); c) par réticulation des thiols en conditions oxydantes.

Ces expériences n'ont pas pu être menées jusqu'à la préparation des nanogels car l'émulsion préparée à partir du précurseur HA-SH₂ s'est destabilisée après fragmentation. Cette observation un peu surprenante nécessite d'être confirmée, mais la quantité de HA-SH₂ ne nous a pas permis de la vérifier. Toutefois, l'alternative des ponts disulfures comme réticulant constituent une version encourageante pour l'encapsulation de macromolécules fluorescentes ou non, car la réticulation du gel ne met pas en jeu la présence de radicaux ou l'exposition aux UV.

II. Dégradabilité des structures

L'alternative des ponts disulfures propose une version dégradable de la réticulation. Cependant, les réseaux de HA-MA étudiés jusqu'à présent sont également dégradables *via* la matrice d'acide hyaluronique.

Ainsi, il convient d'examiner leur dégradabilité sur plusieurs niveaux :

- (i) la stabilité des nanogels dans l'eau ultrapure, au repos, $T=4^{\circ}\text{C}$, a été étudiée dans le temps (vieillessement des structures).
- (ii) le HA étant dégradable par la hyaluronidase, enzyme présente *in vivo*, les cinétiques de dégradation enzymatique ont été examinées.
- (iii) la stabilité des structures sous UV a également été soulevée.

A noter, que ces différentes études ont été menées sur des nanogels de HA réticulés par les méthacrylates par photopolymérisation.

II.1. Stabilité des structures

Pour être utilisées comme vecteurs pharmaceutiques, les dispersions colloïdales doivent rester stables au cours du temps. De plus, le HA étant un précurseur biodégradable, il peut subir une dégradation temporelle. Afin de vérifier la stabilité des dispersions de nanogels, les caractéristiques des nanogels fortement réticulés, formulés à partir du précurseur HA-MA₃, 100 kDa, DM=0.4 (conditions 1H-100% Pmax) ont été suivies sur 1 mois. Comme décrit en Figure 4.15, les nanogels sont présents au bout d'un mois, indiquant l'efficacité de la réticulation permanente. Cependant, on constate une légère diminution de leur taille, corroborée par les mesures granulométriques (Figure 4.16). Ces observations pourraient indiquer une dégradation du HA au cours du temps. Il convient de mentionner que les différences de contrastes des particules sont à relier à l'utilisation de l'acétate d'uranyle comme agent de contraste, qui peut révéler les mêmes objets d'une façon différente selon la façon dont ces objets ont été déposés. Néanmoins, ces résultats demeurent encourageants pour notre type d'application.

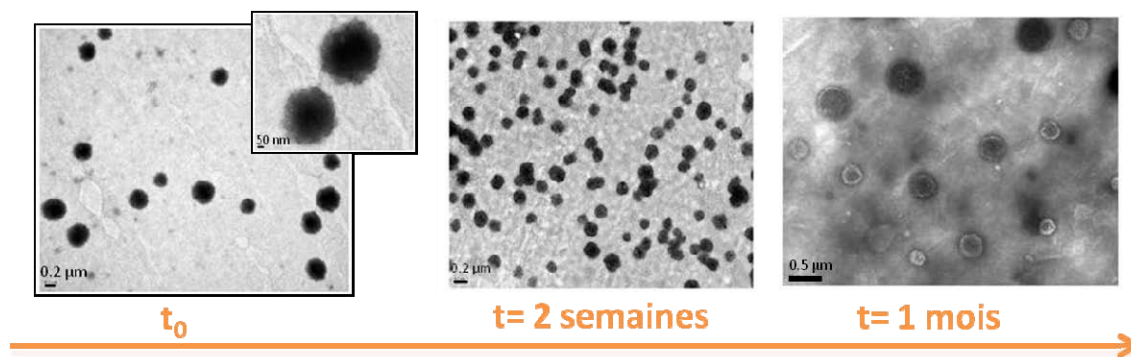


Figure 4.15 : Evolution de la morphologie des nanogels irradiés à une puissance 1h-100% Pmax au cours du temps. Précurseur HA-MA₃, 100 kDa, DM=0.4. Ces structures résultent de leur observation en présence d'acétate d'uranyle, révélant leur faible densité électronique.

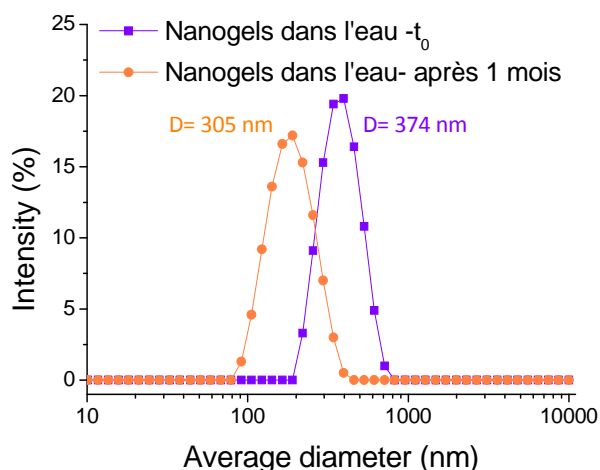


Figure 4.16 : Evolution du diamètre hydrodynamique des nanogels irradiés à une puissance 1h-100% Pmax au cours du temps. Précurseur HA-MA₃, 100 kDa, DM=0.4.

Nous avons également mené une étude sur un lot de nanogels peu réticulés (conditions 1H-10% Pmax). La morphologie des nanogels redispersés dans l'eau a été étudiée par TEM au cours du temps. De façon très surprenante, les morphologies représentées en Figure 4.17 apparaissent au bout d'un mois. Deux types de structures coexistent : des particules sphériques de distribution assez large, et des particules présentant une « écorce » dissymétrique enrobant la particule. Ces observations très surprenantes ont soulevé plusieurs questions. Quelles sont les raisons de l'apparition de ces morphologies ? La structure initiale des nanogels observée par TEM est-elle représentative de leur structure réelle ? Si non, pourrait-on former d'autres structures ?

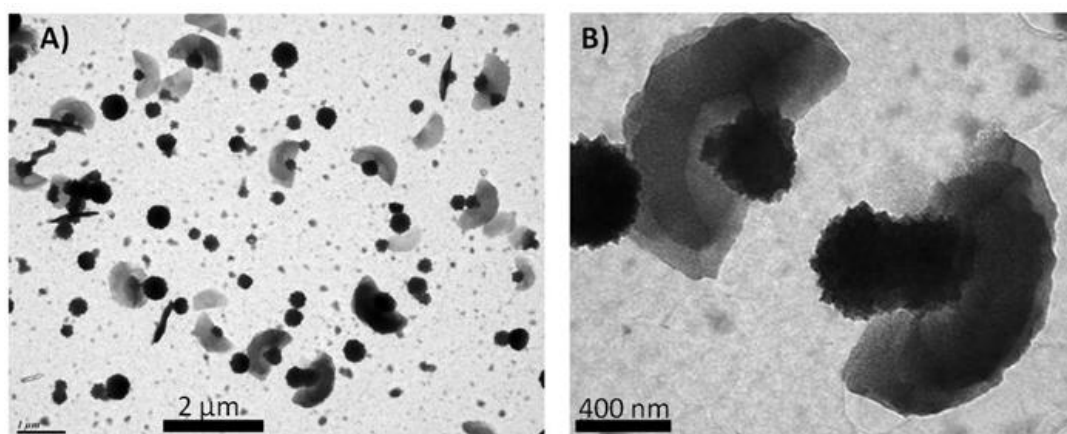


Figure 4.17 : Clichés de TEM obtenus pour des nanogels peu réticulés après un mois au repos, T=4°C. Précurseur : HA-MA₄, 200 kDa, DM=0.3. Présence d'acétate d'uranyle comme agent de contraste.

Par ces études, la stabilité des nanogels présentant un taux de conversion maximal semble validée. Des structures inattendues ont été observées pour les objets partiellement réticulés, qui restent à confirmer et étudier de manière plus systématique.

II.2. Cinétique de dégradation enzymatique

Les nanogels de HA-MA sont constitués d'une matrice complètement biodégradable, soit par hydrolyse en milieu acide, soit par dégradation enzymatique. Nous nous sommes attelés à l'étude de la dégradation enzymatique des nanogels en présence de hyaluronidase (Hase), enzyme présente *in vivo* dans les organes (foie, rate, reins, testicules, peau...) mais aussi dans les fluides (sang, liquide lacrymal, sperme)²⁷. Le terme d'hyaluronidase désigne toute molécule capable de réduire l'acide hyaluronique et dans une certaine mesure, les chondroitines (sulfate ou non), en fragments de plus petite taille²⁸. Il existe différents types de hyaluronidase (Hase), classés selon leur mode d'action²⁹ (Figure 4.18) :

- (i) La hyaluronidase d'origine mammalienne (hyaluroglucosaminidase EC 3.2.2.35). Cette classe d'enzyme clive de façon spécifique le lien glycosidique β -1,4 entre l'acide D-glucuronique et la N-acétyl-D-glucosamine. Les produits de dégradation sont majoritairement des tétrasaccharides, et quelques hexasaccharides et monosaccharides. Ces fragments présentent la N-acétyl-D-glucosamine comme motif terminal réducteur.
- (ii) La hyaluronidase présente dans les glandes salivaires des sangues (classe EC 3.2.1.36). Dans ce cas, le clivage s'effectue au niveau du lien glycosidique β -1,3 et conduit à des tétrasaccharides et hexasaccharides comme fragments finaux.
- (iii) La hyaluronidase d'origine bactérienne (classe EC 4.2.2.1) est une enzyme de la famille des lyases, dégradant la chaîne de HA par un mécanisme de β -élimination. Les produits issus de cette dégradation sont principalement des disaccharides insaturés.

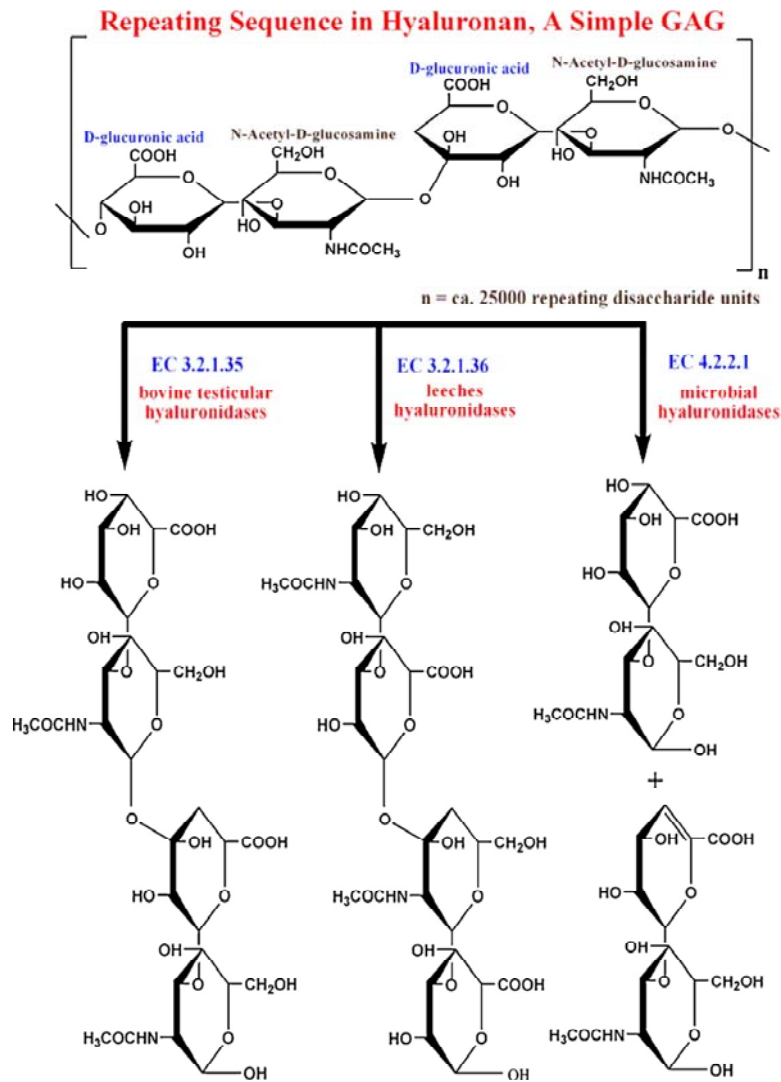


Figure 4.18 : Classification des hyaluronidases selon leur mode d'action. Extrait de²⁹.

Nous nous sommes intéressés à la première classe d'enzyme, la Hase d'origine mammalienne. Cette enzyme de poids moléculaire de 61 kDa est un tétramère constitué de quatre sous-unités, chacune ayant une masse molaire de 14 kDa. Cette glycoprotéine contient 5 % de mannose et 2.2 % de glucosamine³⁰. Le clivage du lien glycosidique β -1,4 est une réaction d'hydrolyse par catalyse acido-basique. Elle fait intervenir l'acide glutamique 113 de la séquence de l'Hase qui joue le rôle de donneur. L'effet donneur du Glu 113 est favorisé par le maintien de l'orientation de ses groupes voisins par l'acide aspartique Asp 111³¹. Il s'agit d'identifier une méthode capable de doser les produits de dégradation. Il existe diverses méthodes pour doser la dégradation du HA.

Ces méthodes peuvent être chimiques ou physico-chimiques²⁸.

- Méthodes chimiques : elles se basent sur le dosage des sucres réducteurs ou des sucres présents sur le polysaccharide. Dans le cas du HA, on peut doser soit l'acide D-glucuronique, soit la *N*-acétyl -D-glucosamine.

- Méthodes physico-chimiques : plusieurs méthodes sont recensées pour évaluer les cinétiques de dégradation. On peut effectuer des mesures de turbidité, des mesures de viscosité ou des mesures de taille. Les deux premières méthodes sont à éliminer car les solutions de nanogels ne sont pas diffusantes et sont très peu visqueuses.

Ainsi, les méthodes chimiques de dosage des sucres présents sur le HA s'avèrent des méthodes de choix pour évaluer les cinétiques de dégradation. Nos recherches nous ont d'abord orientés vers le dosage de la *N*-acétyl-D-glucosamine par la méthode Morgan-Elson³².

II.2.1. Dosage de la N-acétyl-D-glucosamine

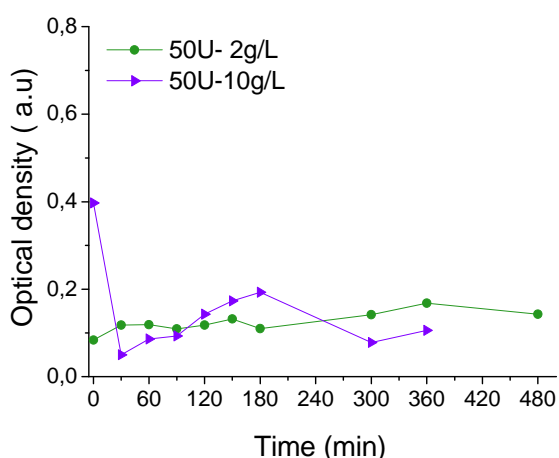
Avant d'étudier la cinétique de dégradation des nanogels, il est important de définir une gamme de temps sur le HA linéaire. Pour cela, nous avons d'abord étudié la cinétique de dégradation du HA en fonction de deux paramètres : la concentration en HA et l'activité enzymatique. On prépare une solution de HA dans le PBS à X g/L. On ajoute une solution de hyaluronidase telle que l'activité enzymatique soit de Y U/mg de HA. On prélève le HA contenant la Hase à différents temps sur une période de 6H. La première étape consiste à bloquer l'activité enzymatique en chauffant en milieu alcalin et en présence de pentadione pendant 1H ce qui produit un chromogène. Avec la pentadione, les motifs glucosamines se transforment en motifs *N*-acétyl-D-glucosamines. Puis on ajoute le N,N-diméthyl-p-aminobenzaldéhyde en solution acide (solution d'Ehrlich) au chromogène, ce qui produit une couleur rose. Le traitement décrit ci-dessus est appliqué afin de doser la quantité de *N*-acétyl-D-glucosamine par spectroscopie UV-Visible. Lors de ces expériences, nous avons remarqué que la couleur des échantillons révélés par le réactif d'Ehrlich n'était pas stable au cours du temps et avec la température. Pour s'affranchir des variations dues à la température, nous avons stocké les prélèvements au réfrigérateur avant d'ajouter la solution d'Ehrlich. Les différents essais réalisés sont résumés en Tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Conditions de dosage testées.

Essai x	Concentration en HA (g/L)	Activité enzymatique (U/mg)	Température de révélation par Ehrlich
Essai 1	2	50	à froid
Essai 2	2	50	à froid
Essai 3	2	50	à chaud
Essai 4	2	50	à chaud
Essai 5	10	50	à froid
Essai 6	2	10	à froid
Essai 7	2	200	à chaud

L'influence de la concentration en HA a tout d'abord été testée pour une concentration en enzyme de 50 U/mg (Figure 4.19 a). Lorsque la concentration en HA est de 2g/L, on constate que l'absorbance stagne sur 8H. Pour [HA] = 10g/L, la tendance est plutôt chaotique, avec une décroissance instantanée de la densité optique de 0.4 à 0.05, puis une augmentation constante pendant 3H et enfin une décroissance sur les temps plus longs. L'influence de l'activité enzymatique a ensuite été testée (Figure 4.19 b). Les tendances observées sont également chaotiques.

(a)



(b)

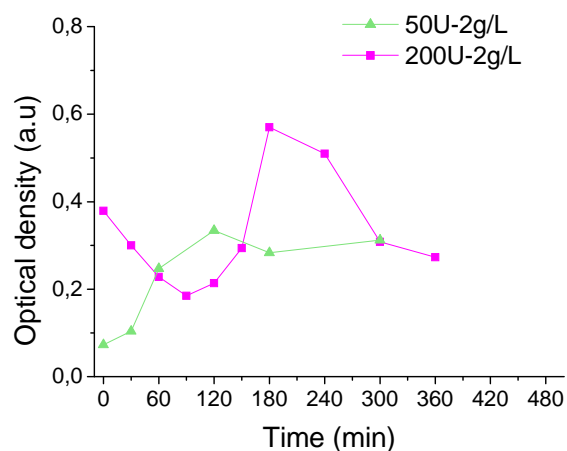


Figure 4.19 : Cinétique de dégradation du HA linéaire en fonction : (a) de sa concentration et (b) de l'activité enzymatique.

En fait ces essais ont été perturbés par des problèmes de reproductibilité. Cette non-reproductibilité des dosages soulève un problème de protocole expérimental, probablement lié aux températures de révélation par le réactif d'Ehrlich. Afin de confirmer ces doutes, nous avons recommencé ces dosages en ajoutant le réactif d'Ehrlich à froid (Essais 1 et 2) ou à chaud (Essais 3 et 4). Comme résumé en Figure 4.20, la température de révélation influence

l'allure de la courbe obtenue. Lorsque révélée à froid, la dégradation semble inexistante alors que révélée à chaud, elle suit une évolution cinétique. De plus il a été remarqué tout au long de ces dosages que la couleur des mélanges évoluait avec le temps, ce qui peut aussi expliquer de telles variations entre les essais mais aussi sur un même essai.

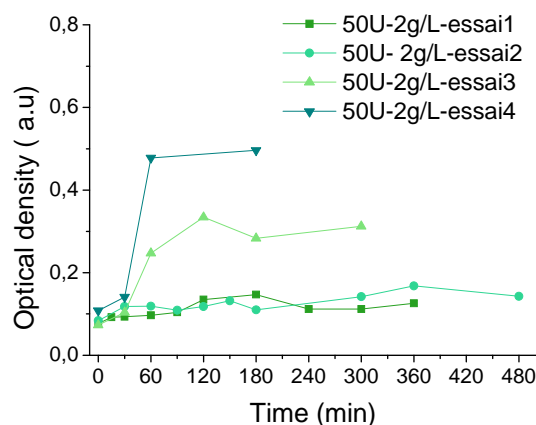


Figure 4.20 : Résultats obtenus sur les essais 1 à 4 en fonction de la température de révélation par le réactif d'Ehrlich. Conditions: HA linéaire à 2g/L en présence d'Hase à 50U.

II.2.2. Dosage de l'acide D-glucuronique

Les cinétiques de dégradation peuvent être également évaluées par le dosage de l'acide D-glucuronique, révélé par le test au carbazole^{33, 34}.

II.2.2.1 Essais sur le HA

Comme pour le dosage de Morgan-Elson, nous avons optimisé le protocole expérimental sur le HA linéaire. Le HA est solubilisé à une concentration de 2 g/L dans le PBS et deux concentrations enzymatiques ont été testées : 5U ou 50U (par mg de HA). Des prélèvements de 50 μ L sont effectués à intervalles de temps réguliers sur 24 h. Le dosage au carbazole est réalisé par incubation à 100°C des prélèvements dans une solution d'acide sulfurique contenant du tétraborate de sodium pendant 15 min. Cette étape conduit à la formation des motifs glycosides acycliques. Le carbazole est ajouté à froid, puis le mélange est incubé de nouveau à T=100°C pendant 15 min, révélant ainsi une couleur magenta. La quantité d'acide D-glucuronique est quantifiée par spectroscopie UV-vis, en analysant la densité optique à $\lambda= 530$ nm. La Figure 4.21 rassemble les tendances observées pour les deux concentrations enzymatiques. Tout d'abord, l'observation qualitative des solutions révélées indiquent qu'elles sont stables dans le temps. Ces résultats est en accord avec les observations

de Bitter *et al.*³⁵. Ensuite, la cinétique de dégradation est fluctuante et ce, pour les deux concentrations enzymatiques. Cependant, pour une concentration en Hase de 5U, la densité optique est toujours plus faible. Ces résultats indiquent que la dégradation est corrélée à la concentration enzymatique mais peuvent en outre pointer un souci expérimental : l'enzyme est révélée par le dosage.

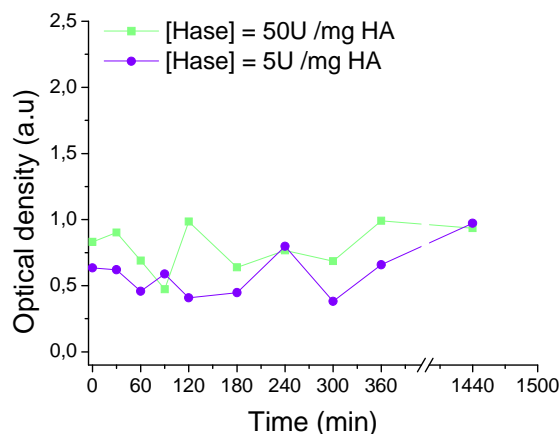


Figure 4.21 : Cinétique de dégradation du HA linéaire révélée par le dosage au carbazole en fonction de la concentration enzymatique : [Hase]=50 U/mg HA (—); [Hase]=5 U/mg HA (—).

Afin de s'affranchir de ce doute, un dispositif de filtration a été mis en place, en s'inspirant des travaux de l'équipe de Giammona³³. Le mélange contenant le HA et l'Hase est placé dans une membrane en cellulose, $M_w = 10$ kDa, baignant dans une solution de PBS. Seuls les produits de dégradation peuvent passer le filtre. Ainsi, 150 μ L du milieu extérieur est prélevé à intervalle de temps régulier et soumis au test au carbazole. La cinétique de dégradation du HA a été évaluée pour des concentrations respectives en HA et Hase de 2 g/L et 50 U/mg de HA (Figure 4.22). La cinétique de dégradation du HA atteint un palier au bout de 12 h.

II.2.2.2 Essais sur les nanogels

Appliquant le même protocole décrit ci-dessus, la cinétique de dégradation des nanogels de HA-MA₂, 100 kDa, DM=0.25, irradiés dans les conditions 1H-100% et 2H-100%, a été examinée. En Figure 4.22, ces cinétiques sont comparées à celle du HA linéaire. Les cinétiques de dégradation des nanogels suivent la même évolution que celle du HA linéaire. De façon surprenante, la réticulation du réseau semble avoir peu d'influence sur la cinétique de dégradation. Ces essais doivent être confirmés, et ce pour diverses

concentrations en HA et en hyaluronidase. A noter que la concentration physiologique de l'hyaluronidase est de 5U³¹.

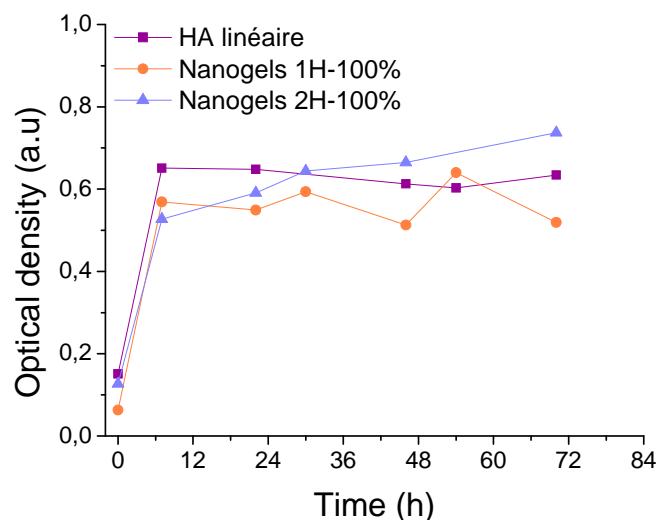


Figure 4.22 : Cinétique de dégradation du HA linéaire et des nanogels avec des degrés de réticulation différents par le dosage au carbazole. Conditions : [HA] ou [nanogel] = 2 g/L, [Hase] = 50U /mg de HA.

II.3. Autres source de dégradation : influence de l'irradiation sur les chaînes de HA et apport du filtre

Suite aux études menées sur l'encapsulation lors de la photopolymérisation, nous avons mis en évidence les limites de la tenue des protéines encapsulées aux conditions d'irradiation sous UV. Nous nous sommes alors interrogés sur l'incidence que pouvait avoir les conditions d'irradiation sur l'acide hyaluronique lui-même. Afin de mener cette étude à bien, nous avons commencé par essayer de changer les conditions d'irradiation des nanogels préparés par photopolymérisation en limitant le champ spectral utilisé. Puis, nous aborderons l'étude de la stabilité des chaînes de HA à ces différentes conditions d'irradiation utilisées.

II.3.1. Caractéristiques de nanogels préparés en présence de filtre

Les nanogels préparés jusqu'à présent par photopolymérisation en miniémulsion résultaient d'une irradiation avec la totalité de la largeur spectrale de la lampe (entre 300 et 450 nm, cf. partie expérimentale). Ces conditions permettaient d'obtenir des taux de conversion quantitatifs en MA. Cependant, la longueur d'onde requise pour l'amorçage de

l'Irgacure est de 365 nm. Nous avons donc sélectionné cette longueur d'onde en appliquant un filtre centré autour de 365 nm, en éliminant la majeure partie des bandes plus énergétiques à 300 nm (cf. partie expérimentale). Nous avons formulé une nouvelle série de nanogels (**nanogel 16**), en irradiant l'émulsion dans les mêmes conditions d'irradiation (1H-100% de la puissance maximale), en présence ou en l'absence de ce filtre. Les caractéristiques des nanogels résultants sont comparées d'un point de vue granulométrique par DLS (Figure 4.23 a), et morphologique par TEM (Figure 4.23 b). Les nanogels irradiés en présence de filtre présentent un diamètre hydrodynamique de 900 nm, soit deux fois supérieur à celui des nanogels photopolymérisés en l'absence de filtre. L'observation par TEM révèle une structure molle, conforme à celle des nanogels à l'état sec, avec une taille homogène qui semble supérieure à celle des nanogels en l'absence de filtre.

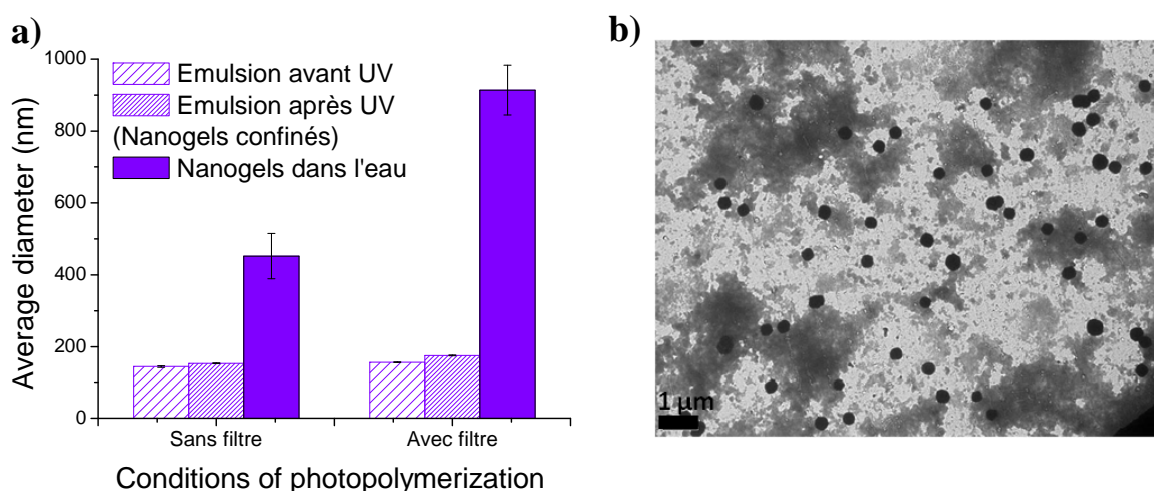


Figure 4.23 : a) Influence de la présence d'un filtre UV sur les diamètres hydrodynamiques de l'émulsion avant et après irradiation et sur les nanogels résultants. Conditions : HA-MA₂, DM=0.25, C_p = 1.5 wt%, irradiation 1H-100% Pmax. B) Cliché de TEM des nanogels obtenus en présence de filtre.

Ces tendances sont confirmées par la comparaison du taux de conversion déterminé par ¹H-RMN des nanogels photopolymérisés en présence ou en l'absence de filtre (Figure 4.24). En effet, le spectre ¹H-RMN des nanogels irradiés avec filtre montre qu'il reste des méthacrylates non polymérisés résiduels (pics à 5.8 et 6.2 ppm, flèches orange), révélant un taux de conversion en MA < 10%. Ainsi, les divergences des taux de gonflement des nanogels irradiés en présence ou en l'absence de filtre sont liées à la différence de taux de conversion des MA.

La diminution du taux de conversion peut avoir deux origines : le nombre de photons reçus diminue, ce qui reviendrait à moduler la puissance de photopolymérisation, ou l'énergie de ces photons. Nous avons estimé la puissance reçue par le HA, en présence ou en l'absence de filtre (déterminée par actinométrie³⁶, cf. partie expérimentale). Cette puissance, de l'ordre de 10^{19} photons par seconde, est relativement proche dans les deux cas. Ainsi, le choix des longueurs d'onde et donc l'énergie des photons a une incidence considérable sur l'avancement de la polymérisation.

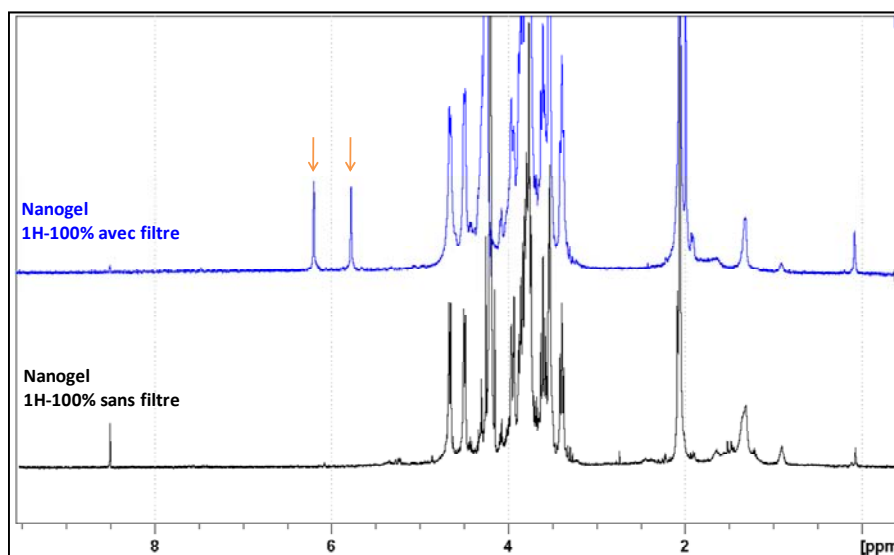


Figure 4.24 : Spectres ^1H -RMN dans le D_2O de la série **nanogel 16**, photopolymérisés en présence ou en l'absence de filtre leur degré de réticulation. Conditions : $T=25^\circ\text{C}$, 256 scans, $C=6$ g/L. Précurseur HA- MA_2 , 100 kDa, $DM=0.25$.

II.3.2. Structure des chaînes de polysaccharide

Afin d'aller plus loin sur l'impact de l'irradiation sur la stabilité du HA, nous avons évalué l'évolution du poids moléculaire du HA linéaire en fonction de l'irradiation. Cette détermination a été faite par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

(i) Le HA en solution (transparente) a d'abord été irradié 1H-10% de la puissance maximale, avec ou sans amorceur (Irgacure 2959), et avec ou sans filtre. Le poids moléculaire de chaque lot a été comparé à celui du HA non irradié (spectres rouge à noir). Le poids moléculaire du HA non irradié est de 86 kDa, et reste similaire après irradiation, en l'absence d'amorceur, et en présence d'amorceur + filtre. En revanche, on constate une diminution du poids moléculaire à 36 kDa lorsqu'il est irradié en présence d'amorceur et en l'absence de filtre, indiquant une dégradation des chaînes de polysaccharide.

(ii) Afin de tenir compte des conditions en milieu confiné, une autre série a également été préparée, en confinant le HA en miniémulsion inverse, en l'irradiant 1H-100% (afin de tenir compte de l'absorption du milieu) avec ou sans filtre en présence d'amorceur, puis en purifiant le polymère de l'huile et des tensioactifs. Le poids moléculaire de chaque lot a été comparé à celui du HA confiné mais non irradié (spectres rose à orange). Sans équivoque, l'absence de filtre conduit à la dégradation des chaînes de HA, de poids moléculaire désormais inférieur à 20 kDa.

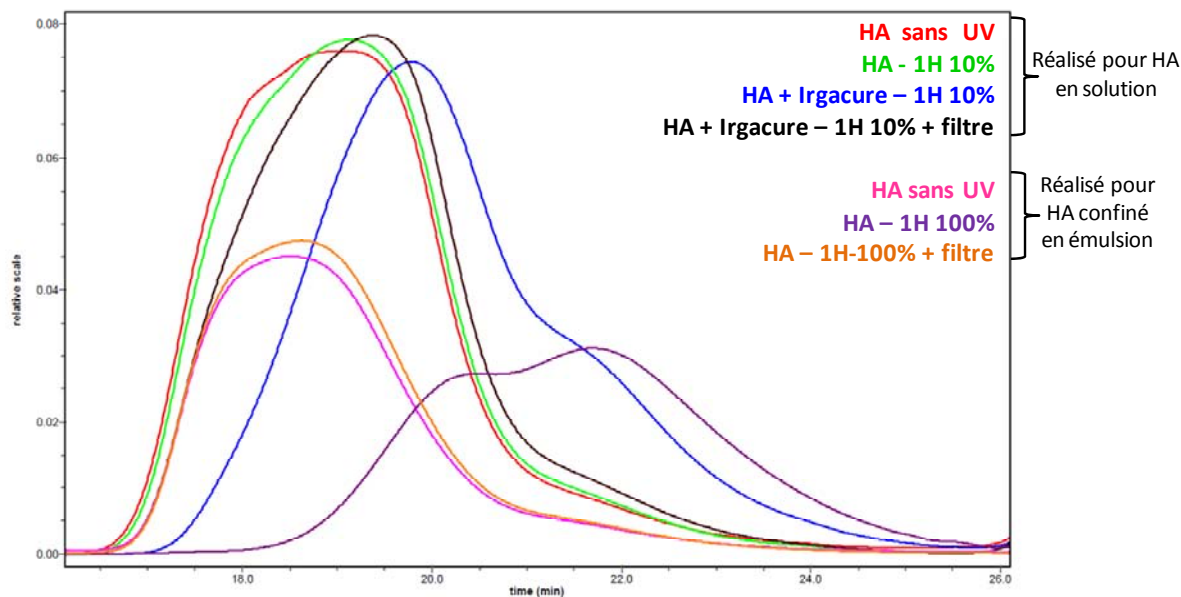


Figure 4.25 : Chromatogrammes SEC enregistrés du HA en solution ou confiné en émulsion, avant et après irradiation sous UV, avec ou sans filtre.

Ainsi, cette étude met en évidence la dégradation des chaînes de HA sous UV. L'application du filtre permet de limiter cette dégradation. De ce fait, la photopolymérisation des HA-MA met en jeu deux phénomènes antagonistes : l'avancement de la conversion des méthacrylates et la dégradation du HA. En l'état actuel de nos connaissances, nous ne pouvons estimer si la dégradation des chaînes de HA a un impact négatif sur la structure des nanogels. En effet, même si les chaînes sont plus courtes, cela ne les empêche pas d'être partie constitutive des nanogels, tant qu'elles sont liées de façon covalente *via* les méthacrylates. Notons que la ^1H -RMN, largement utilisée dans ce travail, ne permet pas de distinguer le HA dégradé du HA non dégradé (Figure 4.26)³⁷. Des mesures quantitatives seront nécessaires pour estimer la fraction de HA en solution comparativement à la fraction de HA dans les nanogels. La séparation de ces deux espèces devra être réalisée par ultrafiltration par exemple. Rappelons également que nous n'avons trouvé aucune dépendance du taux de

gonflement en fonction de la concentration en polymère. La perte d'une fraction du polymère par dégradation pourrait peut-être expliquer ce résultat.

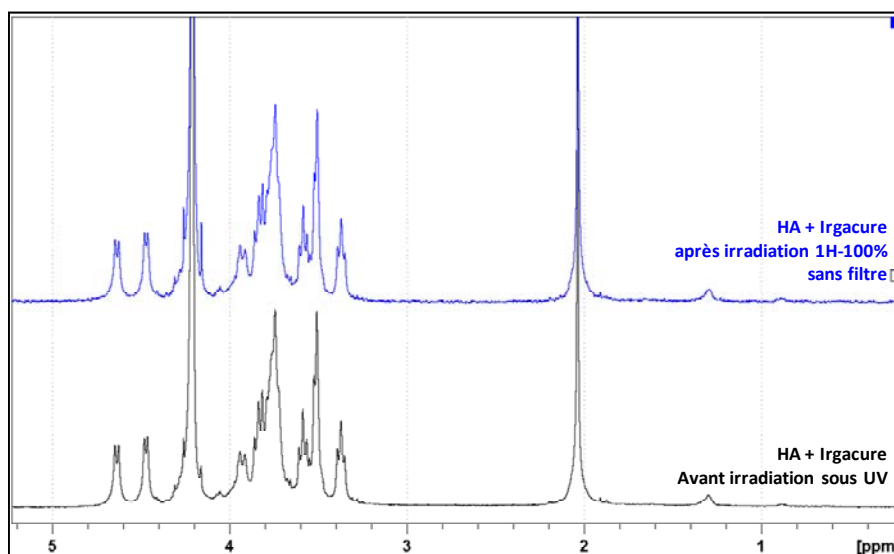


Figure 4.26 : Spectres ^1H -RMN du HA confiné en émulsion avant et après irradiation sous UV.

On peut en outre remarquer que le taux de conversion maximal des méthacrylates n'est observé que dans des conditions où la dégradation des chaînes intervient. Les conditions plus douces utilisées (amorçage redox, thermique ou photopolymérisation avec filtre) n'ont abouti qu'à des taux de conversion partiels des méthacrylates. Il se peut que la dégradation des chaînes augmente leur mobilité au sein du réseau, permettant une meilleure accessibilité des MA pendants.

Conclusion

Dans un premier temps, ce chapitre avait pour but de montrer la potentialité des nanogels de HA pour l'encapsulation d'insuline. Plusieurs possibilités ont été envisagées :

- Une pré-encapsulation de biomacromolécules, fluorescentes ou non n'a pu aboutir par photopolymérisation ;
- Des voies alternatives d'amorçage ont permis d'envisager la pré-encapsulation, mais ces conditions ne permettent pas d'accéder à une conversion totale des méthacrylates. La toxicité potentielle de ces résidus reste à évaluer.

- Une autre voie pourrait être envisagée par réticulation *via* les ponts disulfures, bien que les conditions de préparation des nanogels doivent être examinées de manière plus approfondie.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué la dégradabilité des nanogels sur plusieurs niveaux.

- La stabilité temporelle des nanogels semble vérifiée, mais s'accompagne d'une légère évolution de taille et d'une (hypothétique) structure.

- Les cinétiques de dégradation ont également été examinées et semblent comparables à celles du HA linéaire. Ces tendances sont en cours d'approfondissement.

- Enfin, des expériences complémentaires visant à examiner la structure des chaînes de HA ont démontré que celui-ci se dégradait sous irradiation. L'impact de cet effet sur les structures reste à examiner.

Références:

1. Ghugare, S. V.; Chiessi, E.; Cerroni, B.; Telling, M. T. F.; Sakai, V. G.; Paradossi, G., Biodegradable dextran based microgels: a study on network associated water diffusion and enzymatic degradation. *Soft Matter* **2012**, 8, (8), 2494.
2. Toprak, M. S.; McKenna, B. J.; Waite, J. H.; Stucky, G. D., Control of Size and Permeability of Nanocomposite Microspheres. *Chemistry of Materials* **2007**, 19, (17), 4263.
3. Jha, A. K.; Hule, R. A.; Jiao, T.; Teller, S. S.; Clifton, R. J.; Duncan, R. L.; Pochan, D. J.; Jia, X., Structural analysis and mechanical characterization of hyaluronic acid-based doubly cross-linked networks. *Macromolecules* **2009**, 42, (2), 537.
4. Vermonden, T.; Censi, R.; Hennink, W. E., Hydrogels for protein delivery. *Chemical Reviews* **2012**, 112, (5), 2853.
5. Fleury-Souverain, S.; Sigrist, T.; Griffiths, W.; Ing, H.; Matthey, B.; Sadeghipour, F.; Bonnabry, P., The stability of soluble insulin in plastic syringes. *AJHP Science* **2011**, 17, (1), p. 3- 6.
6. Franssen, O.; Hennink, W. E., A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, 168, (1), 1.
7. Stenekes, R. J. H.; Hennink, W. E., Polymerization kinetics of dextran-bound methacrylate in an aqueous two phase system. *Polymer* **2000**, 41, (15), 5563.
8. Chung, J. T.; Vlugt-Wensink, K. D. F.; Hennink, W. E.; Zhang, Z., Effect of polymerization conditions on the network properties of dex-HEMA microspheres and macro-hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, 288, (1), 51.
9. Oudshoorn, M. H. M.; Rissmann, R.; Bouwstra, J. A.; Hennink, W. E., Synthesis of methacrylated hyaluronic acid with tailored degree of substitution. *Polymer* **2007**, 48, (7), 1915.
10. Klinger, D.; Aschenbrenner, E. M.; Weiss, C. K.; Landfester, K., Enzymatically degradable nanogels by inverse miniemulsion copolymerization of acrylamide with dextran methacrylates as crosslinkers. *Polymer Chemistry* **2012**, 3, (1), 204.
11. Prata, J. E.; Barth, T. A.; Bencherif, S. A.; Washburn, N. R., Complex fluids based on methacrylated hyaluronic acid. *Biomacromolecules* **2010**, 11, (3), 769.
12. Cao, Z. H.; Wang, Z.; Herrmann, C.; Landfester, K.; Ziener, U., Synthesis of Narrowly Size-Distributed Metal Salt/Poly(HEMA) Hybrid Particles in Inverse Miniemulsion: Versatility and Mechanism. *Langmuir* **2010**, 26, (23), 18008-18015.
13. Cheng, G.; Mi, L.; Cao, Z.; Xue, H.; Yu, Q.; Carr, L.; Jiang, S., Functionalizable and Ultrastable Zwitterionic Nanogels. *Langmuir* **2010**, 26, (10), 6883.
14. Carelli, S.; Ceriotti, A.; Cabibbo, A.; Fassina, G.; Ruvo, M.; Sitia, R., Cysteine and Glutathione Secretion in Response to Protein Disulfide Bond Formation in the ER. *Science* **1997**, 277, (5332), 1681-1684.
15. 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.
16. Hahn, S. K.; Park, J. K.; Tomimatsu, T.; Shimoboji, T., Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules* **2007**, 40, (4), 374.
17. Lee, H.; Mok, H.; Lee, S.; Oh, Y.-K.; Park, T. G., Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels. *Journal of Controlled Release* **2007**, 119, (2), 245.
18. Zelikin, A. N.; Quinn, J. F.; Caruso, F., Disulfide Cross-Linked Polymer Capsules: En Route to Biodeconstructible Systems. *Biomacromolecules* **2005**, 7, (1), 27.
19. Bernkop-Schnürch, A.; Schwarz, V.; Steininger, S., Polymers with Thiol Groups: A New Generation of Mucoadhesive Polymers? *Pharmaceutical Research* **1999**, 16, (6), 876.
20. Kast, C. E.; Bernkop-Schnürch, A., Polymer-cysteamine conjugates: new mucoadhesive excipients for drug delivery? *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, 234, (1-2), 91.
21. Shu, X. Z.; Liu, Y.; Luo, Y.; Roberts, M. C.; Prestwich, G. D., Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels. *Biomacromolecules* **2002**, 3, (6), 1304.
22. Kuo, J. W.; Swann, D. A.; Prestwich, G. D., Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. *Bioconjugate Chemistry* **1991**, 2, (4), 232.

23. Vercruyssen, K. P.; Marecak, D. M.; Marecek, J. F.; Prestwich, G. D., Synthesis and in vitro degradation of new polyvalent hydrazide cross-linked hydrogels of hyaluronic acid. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, 8, (5), 686.
24. Hermanson, G. T., *Bioconjugate Procedures* **1996**.
25. Lutolf, M. P.; Tirelli, N.; Cerritelli, S.; Cavalli, L.; Hubbell, J. A., Systematic Modulation of Michael-Type Reactivity of Thiols through the Use of Charged Amino Acids. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, 12, (6), 1051.
26. Kortemme, T.; Creighton, T. E., Ionisation of Cysteine Residues at the Termini of Model α -Helical Peptides. Relevance to Unusual Thiol pKa Values in Proteins of the Thioredoxin Family. *Journal of Molecular Biology* **1995**, 253, (5), 799.
27. Fraser, J. R. E.; Laurent, T. C.; Laurent, U. B. G., Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine* **1997**, 242, (1), 27.
28. El-Safory, N. S.; Fazary, A. E.; Lee, C. K., Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 81, (2), 165.
29. Meyer, K.; Rapport, M. M., Hyaluronidases. *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry* **1952**, 13, 199.
30. Menzel, E. J.; Farr, C., Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: Biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Letters* **1998**, 131, (1), 3.
31. Garg, H. G.; Hales, C. A., *Chemistry and biology of hyaluronan*. Elsevier Science: NL, 2004.
32. Morgan, W. T. J.; Elson, L. A., A colorimetric method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. *Biochemical Journal* **1934**, 28, 988-995.
33. Bitter, T.; Muir, H. M., A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Analytical Biochemistry* **1962**, 4, (4), 330-&.
34. Burdick, J. A.; Chung, C.; Jia, X.; Randolph, M. A.; Langer, R., Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules* **2005**, 6, (1), 386.
35. Pitarresi, G.; Craparo, E. F.; Palumbo, F. S.; Carlisi, B.; Giammona, G., Composite nanoparticles based on hyaluronic acid chemically cross-linked with alpha,beta-polyaspartylhydrazide. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (6), 1890-1898.
36. Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T., *Handbook of photochemistry* **2006**.
37. Blundell, C. D.; Reed, M. A. C.; Almond, A., Complete assignment of hyaluronan oligosaccharides up to hexasaccharides. *Carbohydrate Research* **2006**, 341, (17), 2803.

Conclusion générale et perspectives

Dans ce mémoire de thèse, une gamme de nanogels d'acide hyaluronique, biocompatibles et biodégradables a été développée, par réticulation de précurseurs naturels chimiquement modifiés, en miniémulsion inverse.

Grâce à la modification contrôlée de l'acide hyaluronique, une gamme variée de précurseurs, comportant des fonctions réticulables et des ligands du glucose, a été obtenue. Parmi les fonctions réticulables, les méthacrylates ont fait l'objet d'une attention particulière, conduisant à la réticulation des polymères linéaires par polymérisation radicalaire. Leur confinement dans les gouttes d'une émulsion matricielle a permis de les réticuler pour former des nanogels. Grâce à un bon contrôle de la stabilité et de la taille de cette émulsion, des nanogels de taille et de taux de gonflement contrôlés ont été préparés.

Leur taux de gonflement peut être modulé selon plusieurs paramètres :

- par la structure du précurseur *via* le nombre de fonctions méthacrylates greffées (taux de méthacrylation) et sa masse molaire.
- par les conditions de polymérisation utilisées (temps ou puissance de la lampe pour la photopolymérisation), qui permettent de contrôler l'avancement de la polymérisation des méthacrylates. Selon l'application visée, et notamment à des fins d'encapsuler une espèce lors de la préparation des nanogels, d'autres voies d'amorçage comme l'amorçage thermique ou l'amorçage redox peuvent également être utilisées. Bien que ne conduisant pas à un taux de conversion maximal, ces méthodes alternatives semblent plus douces pour les molécules encapsulées ou pour le squelette de polysaccharide lui-même. Ainsi, il a été montré que les chaînes d'acide hyaluronique sont sensibles à des conditions d'irradiation extrêmes. Cependant, la photopolymérisation peut être menée dans des conditions plus douces en choisissant judicieusement les longueurs d'onde d'irradiation. En outre, une réticulation *via* les ponts disulfure peut être également envisagée, en vue d'introduire une dégradation du réseau tridimensionnel par réduction.

Grâce à toutes ces méthodes développées, des objets mous, de taille et de porosité contrôlée, stables dans le temps mais dégradables par la hyaluronidase, peuvent être proposés pour des applications pharmaceutiques. Ces objets présentent en particulier l'avantage de pouvoir encapsuler des quantités non négligeables de molécules telles que des protéines, qui peuvent être emprisonnées lors de la synthèse des matériaux. L'application à l'insuline semble être réalisable et ouvre une voie pour la suite du projet.

Ces objets nécessiteront des caractérisations complémentaires afin de connaître précisément leur composition et leur porosité. Des analyses complémentaires en diffusion de neutrons ou de perméation de molécules de poids moléculaire connu, permettront de déterminer la taille des pores. Leur morphologie pourra être précisée par des techniques d'imagerie *in situ* comme le cryoTEM ou encore l'AFM.

Dans le cadre du projet MEDICIN, notre objectif était de développer des nanogels sensibles au glucose. A cette fin, nous avons incorporé un ligand du glucose, l'acide phénylboronique, dans la matrice. Les précurseurs de HA, greffés avec ces précurseurs, ont pu être mis en forme de nanogels en utilisant les méthodes mises au point pour les nanogels non fonctionnels. Un peu plus hydrophobes, ces objets sont un peu plus difficiles à redisperser. Néanmoins, leur comportement dans différents milieux a pu être étudié. Malgré tout le soin apporté à l'optimisation de ces structures en termes de taux de fonctionnalisation, aucune réponse au glucose n'a pu être clairement établie. En parallèle, un autre mécanisme de réponse au glucose a été proposé, utilisant des hydrogels interpénétrés constitués de précurseurs hôte et invité. La mise en forme de ces précurseurs en nanogels devrait prochainement aboutir à des nanogels sensibles au glucose, pouvant soit gonfler, soit se contracter, selon le ratio de précurseur hôte ou invité utilisé. Grâce aux outils mis en place, des nanogels de réponse modulables pourront être aisément préparés.

La suite du projet MEDICIN devra approfondir le comportement de ces vecteurs vis-à-vis de l'application pharmaceutique, à la fois en termes d'encapsulation et de libération d'insuline, ainsi que de comportement *in vivo*.

L'encapsulation d'insuline dans les nanogels semble désormais réalisable, en utilisant la méthode de préparation par amorçage redox. L'activité de la protéine reste néanmoins à confirmer, par dichroïsme circulaire. Une étude plus approfondie visera à estimer le taux d'encapsulation d'insuline par cette méthode, et à le comparer avec ceux obtenus par post-encapsulation pour les microgels synthétiques. Pour ce faire, le caractère dégradable de la matrice par l'hyaluronidase sera utilisé. Par la suite, les cinétiques de libération seront alors évaluées, selon la concentration en glucose, le pH, la présence d'interférents, dans des milieux simples puis dans des milieux complexes comme le plasma.

Un deuxième volet visera à comprendre l'interaction de ces objets avec le vivant. Des tests *in vitro* seront menés, afin d'évaluer leur éventuelle cytotoxicité (en cours) et leur hémocompatibilité. Par la suite, leur comportement *in vivo* sera étudié. Leur biodistribution

pourra être suivie par imagerie. Pour cela, une fonctionnalisation préalable des nanogels par des nanoparticules magnétiques ou des fluorophores sera nécessaire. Il convient de préciser que la présence de méthacrylates résiduels peut être une source de toxicité *in vivo*, mais que ces résidus peuvent être neutralisés *a posteriori*. Ils peuvent même être exploités de manière avantageuse pour greffer différentes fonctions, par une simple chimie de couplage, par exemple en utilisant la chimie thiol-ène. De nouveaux ligands pourraient ainsi être introduits, ou des greffons permettant d'améliorer la furtivité des vecteurs comme des chaînes de polyéthylène glycol.

Au-delà de l'application pour un traitement du diabète, les nanogels développés dans ce manuscrit trouveront d'autres applications pour l'encapsulation et/ou la délivrance de macromolécules dans le secteur de la santé, mais aussi de la cosmétique ou encore de l'alimentation. La méthode de préparation mise en place pourra s'appliquer à tout type de précurseur hydrophile.

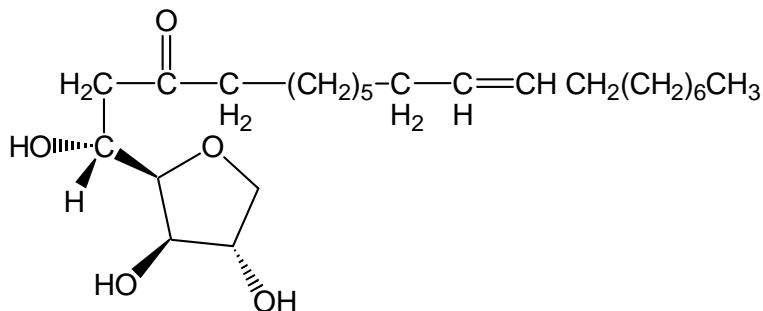
Partie Expérimentale

I. Réactifs

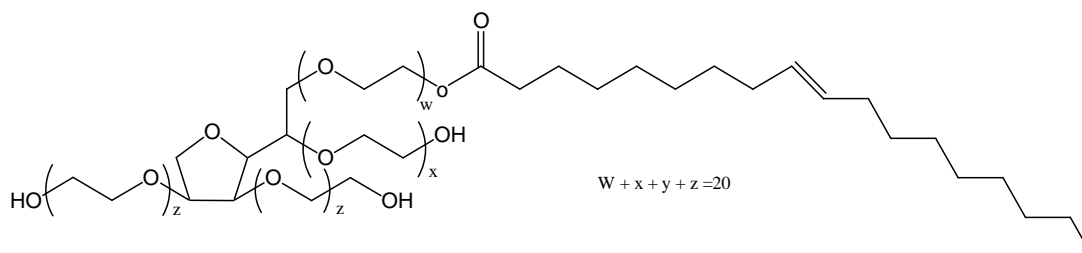
L'acide hyaluronique (HA), 100 kDa ou 20 kDa a été utilisé comme fourni par Lifecore. L'anhydride méthacrylate, l'octane, le DMF, l'EtOH, le cyclohexane, le THF, le NaCl, l'EDC, l'APBA, le PVA, l'HOBt, l'insuline-FITC, l'insuline humaine, le dextran-FITC (10 kDa ou 40 kDa), la cystéamine, la cystamine, l'hydrazine, l'acide 3,3'-dithiobis propanoïque, la hyaluronidase type I-S, le carbazole, le tétraborate de sodium, la 2,4 pentadione, le réactif de Morgan-Elson, les tablettes de PBS, le Na_2HPO_4 , le NaH_2PO_4 , ont été utilisés, comme reçus de chez Sigma-Aldrich. Le PAA, 15 kDa, 35 wt% a été commandé chez PolyScience. Le D_2O provient d'Eurisotop.

➤ Formules développées des tensioactifs utilisés

- a) Formule développée du monooleate de sorbitane (Span 80, Sigma)

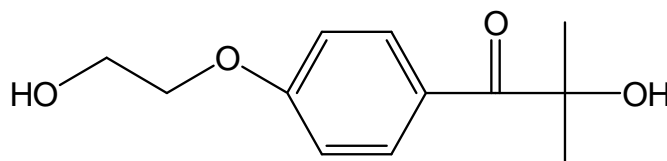


- b) Formule développée du polysorbate 80 (Tween 80, Sigma)

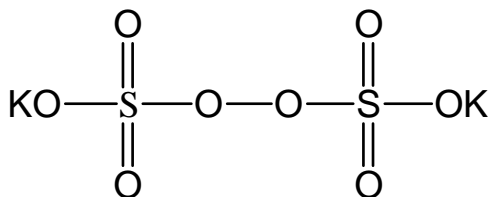
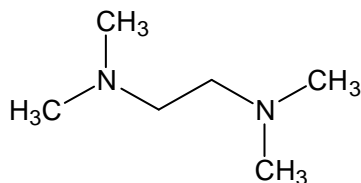


➤ Formules développées des amorceurs

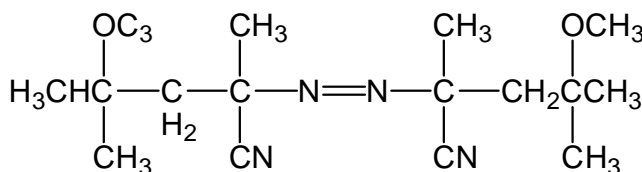
- a) Photopolymérisation : Irgacure 2959 (Ciba)



b) Amorçage redox : Tetraéthylènediamine (TEMED) (Sigma) / Persulfate de potassium (KPS) (Sigma).



d) V-70 (Wako)



II. Détails expérimentaux des synthèses

II.1. Synthèses des précurseurs

➤ Synthèse des HA-MA

A titre d'exemple, la synthèse de HA-MA ($M_w=100$ kDa), DS=0.2 est reportée.

L'acide hyaluronique (HA) (2.5 mmol) est solubilisé à 2% w/v dans 50 mL d'eau distillée à 4°C. La solution est gardée sous agitation pendant 4 heures. Un volume de 33 mL de DMF est ajouté au goutte à goutte afin d'obtenir un mélange DMF/eau de 3/2 (v/v) puis le pH du mélange est ajusté à pH=8. L'anhydride méthacrylique (AMA) (1eq molaire par rapport à l'acide hyaluronique) est ajouté à pH=8, T=4°C. Le pH du mélange est maintenu entre pH= 8 et pH=9 pendant 4 heures par ajout de NaOH à 0.5 N. La réaction est alors maintenue sous agitation toute la nuit à 4°C. Le lendemain, du NaCl à 0.5 N est ajouté dans le mélange. Le polymère est précipité par ajout de 150 mL d'éthanol (ratio water/EtOH de 2/3). Le surnageant est prélevé et le précipité est lavé successivement avec des mélanges eau/EtOH de 3/7, 1/4 et 1/9. Après redispersion du précipité dans 80 mL d'eau ultrapure, la solution est purifiée par diafiltration (seuil de coupure : membrane 10 kDa, Millipore), pendant 24 h puis lyophilisée.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O , 80°C): δ (ppm): 1.78 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{MA})$), 1.85 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{MA})$), 1.91 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{CO})$), 3.8-3.2 (br, 9H), 4.35 (d, $J=7.7$ Hz, 1H *), 4.51 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 5.7 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, $\text{CH}_2=$), 6.1 (d, $J=14\text{Hz}$, 1H $\text{CH}_2=$)

Remarque :

Une vérification supplémentaire du greffage des méthacrylates a été conduite par ^{13}C -RMN. Le spectre du HA non modifié a été pris en référence. Comme illustré en Figure 1, on remarque la présence des groupements carbonyle à 174 et 175 ppm. Cependant ces pics sont également présents sur le HA mais leur ratio semble différent. Cette différence peut venir de la présence du carbonyle de l'ester. Malheureusement, ce spectre ne met pas en évidence la présence des pics des méthacrylates attendus entre 120 et 140 ppm. Cela peut venir du fait que le greffage n'est pas quantitatif. Dans ce cas précis, le DM était de 0.16 ce qui n'est peut-être pas suffisant pour voir l'apparition des méthacrylates sur le spectre ^{13}C -RMN. En revanche, on constate l'apparition d'un pic à 18 ppm (flèche orange), non présent sur le HA. Ce pic correspond au groupement méthyle CH_3 des méthacrylates et constitue une preuve supplémentaire du greffage.

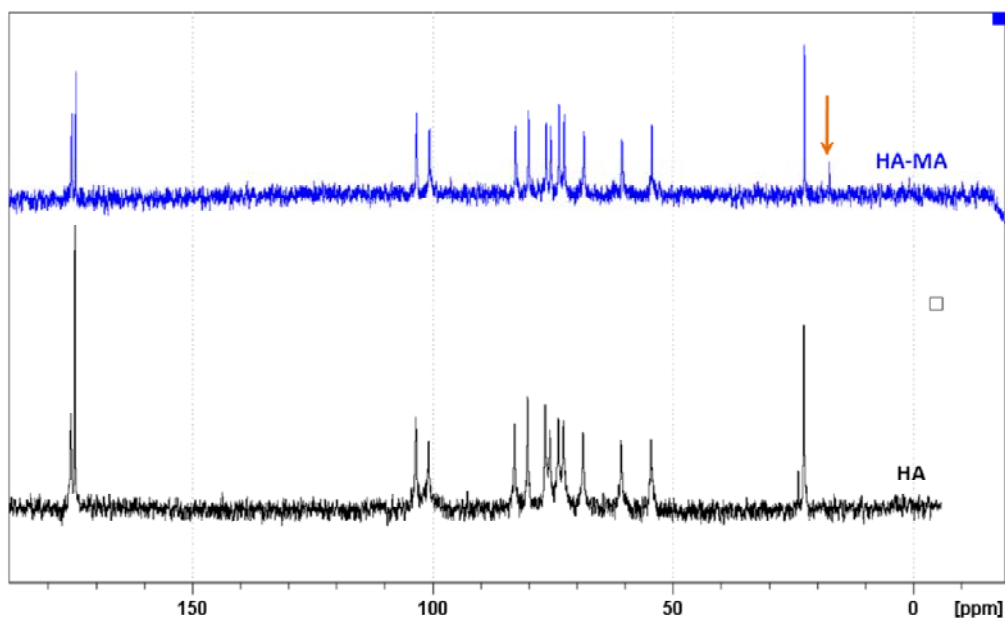


Figure 1 : Spectre ^{13}C -RMN du HA (en noir) et du HA-MA (en bleu).

➤ **Synthèse de l'AECBPA**

L'acide 4-carboxyphénylboronique CPBA (5g, 30.16 mmol) est préalablement séché sous vide durant une nuit afin d'éliminer toute trace d'eau. 75ml de chlorure de thionyle sont additionnés goutte à goutte au CPBA sous chauffage à reflux (88°C) et sous Argon. La réaction est laissée une nuit. Le SOCl_2 est ensuite évaporé à la trompe à eau, puis le chlorure d'acide obtenu est dissout dans 30 mL de THF distillé. Cette solution est mélangée à froid, sous Argon, et pendant 24 h à 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. La solution se teinte en jaune. Les amines sont ensuite évaporées à la trompe à eau puis 50 mL d'eau mQ sont ajoutés. Le pH de la solution (initialement de 10-11) est ramené à 4 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée afin de faire précipiter les dimères obtenus lors de la réaction. Ces derniers sont éliminés par filtration sur Buchner. Le filtrat récupéré est concentré sous pression réduite et placé à 4°C pendant une nuit. Les cristaux obtenus sont ensuite filtrés sous Buchner, lavés à l'eau froide et recristallisés 3 fois.

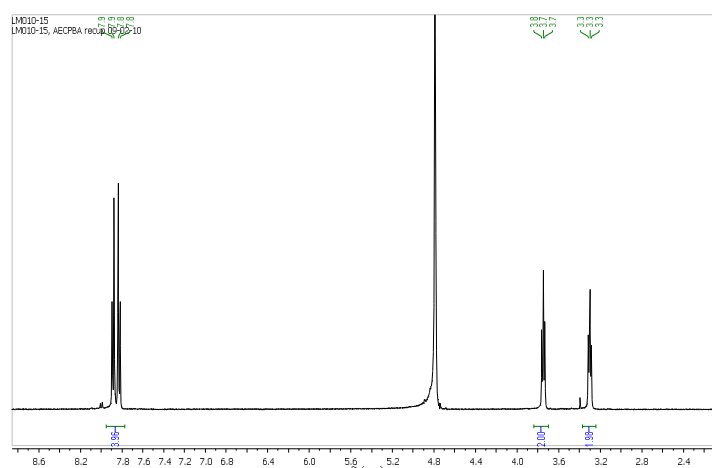


Figure 2 : ^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ : 3.3 (2H, t, $J=5.9$ Hz, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 3.7 (2H, t, $J=5.9$ Hz, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 7.8 (4H, dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=23.0$ Hz $\text{NH-CO-C}_6\text{H}_4\text{-B(OH)}_2$).

➤ Synthèse de PAA-PBA

A titre d'exemple, la synthèse du PAA-PBA₂ est développée (conditions résumées en Tableau 1). A température ambiante, 3 mmol PAA (35% massique) est mélangé dans 15 mL d'eau milliQ. Une solution d'APBA (0.6 mmol, 0.2 eq, 9 mL) est ensuite introduite dans le mélange. Le pH est alors ajusté à 6 avec de la soude à 1 M. Une solution d'EDC (1.1 mmol, 0.4 eq, 6 mL) est préparée séparément et son pH est ajusté rapidement à 5-6 par ajout de HCl à 1M. La solution d'EDC est ensuite introduite au goutte-à-goutte pendant 15 min dans la solution de PAA/APBA vigoureusement agitée. Le mélange est laissé sous agitation pendant 1h. Il est ensuite soit dialysé dans de l'eau milliQ pendant 48 h (MWCO=3500, bains changés 2 fois par jour). Le précurseur ainsi purifié est ensuite lyophilisé.

^1H -RMN (400MHz, 128 scans) du PAA-APBA₂ (D_2O) δ : 7.1 ppm [dd, 4H, $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-B(OH)}_2$], 2.3 ppm [m, 1H, CH(PAA)], 1.7 ppm [m, 2H, $\text{CH}_2(\text{PAA})$]. Pics additionnels à 1.05ppm (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$) à 1.85ppm (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N(CH}_3)_2$) et à 3.2ppm (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N=C=NCH}_2$) peuvent être attribués à l'EDC. Conditions : purification par dialyse.

Ce précurseur a de nouveau été synthétisé dans les mêmes conditions, mais la purification a été réalisée par précipitation à l'acétone (ratio 2/1 acétone/eau). Après retrait du surnageant, les traces d'acétone sont évaporées sous vide, puis le précipité est redispersé dans l'eau ultrapure et stocké à T=4°C jusqu'à utilisation.

$^1\text{H-RMN}$ (400MH) du PAA-PBA₂ (D₂O) δ : 7.1 ppm [dd, 4H, NH₂ -C₆H₄-B(OH)₂], 2.3 ppm [m, 1H, CH(PAA)], 1.7 ppm [m, 2H, CH₂(PAA)]. Conditions : purification à l'acétone. Aucun pic additionnel n'est observé.

Tableau 1 : Détails expérimentaux pour la synthèse du PAA-PBA₂.

	m (g)	n (mmol)	V (L)	C (mmol/L)	N _{eq} /PAA	N _{eq} /PBA
Eau mQ			0,030			
PAA (35% m)	0,61					
PAA pur	0,21	2,96		100,00		
EDC	0,22	1,15		38,80	0,39	1,94
APBA	0,11	0,59		20,00	0,20	

➤ Synthèse de PAA-AECPBA

A titre d'exemple, la synthèse du PAA-AECPBA₅ est développée. Les conditions expérimentales de la synthèse sont détaillées dans le Tableau 2. A température ambiante, 4.5 mmol PAA (35% massique) est mélangé dans 30 mL d'eau ultrapure. Une solution d'AECPBA (0.9 mmol, 0.2 eq, 6 mL) est ensuite introduite dans le mélange. Le pH est alors ajusté à 6 avec de la soude à 1 M. Une solution d'EDC (0.9 mmol, 0.2 eq, 9 mL) est préparée séparément et son pH est ajusté rapidement à 5-6 par ajout de HCl à 1M. La solution d'EDC est ensuite introduite au goutte-à-goutte pendant 15 min dans la solution de PAA/AECPBA vigoureusement agitée. Le mélange est laissé sous agitation pendant 1h. Il est ensuite précipité à l'acétone (ratio 2/1 acétone/eau). Après retrait du surnageant, les traces d'acétone sont évaporées sous vide, puis le précipité est redispersé dans l'eau ultrapure et stocké à T=4°C jusqu'à utilisation.

$^1\text{H-RMN}$ (400Mz) du PAA-AECPBA₅ (D₂O) δ : 7.7 ppm [dd, 4H, NH₂ -C₆H₄-B(OH)₂], 3.3 (2H, t, J=5.9 Hz, NH₂-CH₂-CH₂-), 3.7 (2H, t, J=5.9Hz, NH₂-CH₂-CH₂-), 2.3 ppm [m, 1H, CH(PAA)], 1.7 ppm [m, 2H, CH₂(PAA)]. Pics additionnels à 1.05ppm (t, 3H, CH₃CH₂N) à 1.85ppm (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂) et à 3.2ppm (m, 4H, CH₃CH₂N=C=NCH₂) peuvent être attribués à l'EDC.

Tableau 2 : Détails expérimentaux pour la synthèse du PAA-AECPBA₅.

	m (g)	n (mmol)	V (L)	C (g/L)	C (mmol/L)	eq (p/r PAA)	eq(p/r AECPBA)
Eau mQ			0,045				
PAA (35% m)	0,926						
PAA pur	0,324	4,500		11,22	100,00		
EDC	0,164	0,855		5,68	29,63	0,20	0,94
AECPBA	0,187	0,900		6,48	31,17	0,20	

L'incorporation de l'AECPBA a également été vérifiée par IR, comme illustré en Figure 3. (cf. chapitre 3).

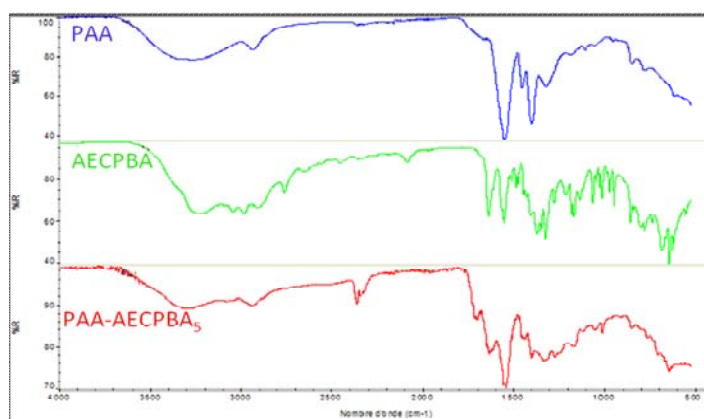


Figure 3 : Spectre IR des PAA, AECPBA et PAA-AECPBA.

➤ Synthèse de HA-PBA

A titre d'exemple, la synthèse du HA-PBA₁ est reportée (conditions en Tableau 3). On solubilise le HA-MA (300 mg) à 0.4% w/v dans 75 mL d'eau salée ([NaCl]= 0.15 M) à température ambiante. Un volume de 50 mL d'éthanol est ajouté en filet afin d'obtenir un mélange EtOH/eau de 2/3 (v/v). Le dérivé d'acide phénylboronique (ici l'AECPBA) (2 eq molaire par rapport à l'acide hyaluronique), est préalablement solubilisé dans 7 mL d'eau mQ, puis ajouté au mélange réactionnel. Ensuite, le HOBt (3eq/HA), solubilisé dans 1mL de DMSO, est ajouté au mélange réactionnel. Le pH de la réaction est alors diminué à pH=4.75 par ajout de HCl 1M pour une activation maximum des fonctions carboxyliques. L'EDC (2eq/HA), solubilisé dans 1 mL d'eau, est ajouté. La réaction est alors maintenue à pH=4.75 pendant 18 heures à température ambiante sous agitation. Le lendemain, on ajoute du NaCl à une concentration de 0.5 N dans le mélange. On précipite le polymère par ajout de 125 mL d'éthanol (ratio eau/EtOH de 3/7). Le surnageant est prélevé et le précipité est redispersé dans un minimum d'eau (50 mL). La solution est ultra-filtrée pendant 45h puis lyophilisée.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O , 80°C): δ (ppm): 1.78 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{MA})$), 1.85 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{MA})$), 1.91 (s, 3H, $\text{CH}_3(\text{CO})$), 3.8-3.2 (br, 9H, protons HA), 4.35 (d, $J=7.7$ Hz, 1H'), 4.51 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 5.62 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, $\text{CH}_2=$), 6.04 (d, $J=14$ Hz, 1H $\text{CH}_2=$), (4H, dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=23.0$ Hz, $\text{NH-CO-C}_6\text{H}_4\text{-B}(\text{OH})_2$).

Tableau 3 : Détails expérimentaux pour la synthèse du HA-MA-PBA₁.

	$N_{\text{eq}}/\text{HA-MA}$	n (mmol)	Mn (g/mol)	m_{th} (mg)	m_{exp} (mg)
HA-MA	1	0,74	406,44	300	300,8
EDC	2	1,48	191,71	283,73	284,1
HOBt	3	2,22	135,13	300,02	302,7
AECBPA	2	1,48	207,8	307,58	307,6

➤ Synthèse du PAA-SH₁

Dans un ballon, le PAA 15 kDa (35%_{mass}, 5 mmol) est dissous dans 20 mL de tampon PBS (10mM, [NaCl] =140 mM, pH=7). La cystamine (3 eq molaire /PAA) est ajoutée au milieu réactionnel sous agitation. Une solution d'EDC (3 eq /PAA) est préparée séparément dans 5 mL de tampon PBS, et son pH est ajustée à pH =5. Après l'ajout de cette solution d'EDC, le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à pH=5 pendant 24 h. La dispersion blanchâtre obtenue est placée dans une membrane de dialyse (seuil de coupure (MWCO) : 3500 Da) et dialysée avec de l'eau ultrapure pendant 24 h. Après dialyse, le mélange est récupéré, dégazé à l'argon pendant 30 min et son pH est ajusté à 7-8 avec de la soude. A ce mélange, du DTT (5 eq / PAA) est ajouté, conduisant à la prise en masse du polymère.

Le même protocole est utilisé pour la synthèse PAA-SH₂. Pour PAA-SH₃, la purification intermédiaire par dialyse est omise.

➤ Synthèse du PAA-SH₅

Dans un ballon, 2.5 mmol de PAA (15 kDa, 35%_{mass}) est solubilisé dans 30 mL d'eau mQ. L'EDC (3 eq / PAA), préalablement solubilisé dans 10 mL d'eau ultrapure, est ensuite ajouté au goutte à goutte et le mélange réactionnel est maintenu sous agitation afin d'activer les fonctions carboxyliques du PAA. Après diminution du pH à 5, la cystéamine HCl est ajoutée sous atmosphère inerte et la réaction est maintenue sous agitation pendant 3 heures. La solution transparente obtenue est transférée dans un tube de dialyse (membrane cellulose

MWCO 3500 Da), puis dialysée dans un b cher d'eau ultrapure, préalablement dégazée, pH=3, sous N₂, T=5 C.

➤ **Synthèse du HA-SH₁ (Figure 4)**

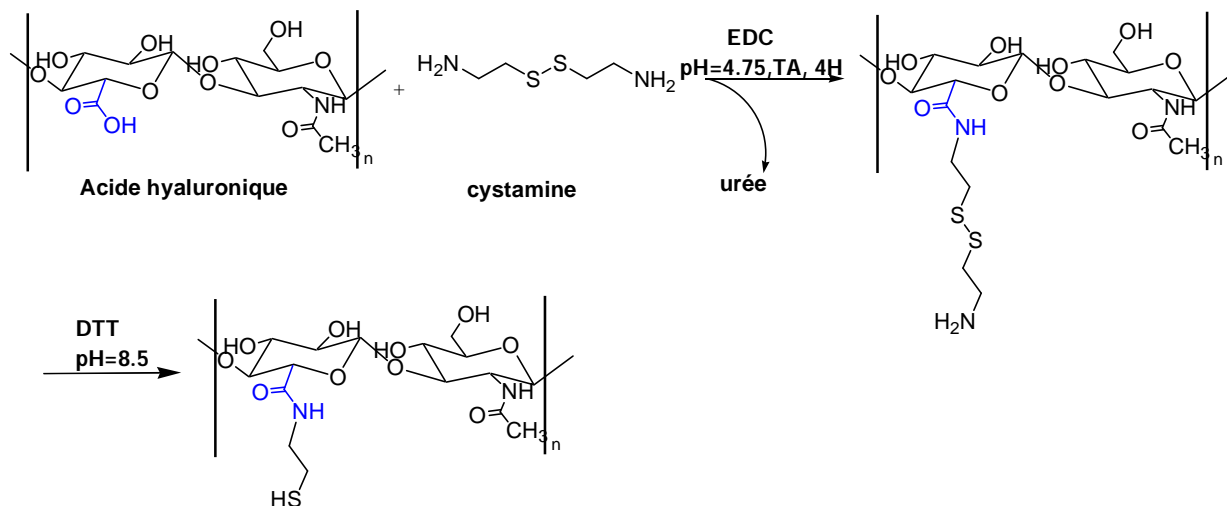


Figure 4 : Schéma réactionnel du HA-SH₁ (cf. chapitre 4, section I.4.).

Dans un ballon, 0.37 mmol de HA 100 kDa est solubilisé dans 10 mL d'eau mQ. La cystamine (2 eq mol /HA), préalablement solubilisée dans 5 mL d'eau ultrapure, est ensuite ajoutée au goutte à goutte et le pH du mélange réactionnel est diminué à pH=4.75. L'EDC sous forme solide est ensuite ajoutée et la réaction est maintenue sous agitation à pH =5 (ajout HCl 0.1 M) pendant 12 heures. En fin de réaction, une solution transparente est obtenue dont le pH s'est élevé à 6.5. Un excès de DTT (13 eq /HA) est ajouté puis le pH est augmenté à 8 par ajout de NaOH 1M. La réaction est maintenue sous agitation à température ambiante pendant 48 h. Le mélange est ensuite lyophilisé.

¹H NMR (400 MHz, D₂O, 80 C) δ (ppm): 2.02 (s, 3H, CH₃(CO)), 2.7 (2H, CH₂(SH)), 3.8-3.3 (br, 9H, protons HA), 4.35 (d, J=7.7 Hz, 1H'), 4.57 (d, J=8.3 Hz, 1H, 1H'). Impureté à 2.9 ppm; pics   1.5 et 4.6 ppm attribuables à l'EDC.

➤ **Synthèse de l'hydrazide 3,3'-dithiobis propano ique (DTP) (Figure 5)**

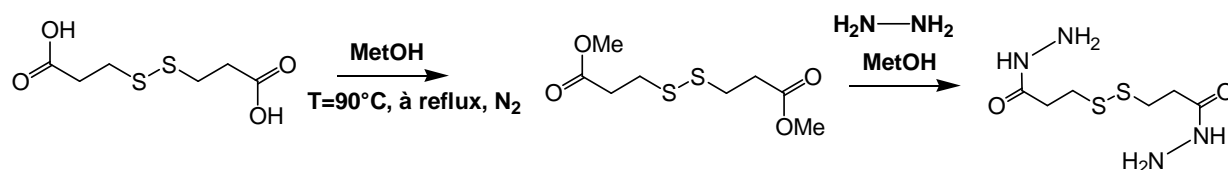


Figure 5 : Schéma réactionnel du DTP (cf. chapitre 4, section I.4.).

Dans un bicol, 5 g d'acide 3,3'-dithiobis propanoïque sont solubilisés dans 50 mL de méthanol contenant 1 à 2 gouttes d' H₂SO₄. Le mélange est porté à reflux, T=90°C sous N₂ pendant 12 h, puis concentré sous pression réduite (jusqu'à 20 mL). Le mélange obtenu est purifié par extraction à l'acétate d'éthyle puis la phase organique est purifiée par 2 x 30 mL d'eau. Après retrait du mélange eau /metoH, la phase organique est concentrée sous pression réduite conduisant à une huile jaune visqueuse, stockée au frigo.

L'acide 3,3'-dithiobis propanoïque diméthyl ester formé est solubilisé dans 15 mL de méthanol, préalablement séché par MgSO₄ et filtré sous fritté de porosité 4. L'ester est ajouté au goutte à goutte à un excès d'hydrazine (10 eq / l'ester), solubilisé dans 10 mL de méthanol. La réaction est maintenue sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Le précipité est filtré sur fritté de porosité 4 puis séché sous vide pendant 24 h (T=20°C-30°C).

¹H NMR (D₂O, 25°C) δ (ppm): 2.64 (t, J=6.9 Hz, 2H, S-CH₂), 2.96 (t, J=6.8 Hz, 2H, CH₂-C(O)).

¹H NMR (DMSO, 25°C) δ (ppm): 2.43 (t, J=7.3 Hz, 2H, S-CH₂), 2.91 (t, J=7.2 Hz, 2H, CH₂-C(O)) 4.21 (br, s, HOD, NH₂), 9,10 (s, 2H, NH).

➤ **Synthèse du HA-DTP**

Dans un bécher de 25 mL, 0.25 mmol de HA 100 kDa est solubilisé dans 10 mL d'eau ultrapure. Le DTP, (1 eq mol /HA), préalablement solubilisé dans 8 mL d'eau est ajouté puis le pH du mélange réactionnel est ajusté à 4.75 par ajout de HCl 1M. L'EDC (2 eq mol /HA) est ajouté sous forme solide conduisant à une élévation du pH. Le pH est maintenu à 4.75 pendant 2 h par ajout d'aliquots d'HCl 1N. Un excès de DTT (6 eq mol /HA) est ensuite ajouté puis le pH du milieu réactionnel est maintenu à 8.5 par ajout de NAOH 1M pendant 1 h. La réaction est laissée sous agitation pendant 12H. Le pH est ensuite diminué à pH=3, puis la solution transparente obtenue est transféré dans un tube de dialyse (MWCO 3500 Da), et dialysé dans le noir, T=5°C dans un bécher d'eau salée, dégazée sous N₂, pH=3. Le bain est changé deux fois en utilisant de l'eau ultrapure dégazée, pH=3. La solution est ensuite lyophilisée et stockée au frigo jusqu'à utilisation.

¹H NMR (D₂O, 80°C) δ (ppm): 2.02 (s, 3H, CH₃(CO)), 2.70 (t, 2H, S-CH₂), 2.86 (t, 2H, CH₂-C(O)), 3.8-3.3 (br, 9H, protons HA), 4.57 (d, J=8.3 Hz, 1H, 1H').

II.2. Synthèse des nanogels

➤ Synthèse des nanogels par photopolymérisation en milieu confiné

Les nanogels de HA-MA ou de HA-MA-PBA ont été préparés par photopolymérisation en miniémulsion inverse. Une procédure typique est décrite ci-dessous.

1°) Formulation de l'émulsion

Du HA-MA (1.5 wt%) est solubilisé en présence de 0.05 wt% de photoamorceur (Irgacure 2959) en milieu aqueux, $[NaCl]=0.15M$ (ratio $[photoamorceur] / [MA]$ of 0.30). La dispersion transparente est ensuite ajoutée à une solution d'octane ou d'hexane, contenant 8 wt % de Span 80. La fraction volumique Φ est de 10%. Le mélange hétérogène est ensuite placé sous agitation magnétique pendant 15 min conduisant à la formation d'une pré-émulsion, qui est ensuite fragmentée par ultrasonication ou par homogénéiseur haute pression (Figure 6).

- Les miniémulsions fragmentées par ultrasonication sont constituées d'hexane et de 2 wt% d'un mélange Span 80 / Tween 80 (ration 3/1). Pour la phase dispersée, les conditions décrites ci-dessus restent valables. La fragmentation de l'émulsion est réalisée par ultra-sons, en utilisant une sonde Branson sonifier 250, opérant avec un output de 9 et un Duty Cycle de 90%. Le cycle de fragmentation des émulsions consiste en un premier passage aux ultra-sons pendant 1 min à température ambiante, puis une mise sous agitation magnétique pendant 5 min dans l'eau froide et à température ambiante respectivement, enfin, un deuxième passage aux ultra-sons pendant 1 min à température ambiante.

- Les miniémulsions préparées par homogénéiseur à haute pression sont constituées d'une phase continue d'octane contenant 8 % Span 80, et d'une phase dispersée identique à celle utilisée dans le cas des ultra-sons. Les émulsions ont été fragmentées en utilisant un dispositif Microfluidizer® M-110S opérant à 400 kPa. Les émulsions ont été homogénéisées après 50 cycles, avec un passage dans un bain d'eau froide (6-9°C) entre chaque cycle.

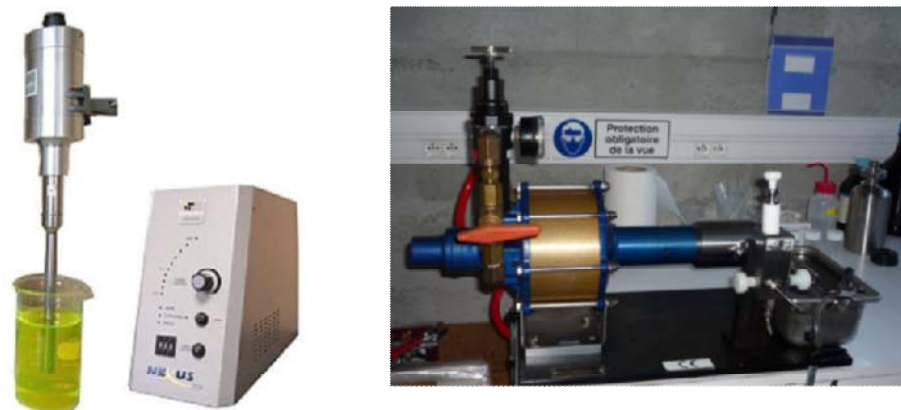


Figure 6 : Dispositif de fragmentation adopté pour la fabrication des miniémulsions.

Notes sur l'ultrasonication et les homogénéiseurs haute pression.

- L'ultrasonication

L'émulsification est assurée par la génération de bulles de cavitation par ultrasons. Les ultrasons sont des ondes sonores dont les fréquences sont comprises entre 16 kHz (limite supérieure de l'audibilité humaine) et 1 MHz. Ils sont en général émis par une surface plane vibrant de façon sinusoïdale autour de sa position d'équilibre, à la fréquence f et avec une amplitude A (de l'ordre du μm). Deux mécanismes permettent d'expliquer l'effet des ultrasons sur l'émulsification. (1) L'onde génère des instabilités à l'interface liquide-liquide. (2) L'implosion des bulles de cavitation près des gouttes de liquide va provoquer des cisaillements extrêmes, à l'origine de la rupture gouttes. On observe alors une réduction progressive du diamètre moyen de l'émulsion. Cette deuxième possibilité est privilégiée.

- Les homogénéiseurs haute pression ou microfluidizer

Les homogénéiseurs haute pression fonctionnent sous très haute pression allant jusqu'à 350 MPa, créant ainsi des taux de cisaillement très élevés. La pré-émulsion est amenée dans une chambre d'interaction munie de canaux de très faible diamètre ($\approx 100 \mu\text{m}$) et subit alors des cisaillements intenses dus aux vitesses d'écoulement très élevées ($\approx 1\,000 \text{ m/s}$) avant de passer dans une zone d'impact jet contre jet.

2°) Photopolymérisation

Un aliquot de 2.3 mL d'émulsion a ensuite été placé dans une cellule en quartz (46mm X 12.5mm X 22.5mm), à une distance de 3.5 mm de la lampe UV, puis exposé sous UV avec une source lumineuse centrée à 365 nm avec une intensité variant de 10 % à 100 % de la puissance maximale (450 mW/cm^2 à 4500 mW/cm^2) (Figure 7). A puissance maximale

d'irradiation, l'échantillon reçoit 10^{19} photons/s. la durée de l'irradiation a été variée de 1 h à 6 h. Après photopolymérisation, les échantillons sont stockés à 4 °C pendant 12 h.

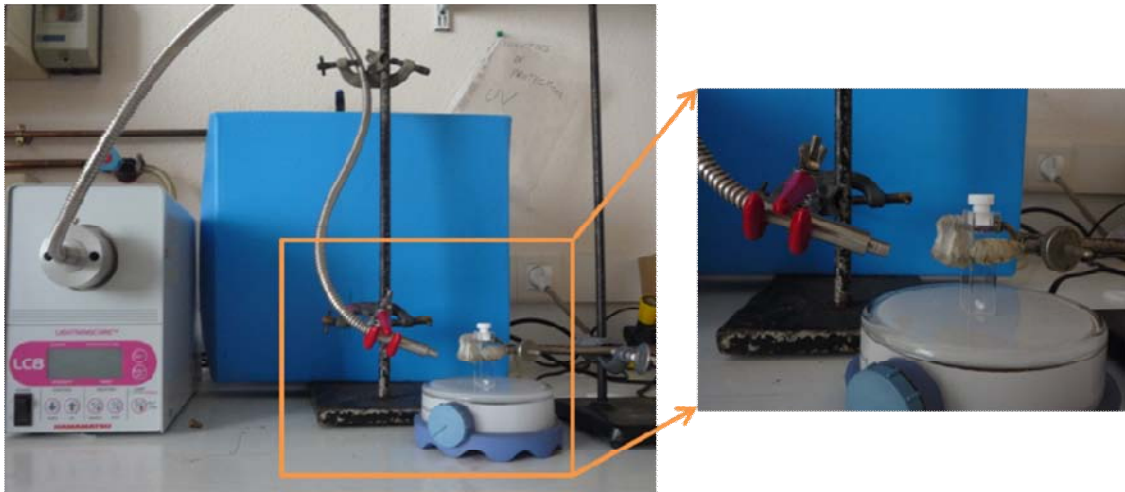


Figure 7 : Dispositif expérimental adopté pour la photopolymérisation.

Notes : Caractéristiques de la lampe

Une lampe UV LC8 de chez Hamamatsu a été utilisée. Cette lampe Mercure-Xénon est équipée d'un miroir elliptique réfléchissant permettant une bonne efficacité d'irradiation (90 % de l'intensité réfléchi). La gamme spectrale de la lampe est reportée en Figure 8 a) (spectre gris). Cette gamme varie de 300 nm à 450 nm (centrée à 365 nm, type 01A). Le filtre utilisé en chapitre IV est le filtre A9616-05, bloquant les longueurs d'onde visibles et infrarouges (spectre vert, Figure 8 a). Les longueurs d'onde transmises oscillent alors entre 300 nm-400 nm, et sont centrées à 365 nm. La puissance de lampe (Figure 8 b) balaye une gamme allant de 1% Puissance maximale (45 mW/cm^2) à la puissance maximale de 4500 mW/cm^2 .

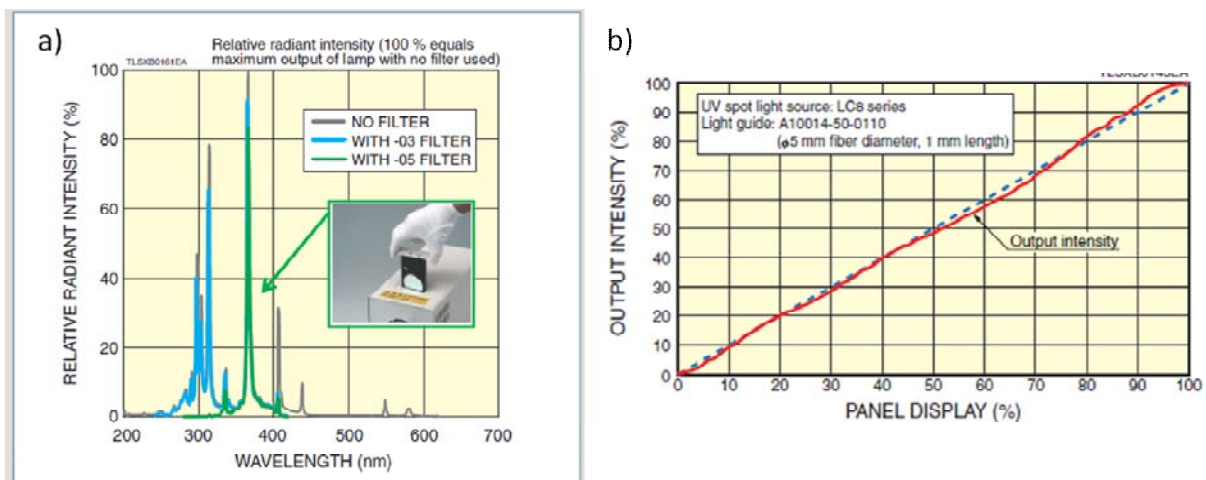


Figure 8 : a) Gamme spectrale de la lampe UV avec ou sans filtre (spectre vert et gris) ; b) gamme de puissances balayées.

3°) Purification

Les nanogels réticulés sont ensuite purifiés par précipitation au THF. Le mélange hétérogène est ensuite centrifugé pendant 45 min à 1h à 16058 g. Le surnageant est ensuite ôté puis du THF est de nouveau ajouté. Ce cycle est répété 4 fois afin d'éliminer complètement l'huile et les tensioactifs. Les nanogels précipités sont ensuite séchés sous vide pendant 12 h, puis redispersés dans 1 mL d'eau ultrapure pendant 24 h (vortex mixer). La suspension finale est stockée à 4°C jusqu'à utilisation.

➤ Nanogels –amorçage redox

La procédure de préparation des nanogels réticulés en miniémulsion par polymérisation radicalaire amorcée par voie redox est similaire à celle utilisée pour la photopolymérisation, à la différence du choix et de l'ajout des amorceurs dans l'émulsion. Le KPS (C= 14 mM) est ajouté à la phase dispersée avant fragmentation de l'émulsion. Le TEMED (C= 4 mM ou 35 mM) est ajouté à la phase continue après fragmentation de l'émulsion (V=3 mL). La polymérisation s'effectue à T=25°C pendant 12 h, puis les nanogels sont purifiés de l'huile et des tensioactifs (cf. point 3°) ci dessus).

➤ Nanogels –amorçage température

Pour la polymérisation en miniémulsion amorcée thermiquement, le V-70 (C= 2 mM) est ajouté à la phase continue après fragmentation. La polymérisation s'effectue à T=37°C pendant 12 h, puis les nanogels sont purifiés de l'huile et les tensioactifs (cf. point 3°) ci dessus).

II.3. Essais d'encapsulation de macromolécules fluorescentes

➤ Encapsulation du FITC-dextran

Du HA-MA, 20 kDa, DM=0.16 (0.07 mmol) est solubilisé à 1.5 wt % dans 1.8 mL d'eau ultrapure. Du FITC-dextran (40 kDa, 5 wt% / HA-MA) est solubilisé séparément dans 500 µL d'eau ultrapure puis ajouté à la solution de HA-MA. Le mélange, de couleur jaune fluorescent, est mis sous agitation magnétique pendant 2 heures. Un volume de 46 µL d'Irgacure 2959 (0.05 wt%) est ensuite ajouté. Ce mélange est placé sous UV, P=10% Pmax (450 mW/cm²) ou à P=100% Pmax (4500 mW/cm²) pendant 20 min. L'évolution de la couleur et de la gélification de la solution est vérifiée toutes les minutes pendant 5 min puis toutes les 5 minutes.

➤ **Irradiation de l'insuline humaine**

L'insuline humaine est solubilisée dans l'eau ultrapure à une concentration de 2 UI/mL. Après homogénéisation, cette solution est irradiée pendant 1 heure sous UV, $P=10\% P_{max}$ (450 mW/cm^2) ; La signature HPLC de cette solution est vérifiée avant et après irradiation, en injectant la solution sur une colonne C8 ULTRASEP.

Phase éluante : mélange Na_2SO_4 , $\text{pH}=2.3$ -acétonitrile-2-méthoxyéthanol

➤ **Préparation d'un macrogel amorcé par KPS/TEMED-encapsulation de FITC-dextran ou de FITC-insuline**

Du HA-MA₂ 100 kDa, $\text{DM}=0.25$ (0.03 mmol) est solubilisé à 1.5 wt% dans le PBS, $\text{pH}=7.4$. Le pilulier est placé à l'étuve $T=30^\circ\text{C}$. Puis 62 μL de KPS ($C=50\text{g/L}$, 185 mM) sont ajoutés, $T=30^\circ\text{C}$. On ajoute 25 μL de TEMED (17% v/v, 1, pH ajusté à 7 avec HCl 1N). Le mélange est laissé au repos, $T=30^\circ\text{C}$. Au final, le ratio molaire KPS/TEMED est de 0.4 ($[\text{KPS}]=14 \text{ mM}$, $[\text{TEMED}]=35 \text{ mM}$).

Les mêmes essais ont été réalisés soit en présence de FITC-dextran 10 kDa, 10 wt% /HA-MA ou de FITC-insuline, 4 wt% /HA-MA.

➤ **Préparation d'un macrogel HA-SH**

Dans un pilulier, 13.5 mg de HA-SH₂ sont solubilisés dans 450 μL de tampon phosphate 2 mM, $\text{pH}=7.4$. La solution est laissée à l'air à température ambiante. La formation du macrogel est observée au bout de 2 heures.

III. Méthodes

¹H-RMN

Les spectres ¹H-RMN et ¹³C-RMN des dérivés HA-MA et HA-MA-PBA et des nanogels résultants ont été enregistrés sur un appareil Bruker Avance II 400 MHz. Les spectres ont été acquis sur un nombre de points $\text{TD} = 65 \text{ K}$ et transformés sur 65 K points avec une EFP de 1.

Les spectres ¹H-RMN ont été réalisés dans le D₂O ($C=6-8 \text{ mg/mL}$) à 80°C avec un nombre de scans de 256 et un délai de 1s. La référence utilisée est alors le pic résiduel de l'eau, étalonné à 4.79 ppm pour une température de 298 K et à 4.21 ppm pour une température de 353 K. Ainsi le pic de l'eau ne recouvre pas celui des protons anomériques.

Les spectres ^{13}C -RMN ont également été réalisés dans le D_2O , mais à $T=25^\circ\text{C}$, avec un nombre de scans de 786 et un délai de 10 s.

Afin de déterminer le taux de conversion MA, les nanogels de HA-MA ou de HA-MA-PBA ont été lyophilisés puis redispersés dans le D_2O à une concentration de 6 g/L.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane utilisé comme référence interne. Les constantes de couplage (J) sont mesurées en Hertz (Hz).

Spectroscopie IR

La spectroscopie Infra Rouge a été utilisée pour évaluer de façon qualitative l'incorporation des différents groupes fonctionnels sur le squelette de l'acide hyaluronique. Tous les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Nicolet iS10 FT-IR équipé d'une sonde ATR (Attenuated Total Reflectance). L'aliquot solide du précurseur est en contact direct avec le cristal ATR, par pression *via* une pointe.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La taille des émulsions et des nanogels et leur distribution respective (indice de polydispersité, PDI) a été mesurée par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS). La technique de DLS permet de mesurer le diamètre hydrodynamique des particules dans un solvant de viscosité connue. Le mouvement brownien des particules est à l'origine de fluctuations temporelles de l'intensité diffusée. Les corrélations entre l'intensité diffusée à un instant t pris pour origine, et celle diffusée à un instant $t+dt$ voisin peuvent être évaluées à l'aide de la fonction d'autocorrélation $C(t)$. Cette fonction est égale à l'unité lorsque t tend vers 0 et est égale à zéro lorsque t tend vers ∞ . Pour une dispersion monodisperse, la fonction d'autocorrélation décroît exponentiellement avec un temps caractéristique τ_c :

$$\tau_c = \frac{1}{D_{\text{diff}}q^2} \quad (\text{Équation 1})$$

où D_{diff} est le coefficient de diffusion translationnel des objets et q le vecteur de diffusion défini par l'expression suivante :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta_{\text{diff}}}{2} \quad (\text{Équation 2})$$

Dans l'expression de q , n est l'indice de réfraction du milieu, λ la longueur d'onde dans le vide du rayonnement incident et θ_{diff} l'angle de diffusion. La relation de Stokes-Einstein permet alors de déduire le rayon hydrodynamique R_h des objets dispersés :

$$D_{iff} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (\text{Équation 3})$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température et η la viscosité de la phase continue ou du solvant.

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

Les distributions en tailles et PDI des émulsions et des nanogels ont été déterminées à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS ou S-90 (Malvern Instruments) doté d'un laser HeNe et d'un système de détection à $\theta_{diff}=173^\circ$ (configuration A, Figure 9) et $\theta_{diff}=90^\circ$ (configuration B, Figure 9) respectivement (Figure 9). Les mesures ont été réalisées à 25°C sur les émulsions concentrées ou diluées (20 μL dans 1 mL d'octane) et les dispersions de nanogels concentrées ou diluées (40 μL en solution aqueuse, avec des concentrations en sel variées).

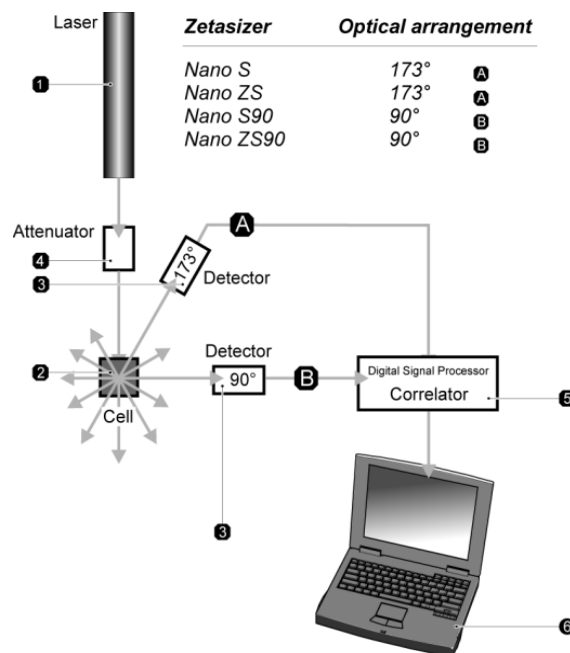


Figure 9 : Schématisation de la technique de DLS.

Microscopie optique, électronique à balayage et électronique à transmission, et à force atomique

(i) Les clichés de microscopie optique ont été obtenus sur un microscope Zeiss utilisant une caméra Axio Vision. Les échantillons ont été déposés sur une lame de verre puis observés à l'objectif x100 avec un liquide d'immersion (dû au mouvement brownien des objets).

(ii) Le principe général de la microscopie électronique consiste à utiliser des électrons à la place des photons.

- Le TEM permet d'observer les nanogels dans leur état sec, par détection des électrons du faisceau primaire qui passent à travers l'échantillon. La structure des nanogels, confinés en émulsion ou à une fois redispersés en milieu aqueux a été visualisée sur une TEM FEI Tecnai 12 biotwin (120 kV). Pour ce faire, un aliquot (20 μ L) de suspension de nanogels ou d'émulsion a été déposé sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone (maillage : 400 Mesh). L'aliquot bien imprégné sur la grille est ensuite absorbé par le dessous avec du papier filtre. La visualisation TEM nécessite l'addition d'un agent de contraste électronique pour marquer les particules. L'acétate d'uranyle acidifié à 0.5% ou l'acide phosphotungstique filtré à 1% a été utilisé, par dépôt d'un aliquot de 10 μ L sur la grille.

- Le MEB est un outil d'analyse très performant pour déterminer la morphologie de matériaux massifs tout comme de particules colloïdales (par détection des électrons secondaires émis par l'échantillon). Les nanogels ont été observés au MEB haute résolution FEG 6700F de chez JEOL. La préparation des échantillons s'est effectuée par dépôt d'un aliquot des nanogels dans le cyclohexane, laissé sécher à l'air pendant 24 h.

(iii) Les nanogels ont également été observés par microscopie à force atomique (AFM) sur un microscope Veeco utilisant un mode Scan assist. Un aliquot (50 μ L) de suspension de nanogels a été déposé par enduction centrifuge sur un substrat en MICA, à une vitesse de 2000 rpm pendant 5 min. Le film ainsi formé a été séché à l'étuve sous vide, T= 30°C pendant 48 h.

Mesures de tension interfaciale : méthode de la goutte pendante

Il existe de nombreuses méthodes de mesure de tensions interfaciales entre deux liquides. L'une d'entre elles consiste à placer une goutte dans un champ de force : c'est le cas de la méthode de la goutte pendante. Une goutte de liquide est formée à l'extrémité d'une aiguille. La forme de cette goutte est déterminée par la compétition entre les forces de pesanteur et les

forces capillaires. Le contour de la goutte en tout point M d'ordonnée y (Figure 10) est décrit par l'équation de Laplace :

$$\gamma_{int} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta\rho g (y - h) + \frac{2\gamma_{int}}{b} \quad (\text{Équation 4})$$

où h et b sont respectivement l'ordonnée et le rayon de courbure au sommet de la goutte, R_1 et R_2 sont les deux rayons de courbure principaux au point considéré, et $\Delta\rho$ est la différence de densité entre les deux phases. Il est donc possible, en déterminant le profil de la goutte à l'équilibre (par numérisation d'image), de calculer la valeur de la tension interfaciale γ_{int} .

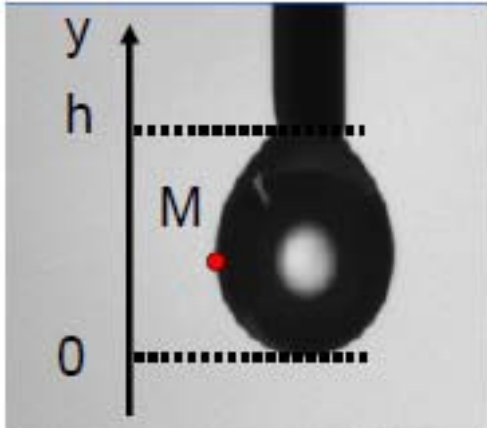


Figure 10 : Profil d'une goutte pendante.

Pour ce faire, une goutte de 12 à 13 μL a été mise en suspension à l'extrémité de l'aiguille sur une gamme de temps variant entre 10 min et 60 min. La tension de surface a été enregistrée via le logiciel Scion capture.

Expériences de rhéologie

Un fluide viscoélastique est un matériau dont le comportement s'apparente à la fois au comportement du solide élastique parfait et à celui du liquide visqueux Newtonien. Les propriétés viscoélastiques d'un échantillon sont représentées par deux grandeurs caractéristiques définies en régime dynamique pour une déformation imposée à une fréquence variable :

- le **module G'** ou le module de stockage (ou de conservation), reflète le caractère "solide" élastique de l'échantillon et caractérise la proportion d'énergie accumulée dans le matériau sous forme élastique.
- le **module G''** ou le module de perte, reflète le caractère "visqueux" de l'échantillon et caractérise l'énergie dissipée dans le matériau par frottements internes.

Ces grandeurs peuvent être déterminées par des sollicitations dynamiques. L'échantillon est soumis à une déformation qui varie de façon sinusoïdale en fonction de la fréquence imposée ($\omega = 2\pi f$). La contrainte résultante est une sinusoïde de même fréquence mais présente un

déphasage par rapport à la contrainte. Les 2 modules déterminants $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ peuvent être ainsi déterminés, $G'(\omega)$ représentant la réponse du matériau en phase avec la déformation appliquée, la grandeur $G''(\omega)$, la réponse différée du matériau.



Figure 11 : Photographie du rhéomètre AR 2000.

Les mesures de G' et G'' ont été réalisées sur un rhéomètre sous contrainte imposée AR2000 30 PSI, de chez TA Instruments (Figure 11). Une géométrie plan-plan de 40 mm de diamètre a été utilisée. Les grandeurs G' et G'' ont été enregistrées à une déformation de 5 % (domaine linéaire), avec un balayage en fréquence de 0.01 à 40 Hz, à $T=25^{\circ}\text{C}$. Le régime linéaire a été déterminé en suivant l'évolution de G' et de G'' en fonction de la déformation à une fréquence donnée. On relève ainsi le pourcentage de déformation pour lequel G' et G'' sont constants.

Les solutions de HA-MA-PBA ont été préparées à 3 wt% en milieu salin ($[\text{NaCl}]=0.15\text{ M}$) ou en tampon phosphate avec sel, $\text{pH}=8.5$.

Dégradabilité : partie expérimentale du dosage

Les cinétiques de dégradation ont été suivies par le dosage soit de la *N*-acétyl-D-glucosamine (dosage de Morgan-Elson¹) soit de la D-glucosamine (dosage au carbazole²). A titre d'exemple, la procédure appliquée pour le dosage au carbazole est détaillée. Les échantillons dégradés sont placés dans un sac de dialyse (Microcon, MWCO 10 kDa, volume interne de 0.5 mL), en présence d'hyaluronidase. Cette solution contient 1 mg de HA ou de nanogels avec 5 U ou 50 U d'hyaluronidase (par mg de polymère) dans 500 μL de PBS. Le milieu extérieur est composé de 4.5 mL de tampon PBS, $\text{pH}=7.4$. Des aliquots de 100 μL sont prélevés dans le milieu extérieur à intervalles de temps réguliers, puis mélangés avec du tétraborate de sodium en milieu acide (H_2SO_4). Ce mélange est ensuite incubé pendant 10 min à $T=100^{\circ}\text{C}$. Le mélange est ensuite refroidi dans l'eau froide, puis le carbazole y est ajouté. Le mélange est porté à température de 100 $^{\circ}\text{C}$ pendant 10 min, formant ainsi une couleur magenta (Figure 12), puis analysé par spectroscopie UV-vis afin de déterminer la quantité

d'acide glucuronique. Le pourcentage de dégradation est suivi par l'évolution de la densité optique à $\lambda = 530$ nm, en utilisant un spectromètre CARY 100 Scan de chez Varian.



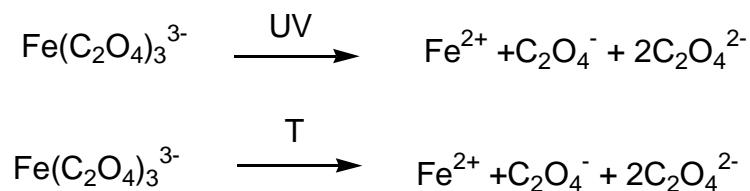
Figure 12 : Photographie des dispersions obtenues lors du test au carbazole.

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La détermination du poids moléculaire du HA (en solution ou après passage en milieu confiné) a été effectuée par SEC, équipée d'une pompe JASCO PU 980 avec dégazeur et amortisseur de pulsation, d'un détecteur de diffusion aux angles multiples (MALS) DAWN HELEOS II, et d'un détecteur réfractométrique OptolabrEX de chez Wyatt Technology. Les solutions ($C=3$ g/L en milieu tampon phosphate 50 mM) sont injectées sur colonnes PLaquagelgel-OH (plusieurs tailles de pores) de chez Polymer Laboratories, en utilisant un injecteur à boucle (volume de 100 μ L) et un débit de pompage de 0.6 mL/min.

Détermination du flux de photons

Le flux de photons reçu par l'émulsion a été déterminé par l'actinomètre ferrioxalate³. Cette méthode a été proposée par Hatchard et Parker en 1956⁴. Sous UV, le ferrioxalate de potassium se décompose suivant les équations suivantes :



La quantité d'ion Fer II formée sous irradiation est suivie par conversion en présence de phénantroline en complexe tris-phénantroline ($\epsilon=11100$ L mol⁻¹ cm⁻¹ à $\lambda=510$ nm), de couleur orange (cf. photo).

Le nombre de photons est lié de façon linéaire à la quantité (en mol) d'ions Fer II par la relation :

$$Nh\nu t = \frac{\text{moles de Fe}^{2+}}{\Phi_{\lambda} \times t \times F} \quad (\text{Équation 5})$$

Où Φ_{λ} est le rendement quantique de la production de l'ion Fer II à la longueur d'onde λ , t est le temps d'irradiation, et F est la fraction moyenne de lumière absorbée par la solution ferrioxalate.

Pour ce faire, 3 mL d'une solution à 0.012 M de ferrioxalate (dans 0.05M de H₂SO₄) sont placés dans une cuve en quartz de 10 mm et irradiés sous UV pendant 20 secondes, tandis qu'un échantillon identique est gardé dans le noir (référence). Puis 500 μ L d'une solution de phénantroline à 0.1 % en milieu tampon (carbonate de sodium) contenant 0.5 M de H₂SO₄, sont ajoutés dans la cuve et l'absorbance à 510 nm est mesurée instantanément⁵.

IV. Calculs théoriques

Calcul de la concentration critique de recouvrement C*

Comme illustré en Figure 13, la concentration critique de recouvrement C* est une grandeur caractéristique des polymères en solution. Elle correspond au passage du régime dilué (pas de recouvrement des pelotes, à gauche), au régime enchevêtré (recouvrement de pelotes, à droite). A C= C* le régime est semi-dilué. La concentration C* peut être calculée par la relation suivante :

$$C^* = \frac{M_w}{\frac{4}{3}\pi R_g^3 N_a} \quad (\text{Équation 6})$$

Où, M_w est la masse molaire en poids du HA, R_g le rayon de giration des pelotes et N_a le nombre d'Avogadro.

Le rayon de giration peut être estimé, en supposant le polymère en bon solvant et en négligeant la contribution des charges, par la relation :

$$R_g = aN^{\frac{3}{5}} \quad (\text{Équation 7})$$

Où, a est la longueur d'une unité monomère (10 Å pour le HA) et N le nombre d'unités monomères.

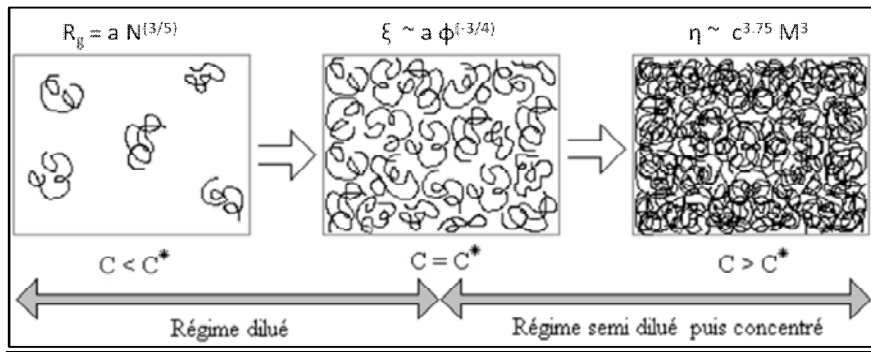


Figure 13 : Illustration des régimes de concentration et lois d'échelles

En utilisant ces deux équations, nous avons calculé le rayon de giration et la concentration critique de recouvrement pour le HA de masse molaire M_w variable, respectivement 20, 100 et 200 kDa, et comparées celles-ci avec celles trouvées par l'équipe de Rinaudo sur le HA 350 kDa⁶. Les données sont reportées en Tableau 4.

Tableau 4 : Grandeurs caractéristiques R_g et C^* des HA en solution.

Mw HA (kDa)	Rg (nm)	C* (g/L)
20	10	8.9
100	28	1.8
200	42	1.1
350	/	0.66

Calcul de la concentration en tensioactifs à l'interface eau-huile

Les propriétés des émulsions aux interfaces se caractérisent en termes de quantité d'interface et de quantité de Span 80 recouvrant cette interface, afin de pouvoir déduire la quantité de Span 80 présente en solution.

- La quantité d'interface par unité de volume est donnée par l'équation :

$$S = N_g 4 \pi R^2 \quad (\text{Équation 8})$$

Avec, N_g le nombre de gouttes par unité de volume et R le rayon de la goutte.

- Le nombre de gouttes N_g , défini comme le ratio entre le volume de la phase dispersée (V_{PD}) et le volume d'une goutte est donné par :

$$N_g = \frac{V_{PD}}{\frac{4}{3} \pi R^2} = \frac{\Phi V}{\frac{4}{3} \pi R^2} \quad (\text{Équation 9})$$

Avec, Φ la fraction volumique de la phase dispersée et V le volume de l'émulsion.

- On obtient la relation entre la quantité de surface S , le volume de l'émulsion V et la fraction volumique Φ :

$$S = \frac{3\phi V}{R} \quad (\text{Équation 10})$$

D'après les caractéristiques obtenues pour la **miniémulsion fragmentée au MF**, on a, pour 1 L d'émulsion, avec une fraction volumique de 10 % et un rayon des gouttes de 65 nm, une quantité de surface **S est 4615 m²**. Sachant que l'aire occupée par tête polaire de Span 80 à l'interface eau-octane est de 35 Å², le nombre de molécules de Span 80 à la surface S est de **132x10²⁰**. Ainsi, on obtient une concentration de Span 80 à l'interface de **0.022 mol/L ou de 9 g/L**. Pour une quantité de 8 wt% de Span 80 par rapport à la masse de l'huile, soit une concentration de 0.131 mol/L ou de 56 g/L, il reste en solution une concentration en Span 80 de **0.109 mol/L ou de 47 g/L**. La CMC du Span 80 dans l'octane étant de 1.8×10^{-5} mol/L ou 0.008 g/L, on est à une concentration ~ 6000 fois supérieure.

Pour information, les mêmes calculs ont été effectués pour **l'émulsion fragmentée aux US**, avec cette fois-ci, un rayon de 160 nm, une aire par tête polaire à l'interface hexane-eau de 46 Å², et une CMC de 1.7×10^{-5} mol/L dans l'hexane. La quantité de surface n'est plus que de **1875 m²**, soit un nombre de molécules à la surface de **40 x 10²⁰**. On obtient une concentration de Span 80 à l'interface de **0.007 mol/L, soit 2.9 g/L**. Dans le cas où une quantité de 8 wt% en Span 80 a été utilisée, il reste en solution, une concentration de **0.116 mol /L ou 50 g/L**, soit un facteur 6500 par rapport à la CMC.

Références:

1. Morgan, W. T. J.; Elson, L. A., A colorimetric method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. *Biochemical Journal* **1934**, 28, 988-995.
2. Bitter, T.; Muir, H. M., A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Analytical Biochemistry* **1962**, 4, (4), 330-&.
3. Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T., *Handbook of photochemistry* **2006**.
4. Hatchard, C. G.; Parker, C. A., A New Sensitive Chemical Actinometer. II. Potassium Ferrioxalate as a Standard Chemical Actinometer. *Proceedings of the Royal Society of London* **1956**, 235, 518-536.
5. Fisher, E., *EPA Newsletters* **1984**, 21, 33-34.
6. Fouissac, E.; Milas, M.; Rinaudo, M., Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules* **1993**, 26, (25), 6945.

