



HAL
open science

Assemblages supramoléculaires à base de hyaluronane modifié chimiquement : synthèse et caractérisation physico-chimique

Aurelia Charlot

► **To cite this version:**

Aurelia Charlot. Assemblages supramoléculaires à base de hyaluronane modifié chimiquement : synthèse et caractérisation physico-chimique. Matériaux. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011174

HAL Id: tel-00011174

<https://theses.hal.science/tel-00011174>

Submitted on 8 Dec 2005

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

(Arrêtés ministériels du 5 Juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Spécialité: SCIENCES DES POLYMERES

présentée par

Aurélia Charlot

ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES A BASE DE HYALURONANE MODIFIE CHIMIQUEMENT : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE

Soutenue publiquement le 25 Novembre 2005

COMPOSITION DU JURY :

Serge Pérez	Président
Monique Mauzac	Rapporteur
Jean-François Tassin	Rapporteur
Thierry Delair	Examineur
Catherine Amiel	Examineur
Rachel Auzély-Velty	Directeur de Thèse
Marguerite Rinaudo	Membre Invité

Thèse préparée au sein du
CENTRE DE RECHERCHES SUR LES MACROMOLÉCULES VÉGÉTALES,
CERMAV-CNRS, GRENOBLE

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

(Arrêtés ministériels du 5 Juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Spécialité: SCIENCES DES POLYMERES

présentée par

Aurélia Charlot

ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES A BASE DE HYALURONANE MODIFIE CHIMIQUEMENT : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE

Soutenue publiquement le 25 Novembre 2005

COMPOSITION DU JURY :

Serge Pérez	Président
Monique Mauzac	Rapporteur
Jean-François Tassin	Rapporteur
Thierry Delair	Examineur
Catherine Amiel	Examineur
Rachel Auzély-Velty	Directeur de Thèse
Marguerite Rinaudo	Membre Invité

Thèse préparée au sein du
CENTRE DE RECHERCHES SUR LES MACROMOLÉCULES VÉGÉTALES,
CERMAV-CNRS, GRENOBLE

A Johann,

A ma mère,

A mon père

Enfin le moment des remerciements... Je vais faire tout mon possible pour n'oublier personne mais soyez indulgents!!

Ces travaux ont été réalisés au CERMAV, laboratoire propre du CNRS associé à l'Université Joseph Fourier. Je remercie son directeur, Serge Pérez, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir conseillée au cours de ces années. Je lui suis également très reconnaissante d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Mes sincères remerciements sont adressés à ma directrice de thèse, Rachel Auzély-Velty qui, pendant quatre années m'a encadrée tout en me faisant confiance et m'a donnée l'opportunité de travailler sur ce sujet très intéressant. Je lui suis très reconnaissante pour sa disponibilité sans faille, ses précieux conseils scientifiques et ses encouragements qui m'ont indiscutablement permis d'évoluer. Merci également pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir...

Je tiens tout particulièrement à remercier Mme Rinaudo, qui a fait preuve d'une très grande disponibilité tant par rapport aux résultats expérimentaux que pour la rédaction du manuscrit. Je tiens à lui exprimer mes plus vifs remerciements pour m'avoir fait partager sa passion pour les polymères et merci également pour son soutien constant tout au long de ces quatre années.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à évaluer mon travail et toutes les remarques qu'ils ont pu faire lors de la soutenance. Je tiens à remercier Monique Mauzac, Professeur à l'Université Paul Sabatier à Toulouse et Jean-François Tassin, Professeur à l'Université du Maine au Mans, qui ont accepté d'être rapporteurs de mon travail. Mes remerciements vont également à Catherine Amiel, Professeur à l'Université Paris VI à Thiais et Thierry Delair, chercheur au CNRS-Biomérieux pour leur participation à ce jury.

Je tiens à remercier Karim Mazeau pour la modélisation moléculaire, qui a d'ailleurs suscité, à notre grande surprise, pas mal de questions pendant la soutenance!!

Un grand merci à Alain Heyraud et à Philippe Colin-Morel pour leur précieuse aide concernant la purification par chromatographie d'exclusion stérique des dérivés de cyclodextrine et pour leur sympathie.

Je remercie également Pierre Guénot du Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest, pour la mesure des spectres de masse haute et basse résolution.

Si ces années se sont si bien passées, c'est également grâce à l'ensemble des personnes du CERMAV, permanents et étudiants, qui ont fait en sorte que chaque jour soit unique.

Un grand merci à Michel, Robert, Annie, Martine (B), Martine (M), Magali, Eric, Frédéric, Jean-Pierre, Claudius, Josiane pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Merci beaucoup à Patrick pour son grand cœur et tout le temps qu'il a consacré à ma chère KA!!!

Je vais maintenant m'adresser aux plus jeunes (nan je rigole !!!). Grâce à vous tous, ces années ont été exceptionnelles et cette journée du 25 novembre inoubliable... Je ne sais pas par où commencer tellement vos prénoms se bousculent dans ma tête.

Je vais donc commencer par les "anciens" qui m'ont, dès mon arrivée au CERMAV, intégrée au sein de la "bande" des thésards. Je citerai Régis (le désagréable ?? Ah non et bien au contraire ! Que de souvenirs...), David (une clope ??? tu as toujours été là...), Sophie (j'ai arrêté le squash depuis!), Fred (quand je suis arrivée dans le bureau, je me demandais où j'étais tombée!!!), Olivier (ou Monsieur chocolat au grand cœur, et non je ne te dois plus de fric, prescription !), Martin (ou le grand blond!), Sylvia et Miguel (la gentillesse Espagnole incarnée), Hélène (un véritable modèle pour

tous et pour moi en particulier), Stéphane (ou Johnny Bobby pour les intimes, que de fous rires...) sans oublier Greg, Youssef, Carole, Peter, Istvan, Fabrizio, Marga.

Un énorme merci à Marie-Pierre (que dire...à part je n'oublierai jamais...), Lémonia (ton sourire fait toujours plaisir à voir!), Pascal (une sacrée personne et une personne sacrée, ne change pas...), Isabelle (entre blondes on s'est toujours comprises, non ?), Lina (toujours avec le rythme dans la peau) sans oublier Emilie, Marie, Sophie, Laurence, Sami, Roberto, Fabien, Samira, Elsa, Gianluca, Charles, Anna, Stéphanie, Nicole, Thomas, Sandra.

Une mention très spéciale est destinée à mes fofous adorés du bureau 110 : Shirin (Shiiiiiiiiin des îles), Caroline (Caroliiiiiiiiin) et Jutta (Juttitou). J'aurais tant de choses à vous dire...Je vous remercie pour tous ces moments partagés...et excusez moi pour tous les surnoms...oh ils étaient pas mal quand même...Un grand merci à Shirin et Caroline pour leur aide, en particulier pour la lecture de ma thèse et la fameuse impression très laborieuse!

Mille merci à mes amies de Vinay : Juju, Marjo, Gégé, Stéph (M), Stéph (B), Lulu, Charlotte et à mes amies de très longue date de Vesoul : Olivia, Elodie et Emily pour tous les excellents moments que nous avons passés ensemble.

Je tiens à remercier infiniment toute ma famille ainsi que mes grands-parents pour leur soutien et leur accompagnement dans la vie.

Et merci de tout mon cœur à Johann d'être à mes côtés. Merci pour son écoute, son soutien et ses encouragements de tous les jours.

A tous merci et à très bientôt !

J'allais oublier, merci à mon ordinateur !!!

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 7

INTRODUCTION..... 11

A. LES HYDROGELS PHYSIQUES..... 12

 I Définition..... 12

 II Les systèmes auto-associatifs..... 13

 III Les systèmes associatifs obtenus par mélange polymère-polymère et polymère-petite molécule
 18

 IV Applications des hydrogels physiques dans le domaine biomédical..... 24

B. CONTEXTE DE L'ETUDE..... 29

 I Présentation générale des cyclodextrines..... 29

 II Systèmes supramoléculaires à base de complexes d'inclusion de cyclodextrine..... 33

 III Hydrogels à base de complexes d'inclusion de cyclodextrine..... 41

 IV Le présent travail..... 44

C. L'ACIDE HYALURONIQUE..... 45

 I Origine et structure..... 45

 II Conformation..... 46

 III Propriétés physico-chimiques..... 48

 IV Applications..... 49

CONCLUSION..... 51

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 52

CHAPITRE II : SYNTHÈSE DES MOLECULES MODELES ET DES ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES A BASE DE HYALURONANE 69

INTRODUCTION..... 72

I SYNTHÈSE DES POLYMERES HOTES ET INVITES DESTINES A LA PREPARATION DES ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES..... 74

 I.1 Approche chimique envisagée..... 74

 I.2 Fonctionnalisation du hyaluronane..... 76

 I.3 Synthèse de dérivés monofonctionnalisés de la β -cyclodextrine..... 83

 I.4 Synthèse des dimères de β -CD et d'adamantane..... 94

 I.5 Greffage des différents composés sur le hyaluronane : obtention des dérivés HA(CD), HA(AD), HA(CD)₂ et HA(AD)₂..... 105

II SYNTHÈSE DE MOLECULES MODELES POUR L'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE..... 117

 II.1 Synthèse du sel de sodium de l'adamantane acétate..... 118

 II.2 Synthèse de l'unité "biantennée" hydrosoluble à base d'adamantane..... 118

CONCLUSION..... 121

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	123
CHAPITRE III : ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES A BASE DE HYALURONANE	129

INTRODUCTION.....	132
I COMPORTEMENT EN MILIEU AQUEUX DES MOLECULES ET DES MACROMOLECULES HOTES ET INVITEES.....	133
I.1 Caractérisation des complexes par titration microcalorimétrique.....	133
I.2 Propriétés en solution des polymères hôtes et invités.....	157
II ETUDE RHEOLOGIQUE DES DIFFERENTS ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES A BASE DE HYALURONANE.....	168
II.1 Formation des assemblages supramoléculaires	168
II.2 Influence de différents paramètres sur les propriétés viscoélastiques des mélanges.....	176
II.3 Etude du comportement en écoulement des mélanges.....	189
CONCLUSION.....	194
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	196

CHAPITRE IV : PARTIE EXPERIMENTALE	203
---	------------

I PRODUITS CHIMIQUES ET SOLVANTS.....	206
II MATERIELS ET METHODES GENERALES.....	206
II.1 Purification	206
II.2 Spectrométrie de masse.....	207
II.3 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	208
II.4 Détermination du taux d'hydratation.....	210
II.5 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	210
II.6 Rhéologie.....	211
II.7 Microtitration calorimétrique isotherme.....	219
I SYNTHESSES.....	223

CONCLUSION GENERALE	247
----------------------------	------------

ANNEXES	255
----------------	------------

LISTE DES ACRONYMES ET DES ABREVIATIONS.....	257
LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES.....	259
LISTE DES FIGURES.....	261
LISTE DES TABLEAUX.....	267
LISTE DES SCHEMAS.....	269

INTRODUCTION GENERALE

Depuis plusieurs années, un intérêt croissant est porté à l'élaboration de nouveaux matériaux dans l'optique de les utiliser dans les domaines biomédical et pharmaceutique. Les domaines principalement visés sont la libération contrôlée de substances biologiquement actives et l'ingénierie tissulaire développée pour la reconstruction des tissus malades.

De nombreux dispositifs reposant sur des matrices polymères ont ainsi été proposés. Ces dispositifs sont généralement des hydrogels érodables préparés à partir de polymères d'origine naturelle ou de polymères synthétiques dégradables. Les hydrogels sont composés principalement d'un fluide dont les molécules sont retenues par de faibles quantités de macromolécules formant un réseau tridimensionnel. Le réseau est créé par l'établissement de nœuds de réticulation qui peuvent être des liaisons covalentes dans le cas des hydrogels chimiques et des interactions secondaires dans le cas des hydrogels physiques. Les liaisons réversibles de faible énergie stabilisant les hydrogels physiques ont une durée de vie caractéristique contrairement aux gels chimiques.

Le domaine des gels physiques connaît une forte expansion, en raison notamment du processus de gélification mis en jeu qui ne requiert aucun agent réticulant toxique ainsi que des potentialités en termes de matériaux stimulables. Ces systèmes sont capables de répondre à l'échelle moléculaire à de très faibles stimuli physiques ou chimiques (force ionique, pH, température, présence de molécules (bio)spécifiques). L'application d'un champ extérieur peut notamment conduire à une modification du nombre et de la durée de vie des jonctions physiques. L'obtention de tels systèmes passe donc par l'introduction sur les chaînes polymères de groupements chimiques judicieusement choisis. Les propriétés mécaniques de ces hydrogels dépendent fortement de leur structure. De ce fait, la méthode utilisée pour la modification chimique s'avère primordiale pour contrôler les interactions et leur stabilité.

Parmi les polymères utilisés pour former des hydrogels physiques, les polysaccharides d'origine naturelle possèdent des propriétés intéressantes et originales valorisables dans le domaine des biomatériaux. Les polysaccharides se distinguent clairement des polymères synthétiques. Ils ont très souvent les caractéristiques particulières de biodégradabilité et de biocompatibilité et sont des polymères semi-rigides contrairement aux polymères synthétiques flexibles.

Dans le cadre de cette thématique, nous nous sommes proposés de développer de nouveaux types de gels physiques à base d'un polysaccharide. Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été effectués au sein de l'équipe "Structures et Fonctions des polysaccharides" du CERMAV et s'inscrivent dans l'une des thématiques du groupe visant à développer des

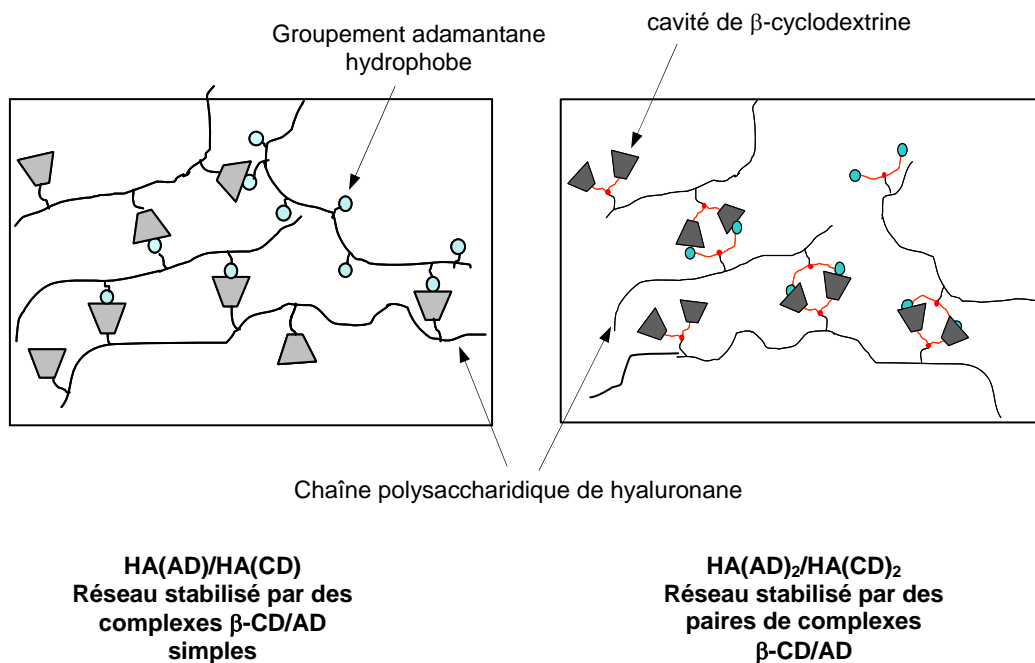
méthodes de modification chimique contrôlées et sélectives des polysaccharides en vue d'obtenir des systèmes épaississants ou gélifiants.

Des travaux antérieurs, effectués au laboratoire, portant sur l'élaboration d'assemblages supramoléculaires à base de chitosane, polysaccharide d'origine naturelle obtenu par *N*-désacétylation de la chitine, ont guidé le présent travail. Des hydrogels physiques ont été obtenus par la formation simultanée de complexes d'inclusion entre des molécules de β -cyclodextrine et des dérivés adamantane greffés sur les chaînes de chitosane.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes proposés d'étendre les travaux à un autre polysaccharide d'origine naturelle, l'acide hyaluronique ou hyaluronane (HA). Ce polysaccharide est bien connu au sein du laboratoire puisque son comportement a fait l'objet de nombreuses études. Nous avons choisi ce polysaccharide en raison de ses propriétés viscoélastiques et biologiques très intéressantes et valorisables dans le domaine des applications biomédicales. De plus, ce polymère présente l'avantage d'être soluble en milieu aqueux neutre. Par ailleurs, modifier chimiquement le hyaluronane de façon contrôlée représente un véritable défi expérimental.

Notre objectif a été de préparer de nouveaux réseaux tridimensionnels à base de HA dans lesquels l'énergie et la taille des jonctions interchaînes sont contrôlées et bien définies. Les systèmes envisagés reposent sur la formation d'interactions multivalentes spécifiques entre des molécules "hôtes" et des molécules "invitées" chacune greffée sur le hyaluronane. La molécule hôte utilisée est la β -cyclodextrine (β -CD) et la molécule invitée hydrophobe est un dérivé d'adamantane dont la taille est parfaitement adaptée à celle de la cavité de la β -cyclodextrine.

Deux assemblages supramoléculaires de structure différente ont été envisagés afin d'évaluer l'influence de l'énergie de la jonction sur la stabilité du réseau. Nous avons donc entrepris de synthétiser différentes macromolécules hôtes et invitées : des chaînes de hyaluronane sur lesquelles des monomères de β -cyclodextrine et d'adamantane sont greffés de façon aléatoire et des chaînes macromoléculaires possédant des dimères de β -cyclodextrine et d'adamantane. Le mélange de ces polymères complémentaires devrait conduire à la formation d'hydrogels physiques résultant de la formation de complexes d'inclusion β -CD/AD simples et de la formation de paires de complexes β -CD/AD, comme le montrent les schémas suivants. Les interactions spécifiques β -CD/AD devraient jouer le rôle de jonctions labiles interchaînes.



L'objectif visé avec ces systèmes est plus particulièrement de relier la structure chimique au comportement en milieu aqueux. Une étude détaillée et la caractérisation de ces assemblages supramoléculaires originaux par calorimétrie et par rhéologie sont présentées.

Nous avons choisi d'articuler ce manuscrit autour de quatre chapitres.

Le premier chapitre, situant le travail dans son contexte bibliographique, s'organise en trois volets. Tout d'abord les principales architectures d'hydrogels physiques sont abordées, ce qui permet ensuite d'appréhender le cas particulier des assemblages supramoléculaires à base de complexes d'inclusion de cyclodextrine et de rappeler les acquis antérieurs. Les objectifs de ce travail pourront donc être plus précisément définis. Le dernier volet est consacré aux principales caractéristiques de l'acide hyaluronique.

Dans un deuxième chapitre, nous présentons la synthèse des macromolécules hôtes et invitées et des molécules modèles en vue d'obtenir les hydrogels physiques. Nous nous employons à développer une chimie contrôlée et sélective du hyaluronane en phase aqueuse afin d'obtenir des systèmes bien définis.

La troisième partie est consacrée à l'étude physico-chimique détaillée des différents assemblages supramoléculaires obtenus. L'analyse thermodynamique des propriétés de complexation réalisée par titration calorimétrique et rhéologie, en particulier par des mesures de viscosité et des mesures en mode dynamique, sont présentées.

La quatrième partie décrit les méthodes expérimentales générales utilisées, en particulier le matériel et les différentes synthèses chimiques effectuées.

CHAPITRE I.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	11
A. LES HYDROGELS PHYSIQUES.....	12
I DEFINITION	12
II LES SYSTEMES AUTO-ASSOCIATIFS	13
II.1 Réticulation par formation de liaisons hydrogène	13
II.2 Réticulation par développement d'interactions hydrophobes.....	15
II.2.1 Copolymères à blocs.....	15
II.2.2 Polymères greffés	17
II.2.2.1 Introduction de chaînons hydrophobes.....	17
II.2.2.2 Introduction de chaînons à LCST	17
III LES SYSTEMES ASSOCIATIFS OBTENUS PAR MELANGE POLYMERE-POLYMERE ET POLYMERE-PETITE MOLECULE.....	18
III.1 Réticulation par formation de liaisons hydrogène.....	19
III.2 Réticulation par interaction spécifique et/ou sélective entre deux entités chimiques de nature différente.....	20
III.2.1 Formation de jonctions spécifiques et/ou sélectives ponctuelles.....	20
III.2.1.1 Interactions impliquant des protéines.....	20
III.2.1.2 Autres types d'interactions ponctuelles.....	22
III.2.2 Formation de zones de jonctions spécifiques et/ou sélectives.....	23
III.2.2.1 Interactions entre des greffons oligomères.....	23
III.2.2.2 Interactions ioniques	24
IV APPLICATIONS DES HYDROGELS PHYSIQUES DANS LE DOMAINE DES BIOMATERIAUX	24
IV.1 Les systèmes à libération contrôlée de principes actifs.....	25
IV.2 L'ingénierie tissulaire.....	26
B. CONTEXTE DE L'ETUDE	29
I PRESENTATION GENERALE DES CYCLODEXTRINES	29
I.1 Origine et structure	29
I.2 Modifications chimiques des cyclodextrines	30
I.3 Synthèse de polymères à base de cyclodextrines.....	30
I.4 Applications des cyclodextrines.....	32
II SYSTEMES SUPRAMOLECULAIRES A BASE DE COMPLEXES D'INCLUSION DE CYCLODEXTRINES.....	33
II.1 Systèmes obtenus par complexation entre dimères.....	33
II.2 Systèmes obtenus par le positionnement supramoléculaire de cyclodextrines	34
II.3 Systèmes obtenus à partir de polymères hôtes constitués de cyclodextrines.....	36
II.4 Systèmes obtenus à partir de mono- et de multicouches de cyclodextrines	38

III HYDROGELS PHYSIQUES A BASE DE COMPLEXES D'INCLUSION DE CYCLODEXTRINE	41
.....	
III.1 Hydrogels physiques obtenus à partir de pseudopolyrotaxanes	41
III.2 Hydrogels physiques obtenus par complexation β-CD/petite molécule	43
IV LE PRESENT TRAVAIL	44
C. L'ACIDE HYALURONIQUE	45
I ORIGINE ET STRUCTURE	45
II CONFORMATION	46
III PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	48
III.1 Principales caractéristiques physico-chimiques	48
III.2 Propriétés rhéologiques	48
IV APPLICATIONS	49
CONCLUSION	51
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	52

Introduction

L'objectif de ce travail est l'obtention de réseaux tridimensionnels physiques en milieu aqueux à base d'acide hyaluronique dont les nœuds de réticulation interchaînes sont constitués de complexes d'inclusion β -cyclodextrine/adamantane de différentes structures. Ces travaux font donc appel aux concepts et aux démarches expérimentales habituellement utilisés pour la conception de structures supramoléculaires qui, dans certaines conditions, conduisent à la formation d'hydrogels physiques.

La première partie de ce chapitre décrit les hydrogels physiques du point de vue de leurs structures, de la nature des interactions et de leurs propriétés. Toutes ces caractéristiques sont étroitement liées aux processus de gélification mis en jeu qui doivent donc être analysés. Deux types d'hydrogels physiques sont considérés : les systèmes auto-associatifs et les hydrogels obtenus par mélange polymère/polymère et polymère/petite molécule.

Les assemblages supramoléculaires stabilisés à base de complexes d'inclusion de cyclodextrines et leurs différentes structures font l'objet d'une seconde partie. Cette partie nous permettra également de définir le contexte de l'étude et les objectifs qui ont guidé ce travail de thèse.

Enfin, la troisième partie porte sur les caractéristiques essentielles du polysaccharide utilisé pour ce travail : l'acide hyaluronique.

A. Les hydrogels physiques

I Définition

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels constitués de polymères dans lesquels sont présents des domaines ou des groupes hydrophiles hydratés dans un environnement aqueux. Le terme de réseau implique la présence de réticulations qui empêchent la dissolution en solution aqueuse. Les hydrogels se divisent en deux grandes familles : les gels chimiques et les gels physiques, aussi désignés sous les termes de gels irréversibles et gels réversibles. La différence entre ces deux familles réside dans la nature des liaisons qui constituent les réticulations : liaisons covalentes dans le premier cas, liaisons secondaires réversibles (hydrogène, van der Waals, ioniques, hydrophobes, complexes...) dans le second [1].

Lorsque l'énergie et la durée de vie des jonctions labiles et réversibles sont suffisamment importantes, les systèmes conduisent à des hydrogels physiques, objets de cette étude.

Le réseau physique formé peut être stabilisé par des jonctions ponctuelles (figure I-1 (A)) réparties de façon aléatoire mais le plus souvent, il possède des zones de jonctions formés par des liaisons coopératives (figure I-1 (B)).

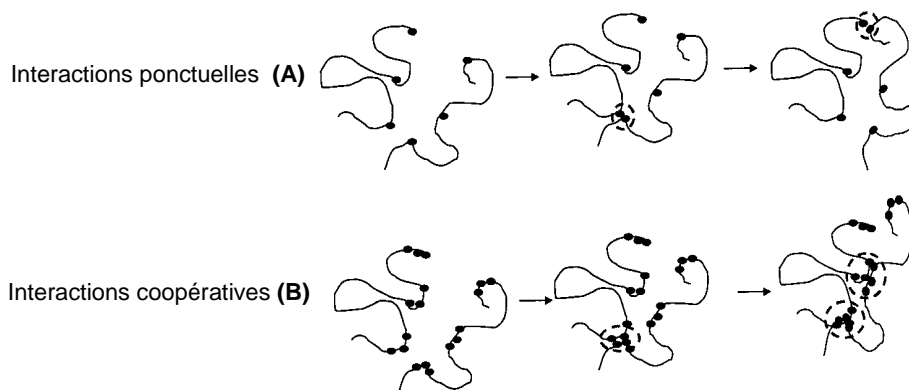


Figure I- 1 : Représentation schématique de réseaux polymère dans lesquels les interactions interchaînes agissent de façon non coopératives (A) et coopératives (B)

II Les systèmes auto-associatifs

Les systèmes auto-associatifs sont constitués de chaînes polymères qui, par développement d'interactions secondaires, s'associent.

II.1 Réticulation par formation de liaisons hydrogène

L'établissement de liaisons hydrogène coopératives est à l'origine de la formation de nombreux réseaux tridimensionnels appartenant au domaine biologique. Les transitions conformationnelles (hélice \leftrightarrow pelote), s'établissant naturellement dans le cas des protéines, des polysaccharides et des acides nucléiques, peuvent conduire à la formation de réseaux physiques [2]. Ces systèmes thermoréversibles sont sous forme "solide" à basse température et sous forme de solution à haute température ; la transition sol-gel est directement associée à la transition pelote-hélice.

L'exemple typique est le gel d'agarose [3]. Ce polysaccharide adopte une conformation en double hélice à basse température et une conformation désordonnée de type pelote à haute température (figure I-2).

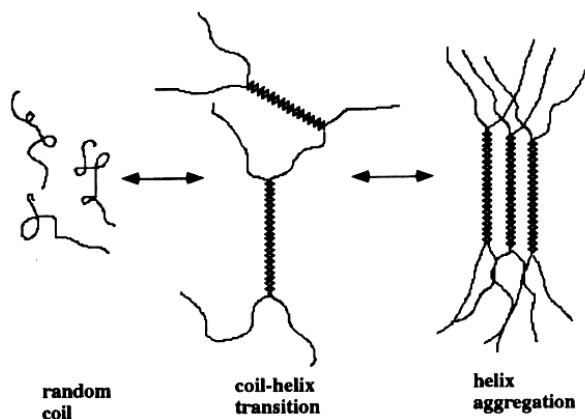


Figure I- 2 : Formation de jonctions physiques due à la transition pelote \rightarrow hélice induite par la température d'après la revue de Bromberg et coll. [2]

Ces hélices s'associent par des liaisons hydrogène coopératives pour former des domaines pseudocristallins conduisant à la formation d'un gel thermosensible. Le même

phénomène est observé dans le cas d'autres polymères naturels comme la gélatine, l'amylopectine, les carraghénanes, le gellane [2,4].

Comme nous le verrons dans une deuxième partie, ces domaines pseudocristallins stabilisés par des liaisons hydrogène se retrouvent dans le cas des hydrogels stabilisés par des complexes d'inclusion à base de cyclodextrines.

Cette gélification thermoréversible liée à une transition conformationnelle est présente également dans certaines protéines naturelles et/ou artificielles. En effet, certaines protéines naturelles présentent des domaines formés par un agrégat de segments hélicoïdaux (dénommé domaines "coiled-coil" dans la littérature anglosaxonne). Un domaine "coiled-coil" est un faisceau constitué de deux (ou plus) hélices α amphiphiles qui, enroulées les unes aux autres, forment des super-hélices (figure I-3) [5].

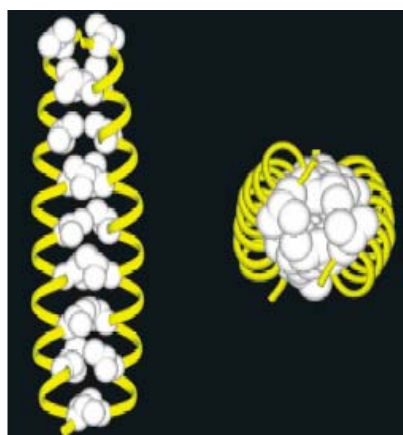


Figure I- 3 : Structure tridimensionnelle vue de côté (à gauche) et de haut (à droite) d'un dimère "coiled-coil" déterminée par modélisation. Les segments jaunes représentent le squelette hélicoïdal et les boules blanches représentent les chaînes secondaires dans le noyau hydrophobe, d'après Yu et coll. [5]

L'association de ces super-hélices par liaisons hydrogène mais aussi par interactions électrostatiques et hydrophobes conduit à la formation de zones de réticulation comme dans le cas des polysaccharides. Des travaux se sont tournés vers l'élaboration de nouvelles protéines artificielles (l'ingénierie des protéines) ayant la particularité de présenter de tels domaines. Ainsi Petka et coll. et Kopecek et coll. ont élaboré des copolymères triblocs constitués d'un bloc central de polyélectrolyte fonctionnalisé aux deux extrémités par des segments de protéines artificielles susceptibles de former des domaines "coiled-coil". Par agrégation des protéines, ces copolymères conduisent à la formation d'hydrogels hybrides réversibles, sensibles au pH et à la température (figure I-4) [6,7].

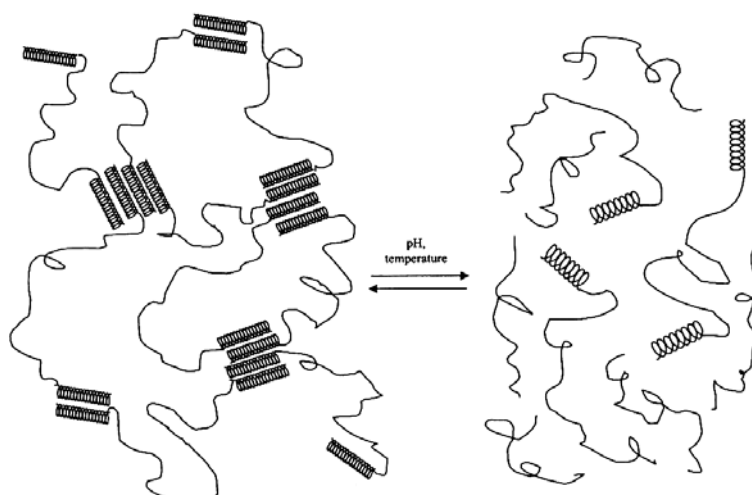


Figure I- 4 : Mécanisme de formation de l'hydrogel. Par une variation de température et de pH, les domaines "coiled-coil" se dissocient, impliquant la dissociation des jonctions physiques d'après Xu et coll. [7]

II.2 Réticulation par développement d'interactions hydrophobes

Les hydrogels stabilisés par des interactions hydrophobes sont formés à partir de polymères amphiphiles. On distingue principalement deux familles de polymères amphiphiles : les copolymères à bloc constitués de blocs hydrophiles et de blocs hydrophobes et les polymères greffés constitués d'une macromolécule hydrosoluble neutre ou chargée comportant des greffons hydrophobes.

II.2.1 Copolymères à blocs

Typiquement, les copolymères amphiphiles diblocs et triblocs forment des micelles ou des phases lamellaires. Des hydrogels physiques peuvent être obtenus à partir de copolymères di- ou triblocs. A basse concentration, les chaînes de copolymère tendent à s'associer pour former des micelles. A haute concentration ces micelles peuvent s'interconnecter par un phénomène d'empilement ou par pontage.

Les polymères téléchéliques ont été beaucoup étudiés en raison de leur développement commercial et de leur structure "modèle". Ils peuvent être considérés comme des copolymères triblocs dans la mesure où ils sont constitués d'un long bloc central hydrophile de poly(oxyde d'éthylène) (POE) et de chaînes alkyle hydrophobes aux deux extrémités. De nombreux auteurs se sont intéressés aux copolymères à rotule uréthane (HEUR = Hydrophobic Ethoxylated URethane) [8] et particulièrement à leur mécanisme d'association. A des concentrations supérieures à la concentration micellaire critique (CMC), les HEUR s'associent pour former des agrégats de type "fleurs". Lorsque la concentration augmente, des pontages s'établissent entre les micelles, aboutissant à la formation d'un réseau tridimensionnel dont les jonctions physiques contribuent à l'élasticité [9].

Les polyacrylamides modifiés hydrophobes (HMPAM) représentent également une catégorie importante de polymères auto-associatifs [10,11]. A partir d'une certaine concentration et pour des blocs hydrophobes dont le nombre et la taille sont suffisamment importants, un phénomène de gélification est observé [12].

De nombreuses études ont porté sur l'élaboration d'hydrogels thermoréversibles en raison de leurs applications dans les domaines pharmaceutique et biomédical. En effet, les propriétés thermogélifiantes de tels systèmes peuvent être avantageusement mises à profit pour le développement de systèmes injectables. Ces applications seront présentées dans la partie IV. Une voie très efficace pour synthétiser des hydrogels thermoassociatifs est l'utilisation de polymères possédant une température critique inférieure de démixtion, ou LCST (Low Critical Solution Temperature). Ces polymères dits à LCST conduisent à une séparation de phase lorsque la température devient supérieure à la LCST. De telles démixtions, induites par l'association des parties hydrophobes, permettent dans certains cas d'obtenir des hydrogels physiques [4]. La force prédominante conduisant au processus de gélification est de nature entropique. La transition sol→gel intervient au chauffage et le phénomène est inverse à celui rapporté généralement pour les solutions de polymères naturels qui gélifient lors de leur refroidissement (agarose, gélatine...), comme il a été expliqué auparavant en raison de l'importance des liaisons hydrogène.

Les copolymères triblocs à LCST les plus étudiés sont les triblocs à base de poly(oxyde d'éthylène) (POE) et de poly(oxyde de propylène) (POP) et ceux à base de POE et d'acide polylactique (PLA) (ou son copolymère avec l'acide glycolique (PLGA)). Le POE constitue les blocs hydrophiles et le POP, le PLA et le PLGA constituent les blocs hydrophobes.

Pour des concentrations très élevées (200 à 300 g/L), les polyéthers POE-POP-POE commercialisés sous le nom de Pluronic[®] (BASF) ou Poloxamers[®] (ICI) conduisent à la formation d'hydrogels thermoréversibles (LCST 32°C-37°C) [13,14]. L'augmentation de la température induit la formation de micelles qui, à haute concentration, s'empilent pour former des hydrogels.

Les copolymères triblocs de type POE-PLA-POE et PLA-POE-PLA (LCST 30°C) [15,16] présentent des diagrammes de phase relativement proches de ceux des Pluronic[®] et présentent l'avantage d'avoir un bloc hydrophobe biodégradable.

II.2.2 Polymères greffés

Il est possible de modifier chimiquement des polymères préexistants de manière à obtenir des dérivés auto-associatifs. Ces derniers sont alors constitués d'un squelette hydrophile sur lequel sont introduits des greffons hydrophobes.

II.2.2.1 Introduction de chaînons hydrophobes

Le squelette hydrophile peut être de nature synthétique ou naturelle comme dans le cas des polysaccharides.

L'introduction de façon sélective de chaînes alkyle, réparties aléatoirement sur des chaînes polysaccharidiques, permet dans certaines conditions de former des gels physiques. Les interactions hydrophobes interchaînes entre les chaînes alkyle pendantes constituent ainsi les noeuds de réticulation réversibles. Les propriétés physico-chimiques de ces gels dépendent principalement du taux d'incorporation et de la longueur des chaînes alkyle. Des systèmes auto-associatifs à base de dérivés alkylés du chitosane et du hyaluronane ont été synthétisés et entièrement caractérisés au sein de notre laboratoire [17-19]. D'autres polysaccharides d'origine naturelle comme le dextrane, l'alginate, les pectines ont été utilisés comme squelette hydrophile [20-22].

Il a également été montré que des chaînes de PLGA [23] greffées sur le chitosane conduisent à la formation d'hydrogels réversibles. Dans le même contexte, l'introduction de chaînons hydrophobes sur l'acide poly(acrylique) (PAA) a permis l'obtention d'hydrogels sensibles au pH [24].

II.2.2.2 Introduction de chaînons à LCST

L'introduction de chaînes à LCST sur un squelette hydrophile a fait l'objet d'un grand nombre d'études. Ce squelette peut être, comme dans le cas des greffons hydrophobes, constitué de polymères synthétiques ou de polysaccharides d'origine naturelle. Cette approche présente plusieurs avantages. En particulier, une faible quantité de chaînes à LCST suffit à l'obtention de l'hydrogel étant donné qu'elles sont greffées sur un polymère.

Il est intéressant de combiner les propriétés physico-chimiques et biologiques des polysaccharides avec celles des chaînes à LCST. Dans ce contexte, le chitosane est le polysaccharide le plus étudié. Ainsi l'introduction sélective de chaînes de *N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm) [25], de POE [26], de copolymères triblocs [27] ou à arrangement aléatoire [28] de la famille des Pluronic[®] sur le chitosane a permis l'obtention d'hydrogels thermoréversibles suscitant un grand intérêt.

Les dérivés de la cellulose (méthyl-, hydroxypropyl-) présentent également une transition sol-gel attribuée au développement d'interactions hydrophobes induit par une augmentation de température [29].

Concernant les polymères synthétiques, Hourdet *et coll.* ont synthétisé des polymères greffés préparés à partir d'un squelette poly(acrylate) de sodium (PANa) portant des greffons à LCST : les PNIPAAm. Ces dérivés de PANa présentent des propriétés de thermogélification [30]. Le greffage de PNIPAAm sur le PAA a également été développé par Hoffman *et coll.* [31].

Etant donné les propriétés intéressantes résultant de l'association du POE avec le PLGA, des travaux ont porté sur la synthèse de copolymères greffés à base de ces polymères. Jeong *et coll.* ont préparé des hydrogels thermoréversibles constitués de chaînes hydrophiles de POE sur lesquelles sont greffés des segments hydrophobes de PLGA [32].

Les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, présentes initialement ou induites par une augmentation de température sont les principales interactions secondaires stabilisant les systèmes auto-associatifs. Ces liaisons de faible énergie agissent, en général, de façon coopérative.

III Les systèmes associatifs obtenus par mélange polymère-polymère et polymère-petite molécule

Des hydrogels physiques peuvent également être obtenus par la formation d'associations entre une macromolécule et un polymère différent ou une petite molécule. Plus généralement, l'établissement de liaisons hydrogène coopératives et d'interactions spécifiques et/ou sélectives ponctuelles ou étendues entraînent la formation de gels physiques.

III.1 Réticulation par formation de liaisons hydrogène

Habituellement deux polymères différents ne sont pas miscibles ; ils sont incompatibles et une séparation de phase est observée. Toutefois dans quelques cas, des interactions spécifiques conduisent à la formation de gels physiques en solution aqueuse.

Un bon exemple de ce type de systèmes est le mélange de xanthane et de galacto- ou glucomannane qui forme des gels thermoréversibles, stabilisés par des ponts hydrogène [33]. Le mélange de ces deux polysaccharides a un caractère synergique puisque les interactions entre les polymères peuvent donner naissance à des gels même à basse concentration. Les interactions entre ces deux polymères et les propriétés mécaniques du gel dépendent de la conformation du xanthane, de la concentration ionique et de la température.

L'établissement de liaisons hydrogène par mélange de deux polymères est mis également en évidence dans le cas des polymères synthétiques. Le PAA et l'acide polyméthacrylique (PMA) forment des complexes avec le POE [1]. Ces complexes sont stabilisés par la formation de liaisons hydrogène mais aussi d'interactions hydrophobes dans le cas du mélange du PMA avec des POE de masse molaire élevée [34]. Les liaisons hydrogène sont formées uniquement lorsque les groupements acide carboxylique sont protonés ce qui explique que ces gels soient sensibles au pH.

Percec et *coll.* ont développé une nouvelle stratégie pour la préparation de réseaux tridimensionnels stabilisés par des liaisons hydrogène [35]. Les hydrogels résultent de la miscibilité entre des petites chaînes de polymères hydrophobes insolubles en milieu aqueux et des longues chaînes hydrosolubles. La miscibilité de ces différents polymères est induite *via* l'établissement de liaisons hydrogène (figure I-5). Lorsque le degré de polymérisation des polymères hydrosolubles est beaucoup plus élevé que celui des polymères insolubles, les gels formés peuvent absorber des quantités d'eau très importantes et possèdent des propriétés mécaniques remarquables.

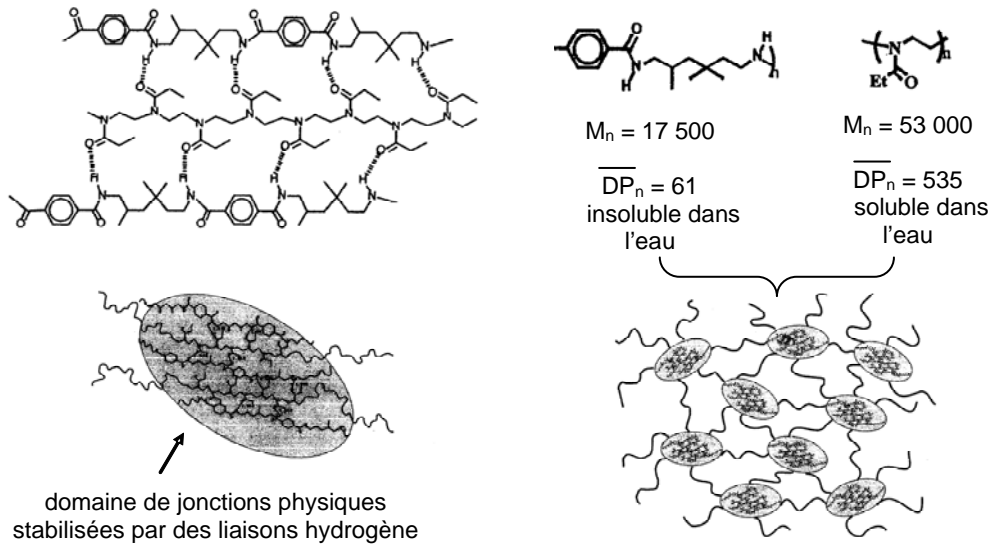


Figure I- 5 : Représentation du mélange d'un polymère hydrosoluble avec un polymère insoluble dans l'eau conduisant à la formation d'un hydrogel stabilisé par des liaisons hydrogène d'après Percec et coll. [35]

III.2 Réticulation par interaction spécifique ou/et sélective entre deux entités chimiques de nature différente

III.2.1 Formation de jonctions spécifiques et/ou sélectives ponctuelles

La formation de jonctions ponctuelles d'énergie suffisamment élevée s'appuie généralement sur le phénomène de reconnaissance moléculaire entre deux molécules de nature différente conduisant à la formation de complexes. Ces complexes sont stabilisés par des interactions non covalentes pouvant être de type électrostatique, hydrophobe, van der Waals ou liaisons hydrogène.

Le terme de reconnaissance moléculaire implique les notions de réversibilité (association-dissociation), de stabilité, de spécificité et de sensibilité à la présence de (bio)molécules spécifiques.

III.2.1.1 Interactions impliquant des protéines

Dans les systèmes biologiques, la reconnaissance moléculaire joue un rôle fondamental, comme par exemple dans le cas des protéines. De nombreux auteurs se sont appuyés sur la formation spontanée de complexes impliquant des protéines comme c'est le cas pour la reconnaissance avidine-biotine, antigène-anticorps ou glucose-concanavaline A, pour synthétiser des hydrogels.

Les systèmes stabilisés par la reconnaissance biotine-avidine sont constitués de microparticules de PLA et de POE décorées en surface par des groupements biotine. Les molécules d'avidine, possédant deux sites de reconnaissance, additionnées aux microparticules fonctionnalisées, jouent le rôle d'agent réticulant [36]. Ces hydrogels ont été utilisés en tant que matrice injectable permettant l'encapsulation de cellules pour l'ingénierie tissulaire.

Miyata et *coll.* se sont appuyés sur la reconnaissance spécifique et réversible antigène-anticorps pour créer des nœuds de réticulation physique. L'hydrogel élaboré est constitué de réseaux de polymères semi-interpénétrés. Dans cette optique, ces auteurs ont modifié chimiquement l'antigène (immunoglobuline (IgG) de lapin) et l'anticorps (IgG de chèvre) en les couplant chacun séparément avec de l'acrylate de *N*-succinimidyle (NSA) pour obtenir des monomères vinyliques. Le monomère vinylique à base d'anticorps est copolymérisé avec l'acrylamide, ce qui permet l'obtention d'un polymère porteur d'anticorps. Indépendamment, le monomère vinylique contenant l'antigène est copolymérisé avec l'acrylamide en présence de *N,N'*-méthylènebisacrylamide (MBAA) [37]. La présence de MBAA permet de créer des jonctions chimiques supplémentaires et permet la formation des réseaux interpénétrés. Les propriétés de ces hydrogels, notamment de gonflement, sont sensibles à l'addition d'antigène libre. En effet, l'ajout d'antigène libre entraîne la dissociation des complexes interchaînes induisant un gonflement important du réseau (figure I-6).

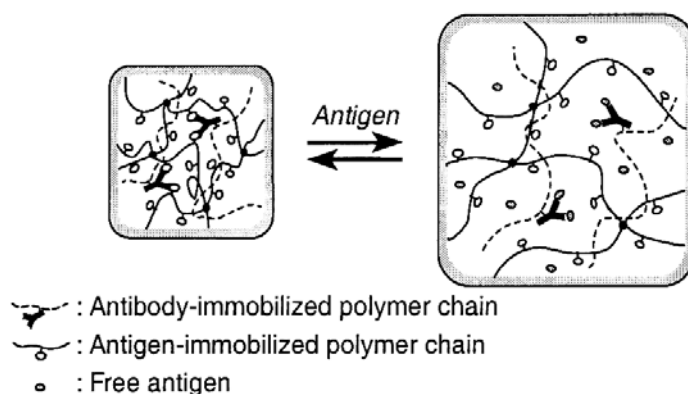


Figure I- 6 : Mécanisme de gonflement suggéré après addition d'antigène libre, d'après Miyata et *coll.* [37]

La préparation de systèmes dont les propriétés physiques sont sensibles à la présence de glucose dans le milieu environnant continue de susciter beaucoup d'intérêts. Différents systèmes comme les hydrogels chimiques, les membranes, les micelles ont été envisagés pour répondre à de tels critères. Obaidat et *coll.* ont préparé des hydrogels physiques stabilisés par l'interaction spécifique entre la concanavoline A (Con A) qui est une lectine tétravalente et le glucose [38,39]. Les gels sont obtenus par simple mélange d'un copolymère contenant du glucose avec la Con A qui joue le rôle d'agent réticulant. Le glucose a été introduit sur un squelette polymère par copolymérisation d'allyl glucose avec des monomères tels que l'acrylamide ou la *N*-vinylpyrrolidone [40]. Ces gels présentent une transition sol-gel réversible en présence de glucose libre (figure I-7) [38]. Ces hydrogels ont été utilisés en tant que systèmes à libération contrôlée et modulée d'insuline en fonction des besoins de l'organisme [41].

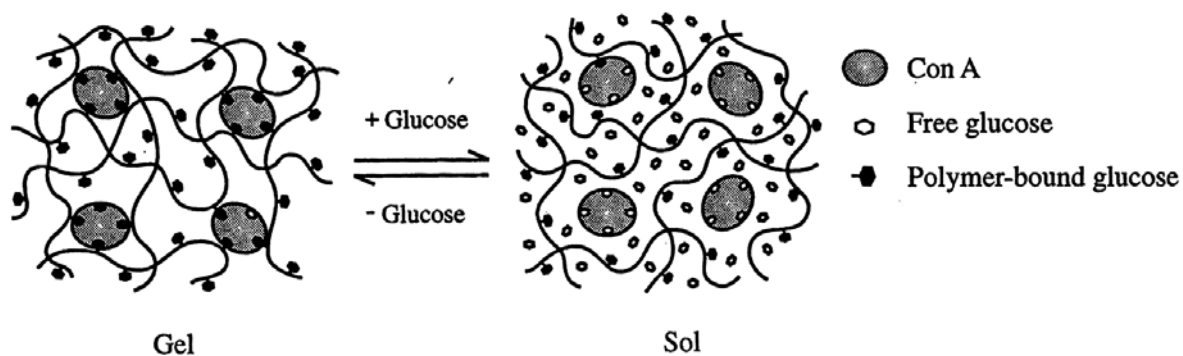


Figure I- 7 : Représentation schématique de la transition sol-gel en présence de glucose libre d'après Lee et *coll.* [39]

III.2.1.2 Autres types d'interactions ponctuelles

Les galactomannanes forment des gels physiques avec les ions borates qui jouent le rôle d'agents réticulants ponctuels. Ces ions sont de bons candidats à la réticulation des polymères polyhydroxylés. Les groupes cis-diol des unités sucre complexent les ions borates. Les deux paires de diol de différentes chaînes macromoléculaires de galactomannane peuvent ainsi être connectées par un ion borate pour former une jonction interchaîne [42,43].

III.2.2 Formation de zones de jonctions spécifiques et/ou sélectives

III.2.2.1 Interactions entre des greffons oligomères

Il a été montré que le mélange de certains polymères de chiralité opposée pouvait conduire à des cristallites racémiques (ou stéréocomplexes). Ikada et *coll.* ont été les premiers à mettre en évidence la formation de stéréocomplexes entre l'acide L-poly lactique et l'acide D-poly lactique [44]. Hennink et *coll.* se sont appuyés sur la formation de ces stéréocomplexes pour élaborer de nouveaux hydrogels physiques [45]. Dans cette optique, ils ont greffé chacun des énantiomères sur une chaîne polysaccharidique : le dextrane. Le mélange des dérivés de dextrane modifiés de chiralité opposée conduit à la formation de gels dont les stéréocomplexes constituent les jonctions physiques interchaînes (figure I-8) [46]. Ils ont montré que la cristallinité (stéréocomplexation) se produit pour des oligomères possédant un degré de polymérisation (DP) supérieur à 7 et que la force des gels obtenus est favorisée par une augmentation du DP et du taux de greffage des unités d'acide lactique sur le dextrane [45].

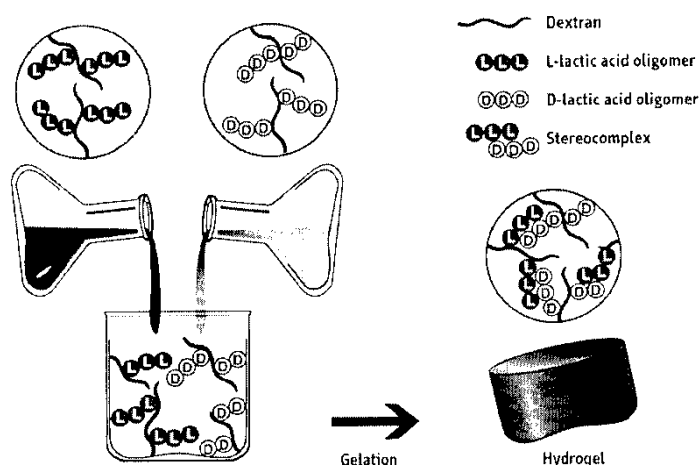


Figure I- 8 : Synthèse d'hydrogels stabilisés par la formation de stéréocomplexes d'après Hennink et *coll.* [46]

Ces hydrogels biodégradables ont trouvé d'intéressantes applications dans le domaine pharmaceutique puisqu'ils ont servi de matrice pour l'encapsulation et la libération de petites protéines (IgG et lysozyme) et également d'échafaudage supramoléculaire formé *in situ* pour une utilisation en ingénierie tissulaire [47,48].

Le concept des stéréocomplexes en tant que nœud de réticulation physique a également été utilisé par Lim et *coll.* qui ont préparé des gels à partir d'un mélange

d'oligomères énantiomères de L et D acide lactique, chacun greffés sur des chaînes de poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (poly(HEMA)) [49].

Par ailleurs, des hydrogels tout à fait originaux ont été obtenus par la reconnaissance entre des brins d'oligodésoxyribonucléotides complémentaires, chacun greffés sur des copolymères synthétiques de poly(*N,N*-diméthylacrylamide-*co-N*-acryloyloxysuccinimide) [50].

III.2.2.2 Interactions ioniques

Les alginates, copolymères constitués de mannuronate et de guluronate de sodium représentent un excellent exemple du mode de gélification obtenue par formation d'interactions ioniques spécifiques coopératives. Lorsqu'ils présentent des blocs de guluronate et en présence de cations divalents (Ca^{2+}), ces polysaccharides d'origine naturelle ont la particularité de gélifier [51]. Le phénomène de gélification repose sur une complexation des cations divalents, par plusieurs groupements carboxylate appartenant à des blocs de guluronate de chaînes macromoléculaires différentes. Le mécanisme d'association du calcium à l'alginate est un phénomène coopératif et les chaînes macromoléculaires se réarrangent spatialement au cours de la gélification. L'arrangement spatial compact des résidus guluronate constitue une sorte de " boîte à œufs " dans laquelle les cations Ca^{2+} sont complexés. Les propriétés mécaniques du gel dépendent directement du nombre de Ca^{2+} coopérativement liés par jonction. L'un des principaux secteurs d'applications est l'industrie alimentaire. Les alginates y sont utilisés pour stabiliser les mousses, viscosifier les crèmes ou encore gélifier certains produits reconstitués. Ils interviennent dans le domaine biomédical et plus particulièrement dans l'ingénierie tissulaire [52]. Ils sont également utilisés dans le domaine biomédical pour la fabrication de pansements hémostatiques et d'empreintes pour les prothèses dentaires.

IV Applications des hydrogels physiques dans le domaine des biomatériaux

Les hydrogels représentent non seulement un objet d'investigation d'un point de vue fondamental mais ils trouvent également de nombreuses applications, en particulier dans les

domaines biomédical et biopharmaceutique [53,54]. Les hydrogels physiques sont de bons candidats pour la libération contrôlée de principes actifs et l'ingénierie tissulaire.

IV.1 Les systèmes à libération contrôlée de principes actifs

De nombreux travaux portent sur l'élaboration de systèmes à libération contrôlée de principes actifs. On entend par libération contrôlée de principes actifs des systèmes capables de libérer les principes actifs de façon contrôlée permettant ainsi une efficacité prolongée et une diminution des doses. La libération modulée en fonction des besoins de l'organisme et, de surcroît, se produisant à des endroits bien spécifiques de l'organisme grâce au ciblage fait également l'objet de nombreuses études [55,56].

Les principes actifs peuvent être incorporés dans l'hydrogel de deux façons. Ils peuvent être physiquement piégés dans l'hydrogel ou liés de façon covalente aux chaînes polymères.

Différents modes de libération peuvent être envisagés. Ils dépendent de la structure de l'hydrogel. La diffusion passive contrôlée est le mode de libération le plus couramment observé. La libération du principe actif peut également être issue de la dégradation chimique ou enzymatique de l'hydrogel soit par clivage des ponts interchaînes et/ou des chaînes polymères soit par coupure des liaisons permettant l'attachement covalent des principes actifs sur la chaîne polymère.

Les hydrogels physiques présentent des propriétés adaptées pour la libération contrôlée de principes actifs. En effet, contrairement aux gels chimiques, la formation de gels physiques ne nécessite pas d'agent de réticulation qui en plus d'être toxique pour l'organisme pourrait affecter l'intégrité de la substance incorporée dans l'hydrogel. De plus, les hydrogels physiques sont généralement des systèmes stimulables c'est-à-dire qu'ils sont sensibles à la variation de paramètres externes tels qu'une variation de température, de pH et à la présence de biomolécules spécifiques comme le glucose, des enzymes ou des antigènes. Ces particularités leur confèrent des propriétés valorisables dans le domaine pharmaceutique [2,57,58]. Les polymères sensibles à la température, en particulier à LCST, sont d'un grand intérêt dans ce domaine de par leur aptitude à gélifier par augmentation de température. Les propriétés thermogélifiantes de tels polymères peuvent être avantageusement mises à profit pour le développement de systèmes injectables. Ces systèmes ont la particularité d'être à l'état liquide à température ambiante et de passer à l'état de gel une fois injectés dans le corps humain ($\sim 37^\circ\text{C}$) [2,4]. Des substances biologiquement actives fragiles telles que les protéines

ou les peptides peuvent par cette stratégie être encapsulées *in situ* dans des conditions douces par solubilisation en milieu aqueux avec le polymère à température ambiante. La gélification du mélange qui se produit après injection dans le corps permet la libération progressive de ces substances actives [15,58,59].

De nombreux travaux ont porté sur la synthèse de systèmes permettant la libération d'insuline réglée en fonction des besoins des sujets atteints de diabète. Plusieurs méthodes ont été envisagées. Des auteurs se sont portés vers l'élaboration d'hydrogels physiques, incorporant de la glucose oxidase, sensibles à la fois au pH et à la présence de glucose [60]. Par ailleurs, comme il a déjà été présenté, Brownlee et *coll.* et Kim et *coll.* se sont intéressés aux hydrogels à base de concanavaline A qui, en présence de glucose libre, libèrent de l'insuline [40,61].

IV.2 L'ingénierie tissulaire

L'utilisation de biomatériaux dans l'ingénierie tissulaire suscite un intérêt croissant [62]. Le terme d'ingénierie tissulaire fait référence à la conception et à la construction de nouveaux tissus possédant des propriétés comparables aux tissus naturels de l'organisme. Ces tissus artificiels sont développés dans le but d'être utilisés en tant que substituts biologiques de certains tissus malades. En effet, les transplantations d'organes sont de plus en plus limitées en raison du nombre trop faible de donneurs potentiels. Les enjeux thérapeutiques et économiques de l'ingénierie tissulaire sont donc considérables [63].

Plus précisément, on entend par ingénierie tissulaire l'utilisation de biomatériaux pour combler des espaces vides et pour reconstruire des tissus mous, comme les vaisseaux sanguins et la peau ou des tissus durs, comme les os (orthopédie/arthrose) [64]. La reconstruction des tissus détériorés implique l'incorporation de cellules vivantes dans la matrice polymère. Le développement et la prolifération des cellules vivantes dans la matrice peuvent avoir lieu directement *in vivo* et peuvent également se faire *in vitro*. Dans ce cas, les cellules sont incorporées dans le biomatériau et sont ensuite cultivées dans un réacteur avant d'être introduites dans le corps humain où elles continuent à proliférer (figure I-9).

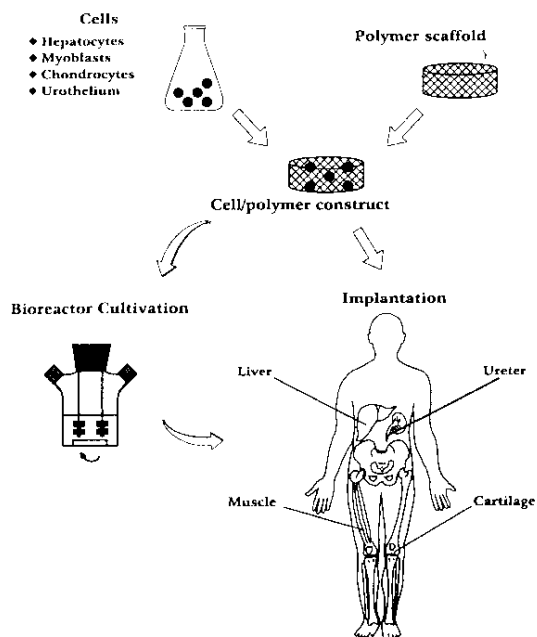


Figure I- 9 : Développement des cellules vivantes dans la matrice soit *in vivo* soit *in vitro* suivi de son introduction dans l'organisme pour la reconstruction des tissus, d'après Marler et coll. [65]

Les hydrogels physiques présentent les propriétés adaptées pour de telles applications. En effet, étant donné que les hydrogels sont capables de fixer d'importantes quantités d'eau ou de fluides biologiques, ils ressemblent, dans une certaine mesure, aux tissus biologiques plus que n'importe quelle autre classe de biomatériaux. De plus, ils présentent généralement les propriétés de biocompatibilité et pour certains, de biodégradabilité et de bioadhésion permettant des interactions spécifiques matrices/cellules. Par ailleurs, les propriétés mécaniques, en particulier rhéologiques, des hydrogels physiques sont adaptées à ce genre d'applications. Les hydrogels physiques possèdent souvent des pores larges ce qui favorise la pénétration et la prolifération des cellules vivantes.

L'introduction dans le corps de l'hydrogel contenant les cellules vivantes peut être envisagée soit par injection avec une seringue soit par implantation (figure I-10) [62].

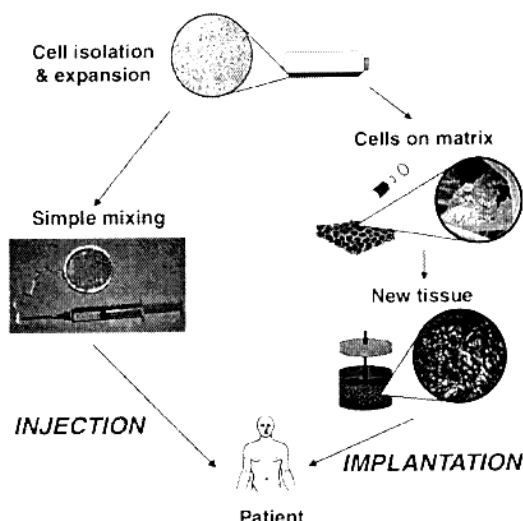


Figure I- 10 : Illustration schématique des deux approches concernant la pratique de l'ingénierie tissulaire, d'après Lee et coll. [62]

Les hydrogels thermoréversibles sont d'un grand intérêt dans ce domaine dans la mesure où ils peuvent être utilisés en tant que systèmes injectables. L'avantage est que la gélification se fait *in situ* et l'introduction ne requiert donc aucune intervention chirurgicale [66].

Les hydrogels physiques utilisés dans l'ingénierie tissulaire peuvent être constitués de polymères naturels ou synthétiques. Les copolymères à base de POE et de POP ont été utilisés en tant que gels injectables pour le traitement et la reconstruction de la peau dans le cas de brûlures superficielles (Ploxamers[®] 407) [67] et pour la reconstruction du cartilage des os [68]. Les gels à base de PAA et de PNIPAAm ont également été utilisés en ingénierie tissulaire [69,70]. Il a été montré que les gels à base d'alginate peuvent être utilisés en tant que matrice permettant la libération de chondrocytes dans le but de reconstruire le cartilage [71].

Dans cette première partie de l'étude bibliographique, nous avons présenté différents types d'interactions secondaires stabilisant les hydrogels physiques. Les jonctions ponctuelles sont principalement obtenues par le phénomène de reconnaissance moléculaire qui implique la formation de complexes. Il existe une autre grande famille de complexes moléculaires : les complexes d'inclusion de type "hôte-invité", à base de molécules de cyclodextrine. Ces complexes peuvent conduire à l'élaboration d'architectures supramoléculaires tout à fait originales.

B. Contexte de l'étude

I Présentation générale des cyclodextrines

I.1 Origine et structure

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques non réducteurs et stables chimiquement obtenus industriellement par la dégradation enzymatique de l'amylose (forme linéaire de l'amidon) à l'aide d'une enzyme, la cyclodextrine glucosyltransférase (CGTase), d'origine bactérienne (*Bacillus macerans*, *Alkalophylic bacillus*,...) [72]. Son origine est très intéressante puisque la CD est obtenue à partir d'une ressource renouvelable. Les trois CDs les plus fréquemment rencontrées sont l' α -, la β - et la γ -CD constituées respectivement de 6, 7 et 8 sous-unités D-glucopyranosiques, reliées par des liaisons glycosidiques $\alpha(1\rightarrow4)$. La dimension du diamètre interne de la CD dépend du type de CD c'est-à-dire du nombre d'unités glucose constituant l'oligosaccharide, la hauteur restant constante (7,9 Å) (figure I-11) [73].

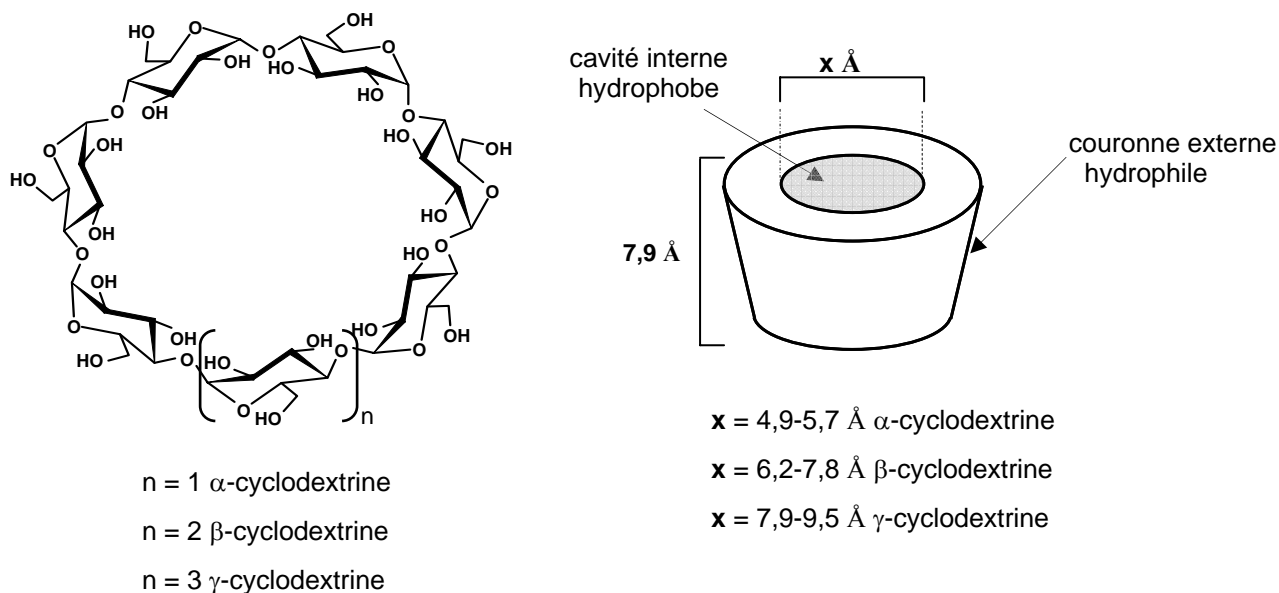


Figure I- 11 : Structure chimique et dimensions des cavités de l' α , de la β et de la γ -cyclodextrine

Les propriétés de solubilité en milieu aqueux dépendent du type de la CD, la β -CD étant la moins soluble (limite de solubilité à température ambiante = 18 g/L).

Ces oligosaccharides ont une structure tridimensionnelle en forme de cylindre tronconique dont la paroi est constituée des unités glucose, en conformation 4C_1 [74,75].

Tous les hydroxyles secondaires (OH-2, OH-3) sont situés sur le côté le plus grand du cône alors que les hydroxyles primaires (OH-6) sont localisés sur le petit côté. La présence de ces groupements hydroxyle sur les deux bords de la couronne confère à la partie extérieure de la CD un caractère hydrophile (surface en contact avec le solvant), alors que l'intérieur de la cavité, tapissée d'atomes d'hydrogène (H-3, H-5, H-6) et de l'oxygène inter-glycosidique est hydrophobe (surface en contact avec la molécule invitée) [76]. La structure des CDs est stabilisée par une véritable ceinture de liaisons hydrogène inter-résidus entre les OH-2 d'une unité glucose et les OH-3 de l'unité voisine. Dans le cas de la β -CD, ces liaisons hydrogène rendent sa structure très rigide et peuvent justifier sa faible solubilité dans l'eau par rapport aux autres types de CDs.

Les CDs sont entourées de molécules d'eau d'hydratation et la cavité apolaire de la CD est occupée par des molécules d'eau, ce qui est énergétiquement défavorable (interactions polaire – apolaire). Ces molécules d'eau peuvent être facilement substituées par une ou plusieurs molécules "invitées" hydrophobes pour former des complexes d'inclusion de type "hôte-invité" [77].

I.2 Modifications chimiques des cyclodextrines

La modification chimique des β -CDs a fait l'objet de nombreux travaux motivés par la possibilité d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, complexation...). Le défi qui est posé aux chimistes est celui de développer des méthodes efficaces pour modifier de manière sélective les nombreuses fonctions hydroxyle portées par les CDs. On distingue les persubstitutions, les monosubstitutions et les polysubstitutions [78].

I.3 Synthèse de polymères à base de cyclodextrines

Deux types de structure macromoléculaire peuvent être distinguées :

- i. les polymères possédant des CDs pendantes le long de la chaîne,

- ii. les polymères ramifiés dont le squelette est constitué de CDs.

La première famille de polymères peut être synthétisée par deux voies différentes.

- Soit par polymérisation de monomères fonctionnalisés par des cyclodextrines.

Des polymères de cyclodextrines ont été synthétisés par polymérisation radicalaire de monomères vinyliques substitués par des CDs (acryloyl-CD, *N*-acrylyl-6-aminocaproyl-CD) [79]. Ces monomères ont été copolymérisés avec d'autres monomères hydrosolubles comme l'acrylamide, l'acide acrylique et la *N*-vinylpyrrolidone.

- Soit par modification chimique d'un polymère préexistant.

Le polymère préexistant peut être un polymère synthétique ou un polysaccharide. Wenz et coll. ont préparé des polyesters porteurs de cavités de β -CD par réaction entre des β -CDs monofonctionnalisés et le poly[(anhydride maléique)-*co*-(*N*-vinyl-2-pyrrolidinone)] [80]. Il a également été montré que les dérivés tosylés de la cyclodextrine (β et γ) peuvent être introduits sur des chaînes linéaires de poly(allylamine), poly(vinylamine) et poly(éthylèneimine) par substitution nucléophile [81-84].

Plusieurs travaux ont porté sur l'élaboration de polysaccharides porteurs de CDs. Ces systèmes sont d'un grand intérêt puisqu'ils combinent à la fois les propriétés spécifiques des cyclodextrines et les propriétés biologiques et physico-chimiques intéressantes des polysaccharides. Le polysaccharide le plus utilisé en tant que polymère pré-formé est le chitosane. En effet, ce polymère possède une fonction amine en position C-2 de l'unité D-glucosamine ce qui permet des modifications chimiques sélectives. La stratégie de synthèse la plus utilisée est la réaction d'amination réductrice. Ainsi, différents dérivés monofonctionnalisés de CD possédant une fonction aldéhyde comme les α - et les β -CDs (2-*O*-(formylméthylées)) [85,86] ou possédant un sucre réducteur ont été couplés au chitosane [87]. En outre, il est possible d'obtenir un chitosane porteur de CDs par substitution nucléophile avec le dérivé tosylé de la CD [88] ou par un couplage de type peptique avec un dérivé carboxyméthylé de la CD [89].

La deuxième grande famille de polymères, dont le squelette est formé de CDs, est obtenue par réticulation de CDs *via* des agents bifonctionnels. L'agent le plus utilisé est l'épichlorohydrine mais d'autres composés époxyde, comme des bisépoxydes (l'éther diglycidique de propyle) ont été utilisés. Ces polycondensations nécessitent des conditions alcalines assez fortes pour permettre la déprotonation des groupements hydroxyle des unités glucose. Généralement, les polymères de CDs obtenus par réticulation avec

l'épichlorohydrine ont des masses molaires faibles mais Renard et *coll.* ont mis au point des conditions de préparation (rapport épichlorohydrine/ β -CD et concentration en NaOH suffisamment élevés) permettant d'obtenir des polymères de haute masse molaire [90]. Par ailleurs, Harada et *coll.* ont reporté la synthèse de polymères tubulaires de CD tout à fait originaux obtenus par traitement à la soude et en présence d'épichlorohydrine de polyrotaxanes [91].

I.4 Applications des cyclodextrines

L'exploitation des capacités d'inclusion, la biocompatibilité et la biodégradabilité des CDs a entraîné un accroissement du nombre et de la diversité des applications scientifiques et industrielles [73,77,92,93].

Dans l'industrie, les domaines d'application des CDs sont par conséquent très nombreux et recouvrent notamment les secteurs de la pharmacie, de la cosmétique, de l'agro-alimentaire, de l'agriculture et du textile [94].

Par formation de complexes d'inclusion, les CDs peuvent permettre la solubilisation de certains principes actifs hydrophobes non solubles naturellement dans l'eau. Un intérêt s'est porté sur la solubilisation d'insuline [95], d'hormones, stéroïdes et sur les médicaments anti-viraux. Par encapsulation, les CDs peuvent réduire ou retarder l'activité de certaines substances en augmentant leur efficacité. L'encapsulation est utilisée également pour stabiliser certaines molécules invitées en les protégeant contre l'auto-oxidation, la photolyse ou l'hydrolyse.

Dans les domaines plus fondamentaux et technologiques, les CDs trouvent aussi de nombreuses applications. En chimie analytique, les CDs ont un potentiel considérable pour la séparation d'énantiomères et de molécules de masses molaires différentes (chromatographie sur couche mince, HPLC, électrophorèse capillaire...) [96,97]. Les CDs sont aussi des catalyseurs chimiques efficaces [98] ; elles sont utilisées dans la conception d'enzymes artificielles [99,100].

II Systèmes supramoléculaires à base de complexes d'inclusion de cyclodextrine

De nombreux travaux ont porté sur l'élaboration d'assemblages supramoléculaires. Ces structures très intéressantes résultent d'interactions non covalentes entre différentes entités moléculaires [101]. Dans cette optique, les complexes de type hôte-invité peuvent être utilisés pour la construction de tels assemblages [92]. La présence d'interactions multivalentes, impliquant la formation simultanée de plusieurs complexes d'inclusion, permet l'obtention d'architectures supramoléculaires. Les interactions stabilisant ces complexes sont des liaisons secondaires telles que les interactions de van der Waals, hydrophobes, dipôle-dipôle ou liaisons hydrogène. Les assemblages supramoléculaires synthétiques peuvent permettre de mieux comprendre le fonctionnement des systèmes biologiques naturels.

Cette partie présente un aperçu de différentes entités moléculaires à base de CD permettant la formation d'interactions multivalentes et donc l'élaboration d'assemblages supramoléculaires.

II.1 Systèmes obtenus par complexation entre dimères

La formation de liaisons covalentes entre deux molécules de CD et entre deux molécules invitées, conduisant à la formation de dimères, offre la possibilité de construire des assemblages supramoléculaires. Reinhoudt et *coll.* et Breslow et *coll.* ont décrit les propriétés de complexation entre des cyclodextrines simplement (figure I-12 (A)) et/ou doublement pontées (figure I-12 (B)) [102,103]. Ces dimères de CD ont la capacité d'inclure deux molécules hydrophobes invitées ou une molécule invitée constituée de deux molécules hydrophobes. La complexation entre deux dimères est caractérisée par une constante d'association remarquablement élevée. Quelques travaux ont porté sur la préparation et l'étude de molécules de CDs liées chacune de façon covalente à une molécule invitée. De tels composés peuvent s'autoassembler de façon intramoléculaire pour donner de simples complexes d'inclusion (figure I-12 (C)) et peuvent également interagir de façon intermoléculaire pour former des dimères ou des polymères de complexes d'inclusion (figure I-12 (D)) [104,105].

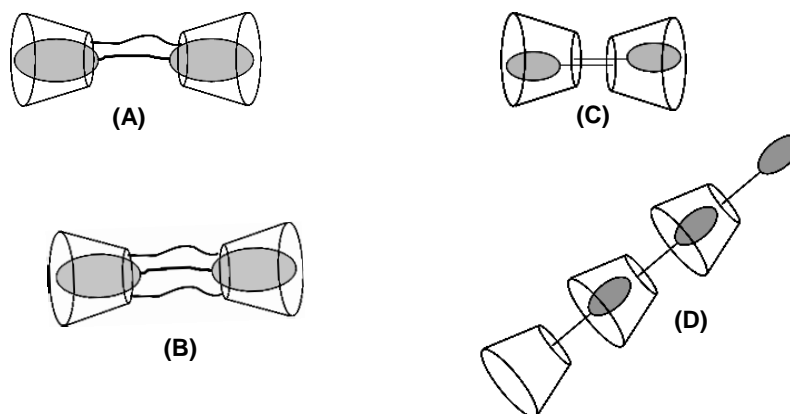


Figure I- 12 : Représentation schématique de la complexation entre dimères de structure chimique différente

II.2 Systèmes obtenus par le positionnement supramoléculaire de cyclodextrines

Depuis les années 1980, la formation de complexes entre les CDs (modifiées ou non) et des polymères a fait l'objet de nombreuses études [106].

En raison de leur structure particulière, les polyrotaxanes et les pseudopolyrotaxanes incorporant des molécules de CD, ont été beaucoup étudiés [107,108]. Ces systèmes sont formés de une ou plusieurs cavités de CD s'enfilant soit directement le long d'un polymère linéaire pour former des structures en collier (figure I-13, (A)), soit sur les chaînes latérales d'un polymère linéaire (figure I-13 (B)). A la différence des pseudopolyrotaxanes, les polymères constituant les polyrotaxanes sont fonctionnalisés en bout de chaîne (chaîne linéaire principale ou chaînes latérales) par des groupements volumineux bloquant ainsi le passage des CDs. Les interactions non covalentes stabilisant ces assemblages supramoléculaires sont les interactions secondaires mises en jeu habituellement dans le cas des complexes d'inclusion de type hôte-invité mais aussi des liaisons hydrogène entre les cavités de CDs voisines.

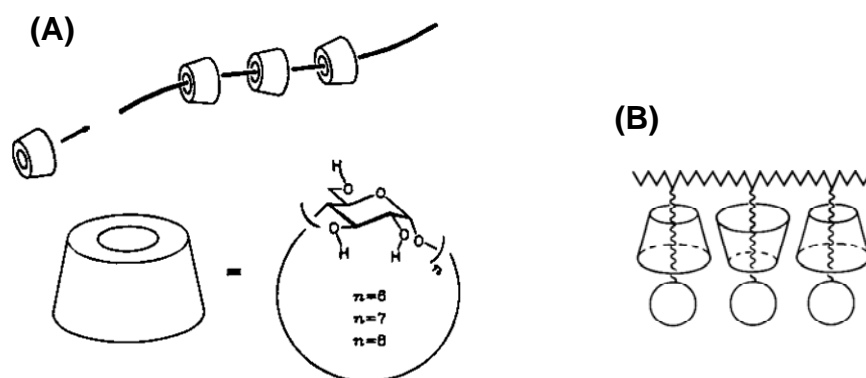


Figure I- 13 : Structure possible d'un polypseudorotaxane (A), d'après Meier et coll. [109] et d'un polyrotaxane (B), d'après Nepogodiev et coll. [108]

De nombreux travaux ont portés principalement sur la préparation de pseudopolyrotaxanes. Le type de cyclodextrines (α , β ou γ) impliquées dans la complexation dépend de la nature, de la structure et de la taille des polymères. Dans la suite de cette partie, nous ne ferons pas la distinction et traiterons des cyclodextrines en général. Les polymères mis en jeu peuvent être neutres ou chargés.

Des pseudopolyrotaxanes sensibles au pH ont été obtenus avec des polyélectrolytes [110,111]. Harada et coll. ont montré que les CDs forment des complexes avec des polymères hydrophiles neutres tels que le POE et l'éther poly(vinyle de méthyle) [112,113] et avec des polymères hydrophobes neutres tels que le polyisobutylène et le POP [114]. Ces polymères sont stables mais difficilement dégradables étant donné la nature de leurs liaisons (éther).

Des travaux ont donc porté sur l'élaboration de complexes d'inclusion supramoléculaires à base de polymères (bio)dégradables comme par exemple la poly(ϵ -caprolactone) (PCL) [115] ou avec d'autres polyester aliphatiques [116]. Dans la même optique, des pseudopolyrotaxanes à base de copolymères à blocs biodégradables ont été développés. Les copolymères à blocs principalement utilisés sont les triblocs POE-POP-POE [117], POP-POE-POP [118], les triblocs à base de POE et de poly((*R*)-3-hydroxybutyrate) [119], de POE et de PLA [120], de PCL et de POE [121] et les diblocs à base de PCL et de PLLA [122]. Pour ces systèmes, en raison de la nature sélective de la complexation, les CDs se positionnent à des endroits spécifiques du copolymère, modifiant ainsi sa morphologie. Les

propriétés des pseudopolyrotaxanes obtenus dans le cas des copolymères à LCST sont sensibles à la température et sont cristallins.

La formation de complexes d'inclusion entre les CDs et les copolymères à bloc s'est avérée un moyen de moduler les propriétés, en particulier de biodégradabilité et de perméabilité, des copolymères en question ; c'est ce qui a été démontré dans le cas du dibloc PCL-PLLA [122,123]. Il a été montré également que la formation de complexes d'inclusion entre les CDs et certains polymères pouvait être une nouvelle approche d'une part, pour obtenir des mélanges homogènes de polymères qui sont normalement non miscibles comme c'est le cas du PLLA et de la PCL [124] et d'autre part, pour séparer des polymères de même nature mais de masses molaires différentes [125].

Les pseudopolyrotaxanes biodégradables ont trouvé d'intéressantes applications dans le domaine biomédical puisqu'ils peuvent servir de matrices supramoléculaires pour transporter et libérer des principes actifs [126,127].

II.3 Systèmes obtenus à partir de polymères hôtes constitués de cyclodextrines

Le greffage covalent de molécules de cyclodextrine sur des chaînes polymères offre une possibilité de créer des assemblages supramoléculaires.

Ainsi, le mélange de polymères de CDs avec des polymères amphiphiles porteurs de molécules invitées hydrophobes permet d'obtenir des assemblages supramoléculaires stabilisés par des complexes d'inclusion constituant les pontages interchaînes. La force des interactions dépend essentiellement du nombre de groupements hydrophobes par chaîne de polymère et de la constante d'association entre les CDs et la molécule invitée considérée. La plupart des auteurs ont utilisé la molécule d'adamantane (AD) comme molécule invitée hydrophobe modèle pour l'élaboration d'assemblages supramoléculaires. Ceci s'explique par le fait qu'en milieu aqueux, la β -CD naturelle et les dérivés de β -CD présentent de fortes affinités avec les dérivés d'AD (constante d'association $K_a = 80\,000\text{ M}^{-1}$) étant donné que la taille (7 Å) et le volume de l'AD sont parfaitement adaptés aux dimensions de la cavité interne de la β -CD [128,129].

Des solutions épaississantes de haute viscosité ont été obtenues par interaction entre des polymères synthétiques de CD et des polymères fonctionnalisés par des résidus 4-*tert*-

butylphényl [130]. Amiel et *coll.* ont synthétisé des assemblages supramoléculaires en mélangeant des polymères ramifiés de CD-épichlorhydrine avec des POE fonctionnalisés aux deux extrémités par des groupements naphtyl et adamantane hydrophobes (figure I-14 (A)) [131]. Ces auteurs ont développé également des systèmes associatifs stabilisés par la complexation entre des polymères ramifiés de CDs et des POE en étoile fonctionnalisés par des molécules d'AD mais aussi des copolymères synthétiques, notamment l'acide poly(malique) conjugué avec des motifs d'AD (figure I-14 (B)) [131-135]. Le mélange de ces polymères complémentaires conduit à la formation de solutions épaississantes stabilisées par des agrégats de dimension finie.

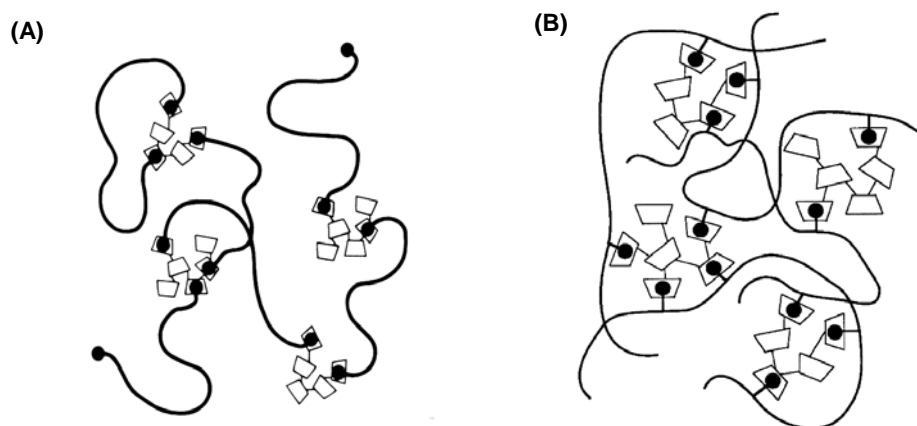


Figure I- 14 : Représentation schématique des interactions entre les polymères de β -CDs et des POE fonctionnalisés aux deux extrémités par des groupements AD (A) et des polymères amphiphiles porteurs de groupements AD (B) d'après, Amiel et *coll.* [132,133]

La formation de réseaux supramoléculaires originaux à partir de polymères tubulaires d' α -CD [91] et de dextrane porteur de chaînes de POE a été rapportée. Les polymères de CD en forme de tube se comportent comme des agents réticulants interchaînes connectant des chaînes de dextrane puisqu'un polymère de CDs forme un complexe avec deux chaînes de POE indépendantes [136] (figure I-15)

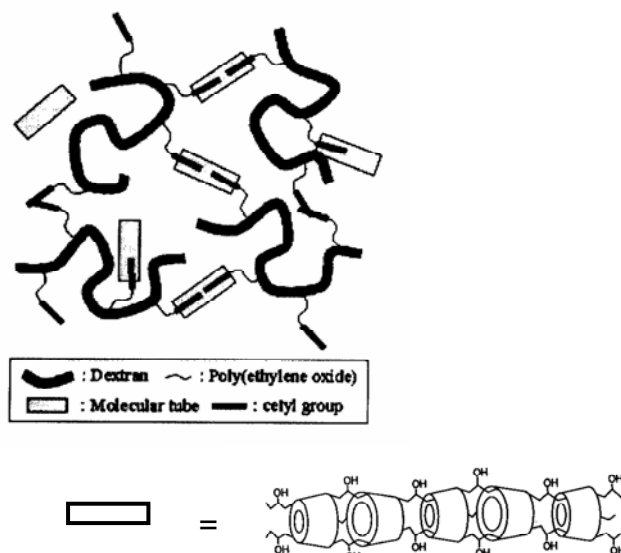


Figure I- 15 : Représentation schématique de l'assemblage supramoléculaire, d'après Ikeda et *coll.* [136]

II.4 Systèmes obtenus à partir de mono- et de multicouches de cyclodextrines

Les mono- et multicouches de CDs constituent une voie intéressante pour la construction d'assemblages supramoléculaires. Elles peuvent être conçues de deux façons, soit par auto-organisation naturelle de CDs modifiées, soit par chimisorption sur des surfaces solides.

Il a été montré que les CDs amphiphiles peuvent former des monocouches à l'interface air-eau et des micelles en milieu aqueux. Elles peuvent être introduites dans des monocouches phospholipidiques telles que les liposomes et peuvent également être dispersées sous forme de nanoparticules. Ravoo et *coll.* ont préparé des vésicules de bicouches de CD se comportant comme des macromolécules hôtes [137]. Ces bicouches sont formées par l'auto-organisation en milieu aqueux de cyclodextrines amphiphiles [138]. Des assemblages supramoléculaires ont pu être élaborés en étudiant la reconnaissance entre ces bicouches de CDs et des polymères hydrophobiquement modifiés : l'acide poly(isobutène-*alt*-maléique) fonctionnalisé par des groupements *p-tert*-butylphényl [137] (figure I-16).

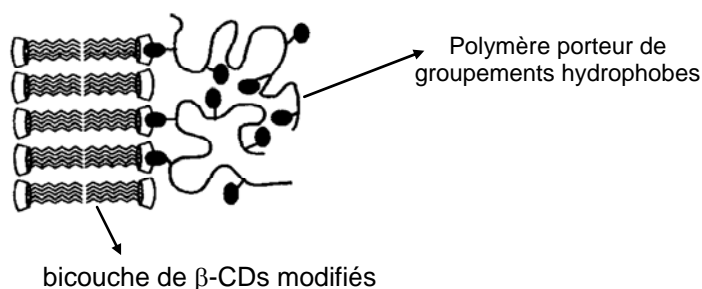


Figure I- 16 : Représentation schématique de l'interaction ente les bicouches de CDs et le polymère porteur de groupements hydrophobes d'après, Ravoo et coll. [137]

Une autre voie permettant l'obtention de monocouches de CDs est l'adsorption de CDs modifiées par des groupements thiol ou sulfure sur des surfaces d'or ou d'argent. Beaucoup de travaux ont porté sur la préparation et la caractérisation (épaisseur du film, orientation des cavités de CD, cinétique d'adsorption...) de ces monocouches auto-assemblées (figure I-17) [139-141].

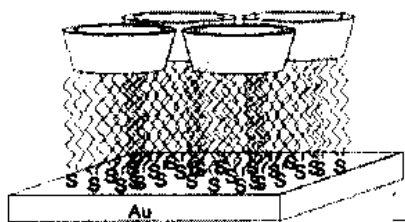


Figure I- 17 : Architectures des monocouches de CDs adsorbées sur une surface d'or d'après de Jong et coll. [142]

Les méthodes utilisées pour caractériser ces monocouches sont l'AFM (Microscopie à Force Atomique), la XPS (Spectroscopie de Photoélectrons par rayons X), les études de perméabilité et les analyses électrochimiques.

Les CDs adsorbées à la surface préservent leur propriété d'inclusion et sont donc susceptibles d'interagir avec des molécules ou macromolécules invitées hydrophobes pour former des assemblages supramoléculaires. Les interactions hôte-invité à la surface sont généralement analysées par SPR (Résonance Plasmonique de Surface) et par EIS (Spectroscopie d'Impédance Electrochimique) [143]. Les interactions s'avèrent plus fortes qu'en milieu aqueux et dans certains cas, elles sont irréversibles et ne peuvent pas être déplacées par l'ajout de molécules invitées compétitives [144].

Ces interactions ont été principalement étudiées par Reinhoudt et *coll.* qui ont élaboré des auto-assemblages stabilisés par la complexation multivalente entre des dimères, des dendrimères et des polymères fonctionnalisés par des groupements hydrophobes d'adamantane et des monocouches de CD adsorbées sur des surfaces d'or (figure I-18) [144,146].

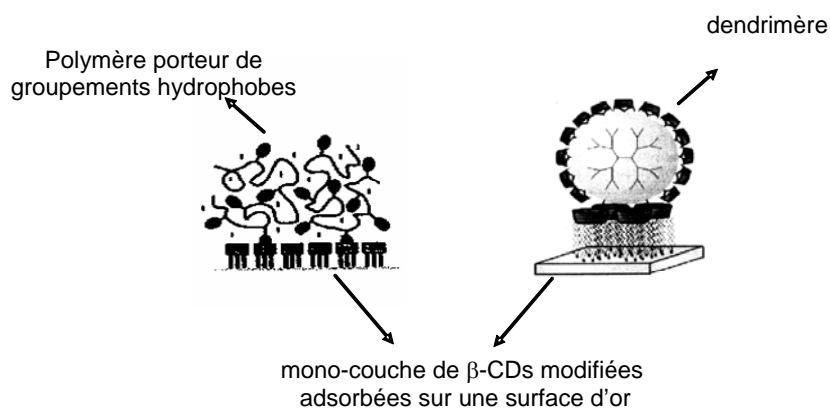


Figure I-18 : Différentes architectures à base de monocouches de β -CDs adsorbées sur un surface d'or impliquant des interactions multivalentes, d'après Reinhoudt et *coll.* [144,145]

Les travaux de Reinhoudt et *coll.*, en particulier la thermodynamique des interactions divalentes, nous ont permis, comme il sera présenté dans le chapitre III, de mieux comprendre certains processus de complexation.

La préparation de structures multicouches a également été rapportée. Millot et *coll.* ont immobilisé des polymères de β -CD sur des surfaces d'or. Pour se faire, ils ont couplés ces polymères fonctionnalisés par des groupements amine avec des surfaces d'or possédant des fonctions acide carboxylique. L'interaction de ces polymères avec des POE fonctionnalisés par des groupements naphthyle et adamantane conduit à la formation de multicouches stables [147].

Ces systèmes peuvent trouver des applications dans les domaines des nanotechnologies. Ils peuvent permettre de lier des molécules comme des protéines ou des oligonucléotides à des surfaces solides et peuvent servir de biocapteurs.

III Hydrogels physiques à base de complexes d'inclusion de cyclodextrine

Comme nous l'avons expliqué dans la première partie de ce chapitre, les hydrogels physiques résultent d'interactions secondaires et réversibles dont la durée de vie est suffisamment importante pour assurer la stabilité du réseau tridimensionnel formé. Comme nous venons de le voir, les complexes d'inclusion à base de cyclodextrine mènent à des assemblages supramoléculaires et peuvent, dans des conditions particulières (structure et nature des entités constituant l'architecture, conditions de température ou de pH...), conduire à la formation d'hydrogels physiques.

III.1 Hydrogels physiques obtenus à partir de pseudopolyrotaxanes

Les structures particulières de pseudopolyrotaxanes conduisent, dans certains cas, à la formation d'hydrogels réversibles. Les tubes de CDs, constituant les pseudopolyrotaxanes, s'associent par liaisons hydrogène créant ainsi des microcristaux qui agissent comme des nœuds de réticulation physique.

Plusieurs structures à base de pseudopolyrotaxanes ont donc été envisagées. Li et *coll.* ont montré que la complexation des α -CD avec des chaînes de POE ou de copolymères triblocs POE-PPO-POE de haute masse molaire conduit à la formation d'hydrogels thermoréversibles [148,149]. Il s'avère que l'obtention d'hydrogels physiques constitués de pseudopolyrotaxanes à base de POE-PPO-POE nécessite des concentrations en copolymère nettement plus faible qu'en l'absence de CD. Pour ce système, la gélification résulte non seulement de l'agrégation des complexes α -CD/POE mais également des interactions hydrophobes entre les segments POP [149]. Les hydrogels à base de POE/ α -CD ont été utilisés en tant que matrice injectable pour encapsuler et libérer des dextrans marqués par des groupements fluorescents d'isothiocyanate [150].

Ces hydrogels nécessitent des temps de gélification relativement longs et des polymères de masse molaire élevée. Afin de pallier ceci, Yui et *coll.* ont élaboré des hydrogels supramoléculaires en greffant des petites chaînes de POE sur différentes chaînes polysaccharidiques : le dextrane, le chitosane et l'acide hyaluronique [151-153]. Comme expliqué auparavant, les "tubes" constitués de complexes d'inclusion se rassemblent pour

conduire à des microdomaines cristallins stabilisés par des ponts hydrogène entre les cavités d' α -CD (figure I-19). Ces systèmes présentent une transition sol-gel thermoréversible basée sur la dissociation des assemblages supramoléculaires à haute température et leurs propriétés mécaniques sont liées à la masse molaire du polysaccharide, en particulier dans le cas de l'acide hyaluronique [153].

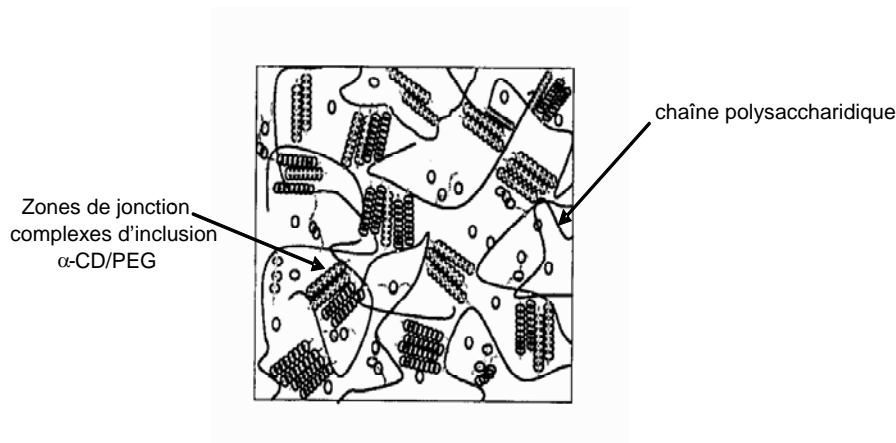


Figure I- 19 : Représentation schématiques des hydrogels obtenus par interactions entre les α -CDs et les polysaccharides porteurs de POE, d'après Huh et coll. [151]

Ce concept a été étendu au POP greffé sur le dextrane, qui forme des complexes avec les β -CDs et conduit à des hydrogels présentant une transition thermoréversible sol-gel [154].

Dans cette optique, Hongliang et coll. ont élaboré des structures d'hydrogel obtenues par l'assemblage d' α -CD avec des copolymères amphiphiles de LA-POE-LA (LA : oligomères de L-acide lactique) fonctionnalisés aux extrémités par des groupements méthacrylate [155]. La gélification est due, d'une part à l'agrégation des pseudopolyrotaxanes et d'autre part, aux interactions hydrophobes entre les groupements méthacrylate terminaux. La photopolymérisation par irradiation UV des groupements méthacrylate permet de créer des nœuds de réticulation chimiques supplémentaires.

La formation de liaisons hydrogène entre les pseudopolyrotaxanes présente des analogies avec le processus de gélification des gels d'agarose ou de gélatine. Ainsi, par modification chimique, ici la fixation du POE ou du POP sur un polysaccharide, il est possible d'obtenir des modes de gélification proches des gélifications s'établissant naturellement. Compte tenu de leur fonctionnalité, à savoir les propriétés intéressantes des CDs et des polymères, ces systèmes peuvent être utilisés dans le domaine biomédical.

III.2 Hydrogels physiques obtenus par complexation β -CD/petite molécule

Choi et *coll.* ont mis au point un réseau à base de poly(ϵ -lysine) porteur de molécules de β -CDs formant des complexes avec des molécules invitées hydrophobes chargées : l'acide 3-(triméthylsilyl)propionique (TPA) conduisant à des hydrogels. Par formation d'interactions simultanées coopératives hydrophobes, liées aux complexes d'inclusion et d'interactions ioniques, dues aux charges opposées de la poly(ϵ -lysine) et du TPA, les chaînes polymères sont connectées [156,157]. Choi et *coll.* ont montré que ces hydrogels sont sensibles au pH et à la température (figure I-20). Ces systèmes pourraient ainsi permettre l'encapsulation de principes actifs ioniques.

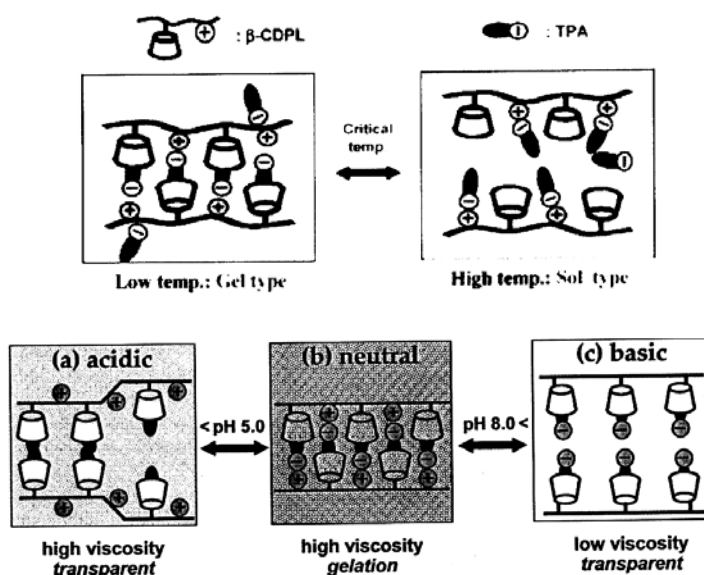


Figure I- 20 : Modulation des propriétés physiques des hydrogels à base de poly(ϵ -lysine) et de TPA par variation de la température et/ou du pH d'après Choi et *coll.* [156,157]

Au sein du laboratoire, de nouvelles architectures supramoléculaires stabilisées par des complexes d'inclusion entre des β -CDs et des groupements adamantane ont été synthétisées et entièrement caractérisées. Auzély-Velty et *coll.* ont étudié les interactions entre des molécules de β -CDs greffées aléatoirement sur un polysaccharide d'origine naturelle, le chitosane et différents polymères fonctionnalisés par des groupements adamantane [87]. Deux assemblages supramoléculaires de structure différente ont été envisagés. Le premier assemblage synthétisé résulte de la complexation entre le chitosane porteur de molécules de

β -CD et des POE, de masses molaires différentes, fonctionnalisés aux deux extrémités par des molécules d'adamantane. Le second assemblage est stabilisé par la formation d'interactions spécifiques entre la β -CD et l'AD, chacun greffé sur le chitosane [87,158,159]. La structure de la macromolécule invitée joue un rôle important sur les propriétés viscoélastiques des assemblages obtenus. En effet, les assemblages issus de la complexation avec les POE fonctionnalisés en bout de chaîne par deux motifs d'AD donnent des solutions de haute viscosité alors que les systèmes à base de chitosane porteur de β -CDs et d'AD ont un comportement de type gel. Dans ce dernier cas, les jonctions interchaînes (complexes d'inclusion) ont une taille bien définie et une énergie suffisamment importante pour conduire à la formation d'hydrogels physiques. Contrairement à la plupart des gels physiques, qui sont stabilisés par des zones de jonctions, ces réseaux ont la particularité d'être stabilisés par des jonctions ponctuelles. Une étude détaillée des propriétés rhéologiques de ces hydrogels a été effectuée [159]. L'influence de la concentration en polymère, de la force ionique, de la température et de l'addition de molécules hôtes compétitives sur les propriétés viscoélastiques des systèmes obtenus a été étudiée. Il s'avère que les réseaux présentent un comportement original.

L'utilisation d'un polysaccharide présente de nombreux intérêts. Les polysaccharides, en général, présentent des propriétés intéressantes et originales qui les distinguent clairement des polymères synthétiques (semi-rigidité, biodégradabilité, biocompatibilité). Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, l'utilisation d'un polysaccharide semble propice à la formation d'hydrogels, ce qui peut tenir à la présence naturelle d'interactions interchaînes hydrogène ou hydrophobes entre les sucres, ainsi qu'à la nature semi-rigide des polysaccharides en général.

IV Le présent travail

Nous nous sommes proposés d'étendre les travaux décrits précédemment de synthèse d'assemblages supramoléculaires résultant de l'interaction spécifique β -CD/AD, à un autre polysaccharide, l'acide hyaluronique (HA), dont l'origine, la structure et les propriétés physico-chimiques et biologiques sont différentes de celles du chitosane.

Cette étude nous permettra de vérifier si les propriétés rhéologiques particulières, observées avec le chitosane, sont conservées avec l'acide hyaluronique, et d'évaluer ainsi le rôle de la chaîne polysaccharidique.

Deux assemblages supramoléculaires de structures différentes ont été envisagés ; moduler la structure chimique des molécules hôtes et invitées greffées sur le HA, constituant les pontages interchaînes, peut permettre d'évaluer l'influence de l'énergie des jonctions sur la stabilité du réseau. Nous nous sommes fixés comme objectif la synthèse de polymères hôtes et invitées porteur de monomères et de dimères de β -CD et d'AD, respectivement. Le mélange de ces polysaccharides modifiés conduit à la formation d'assemblages supramoléculaires stabilisés par des complexes d'inclusion β -CD/AD simples d'une part, et par des paires de complexes β -CD/AD d'autre part.

Par ailleurs, l'utilisation du HA présente de nombreux avantages. Ses propriétés physico-chimiques et biologiques, détaillées dans la suite de ce chapitre, sont très intéressantes. Le HA peut être préféré au chitosane en raison de sa solubilité dans l'eau à pH neutre. Toutefois, la modification chimique de ce polysaccharide est loin d'être triviale et nécessite donc le développement d'une chimie contrôlée et sélective conduisant à des systèmes parfaitement définis. La synthèse d'un HA porteur de cavités de β -CD a déjà été décrite [160,161]. Cependant, le couplage repose sur la réaction de Mitsunobu réalisée dans des conditions hétérogènes. De plus, cette réaction ne permet pas de connaître avec précision le nombre exact et la position des molécules de CD greffées sur le polymère. Le couplage que nous avons envisagé présente l'avantage d'être contrôlé, sélectif et effectué dans l'eau, bon solvant du polymère.

Avant d'aborder les résultats expérimentaux, il est essentiel de présenter les principales caractéristiques de l'acide hyaluronique.

C. L'acide hyaluronique

I Origine et structure

En 1934, Meyer et Palmer isolent de l'humeur vitreuse bovine une substance qu'ils nomment acide hyaluronique (HA), donnant une solution de viscosité très élevée [162]. Le HA est l'un des constituants du tissu conjonctif : on le trouve dans le liquide synovial, l'humeur vitreuse, la matrice extracellulaire et le cartilage. Molécule intervenant dans les processus d'inflammation, de cicatrisation et dans la métastase cancéreuse, l'acide hyaluronique joue également un rôle dans l'adhésion, la croissance et la migration cellulaire. Obtenu pendant

longtemps par extraction de la crête de coq, on le fabrique, depuis plusieurs années par fermentation bactérienne. Cette méthode permet d'une part l'obtention de ce polysaccharide avec des rendements plus importants (6 à 10g/kg de moût contre 0,8g/kg de crêtes de coq) et permet d'autre part de préparer un HA facilement purifié, alors que les formes extraites des tissus conjonctifs contiennent de nombreuses protéines animales associées.

Bien que son existence soit connue depuis les années 30, il faudra attendre les travaux de Weissman et *coll.* et Jeanloz et *coll.* pour connaître la structure exacte du polysaccharide [163,164]. Le hyaluronane, désignant à la fois l'acide hyaluronique et le hyaluronate de sodium est un des polysaccharides les plus abondants appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. Le polymère peut être décrit par une chaîne linéaire non ramifiée dont le motif disaccharidique répétitif est composé d'acide D-glucuronique lié en β -1,3 à la N-acétyl-D-glucosamine (figure I-21). Les motifs sont reliés par des liaisons glycosidiques de type β -1,4. La longueur du motif de répétition du HA en solution est évaluée à 10 Å.

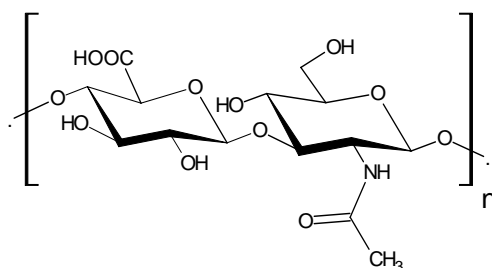


Figure I- 21 : Unité de répétition disaccharidique du HA

II Conformation

A l'état solide, le HA se présente comme un polymère semi-cristallin. Winter et *coll.* ont montré que ce polysaccharide possédait une conformation en hélice stabilisée par des liaisons hydrogène [165].

En solution, aucune transition conformationnelle hélice-pelote, avec du HA d'origine bactérienne, n'a pu être observée à ce jour. La transition conformationnelle pour des solutions de HA issu de crête de coq mise en évidence par changement du pouvoir rotatoire spécifique et par dichroïsme circulaire [166,167] peut être liée à la présence de protéines, toujours présentes dans le HA d'origine animale.

Scott et *coll.* ont mis en évidence une conformation stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires impliquant les groupes carboxylique, acétamido et hydroxyle [168].

La RMN ^1H et ^{13}C a été utilisée pour tenter de définir la conformation du HA en solution aqueuse. L'utilisation de l'eau comme solvant ne permet pas d'observer facilement les groupes NH et OH directement impliqués dans des liaisons hydrogène. De ce fait, de nombreuses études ont été réalisées dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) deutérié. En 1984, Scott et *coll.* ont dénombré quatre liaisons hydrogène par unité tétrasaccharidique [169]. Suite aux travaux de Cowman et *coll.* [170], ils ont suggéré que l'addition d'eau dans une solution de HA dans le DMSO modifie l'équilibre entre les liaisons hydrogène. La liaison hydrogène directe serait remplacée par une molécule d'eau créant un pont entre le NH et le COO^- (figure I-22) [171].

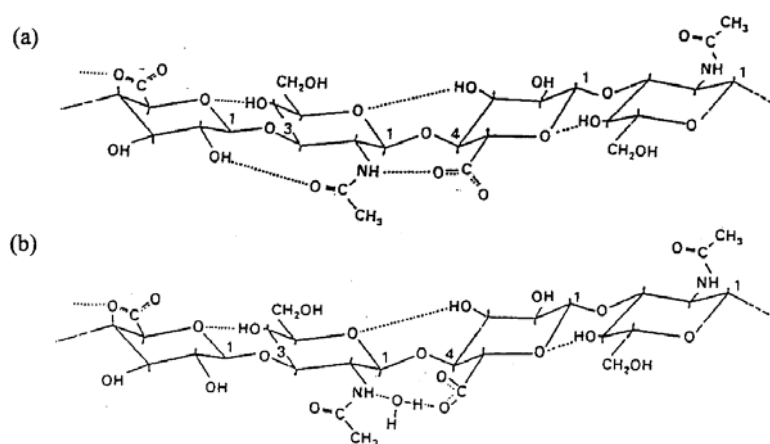


Figure I-22 : Structure secondaire du HA dans (a) du DMSO et (b) du DMSO contenant de l'eau

Les travaux de Scott et *coll.* ont été corroborés par des analyses de spectroscopie infrarouge qui ont permis de localiser les ponts hydrogène intra et interchaînes ainsi que l'insertion des molécules d'eau [172-175]. La spectrométrie infrarouge a mis également en évidence le mécanisme d'hydratation et les changements conformationnels induits au sein de la chaîne par l'hydratation.

Almond et *coll.* ont étudié la conformation d'oligosaccharides en solution par dynamique moléculaire. Ils observent que les liaisons hydrogène intramoléculaires se réarrangent rapidement et s'échangent avec les molécules d'eau [176-178]. Le modèle microscopique le plus répandu du HA en solution est celui d'une hélice 2_1 stabilisée par un

réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires dynamiques entre résidus adjacents : cette structure, lui conférant le caractère semi-rigide, est présente dans les simulations de dynamique moléculaire de Almond et *coll.*

III Propriétés physico-chimiques

III.1 Principales caractéristiques physico-chimiques

La présence d'un acide uronique dans l'unité de répétition du HA lui confère des propriétés de polyélectrolyte et le rend parfaitement soluble en milieu aqueux neutre. Le pKa des acides glucuroniques est de l'ordre de 2,9 mais puisque le HA est un polyanion, un pH de 7,5 est nécessaire pour une neutralisation totale des groupements carboxylique.

Les charges portées par le HA conduisent à des interactions à courte et longue distance pouvant être écrantées par la présence d'électrolytes. Le HA est donc très sensible à la présence de sel en solution et au pH.

Rinaudo et *coll.* ont évalué par chromatographie d'exclusion stérique multidétection la longueur de persistance L_p du HA, en l'absence de répulsions électrostatiques, à environ 70 Å [179,180]. Cette valeur traduit un caractère semi-rigide de la chaîne macromoléculaire et correspond aux valeurs prédites par modélisation moléculaire [181].

III.2 Propriétés rhéologiques

Le succès du HA tient à ses propriétés viscoélastiques. Depuis plus de 30 ans, de nombreux travaux ont porté sur l'étude du comportement rhéologique du HA [182-186] ainsi que sur les différents paramètres tels que la concentration en polymère, la masse molaire, la température, la force ionique, la nature des ions compensateurs et le pH qui peuvent influencer ce comportement [187-192]. L'analyse des propriétés en solution sera présentée dans le chapitre III.

IV Applications

Dans le domaine cosmétique, le HA intervient dans la formulation de crèmes ou de gels en raison de ses propriétés hydratantes [193].

Du fait de ses propriétés viscoélastiques et de ses fonctions biologiques remarquables (interactions spécifiques avec certaines protéines), le HA est principalement utilisé dans le domaine biomédical [194].

Les recherches actuelles suggèrent de nouvelles applications dont le traitement des escarres chez l'adulte, du cancer ou du développement fœtal humain.

Le fort taux d'hydratation des gels de HA, associé à l'action positive de ce polysaccharide sur la différenciation et la prolifération cellulaire, en font des matériaux de choix pour la réparation de nombreux tissus, dont notamment la peau [195,196].

Grâce à sa biocompatibilité, le HA présente des qualités particulières pour la libération contrôlée de principes actifs [197,198].

Les propriétés du HA ont été mises à profit en ophtalmologie [199]. En effet, le HA est utilisé sous forme de gel, en tant qu'agent protecteur, lors d'interventions en microchirurgie de l'oeil [200]. Les principales formulations de HA commercialisées pour ce type d'applications sont le Healon[®] (Advanced Medical Optics, Etats-Unis), l'Opegan[®] (Santen Pharmaceuticals, Japon) et l'OpeganHi[®] (Santen Pharmaceuticals, Japon).

Le HA est, de plus, utilisé dans le traitement des pathologies ostéoarticulaires. Dans ce cadre, des solutions visqueuses de HA sont utilisées pour la viscosupplémentation [201]. En effet, l'arthrose résulte de la dégradation du liquide synovial et en particulier du HA qui le compose. Le liquide synovial perd alors ses propriétés rhéologiques. Chez une personne saine, celles-ci apparaissent variables selon les contraintes articulaires imposées au cours des mouvements lents et rapides. La viscosité et l'élasticité sont complémentaires : dans les mouvements lents, le liquide est plus visqueux qu'élastique et inversement dans les mouvements rapides. Le liquide synovial dégradé devient de moins en moins visqueux et perd son caractère viscoélastique. Ce liquide une fois détérioré ne joue plus son rôle de lubrifiant et d'absorbeur de chocs articulaires et entraîne ainsi une inflammation et la dégradation des différentes couches cartilagineuses. La viscosupplémentation consiste en l'injection de HA dans une articulation arthrosique afin de restaurer les fonctions lubrifiantes et protectrices en remplaçant le HA détérioré. Commercialement, on trouve l'Arthrum[®] (LCA, France), le Hyalgan[®] (Fidia pharmaceuticals, Etats-Unis), le SUPERARTZ[®] (Seikagaku, Japon), OSTENIL[®] (CHEMEDICA AG, Allemagne), Sinovial[®]

(Genévrier, Sophia Antipolis, France) et VISCOSEAL[®] (TRB CHEMEDICA International, Suisse).

De nombreux travaux de recherche ont été consacrés à la modification chimique du HA afin d'obtenir en particulier des hydrogels chimiques et/ou physiques (dérivés hydrophobiquement modifiés) en vue d'étendre ses applications dans les domaines biomédical et pharmaceutique [19,28,202-204].

Conclusion

Afin de mieux situer le contexte de l'étude, nous avons, dans ce chapitre, présenté les hydrogels physiques qui nous paraissent les plus pertinents. Ces hydrogels, stabilisés par des liaisons secondaires réversibles peuvent être issus de l'auto-association de polymères, du mélange de deux polymères complémentaires et du mélange d'un polymère avec une petite molécule. Dans la majeure partie des cas, les différents types d'interactions (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, interactions électrostatiques...) mises en jeu forment des zones de jonctions. Les systèmes formés de jonctions ponctuelles, plus rares, sont stabilisés par des complexes impliquant une reconnaissance moléculaire entre deux molécules d'origine naturelle.

De part leurs propriétés particulières, les hydrogels physiques, en particulier les systèmes injectables, trouvent de nombreuses applications dans les domaines biomédical et pharmaceutique, comme c'est le cas de la libération contrôlée de principes actifs et l'ingénierie tissulaire.

Depuis plusieurs années, une attention particulière a été portée sur la chimie supramoléculaire impliquant des liaisons non covalentes. A ce titre, les complexes de type hôte-invité à base de cyclodextrine ont fait l'objet de nombreuses études. Des entités moléculaires de structure différente permettant la formation d'interactions multivalentes ont été développées afin d'élaborer des assemblages supramoléculaires et/ou des hydrogels physiques. C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux de thèse que nous présentons dans la suite du manuscrit.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Hennink, W.E.; van Nostrum C.F. (2002) **Novel crosslinking methods to design hydrogels**, *Adv. Drug Deliv.*, 54, 13-36.
- [2] Bromberg, L.E.; Ron, E.S. (1998) **Temperature-responsive and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery**, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 31, 197-221.
- [3] Rinaudo, M. (1993) **Gelation of polysaccharides**, *J. Intelligent Mat. Syst. Struct.*, 4, 210-215.
- [4] Jeong, B.; Kim, S.W.; Bae, Y.H. (2002) **Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels**, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 37-51.
- [5] Yu, B.Y. (2002) **Coiled-coils: stability, and drug delivery potential**, *Adv. Drug Rev.*, 54, 1113-1129.
- [6] Petka, W.A.; Harden, J.L.; McGrath K.P.; Wirtz, D.; Tirell, D.A. (1998) **Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins**, *Science*, 281, 389-392.
- [7] Xu, C.; Breedveld, V.; Kopecek, J. (2005) **Reversible hydrogels from self-assembling genetically engineered protein block copolymers**, *Biomacromolecules*, 6, 1739-1749.
- [8] Yekta, A.; Duhamel, J.; Adiwidjaja, H.; Brochard, P.; Winnik, M.A. (1993) **Association structure of telechelic associative thickeners in water**, *Langmuir*, 9, 881-883.
- [9] Tam, K.C.; Jenkins, R.D.; Winnik, M.A.; Basset, D.R. (1998) **A structural model of hydrophobically modified urethane-ethoxylate (HEUR) associative polymers in shear flows**, *Macromolecules*, 31, 4149-4159.
- [10] Hill, A.; Candau, F.; Selb, J. (1993) **Properties of hydrophobically associating polyacrylamides: influence of the method of synthesis**, *Macromolecules*, 26, 4521-4532.
- [11] Volpert, E.; Selb, J.; Candau, F. (1996) **Influence of the hydrophobe structure on composition, microstructure, and rheology in associating polyacrylamides prepared by micellar copolymerization**, *Macromolecules*, 29, 1452-1463.
- [12] Regalado, E.J.; Selb, J.; Candau, F. (1999) **Viscoelastic behavior of semidilute solutions of multistickers polymer chains**, *Macromolecules*, 32, 8580-8588.
- [13] Malmsten, M.; Lindman, B. (1992) **Self-assembly in aqueous block copolymer solutions**, *Macromolecules*, 25, 5440-5445.

- [14] Kabanov, A.V.; Lemieux, P.; Vinogradov, S.; Alakhov, V. (2002) **Pluronic® block copolymers: novel functional molecules for gene therapy**, *Adv. Drug Deliv.*, 54, 223-233.
- [15] Qiao, M.; Chen, D.; Ma, X.; Liu, Y. (2005) **Injectable biodegradable temperature-responsive PLGA-PEG-PLGA copolymers: synthesis and effect of copolymer composition on the drug release from the copolymer composition on the drug release from copolymer-based hydrogels**, *Int. J. Pharm.*, 294, 103-112.
- [16] Jeong, B.; Bae, Y.H.; Kim, S.W. (1999) **Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions**, *Macromolecules*, 32, 7064-7069.
- [17] Desbrières, J. (2004) **Autoassociative natural polymer derivatives: the alkylchitosans. Rheological behavior and temperature stability**, *Polymer*, 45, 3285-3295.
- [18] Rinaudo, M.; Auzély-Velty, R.; Vallin, C.; Mullagaliev, I. (2005) **Specific interactions in modified chitosan systems** (submitted).
- [19] Creuzet, C.; Kadi, S.; Rinaudo, M.; Auzély-Velty, R. (2005) **New associative systems based on alkylated hyaluronic acid. Synthesis and aqueous solution properties** (submitted).
- [20] Siquin, A.; Hubert, P.; Marchal, P.; Choplin, L.; Dellacherie, E. (1996) **Rheological properties of semi-dilute aqueous solutions of hydrophobically modified propylene glycol alginate derivatives**, *Colloids and surfaces*, 112, 193-200.
- [21] Zhang, R.; Tang, M.; Bowyer, A.; Eienthal, R.; Hubble, J. (2005) **A novel pH- and ionic-strength-sensitive carboxy methyl dextran hydrogel**, *Biomaterials*, 26, 4667-4683.
- [22] Fisher, A.; Houzelle, M.C.; Hubert, P.; Axelos, M.A.V.; Geoffroy-Chapotot, C.; Carré, M.C.; Viriot, M.L.; Dellacherie, E. (1998) **Detection of intramolecular associations in hydrophobically modified pectin derivatives using fluorescent probes**, *Langmuir*, 14, 4482-4488.
- [23] Qu, X.; Wirsén, A.; Albertsson, A.-C. (2000) **Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water**, *Polymer*, 41, 4589-4598.
- [24] Shedge, A.S.; Lele, A.K.; Wadgaonkar, P.P.; Hourdet, D.; Perrin, P.; Chassenieux, C.; Badiger, M.V. (2005) **Hydrophobically modified poly(acrylic)acid using 3-pentadecylcyclohexylamine : synthesis and rheology**, *Macromol. Chem. Phys.*, 205, 464-472.
- [25] Kim, S.Y.; Cho, S.M.; Lee, Y.M.; Kim, S.J. (2000) **Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blem based on chitosan and N-isopropylacrylamide**, *J. Appl. Polym. Sci.*, 78, 1381-1391.
- [26] Bhattarai, N.; Ramay, H.R.; Gunn, J.; Matsen, F.A.; Zhang, M. (2005) **PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release**, *J. Control. Release*, 103, 609-624.

- [27] Chung, H.J.; Go, D.H.; Bae, J.W.; Jung, I.K.; Lee, J.W.; Park, K.D. (2005) **Synthesis and characterization of Pluronic[®] grafted chitosan copolymer as a novel injectable biomaterial**, *Current Applied Physics*, 5, 485-488.
- [28] Creuzet, C.; Auzély-Velty, R.; Rinaudo, M. (2005) **Synthèse et étude d'hydrogels thermoréversibles obtenus par modification chimique contrôlée du chitosane** (submitted to *Actualité Chimique*)
- [29] Desbrières, J.; Hirrien, M.; Ross-Murphy, S.B. (2000) **Thermogelation of methylcellulose : rheological considerations**, *Polymer*, 41, 2451-2461.
- [30] Durand, A.; Hourdet, D. (1999) **Synthesis and thermoassociative properties in aqueous solution of graft copolymers containing poly(*N*-isopropylacrylamide) side chains**, *Polymer*, 40, 4941-4951.
- [31] Chen, G.; Hoffman, A.S. (1995) **Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH**, *Nature*, 373, 49-52.
- [32] Jeong, B.; Kibbey, M.R.; Birnbaum, J.C.; Won, Y-Y.; Gutowska, A. (2000) **Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-g-PLGA**, *Macromolecules*, 33, 8317-8322.
- [33] Goycoolea, M.; Milas, M.; Rinaudo, M. (2001) **Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems**, *Intern. J. Biol. Macromolecules*, 29, 181-192.
- [34] Eagland, D.; Crowther, N.J.; Butler, C.J. (1994) **Complexation between polyoxyethylene and polymethacrylic acid - The importance of the molar mass of polyethylene**, *Eur. Polym. J.*, 30, 767-773.
- [35] Percec, V.; Bera, T.K. (2002) **A new strategy for the preparation of supramolecular neutral hydrogels**, *Biomacromolecules*, 3, 272-279.
- [36] Salem, A.K.; Rose, F.R.A.J.; Oreffo, R.O.C.; Yang, X.; Davies, M.C.; Mitchell, J.R.; Roberts, C.J.; Stolnik-Trenkic, S.; Tendler, S.J.B.; Williams, P.M.; Shakesheff, K.M. (2003) **Porous polymer and cell composites that self-assembled *in situ***, *Adv. Mater.*, 15, 210-213.
- [37] Miyata, T.; Asami, N.; Uragami, T. (1999) **A reversibly antigen-responsive hydrogel**, *Nature*, 399, 766-769.
- [38] Obaidat, A.A.; Park, K. (1996) **Characterization of glucose dependant gel-sol phase transition of the polymeric glucose-concanavalin A hydrogel system**, *Pharm. Res.*, 13, 989-995.
- [39] Lee, S.J.; Park, K. (1996) **Synthesis and characterization of sol-gel reversible hydrogels sensitive to glucose**, *J. Mol. Recogn.*, 9, 549-557.

- [40] Kim, J.J.; Park, K. (2001) **Modulated insulin delivery from glucose-sensitive hydrogel dosage forms**, *J. Control. Release*, 77, 39-41.
- [41] Obaidat, A.A.; Park, K. (1997) **Characterization of protein release through glucose-sensitive hydrogel membranes**, *Biomaterials*, 18, 801-806.
- [42] A. Tayal, V.B.; Pai, S.A. Khan, (1999) **Rheology and microstructural changes during enzymatic degradation of a guar-borax hydrogel**, *Macromolecules*, 32, 5567-5574.
- [43] Pezron, E. (1988) Thesis, **Influence de la complexation d'ions sur les propriétés physico-chimiques de solutions de polymères**, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.
- [44] Ikada, Y.; Jamshidi, K.; Tsuji, H.; Hyon, S-H. (1987) **Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactides)**, *Macromolecules*, 20, 904-906.
- [45] De Jong, S.J.; De Smedt, S.C.; Wahls, M.W.C.; Demeester, J.; Kettenes-van den Bosh, Hennink, W.E. (2000) **Novel self-assembled hydrogels by stereocomplex formation in aqueous solution of enantiomeric lactic acid oligomers grafted to dextran**, *Macromolecules*, 33, 3680-3686.
- [46] Hennink, W.E.; De Jong, S.J.; Bos, G.W.; Velduis, T.F.J.; van Nostrum, C.F. (2004) **Biodegradable dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation for the controlled release of pharmaceutical proteins**, *Int. J. Pharm.*, 277, 99-104.
- [47] Bos, G.W.; Hennink, W.E.; Brouwer, L.A.; den Otter, W.; Veldhuis, F.J.; van Nostrum, C.F.; van Luyn, M.J.A. (2005) **Tissue reactions of *in situ* formed dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation after subcutaneous implantation in rats**, *Biomaterials*, 26, 3901-3909.
- [48] De Jong, S.J.; van Eerdenbrugh, B.; van Nostrum C.F.; Kettenes-van den Bosh, J.J.; Hennink, W.E. (2001) **Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior**, *J. Control. Release*, 71, 261-275.
- [49] Lim, D.W.; Choi, S.H.; Park, T.G. (2000) **A new class of biodegradable hydrogels stereocomplex by enantiomeric oligo(lactide) side chains of poly(HEMA-g-OLA)s**, *Macromol. Rapid Commun.*, 21, 464-471.
- [50] Nagahara, S.; Matsuda, T. (1996) **Hydrogel formation via hybridization of oligonucleotides derivatized in water-soluble vinyl polymers**, *Polymer Gels and Networks*, 4, 111-127.
- [51] Gacesa, P. (1988) **Alginates**, *Carbohydr. Polym.*, 8, 161-182.
- [52] Kuo, C.K.; Xa, P.X. (2001) **Ionicly cross-linked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties**, *Biomaterials*, 22, 511-521.

- [53] Hoffman, A.S. (2002) **Hydrogels for biomedical applications**, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 43, 3-12.
- [54] Peppas, N.A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. (2000) **Hydrogels in pharmaceutical formulations**, *Eur. J. Pharm. Biopharma.*, 50, 27-46.
- [55] Kikuchi, A.; Okano, T. (2002) **Pulsatile drug release control using hydrogels**, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 53-77.
- [56] Miyata, T.; Uragami, T.; Nakamae, K. (2002) **Biomolecule-sensitive hydrogels**, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 79-98.
- [57] Gil, E.U.; Hudson, S.M. (2004) **Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates**, *Prog. Polym. Sci.*, 29, 1173-1222.
- [58] Molina, I.; Li, S.; Matinez, M.B.; Vert, M. (2001) **Protein release from physically crosslinked hydrogels of the PLA/PEO/PLA triblock copolymer-type**, *Biomaterials*, 22, 363-369.
- [59] Bezemer, J.M.; Grijpma, D.W.; Dijkstra, P.J.; van Blitterswijk, Feijen, J. (1999) **A controlled release system for proteins based on poly(etherester) block-copolymers: polymer network characterization**, *J. Control. Release*, 62, 393-405.
- [60] Hassan, C.M.; Doyle III, F.J.; Peppas, N.A. (1997) **Dynamic behavior of glucose-responsive poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels**, *Macromolecules*, 30, 6166-6173.
- [61] Kim, S.W.; Pai, C.M.; Makino, K.; Seminoff, L.A.; Holmberg, D.L.; Gleeson, J.M.; Wilson, D.E.; Mack, E.J. (1990) **Self-regulated glycosylated insulin delivery**, *J. Control. Release*, 11, 193-201.
- [62] Lee K.Y.; Mooney, D.J. (2001) **Hydrogels for tissue engineering**, *Chem. Rev.*, 101, 1869-1879.
- [63] Langer, R. (2000) **Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience**, *Acc. Chem. Res.*, 33, 94-101.
- [64] Drury, J.L.; Mooney, D.J. (2003) **Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications**, *Biomaterials*, 24, 4337-4351.
- [65] Marler, J.J.; Upton, J.; Langer, R.; Vacanti, J.P. (1998) **Transplantation of cells in matrice for tissue regeneration**, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 33, 165-182.
- [66] Gutowska A.; Jeong, B.; Jasionowski, M. (2001) **Injectable gels for tissue engineering**, *The Anatomical Record*, 263, 342-349.
- [67] Schmolka, I. (1972) **Artificial skin: preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns**, *J. Biomat. Res.*, 6, 571-582.

- [68] Cao, Y.L.; Ibarra, C.; Vacanti, C. (1999) **Preparation and use of thermosensitive polymers. I: tissue engineering methods and protocols.** Towota, NJ: Humana Press.
- [69] Gutowska, A.; Song, L.; Armstrong, B.L.; Campbell, A.A. (1998) **Injectable stimuli-sensitive polymer ceramic composites for bone tissue regeneration.** *Trans Soc. Biomat.*, 21, 450.
- [70] Vernon, B.; Gutowska, A.; Bae, Y.H.; Kim, S.W. (1996) **Thermally reversible polymer gel for biohybrid artificial pancreas,** *J. Macromol. Chem. Phys.*, 109, 155-167.
- [71] Paige, K.T.; Cima, L.G.; Yaremchuk, M.J.; Vacanti, Jp; Vacanti, C.A. (1995) **Injectable cartilage,** *Plast. Reconstr. Surg.*, 96, 1390-1400.
- [72] Szejtli, J.(1988) **Cyclodextrin Technology,** Kluwer: Dordrecht.
- [73] Saenger, W. (1980) **Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry,** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19, 344-362.
- [74] Saenger, W.; Jacob, J.; Gessler, K.; Steiner, T.; Hoffmann, D.; Sanbe, H.; Koizumi, K.; Smith, S.M.; Tahaka, T. (1998) **Structures of the common cyclodextrins and their larger analogues-beyond the doughnut,** *Chem. Rev.*, 98, 1787-1802.
- [75] Harata, K. (1998) **Structural aspects of stereodifferentiation in the solid state,** *Chem. Rev.*, 98, 1803-1828.
- [76] Szejtli, J. (1998) **Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry,** *Chem. Rev.*, 98, 1743-1753.
- [77] Connors, K.A. (1997) **The stability of cyclodextrin complexes in solution,** *Chem. Rev.*, 1325-1357.
- [78] Lecourt, T. (2003) Thesis **Débenzylation régiosélective des cyclodextrines: mécanisme réactionnel et application à la synthèse d'oligomères cycliques,** Université Paris 6, Paris, France.
- [79] Harada, A.; Furue, M.; Nozakura, S-I. (1976) **Cyclodextrin-containing polymers. 1. Preparation of polymers,** *Macromolecules*, 9, 701-704.
- [80] Weickenmeier, M.; Wenz, G. (1996) **Cyclodextrin sidechain polyesters-synthesis and inclusion of adamantan derivatives,** *Macromol. Rapid. Commun.*, 17, 731-736.
- [81] Ruebner, A.; Statton, G.L.; James, M.R. (2000) **Synthesis of a linear polymer with pendant γ -cyclodextrins,** *Macromol. Chem. Phys.*, 201, 1185-1188.
- [82] Martel, B.; Leckchiri, Y.; Pollet, A.; Morcellet, M. (1995) **Cyclodextrin-poly(vinylamine) systems-I. Synthesis, characterization and conformational properties,** *Eur. Polym. J.*, 31, 1083-1088.

- [83] Seo, T.; Kajihara, T.; Iijima, T. (1987) **The synthesis of poly(allylamine) containing covalently bound cyclodextrin and its catalytic effect in the hydrolysis of phenyl esters**, *Makromol. Chem.*, 188, 2071-2082.
- [84] Suh, J.; Lee, S.H.; Zoh, K.D. (1992) **A novel host containing both binding site and nucleophile prepared by attachment of β -cyclodextrin to poly(ethylenimine)**, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 7916-7917.
- [85] Tanida, F.; Tojima, T.; Han, S-M.; Nishi, N.; Tokura, S.; Sakairi, N.; Seino, H.; Hamada, K. (1998) **Novel synthesis of α water-soluble cyclodextrin-polymer having a chitosan skeleton**, *Polymer*, 39, 5261-5263.
- [86] Tojima, T.; Katsura, H.; Han, S-M.; Tanida, F.; Nishi, N.; Tokura, S.; Sakairi, N. (1998) **Preparation of an α -cyclodextrin-linked derivative via reductive amination strategy**, *J. Polym. Sci. :Part A*, 36, 1965-1968.
- [87] Auzély-Velty, R.; Rinaudo, M. (2001) **Chitosan derivatives bearing pendant cyclodextrin cavities: synthesis and inclusion performance**, *Macromolecules*, 34, 3574-3580.
- [88] Chen, S.; Wang, Y. (2001) **Study on β -cyclodextrin grafting chitosan and slow release of its inclusion complex with radioactive iodine**, *J. Appl. Polym. Sci.*, 82, 2414-2421.
- [89] Furusaki, E.; Ueno, Y.; Sakairi, N.; Nishi, N.; Tokura, S. (1996) **Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin**, *Carbohydr. Polym.*, 29, 29-34.
- [90] Renard, E.; Deratani, A.; Volet, G.; Sébille, B. (1997) **Preparation and characterization of water soluble high molecular weight β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers**, *Eur. Polym. J.*, 33, 49-57.
- [91] Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. (1993) **Synthesis of a tubular polymer from threaded cyclodextrins**, *Nature*, 364, 516-518.
- [92] Wenz, G. (1994) **Cyclodextrins as building blocks for supramolecular structures and functional units**, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33, 803-822.
- [93] Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. (1998) **Cyclodextrin drug carrier systems**, *Chem. Rev.*, 98, 2045-2976.
- [94] Hedges, A.R. (1998) **Industrial applications of cyclodextrins**, *Chem. Rev.*, 98, 2035-2044.
- [95] Arima, H.; Wahamutsu, K.; Aritomi, H.; Irie, T.; Uekama, K. (1990) **Minutes of the 5th international symposium on cyclodextrins** (Ed: D. Duchêne), Editions de Santé, Paris, p 487.
- [96] Li, S.; Purdy, W.C. (1992) **Cyclodextrins and their applications in Analytical chemistry**, *Chem. Rev.*, 92, 1457-1470.

- [97] Armstrong, D.W.; He, F.Y.; Han, S.M. (1988) **Planar chromatographic separation of enantiomers and diastereomers with cyclodextrin mobile phase additives**, *J. Chromatogr.*, 448, 345-354.
- [98] Takahashi, K. (1998) **Organic reactions mediated by cyclodextrins**, *Chem. Rev.*, 98, 2013-2034.
- [99] Breslow, R.; Zhang, B. (1992) **Very fast ester hydrolysis by a cyclodextrin dimer with a catalytic linking group**, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5882-5883.
- [100] Breslow, R.; Dong, S.D. (1998) **Biomimetic reactions catalyzed by cyclodextrins and their derivatives**, *Chem. Rev.*, 98, 1997-2012.
- [101] Lehn, J-M. (1985) **Supramolecular chemistry: receptors, catalysts, and carriers**, *Science*, 227, 849-856.
- [102] Breslow, R.; Halfon, S.; Zhang, B. (1995) **Molecular recognition by cyclodextrin dimers**, *Tetrahedron*, 51, 377-388.
- [103] Mulder, A.; Auletta, T.; Sartori, A.; Del Ciotto, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D.N. (2004) **Divalent binding of a bis(adamantyl)-functionalized calix[4]arene to β -cyclodextrin-based hosts: an experimental and theoretical study on multivalent binding in solution and a self-assembled monolayers**, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 6627-6636.
- [104] Hirotsu, K.; Higuchi, T. (1982) **Polymeric inclusion compound derived from β -cyclodextrin**, *J. Org. Chem*, 47, 1143-1144.
- [105] Petter, R.C.; Salek, J.S.; Sikorski, C.T.; Kumaravel, G.; Lin, F-T. (1990) **Cooperative binding by aggregated mono-6-(alkylamino)- β -cyclodextrins**, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 3860-3868.
- [106] Harada, A. (1996) **Preparation and structures of supramolecules between cyclodextrins and polymers**, *Coordination Chemistry Reviews*, 148, 115-133.
- [107] Raymo, F.M.; Stoddart, J.F. (1999) **Interlocked macromolecules**, *Chem. Rev.*, 99, 1643-1663.
- [108] Nepogodiev, S.A.; Stoddart, J.F. (1998) **Cyclodextrin-based catenanes and rotaxanes**, *Chem. Rev.*, 98, 1959-1976.
- [109] Meier, L.P.; Heule, M.; Caseri, W.R.; Shelden, R.A.; Suter, U.W. (1996) **Adsorption of polymeric inclusion compounds on muscovite mica**, *Macromolecules*, 29, 718-723.
- [110] Choi, H.S.; Ooya, T.; Lee, S.C.; Sasaki, S.; Kurisawa, M.; Uyama, H.; Yui, N. (2004) **pH Dependence of polypseudorotaxane formation between cationic linear polyethylenimine and cyclodextrins**, *Macromolecules*, 37, 6705-6710.

- [111] Huh, K.M.; Ooya, T.; Sasaki, S.; Yui, N. (2001) **Polymer inclusion complex consisting of poly(ϵ -lysine) and α -cyclodextrin**, *Macromolecules*, 34, 2402-2404.
- [112] Harada, A.; Kamachi, M. (1990) **Complex formation between poly(ethylene glycol) and α -cyclodextrin**, *Macromolecules*, 23, 2821-2823.
- [113] Harada, A.; Li, J. (1993) **Complex formation between poly(methyl vinyl ether) and γ -cyclodextrin**, *Chem. Lett.*, 1993, 237-240.
- [114] Harada, A.; Okada, M.; Li, J.; Kamachi, M. (1995) **Preparation and characterization of inclusion complexes of poly(propylene glycol) with cyclodextrins**, *Macromolecules*, 28, 8406-8411.
- [115] Harada, A.; Kawaguchi, Y.; Nishiyama, T.; Kamachi, M. (1997) **Complex formation of poly(ϵ -caprolactone) with cyclodextrin**, *Macromol. Rapid Commun.*, 18, 535-539.
- [116] Harada, A.; Nishiyama, T.; Kawaguchi, Y.; Okada, M.; Kamachi, M. (1997) **Preparation and characterization of inclusion complexes of aliphatic polyesters with cyclodextrins**, *Macromolecules*, 30, 7115-7118.
- [117] Fujita, H.; Ooya, T.; Yui, N. (1999) **Thermally induced localization of cyclodextrins in a polyrotaxane consisting of β -cyclodextrins and poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol) triblock copolymer**, *Macromolecules*, 32, 2534-2541.
- [118] Li, J.; Ni, X.; Zhou, Z.; Leong, K.W. (2003) **Preparation and characterization of polypseudorotaxanes based on block-selected inclusion complexation between poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) triblock copolymers and α -cyclodextrin**, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 1788-1795.
- [119] Li, X.; Li, J.; Leong, K. W. (2003) **Preparation and characterization of inclusion complexes of biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)-poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-poly(ethylene oxide) triblock copolymers with cyclodextrins**, *Macromolecules*, 36, 1209-1214.
- [120] Choi, H.S.; Ooya, T.; Sasaki, S.; Yui, N.; Ohya, Y.; Nakai, T.; Ouchi, T. (2003) **Preparation and characterization of polypseudorotaxanes based on biodegradable poly(L-lactide)/poly(ethylene glycol) triblock**, *Macromolecules*, 36, 9313-9318.
- [121] Lu, J.; Shin, I.D.; Nojima, S.; Tonelli, A.E. (2000) **Formation and characterization of the inclusion compounds between poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ϵ -caprolactone) triblock copolymer and α - and γ -cyclodextrin**, *Polymer*, 41, 5871-5883.
- [122] Shuai, X.; Wei, M.; Porbeni, F.E.; Bullions, T.A.; Tonelli, A.E. (2002) **Formation of and coalescence from the inclusion complex of a biodegradable block copolymer and α -cyclodextrin. 2: a novel way to regulate the biodegradation behavior of biodegradable block copolymers**, *Biomacromolecules*, 3, 201-207.

- [123] Shuai, X.; Porbeni, F.E.; Wei, M.; Shin, I.D.; Tonelli, A.E. (2001) **Formation of and coalescence from the inclusion complex of a biodegradable block copolymer and α -cyclodextrin : a novel means to modify the phase structure of biodegradable block copolymers**, *Macromolecules*, 34, 7355-7361.
- [124] Rusa, C.C.; Tonelli, A.E. (2000) **Polymer/polymer inclusion compounds as a novel approach to obtaining a PLLA/PCL intimately compatible blend**, *Macromolecules*, 33, 5321-5324.
- [125] Rusa, C.C.; Tonelli, A.E. (2000) **Separation of polymers by molecular weight through inclusion compound formation with urea and α -cyclodextrin hosts**, *Macromolecules*, 33, 1813-1818.
- [126] Ooya, T.; Yui, N. (1999) **Synthesis of theophylline-polyrotaxane conjugates and their drug release via supramolecular dissociation**, *J. Control. Release*, 58, 251-269.
- [127] Ooya, T.; Yui, N. (1998) **Supramolecular dissociation of biodegradable polyrotaxanes by enzymatic terminal hydrolysis**, *Macromol. Chem. Phys.*, 199, 2311-2320.
- [128] Rekharsky, M.V.; Inoue, Y. (1998) **Complexation thermodynamics of cyclodextrins**, *Chem. Rev.*, 98, 1875-1917
- [129] Rüdiger, V.; Eliseev, A.; Simona, S.; Schneider, H-J.; Blandamer, M.J.; Cullis, P.M.; Meyer, A.J. (1996) **Conformational, calorimetric and NMR spectroscopic studies on inclusion complexes of cyclodextrins with substituted phenyl and adamantane derivatives**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2119-2123.
- [130] Weickenmeier, M.; Wenz, G.; Huff, J. (1997) **Association thickener by host guest interaction of a β -cyclodextrin polymer and a polymer with hydrophobic side-groups**, *Macromol. Rapid. Commun.*, 18, 1117-1123.
- [131] Amiel, C.; Sébille, B. (1999) **Association between amphiphilic poly(ethylene oxide) and β -cyclodextrin polymers: agregation and phase separation**, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 79, 105-122.
- [132] Moine, L.; Amiel, C.; Brown, W.; Guerin, P. (2001) **Associations between a hydrophobically modified, degradable, poly(malic)acid and a β -cyclodextrin polymer in solution**, *Polym. Int.*, 50, 663-676.
- [133] Sandier, A.; Brown, W.; Mays, H. (2000) **Interaction between an adamantane end-capped poly(ethylene oxide) and a β -cyclodextrin polymer**, *Langmuir*, 16, 1634-1642.
- [134] Moine, L.; Cammas, S.; Amiel C.; Renard, E.; Sébille, B.; Guérin, P. (1998) **New pH sensitive network : combination of an amphiphilic degradable polyester with a β -cyclodextrin copolymer**, *Macromol. Symp.*, 130, 45-52.

- [135] Moine, L.; Cammas, S.; Amiel, C.; Guerin, P.; Sebille, B. (1997) **Polymers of malic acid conjugated with the 1-adamantyl moiety as lipophilic pendant group**, *Polymer*, 38, 3121-3127.
- [136] Ikeda, T.; Ooya, T.; Yui, N. (2000) **Supramolecular network formation through inclusion complexation of an α -cyclodextrin-based molecular tube**, *Macromol. Rapid Commun.*, 21, 1257-1262.
- [137] Ravoo, B.J.; Jacquier, J-C.; Wenz, G. (2003) **Molecular recognition of polymers by cyclodextrin vesicles**, *Angew. Chem.*, 115, 2112-2115.
- [138] Ravoo, B.J.; Darcy, R. (2000) **Cyclodextrin bilayer vesicles**, *Angew. Chem.*, 39, 4324-4326.
- [139] Weisser, M.; Nelles, G.; Wenz, G.; Mittler-Neher, S. (1997) **Guest-host interactions with immobilized cyclodextrins**, *Sensors and Actuators B*, 58-67.
- [140] Rojas, M.T.; Königer, R.; Stoddart, J.F.; Kaifer, A.E. (1995) **Supported monolayers containing preformed binding sites. Synthesis and interfacial binding properties of a thiolated β -cyclodextrin derivative**, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 336-343.
- [141] Beulen, M.W.J.; Bügler ; Lammerink, B.; Geurts, F.A.J.; Biemond, Ed.M.E.F.; van Leerdam, K.G.C.; van Veggel, F.C.J.M.; Engbersen, J.F.J.; Reinhoudt, D.N. (1998) **Self-assembled monolayers of heptapodant β -cyclodextrins on gold**, *Langmuir*, 14, 6424-6429.
- [142] de Jong, M.R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D.N. (2001) **Influencing the binding selectivity of self-assembled cyclodextrin monolayers on gold through their architecture**, *Chem. Eur. J.*, 7, 4164-4170.
- [143] Beulen, M.W.J.; Bügler, J.; DeJong, M.R.; Lammerink, B.; Huskens, J.; Schönherr H.; Vansco, G.J.; Boukamp, B.A.; Wieder, H.; Offenhäuser, A.; Knoll, W.; Van Veggel, F.C.J.M.; Reinhoudt D.N. (2000) **Host-guest interactions at self-assembled monolayers of cyclodextrins on gold**, *Chem. Eur. J.*, 6, 1176-1183.
- [144] Crespot-Biel, O.; Péter, M.; Bruinink, C.M.; Ravoo, B.J.; Reinhoudt, D.N.; Huskens, J. (2005) **Multivalent host-guest interactions β -cyclodextrin self-assembled monolayers and poly(isobutene-*alt*-maleic acid)s modified with hydrophobic guest moieties**, *Chem. Eur. J.*, 11, 2426-2432.
- [145] Huskens, J.; Deij, M.A.; Reinhoudt D.N. (2002) **Attachment of molecules at a molecular printboard by multiple host-guest interactions**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 4467,4471.
- [146] Auletta, T.; Dordi, B.; Mulder, A.; Sartori, A.; Onclin, S.; Bruinink, C.M.; Péter, M.; Nijhuis, C.A.; Beijleveld, H.; Schönherr, H.; Vansco, G.J.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Ravoo, B.J.; Huskens, J.; Reinhoudt, D.N. (2004) **Writing patterns of molecules on molecular printboards**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 369-373.

- [147] David, C.; Millot, M.C.; Sébille, B.; Lévy, Y. (2003) **The reversible of hydrophobically end-capped poly(ethylene glycol)s to poly- β -cyclodextrin-coated gold surfaces: a surface plasmon resonance investigation**, *Sensuors and Actuators B*, 90, 286-295.
- [148] Li, J.; Harada, A.; Kamachi, M. (1994) **Sol-gel transition during inclusion complex formation between α -cyclodextrin and high molecular weight poly(ethylene glycol)s in aqueous solution**, *Polymer J.*, 26, 1019-1026.
- [149] Li, J.; Li, X.; Zhou, Z.; Ni, X.; Leong, K.W. (2001) **Formation of supramolecular hydrogels induced by inclusion complexation between pluronics and α -cyclodextrin**, *Macromolecules*, 34, 7236-7237.
- [150] Li, J.; Ni, X.; Leong, K.W. (2003) **Injectable drug-delivery systems based on supramolecular hydrogels formed by poly(ethylene oxide)s and α -cyclodextrin**, *J. Biomed. Mater. Res.*, 65A, 196-202
- [151] Huh, K.M.; Ooya, T.; Lee, W.K.; Sasaki, S.; Kwon, I.C.; Jeong, S.Y.; Yui, N. (2001) **Supramolecular-structured hydrogels showing a reversible phase transition by inclusion complexation between poly(ethylene)glycol grafted dextran and α -cyclodextrin**, *Macromolecules*, 34, 8657-8662.
- [152] Huh, K.M.; Cho, Y.W.; Chung, H.; Kwon, I.C.; Jeong, S.Y.; Ooya, T.; Lee, W.K.; Sasaki, S.; Yui, N. (2004) **Supramolecular hydrogel formation based on inclusion complexation between poly(ethylene glycol)-modified chitosan and α -cyclodextrin**, *Macromol. Biosci.*, 4, 92-99.
- [153] Nakama, T.; Ooya, T.; Yui, N. (2004) **Gelation rate modulation of an α -cyclodextrin and poly(ethylene glycol)-grafted hyaluronic acid solution system by inclusion complexation of a microphase-separated structure**, *Macromol. Rapid Commun.*, 25, 739-742.
- [154] Choi, H.K.; Kontani, K.; Huh, K.M.; Sasaki, S.; Ooya, T.; Lee, W.K.; Yui, N. (2002) **Rapid induction of thermoreversible hydrogel formation based on poly(propylene glycol)-grafted dextran inclusion complexes**, *Macromol. Biosci.*, 2, 298-303.
- [155] Hongliang, W.; Jiyu, H.; Ling-gang, S.; Kaiqiang, Z.; Zeng-guo, F. (2005) **Gel formation and photopolymerization during supramolecular self-assemblies of α -CDs with LA-PEG-LA copolymer end-capped with methacryloyl groups**, *Eur. Polym. J.*, 41, 948-957.
- [156] Choi, H. S.; Ooya, T.; Sasaki, S.; Yui, N. (2003) **Control of rapid phase transition induced by supramolecular complexation of β -cyclodextrin-conjugated poly(ϵ -lysine) with a specific guest**, *Macromolecules*, 36, 5342-5347.
- [157] Choi, H.S.; Huh, K.M.; Ooya, T.; Yui, N. (2003) **pH- and thermosensitive supramolecular assembling system: rapidly responsive properties of β -cyclodextrin-conjugated poly- ϵ -lysine**, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 6350-6351.

- [158] Auzély-Velty, R.; Rinaudo, M. (2002) **New supramolecular assemblies of a cyclodextrin-grafted chitosan through specific complexation**, *Macromolecules*, 35, 7955-7962.
- [159] Charlot, A.; Auzély-Velty, R.; Rinaudo, M. (2003) **Specific interactions in model charged polysaccharide systems**, *J. Phys. Chem. B*, 107, 8248-8254.
- [160] Soltés, L.; Mendichi, R.; Machova, E.; Steiner, B.; Alföldi, J.; Sasinkova, V.; Bystricky, S.; Balog, K. (1999) **Cyclodextrin derivative of hyaluronan**, *Carbohydr. Polym.*, 39, 17-24.
- [161] Soltés, L.; Mendichi, R. (2003) **Molecular characterization of two host-guest associating hyaluronan derivatives**, *Biomed. Chromatogr.*, 17, 376-384.
- [162] Meyer, K.; Paler, J.W. (1934) **The polysaccharide of the vitreous humor**, *J. Biol. Chem.*, 107, 629.
- [163] Weissmann, B.; Meyer, K. (1952) **Structure of hyaluronic acid. The glucuronic linkage**, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 4729.
- [164] Jeanloz, R.; Flowers, H. (1962) **The Isolation and synthesis of the methyl ester-methyl α -glycoside of 3-O- β -D-glucuronosyl-N-acetyl-D-glucosamine (hyalobiuronic acid)**, *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 3030.
- [165] Winter, W.T.; Smith, P.J.C.; Arnott, S. (1975) **Hyaluronic acid: structure of a fully extended 3-fold helical sodium salt and comparison with the less extended 4-fold helical forms**, *J. Mol. Biol.*, 99, 219-235.
- [166] Hirano, S.; Kondo, S. (1973) **Molecular conformational transition of hyaluronic acid in solution**, *J. Biochem.*, 74, 861-862.
- [167] Hirano, S.; Kondo-Ikeda, S. (1974) **Molecular conformation of polysaccharides in solution. Changes in the optical rotation and in the elution pattern of gel filtration**, *Biopolymers*, 13, 1357-1366.
- [168] Scott, J.E.; Tigwell, M.J. (1978) **Periodate oxidation and the shapes of glycosaminoglycuronans in solution**, *Biochem. J.*, 173, 103-114.
- [169] Scott, J.E.; Heatley, F.; Hull, W.E. (1984) **Secondary structure of hyaluronate in solution. A ^1H -n.m.r. investigation at 300 and 500 MHz in $[\text{2H}_6]$ dimethyl sulfoxide solution**, *Biochem. J.*, 220, 197-205.
- [170] Cowman, M.K.; Cozart, D.; Nakanishi, K.; Balazs, E.A. (1984) **^1H NMR of glycosaminoglycans and hyaluronic acid oligosaccharides in aqueous solution: the amide proton environment**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 230, 203-212.
- [171] Heatley, F.; Scott, J.E. (1988) **A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan**, *Biochem. J.*, 254, 489-493.

- [172] Haxaire, K.; Maréchal, Y.; Milas, M.; Rinaudo, M. (2003) **Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. I.Preliminary experiments and bands assignments**, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 72, 10-20.
- [173] Haxaire, K.; Maréchal, Y.; Milas, M.; Rinaudo, M. (2003) **Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. II.Definition and quantitative analysis of elementary hydration spectra and water uptake**, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 72, 149-161.
- [174] Maréchal, Y.; Milas, M.; Rinaudo, M. (2003) **Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry.III. Structure and mechanism of hydration**, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 72, 162-173.
- [175] Haxaire, K. (2000) Thesis, **Conformation du hyaluronane et interactions en solution à l'état solide**, Université Joseph Fourier, Grenoble, France
- [176] Almond, A.; Sheehan, J.K.; Brass, A. (1997) **Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution**, *Glycobiology*, 7, 597-604.
- [177] Almond, A.; Brass, A.; Sheehan, J.K. (1998) **Dynamic exchange between stabilized conformations predicted for hyaluronan tetrasaccharides: comparison of molecular dynamics simulations with available NMR data**, *Glycobiology*, 8, 973-980.
- [178] Almond, A., Brass, A.; Sheehan, J.K. (2000) **Oligosaccharides as model systems for understanding water-biopolymer interaction: hydrated dynamics of a hyaluronan decamer**, *J. Phys. Chem. B*, 104, 5634-5640.
- [179] Kennedy, J.F.; Philipps, G.O.; Williams, P.A., Hascall, V.C. (2002) **Hyaluronan**, volume 1, Woodhead Publishing Ltd, Abington, England, 37-47.
- [180] Schmitz, K.S. (1994) **Macron-Ion characterization**, *ACS symposium 548*, Washington, DC, 297-314.
- [181] Haxaire, K.; Braccini, I.; Milas, M.; Rinaudo, M.; Pérez, S. (2000) **Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modelling**, *Glycobiology*, 10, 587-594.
- [182] Fouissac, E.; Milas, M.; Rinaudo, M.; Borsali, R. (1992) **Influence of the ionic strength on the dimensions of sodium hyaluronate**, *Macromolecules*, 25, 5613-5617.
- [183] Rinaudo, M.; Milas, M.; Jouon, N.; Borsali, R. (1993) **On some original properties of dilute polyelectrolyte solutions at low salt content: sodium hyaluronate example**, *Polymer*, 34, 3710-3715.
- [184] Roure I.; Rinaudo, M.; Milas, M. (1996) **Viscometric behavior of dilute polyelectrolytes. Role of electrostatic interactions**, *Ber. Busenges.*, 100, 703-706.

- [185] Fouissac, E. (1992) Thesis, **Contribution à l'obtention d'acide hyaluronique par voie fermentaire et étude de ses propriétés physico-chimiques**, Université Joseph Fourier, Grenoble, France
- [186] Roure, I. (1997) Thesis, **Rhéologie et dimensions des chaînes de hyaluronane en solution**, Université Joseph Fourier, Grenoble, France
- [187] Gibbs, D.A.; Merrill, E.W.; Smith, K. (1968) **Rheology of hyaluronic acid**, *Biopolymers*, 6, 777-791.
- [188] Balazs, E.A.; Gibbs, D.A. (1970) **Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix**, Balazs, ed, Academic, London.
- [189] Yanaki, T.; Yamaguchi, T. (1990) **Temporary network formation of hyaluronate under a physiological condition. 1. Molecular-weight dependence**, *Biopolymers*, 30, 415-425.
- [190] Kobayashi, Y.; Okamoto, A.; Nishinari, K. (1994) **Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights**, *Biorheology*, 31, 235-244.
- [191] Pisarcik, M.; Bakos, D.; Ceppan, M. (1995) **Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution**, *Colloid. Surface. A*, 97, 197-202.
- [192] Fouissac, E.; Milas, M.; Rinaudo, M. (1993) **Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte**, *Macromolecules*, 26, 6945-6951.
- [193] Band, P. (1985) **Effective use of hyaluronic acid**, *Drug and cosmetic industry*, 54-57.
- [194] Asari, A.; Miyauchi, S. Medical applications of hyaluronan, <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA12/HA12E.html>.
- [195] King, S.R.; Hickerson, W.L.; Proctor, K.G. (1991), **Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing**, *Surgery*, 109, 76-84.
- [196] Burd, D.A.; Greco, R. M.; Regauer, S.; Longaker, M.T.; Siebert, J.W.; Garg, H.G. (1991) **Hyaluronan and wound healing: a new perspective**, *J. Plast. Surg.*, 44, 579-584.
- [197] Larsen, N.E.; Balazs, E.A. (1991) **Drug delivery systems hyaluronan and its derivatives**, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 7, 279-293.
- [198] Drobnik, J. (1991) **Hyaluronan in drug delivery**, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 7, 295-308.
- [199] Goa, K.; Benfield, P. (1994) **Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical id in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing**, *Drugs*, 47, 536-566.
- [200] Lisegang, T.J. (1990) **Viscoelastic substances in ophthalmology**, *Surv. Ophthalmol.*, 34, 268-293.

- [201] Balazs, E.A.; Denlinger, J.L. (1993) **Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis**, *J. Rheumatology*, 39, 3-9.
- [202] Luo, K.; Kirker, K.R.; Prestwich, G.D. (2000) **Cross-linked hyaluronic acid hydrogel film: new biomaterials for drug delivery**, *J. Control. Release*, 69, 169-184.
- [203] Pelletier, S.; Hubert, P.; Payan, E.; Marchal, P.; Choplin, L.; Dellacherie, E. (2001) **Amphiphilic derivatives of sodium alginate for cartilage repair: rheological properties**, *J. Biomed. Mat. Res.*, 54, 102-108.
- [204] Abatangelo, G.; Weigel, P.H. (2000) **New frontiers in medical sciences: redefining hyaluronan**, Elsevier science B.V., Amsterdam, The Netherland.

CHAPITRE II.

**SYNTHESE DES MOLECULES MODELES ET
DES ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES
A BASE DE HYALURONANE**

INTRODUCTION	72
I SYNTHÈSE DES POLYMERES HOTES ET INVITES DESTINES A LA PREPARATION DES ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES	74
I.1 Approche chimique envisagée	74
I.2 Fonctionnalisation du hyaluronane	76
I.2.1 Activation du hyaluronane par des groupements hydrazide réactifs.....	76
I.2.2 Caractérisation du dérivé HA-ADH.....	80
I.2.2.1 Résonance Magnétique Nucléaire.....	80
I.2.2.2 Dosage conductimétrique.....	82
I.3 Synthèse de dérivés monofonctionnalisés de la β-cyclodextrine	83
I.3.1 Oxydation de la β -CD par le réactif de Dess-Martin	83
I.3.2 Synthèse d'un dérivé de la β -CD monofonctionnalisé par une fonction acide carboxylique	87
I.3.3 Synthèse d'un dérivé monoaldéhydique protégé de la β -CD.....	88
I.3.4 Caractérisation structurale des dérivés de β -CD.....	89
I.3.4.1 Analyse structurale des composés par RMN.....	89
I.3.4.2 Analyse par spectrométrie de masse	92
I.4 Synthèse des dimères de β-CD et d'adamantane	94
I.4.1 Synthèse d'un dérivé carboné "biantenné" pour la synthèse des dimères de β -CD et d'adamantane.....	94
I.4.2 Obtention des dimères de β -CD et d'adamantane.....	99
I.4.2.1 Analyse structurale des composés par RMN.....	101
I.4.2.2 Analyse par spectrométrie de masse.....	103
I.5 Greffage des différents composés sur le hyaluronane : obtention des dérivés HA(CD), HA(AD), HA(CD)₂ et HA(AD)₂	105
I.5.1 Principe du greffage.....	105
I.5.2 Synthèse du HA porteur de monomères de β -CD, HA(CD) et du HA porteur de dimères de β -CD, HA(CD) ₂	106
I.5.3 Synthèse du HA porteur de monomères d'adamantane, HA(AD) et du HA porteur de dimères d'adamantane, HA(AD) ₂	111
II SYNTHÈSES DE MOLECULES MODELES POUR L'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE	117
II.1 Synthèse du sel de sodium de l'acétate d'adamantane	118
II.2 Synthèse de l'unité "biantennée" hydrosoluble à base d'adamantane	118
CONCLUSION	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123

Introduction

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre I, nous nous sommes proposés de développer de nouveaux types de gels physiques à base d'acide hyaluronique chimiquement modifié. Les jonctions labiles interchaînes contrôlent la stabilité de ces réseaux tridimensionnels. Les systèmes que nous avons envisagés reposent sur des interactions spécifiques entre des molécules hôtes et invitées greffées sur le hyaluronane. La molécule hôte utilisée est la β -cyclodextrine et la molécule invitée est l'adamantane puisque ces 2 molécules, comme il a été expliqué auparavant, forment des complexes d'inclusion avec une constante d'association élevée de $80\,000\text{ M}^{-1}$.

Nous nous sommes tout d'abord fixés comme objectif la synthèse de dérivés de hyaluronane possédant des monomères de β -CD greffés au hasard le long de la chaîne polymère et d'autres possédant des monomères d'adamantane. Moduler la structure chimique des molécules greffées peut nous permettre d'évaluer l'influence de l'énergie des jonctions sur la stabilité du réseau. Par conséquent, d'autres dérivés possédant des dimères de β -CD et des dimères d'adamantane greffés sur le polymère ont été synthétisés. La formation de complexes d'inclusion entre les dérivés d'adamantane et de β -CD greffés impliquant, soit des interactions monovalentes soit des interactions divalentes, devrait donc conduire à la formation d'hydrogels physiques.

La stratégie de synthèse envisagée pour accéder à ces dérivés originaux du hyaluronane a reposé sur:

- i. la fonctionnalisation du HA par des groupements hydrazide afin de le rendre "réactif" (figure II-1),
- ii. la synthèse de dérivés de la β -CD et de l'AD sous forme de monomère (figure II-2) et de dimère (figure II-3) puis,
- iii. le greffage de ces molécules hôtes et invitées sur le HA activé.

On entend par monomères et dimères, des dérivés mono- et bifonctionnalisés soit par des molécules d'adamantane, soit par des molécules de β -cyclodextrine. Ces appellations ne présentent aucun lien avec les termes communément employés en chimie des polymères.

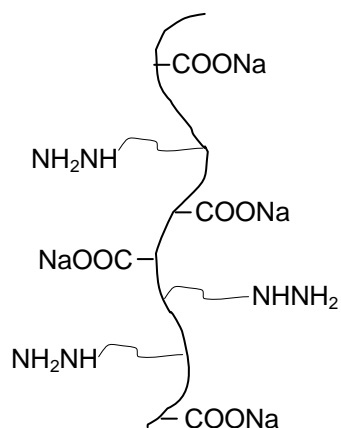


Figure II- 1 : Dérivé du HA porteur de groupements hydrazide

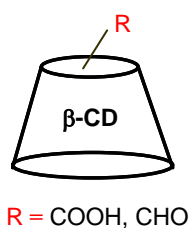


Figure II- 2 : β-CD monosubstituée par une fonction acide carboxylique ou par une fonction aldéhyde

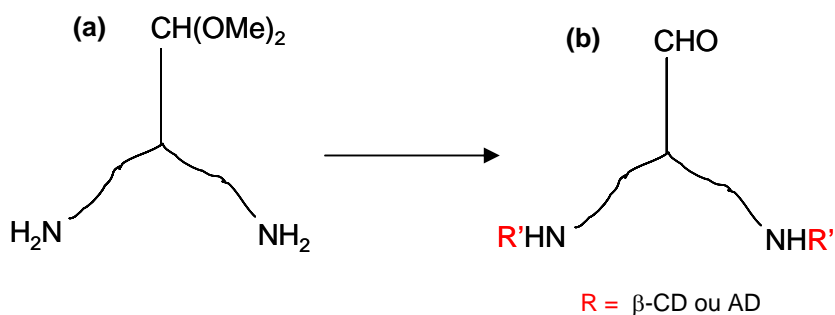


Figure II- 3 : Dérivé carboné “biantenné” intermédiaire (a) permettant l’obtention de dimères de β-CD et d’AD possédant une fonction aldéhyde (b)

La première partie est consacrée à la synthèse des différents polymères hôtes et invités. Nous y présentons tout d'abord l'approche chimique générale envisagée pour l'obtention des monomères et des dimères puis pour le greffage sur le polysaccharide. Nous exposons ensuite la synthèse d'un dérivé du HA porteur, au niveau de l'unité glucuronique, de groupements hydrazide réactifs. En effet, le HA initial s'avère très difficile à modifier de façon contrôlée. L'introduction de dérivés de la β -CD sur le HA et la synthèse des dimères de β -CD passent tous deux par la monofonctionnalisation de cet oligosaccharide. Dans un troisième point, nous présentons donc la voie de synthèse que nous avons utilisée pour introduire sélectivement une fonction acide carboxylique et une fonction aldéhyde sur la β -CD. Enfin, la synthèse des dimères de β -CD et d'AD et des polymères hôtes et invités est abordée.

Dans une deuxième partie, la synthèse de molécules modèles pour l'étude physico-chimique est décrite.

I Synthèse des polymères hôtes et invités destinés à la préparation des assemblages supramoléculaires

I.1 Approche chimique envisagée

La plupart des réactions que nous avons envisagées s'appuie sur la formation de liaisons stables et sont spécifiques. Ces méthodes de couplage chimiosélectives ("chemoselective ligation"), trouvent de nombreuses applications dans divers domaines [1,2]. Elles s'effectuent de manière efficace en milieu aqueux dans des conditions douces sans nécessiter d'étapes de protection/déprotection. Dans notre étude, nous nous sommes appuyés sur la formation de liaisons hydrazone et oxime.

Le greffage des monomères et des dimères de β -CD et d'adamantane sur le polymère s'appuie sur la haute réactivité aldéhyde/hydrazide [3]. En milieu acide, la fonction aldéhyde réagit de façon spécifique avec l'hydrazide pour donner des liaisons hydrazone. Beaucoup de travaux [4,5,6], reposent sur la formation de ce type de liaison. Il a été montré que la réaction conduisant à la formation d'hydrazones dépend du pH, du temps et n'est pas quantitative [7]. Il s'avère que cette réaction est réversible [7,8] et que l'hydrazone n'est pas stable en milieu acide puisqu'elle s'hydrolyse partiellement lorsque le pH est inférieur à 5. Nous avons donc choisi de stabiliser cette liaison hydrazone par une réduction [7,9] avec le cyanoborohydrure

de sodium pour donner l'hydrazide correspondant. Le principe de la réaction que nous allons mettre en oeuvre présente donc de grandes analogies avec les réactions d'amination réductrice [10,11]. Ce greffage, effectué dans des conditions douces en milieu aqueux homogène, n'entraîne aucune dégradation de la chaîne polymère. Les monomères et dimères de β -CD et d'adamantane, destinés à être couplés au polymère de cette façon, devront donc être fonctionnalisés par des fonctions aldéhyde. Quant au polymère, il sera fonctionnalisé, comme nous le verrons par la suite, par des groupements hydrazide le long de la chaîne.

L'obtention des monomères et des dimères de β -CD finaux passe par la fonctionnalisation de la β -CD par une fonction acide carboxylique. Cette modification de la β -CD s'appuie sur le couplage de la fonction aldéhyde présente à la surface de la cavité de β -CD avec une oxyamine, la *O*-(carboxyméthyl)hydroxylamine. En effet, les fonctions oxyamine (hydroxylamines ou alkoxyamines) sont de bons nucléophiles et sont très réactives vis-à-vis des groupements aldéhyde en milieu acide ce qui conduit à la formation de liaisons oxime [12-14]. Ce type de liaison est très stable en milieu acide ou neutre et commence à se dégrader à partir d'un pH de 9 [6,15]. La formation de la liaison oxime suscite un grand intérêt et a été utilisée dans divers domaines, en chimie des peptides [16], en particulier pour la synthèse de dendrimères [17], pour les conjugaisons peptides-oligonucléotides [13,18], peptides-sucres [19], sucres-oligonucléotides [20].

Par ailleurs, comme nous le verrons dans la suite du manuscrit, les monomères et les dimères de β -CD et d'AD sont obtenus *via* des couplages de type peptidique. Concernant les dimères d'AD, ces réactions sont effectuées en présence de triéthylamine et de deux réactifs de couplage, le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) [21] et le *N*-hydroxybenzotriazole (HOBT) [22]. L'attaque nucléophile de l'acide carboxylique sur la DCC conduit à une *O*-acyl-urée intermédiaire. L'attaque de l'amine primaire sur le carbonyle activé et un réarrangement conduisent à la formation de la liaison amide et à la libération de dicyclohexylurée (DCU), qui précipite et qui est éliminée par filtration. Ce mode de couplage peut conduire à une racémisation partielle et à des réactions secondaires, phénomènes qui peuvent être limités par l'addition d'un coagent : le HOBT [21,23]. Ce composé intervient surtout en tant que puissant nucléophile capable d'attaquer la *O*-acyl-urée pour donner un ester stable chiralement et beaucoup plus réactif. La présence d'une base, la triéthylamine, dans le milieu permet d'exacerber le caractère nucléophile de l'amine. Quant aux dérivés à base de β -CD [24], les réactifs de couplage sont le HOBT [22] et le diisopropylcarbodiimide (DIC). Le DIC est privilégié avec les dérivés de β -CD car la diisopropylurée (DIU), libérée pendant le couplage

peut être facilement éliminée par solubilisation dans l'acétone lors de l'étape de précipitation des dérivés de β -CD.

I.2 Fonctionnalisation du hyaluronane

I.2.1 Activation du hyaluronane par des groupements hydrazide réactifs

Le hyaluronane (1) présente plusieurs groupements fonctionnels susceptibles d'être modifiés chimiquement de façon sélective : les fonctions alcool primaire, acétamide et carboxylate (figure II-4). Néanmoins, les modifications chimiques sont très limitées en raison de la faible réactivité de ces groupements.

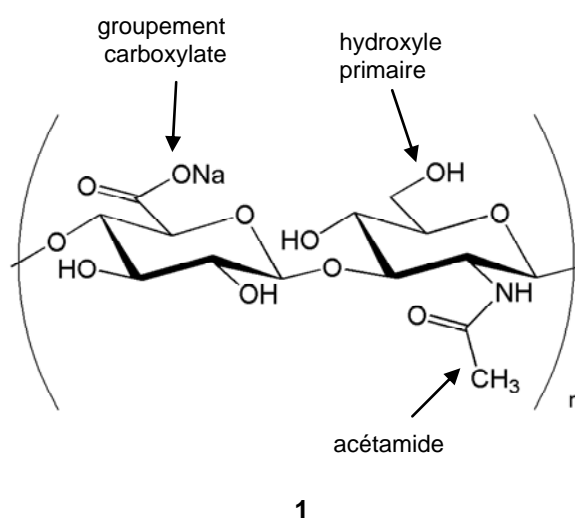


Figure II- 4 : Principaux sites pour la modification chimique sélective du hyaluronane

Dans notre étude, nous nous sommes fixés des critères afin de modifier le hyaluronane de façon contrôlée. Tout d'abord, la modification chimique doit être effectuée sur une position bien définie de l'unité disaccharidique et doit être non dégradante afin de ne modifier ni la conformation de la chaîne ni les propriétés du polymère en solution. Puis, afin d'obtenir une répartition des substituants le long de la chaîne la plus homogène possible et compte tenu des molécules complexes à greffer sur le polymère, il paraît essentiel d'effectuer la synthèse dans l'eau, bon solvant du polymère.

La fonction amine en position 2 de l'acide D-glucuronique résultant de la N-désacétylation de la fonction acétamide pourrait être une cible intéressante pour une

modification sélective mais les conditions expérimentales drastiques requises pour la *N*-désacétylation mènent à une dégradation très importante de la chaîne polymère [25,26].

La modification des hydroxyles secondaires n'est pas une approche adaptée puisque le traitement du HA par le periodate oxyde deux hydroxyles secondaires vicinaux, ce qui conduit à une ouverture du sucre et dénature alors la structure native du polysaccharide. Il est également possible d'oxyder la fonction hydroxyle primaire de l'unité *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) de façon sélective par la méthode TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy) [27] mais cette réaction mène à une dégradation de la chaîne polymère.

Concernant la fonction alcool primaire, une estérification sélective peut être obtenue en milieu organique (DMF) en présence de pyridine par le chlorure de palmitoyle (C₁₅H₃₁-CO-Cl) [28]. Cependant, ce dernier réagit également avec la fonction carboxylate du HA pour former un anhydride. Un traitement en milieu basique (NaOH 1M, pendant plusieurs heures) est alors nécessaire pour récupérer le groupement carboxylate. Une dégradation du polysaccharide peut donc être envisagée avec une diminution du degré de substitution par saponification. D'autre part, le HA, insoluble en milieu organique est mis en suspension dans le DMF ce qui implique que la réaction est effectuée en milieu hétérogène.

Une estérification sélective au niveau de la fonction carboxylate du hyaluronane a également été décrite en milieu organique [29,30]. Dans le but de rendre le hyaluronane soluble dans le solvant organique, son sel de tétrabutylammonium est préparé. Le carboxylate réagit alors avec un dérivé bromé pour donner une liaison ester *via* une substitution nucléophile. Cependant, on peut s'interroger sur l'homogénéité de la répartition des substituants le long de la chaîne dans la mesure où cette réaction est effectuée dans un mauvais solvant du polymère.

Il est bien connu que les réactions de couplage entre des groupements carboxylate et des amines en milieu aqueux en présence de 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) [31] comme agent de couplage hydrosoluble conduisent à la formation d'amides. Danishefsky et *coll.* [32], ont montré que le couplage du hyaluronane avec l'ester méthylique de la glycine *via* l'EDC conduit à la formation d'un amide. Cependant, certaines études ont montré que le couplage entre des amines primaires et le groupement carboxylate du HA (1) ne donne pas ou en très faible quantité l'amide attendu (5) (schéma II-1) [33-36]. Le produit obtenu largement majoritaire est le dérivé *N*-acyl-urée (4) [37,38] résultant du couplage covalent entre le HA et l'EDC (2). En milieu acide (pH = 4,75), l'EDC réagit très

rapidement avec le groupement carboxylate du HA pour donner un intermédiaire instable : la *O*-acyl-urée (3) [37]. Comme le montre le schéma II-1, cet intermédiaire instable se réarrange en un dérivé stable, la *N*-acyl-urée (4) et ne subit aucune attaque nucléophile de l'amine primaire qui pourrait mener à la formation de l'amide (5).

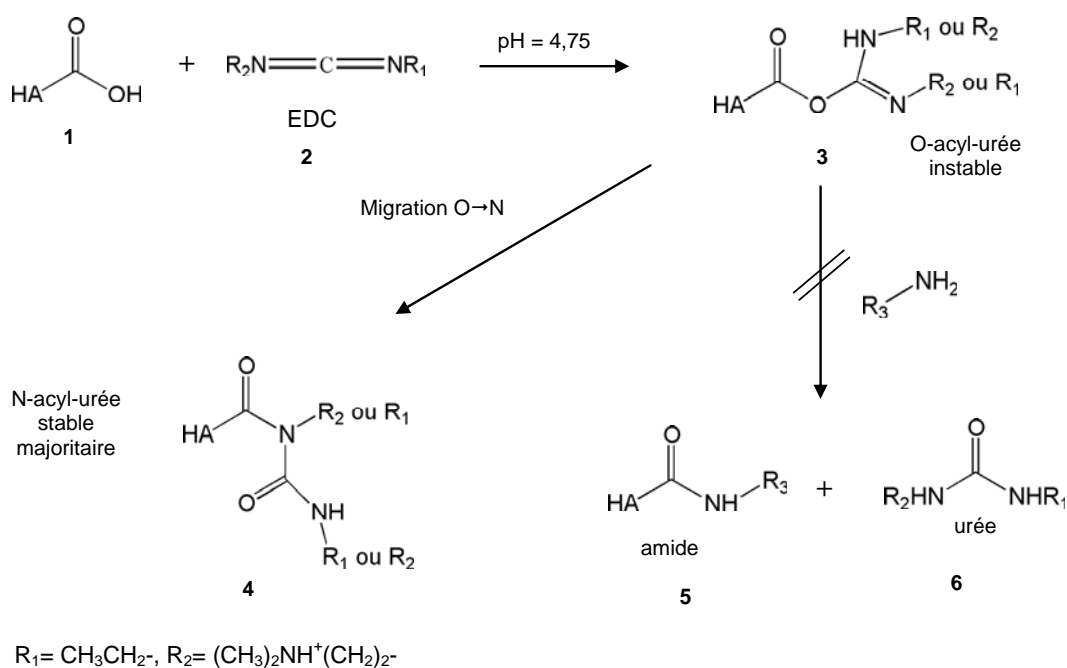


Schéma II- 1 : Produits obtenus et mécanisme de la réaction entre le HA et l'EDC en présence d'une amine

Afin de pallier ce problème de réactivité, Bulpitt et *coll.* [39], ont proposé l'utilisation conjointe d'HOBt ou de *N*-hydrosulfosuccinimide (NHS.SO₃Na) avec l'EDC de façon à éviter le réarrangement en *N*-acyl-urée par formation d'un ester intermédiaire activé plus réactif que le dérivé *O*-acyl-urée. Par cette méthode, ces auteurs ont synthétisé des dérivés du HA possédant des amines réactives le long de la chaîne. Néanmoins, cette approche ne nous paraît pas favorable car elle requiert un large excès d'amine (30 éq. molaires) en présence d'un excès d'EDC (4 éq. molaires) et d'un excès d'HOBt ou de NHS.SO₃Na (4 éq. molaires).

Par ailleurs, il a été montré que le HA peut réagir efficacement avec les groupements hydrazide [40,41] en présence d'un excès d'hydrazide et d'un léger excès d'EDC à pH 4,75,

sans formation de dérivé *N*-acyl-urée. Etant donné leurs faibles valeurs de pK_a (entre 2 et 4) dû à l'effet α , les hydrazides ont un caractère plus nucléophile que les amines à $pH = 4,75$ ce qui permet une attaque plus efficace mais également plus rapide de l'hydrazide sur l'intermédiaire *O*-acyl-urée [18,42]. L'utilisation de dihydrazides, notamment l'acide adipique dihydrazide (ADH) (7), permet donc d'obtenir un dérivé de HA porteur de groupements hydrazide (HA-ADH) (8) réactifs le long de la chaîne polymère (schéma II-2).

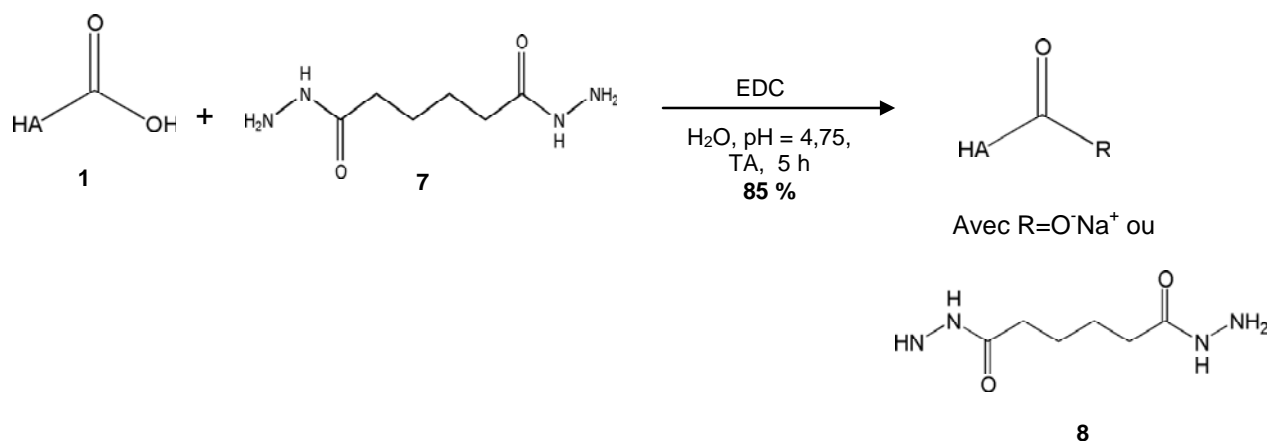


Schéma II- 2 : Synthèse du dérivé HA-ADH (8)

Contrairement aux méthodes décrites dans la littérature qui mènent à des dérivés HA-ADH avec des degrés de substitution (DS : le nombre de moles de substituant par unité disaccharidique) élevés ($10 \% < DS < 60 \%$), notre objectif est d'obtenir des échantillons à faibles DS ($5 \% < DS < 10\%$) [36,38,43]. De faibles valeurs de DS pour le HA-ADH permettent de maintenir les propriétés viscoélastiques observées avec le polysaccharide natif. Elles permettent également de conserver une densité de charge élevée sur la chaîne polymère, nécessaire à la solubilité du hyaluronane en milieu aqueux.

L'optimisation des conditions expérimentales de greffage de l'ADH avec un faible DS a été nécessaire. L'utilisation d'un large excès d'ADH (7) apparaît primordiale pour, d'une part, éviter les réticulations chimiques entre les chaînes macromoléculaires et, d'autre part, s'affranchir du réarrangement en *N*-acyl-urée. Après plusieurs essais, il ressort que le couplage nécessite 10 équ. molaires d'ADH (7) et 0,15 équ. molaires d'EDC pour obtenir un dérivé HA-ADH ayant un degré de substitution de 8 % c'est-à-dire 8 groupements dihydrazide en moyenne toutes les 100 unités disaccharidiques. L'EDC utilisé est en léger excès par

rapport au DS désiré (0,15 par rapport à 0,08) et s'avère être le réactif contrôlant le taux de greffage. Etant donné que l'on utilise un excès d'ADH, il serait difficile de greffer des molécules fonctionnalisées par des fonctions hydrazide car ce procédé nécessiterait d'importantes quantités de produit.

Nous avons donc mis au point les conditions optimales permettant l'obtention d'un dérivé du hyaluronane : le HA-ADH (**8**), possédant des groupements hydrazide greffés aléatoirement le long de la chaîne macromoléculaire. La réaction est totalement reproductible et il est désormais possible d'utiliser ces groupements hydrazide pendants pour former des hydrazones avec les fonctions aldéhyde. Ce composé a été caractérisé par RMN haute résolution et ses propriétés en solution seront présentées dans le chapitre III.

I.2.2 Caractérisation du dérivé HA-ADH

I.2.2.1 Résonance Magnétique Nucléaire

La structure du dérivé HA-ADH (**8**) a été confirmée par RMN. Le spectre RMN proton, enregistré à 353 K est présenté sur la figure II-5.

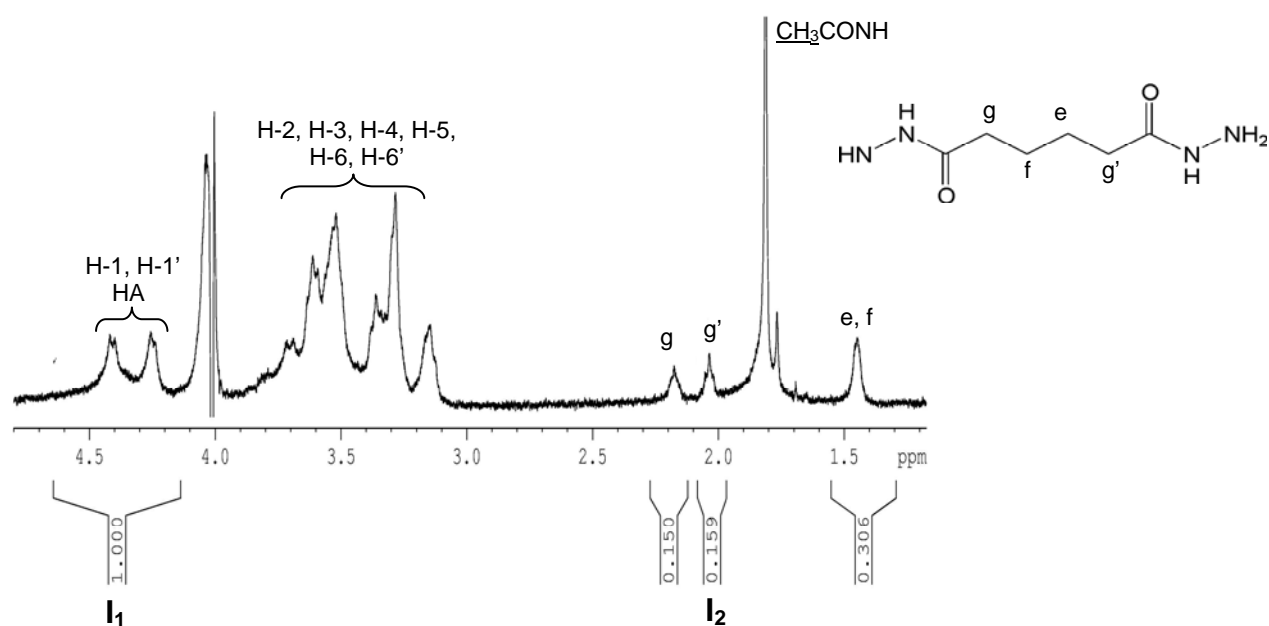


Figure II- 5 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, 353 K, D_2O , 6 mg/mL) du dérivé HA-ADH (8)

La valeur du DS a été déterminée par intégration des signaux des protons méthyléniques g, g' du groupement hydrazide avec comme référence interne les protons anomères du hyaluronane :

$$\text{DS} = I_2 / (2 \times I_1) = 0,159 / 2 = 0,08 \text{ soit } 8 \% \pm 1\%.$$

La RMN à une dimension ne montre pas la présence de réticulation chimique entre les chaînes macromoléculaires. En effet, l'intégration du signal caractéristique des 2 protons g est égale à celle correspondant aux 2 protons g'. Toutefois, il est important de tenir compte de la précision relative de la RMN évaluée approximativement à 5 %.

Par ailleurs, l'expérience de corrélation homonucléaire bidimensionnelle de type COSY effectuée sur le dérivé HA-ADH prouve que la modification chimique du hyaluronane par le bras dihydrazide est sélective. Le spectre COSY (figure II-6) montre deux taches de corrélation pour les couplages H-1'/H-2' et H-1/H-2 correspondant respectivement aux unités glucuronique modifiées et non modifiées tandis qu'une seule tache de corrélation est observée pour le couplage H-1/H-2 de l'unité *N*-acétyl-*D*-glucosamine.

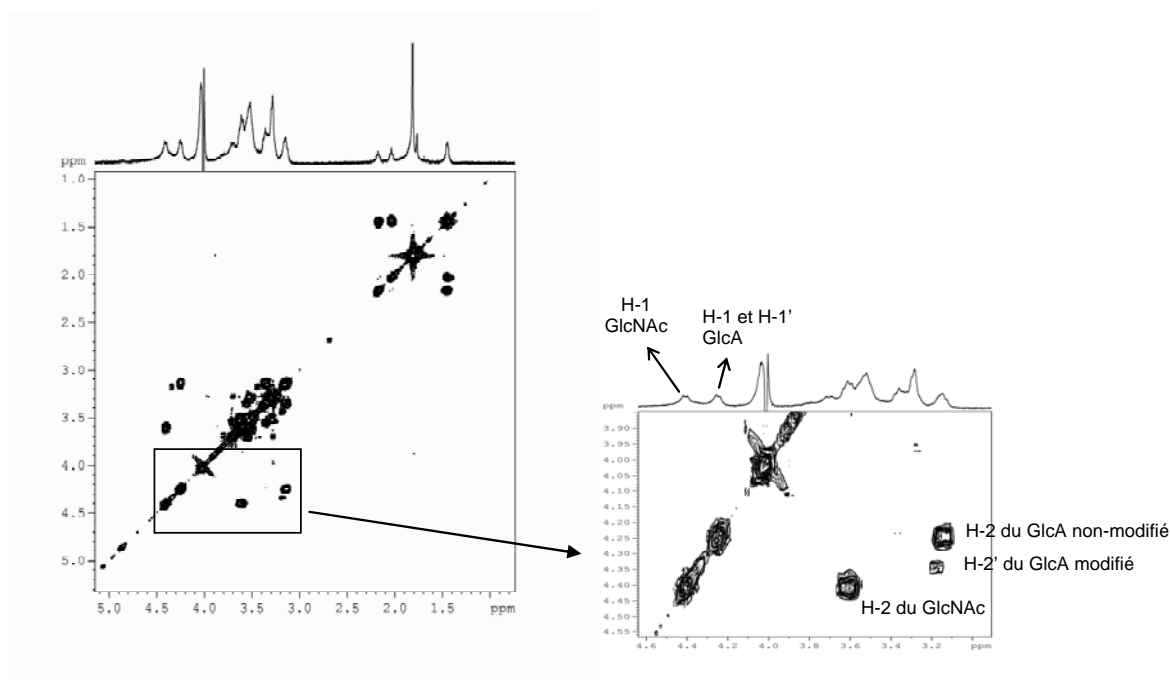


Figure II- 6 : Carte COSY (400 MHz, 353 K, D₂O, 20 mg/mL) du dérivé HA-ADH (8)

1.2.2.2 Dosage conductimétrique

Il est important de s'assurer du caractère non amphotère du dérivé HA-ADH. En effet, d'une part, l'ionisation des acides carboxyliques confère au hyaluronane un caractère de polybase et d'autre part, sous forme protonnée, les fonctions hydrazide greffées sur la chaîne polysaccharidique peuvent acquérir un caractère acide. Ainsi, le dérivé HA-ADH pourrait se comporter comme un ampholyte (à la fois base et acide). Ce caractère à la fois basique et acide impliqueraient la présence simultanée de charges négatives et positives sur le polymère modifié. En créant des interactions électrostatiques, l'apparition de ces charges de signes opposés aurait une influence sur les interactions intra- et interchaînes et donc sur les propriétés physico-chimiques du polymère en solution. Nous avons donc effectué un double dosage du dérivé HA-ADH (à pH = 7) suivi par mesure de la conductivité, en titrant ce dérivé préalablement avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium puis avec une solution d'acide chlorhydrique. Le dosage par NaOH ne met pas en évidence la présence de groupements protonnés NH_3^+ . Ces résultats sont cohérents puisqu'à pH = 7,5 (pH de la

solution de HA-ADH), les fonctions hydrazide sont sous forme NH_2 car leur pK_a est compris entre 2 et 4.

Ainsi, nous avons obtenu un dérivé du hyaluronane fonctionnalisé permettant l'introduction de divers greffons de manière efficace *via* les fonctions hydrazide pendantes.

I.3 Synthèse de dérivés monofonctionnalisés de la β -cyclodextrine

Comme évoqué au début de ce chapitre, nous avons cherché à mettre au point des conditions de synthèse efficaces de β -CDs monofonctionnalisées par des fonctions aldéhyde et acide permettant de réagir sélectivement avec le HA et avec l'unité carbonée "biantennée" schématisée sur la figure II-3 (a). Les CDs sont des molécules difficiles à monofonctionnaliser en raison du nombre élevé de groupements hydroxyle présents susceptibles de réagir de façon concomitante. L'obtention de dérivés de β -CD monofonctionnalisés est nécessaire afin d'éviter d'éventuelles réticulations chimiques lors du greffage sur le polysaccharide. En effet, des cyclodextrines bifonctionnalisées pourraient alors jouer le rôle d'agent réticulant entre les chaînes macromoléculaires provoquant ainsi une modification totale du comportement en milieu aqueux du polymère modifié. Les réactions décrites dans la littérature conduisent souvent à un mélange de produits difficiles à purifier.

Pour ce travail, de nouvelles méthodologies de synthèse de dérivés monomodifiés ont été recherchées, avec des rendements de synthèse, une pureté et des quantités de produits suffisants.

I.3.1 Oxydation de la β -CD par le réactif de Dess-Martin

Parce que le greffage des dérivés de β -CD sur le hyaluronane s'appuie sur la formation d'hydrazone, notre première stratégie a consisté à monofonctionnaliser la β -cyclodextrine par une fonction aldéhyde en position 6 pour obtenir le composé 6^I-formyl-6^I-désoxy-cyclomaltoheptaose (**13**).

Plusieurs méthodologies décrites dans la littérature, résumées sur le schéma II-3, conduisant au dérivé monoaldéhydrique de la β -CD (**13**), s'appuient sur l'utilisation du dérivé intermédiaire monotosylate (**10**) (le 6-*O*-*p*-toluènesulphonyl-cyclohexaamylose) [**44**].

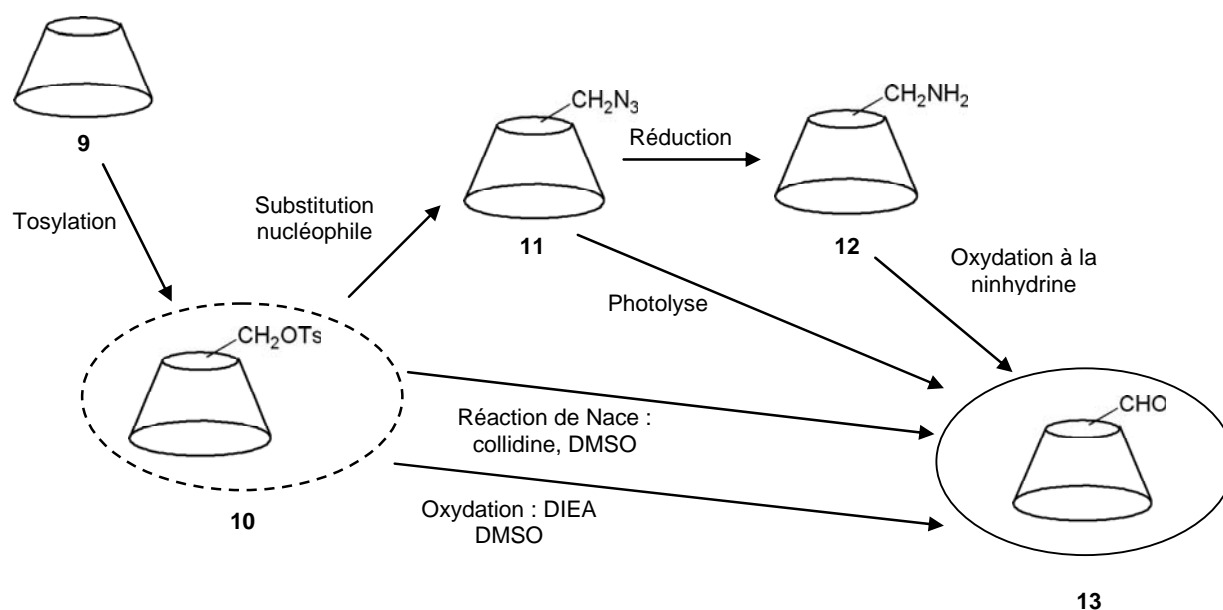


Schéma II- 3 : Réactions conduisant au dérivé monoaldéhydrique de la β-CD s'appuyant sur l'intermédiaire monotosylate

Martin et *coll.* [45], ont obtenu un dérivé aldéhydrique par la réaction de Nace [46,47] qui s'effectue en présence d'un excès de collidine dans le DMSO à une température très élevée de 135 °C. Le dérivé aldéhydrique de la CD peut être obtenu par photolyse [48] du dérivé monoazide (11) (6-azido-6-désoxy-cyclohexaamylose) issu de la substitution nucléophile du tosylate du dérivé (10) ou encore par oxydation à la ninhydrine [49] du dérivé monoamine (12) (6-amino-6-désoxy-cyclohexaamylose) issue de la réduction de l'azide (11). Toutefois, la photolyse de l'azide entraîne la formation d'amine en produit secondaire [50]. Huff et *coll.* ont synthétisé un dérivé monoaldéhydrique de la β-CD par une oxydation du dérivé monotosylate (10) dans le DMSO catalysée par la diisopropyléthylamine (DIEA) [51]. Néanmoins, cette étape est sensible à la β-élimination qui conduit à une ouverture du cycle oligosaccharidique de la β-CD.

Ces différentes méthodes d'obtention d'un dérivé monoaldéhydrique de la β-CD (13) nécessitent donc au minimum 2 étapes, voire 4, pour l'oxydation à la ninhydrine, puisqu'elles reposent toutes sur l'utilisation du dérivé monotosylate. Par ailleurs, ces réactions requièrent soit des températures élevées soit des temps de réaction relativement longs.

Une stratégie alternative repose sur l'oxydation directe de la β-CD par le réactif de Dess-Martin (Dess-Martin periodinane (DMP)) [52,53]. La DMP est un agent utilisé pour la

conversion efficace d'alcools primaires et secondaires en aldéhydes et cétones à 25 °C. L'oxydation avec la DMP a l'avantage de ne nécessiter ni de longs temps de réaction ni de large excès d'oxydant. D'après la littérature, il est possible d'obtenir un dérivé monoaldéhydique de β -CD (**14**) avec un rendement tout à fait satisfaisant [54] en présence de deux équivalents de DMP dans le DMSO pendant une heure.

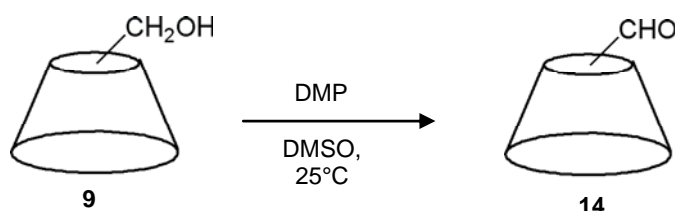


Schéma II- 4 : Oxydation de la β -CD naturelle par le réactif de Dess-Martin conduisant à un dérivé monoaldéhydique de la cyclodextrine

Nous avons appliqué ces conditions expérimentales simples nécessitant une seule étape, pour l'oxydation de la β -CD. Contrairement aux résultats rapportés dans la littérature, il s'avère que la caractérisation structurale du produit brut par spectrométrie de masse (figure II- 7) révèle la présence de dérivés mono-, di- et trialdéhydiques .

De plus, la β -CD initiale non oxydée est présente en quantité non négligeable dans le milieu réactionnel.

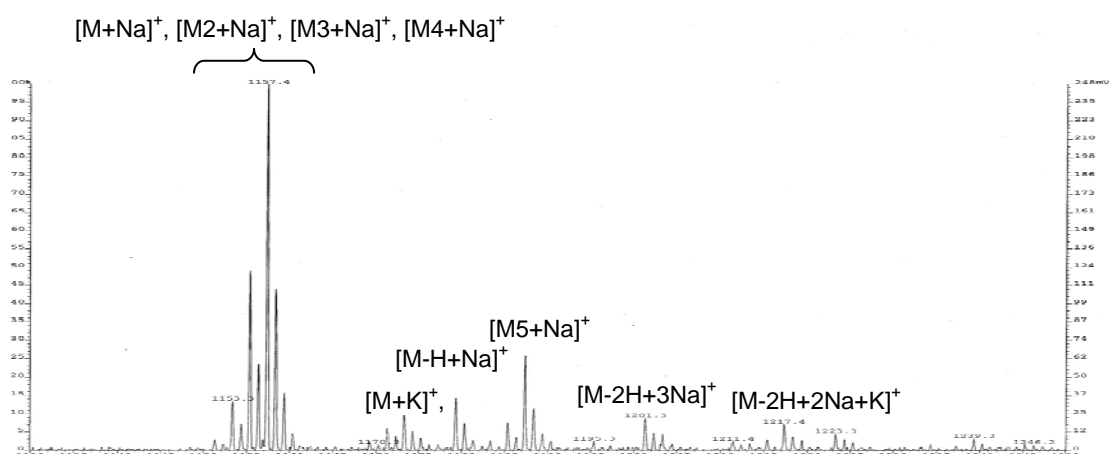


Figure II- 7: Spectre de masse basse résolution ESI en mode positif du produit brut solubilisé dans $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ issu de l'oxydation de la β -CD avec les conditions décrites dans la littérature

Le composé majoritaire à $[M+Na]^+$ m/z 1157, correspond à la β -cyclodextrine native. La β -cyclodextrine monoaldéhyde est observée à $[M2+Na]^+$ m/z 1155 avec une intensité relative de l'ordre de 50 % par rapport à celle de la β -CD native. On observe également avec des intensités relatives décroissantes les β -cyclodextrines comportant respectivement 2 et 3 groupements aldéhyde à m/z 1153 $[M3+Na]^+$ et m/z 1151 $[M4+Na]^+$. Le composé $[M5+Na]^+$ à m/z 1187 peut correspondre à un second aldéhyde sur la β -CD ouverte.

Etant donné que le taux d'oxydation est contrôlé par la quantité d'agent oxydant (DMP), le temps de réaction ou la température [55], nous avons choisi d'optimiser la réaction en faisant varier la quantité d'agent oxydant et le temps en vue d'orienter la sélectivité de la réaction vers la formation du dérivé monoaldéhydique de la β -CD. Malheureusement, ces tentatives n'ont pas été fructueuses comme le montre le tableau II-1.

Expériences	DMP/ β -CD	β -CD %	β -CD monoaldéhyde %	β -CD dialdéhyde %	β -CD trialdéhyde %
1	0,9	86	12,5	1,5	-
2	1,2	55	29	11	5
3	2	34	35	19.5	11.5

Tableau II- 1: Pourcentages molaires de β -CD initiale, de dérivés mono-, di-, et trialdéhydiques calculés à partir des spectres de masse en fonction du rapport molaire initiale DMP/(β -CD) ; réactions effectuées dans le DMSO anhydre pendant 45 minutes à température ambiante

Les pourcentages présentés dans le tableau ont été calculés par comparaison de l'intensité des pics des spectres de masse. Bien que la spectrométrie de masse ne soit pas quantitative, nous pouvons faire l'hypothèse dans ce cas que la présence de 1, 2 ou 3 fonctions aldéhyde greffées sur la β -CD ne modifient pas fondamentalement les propriétés d'ionisation. La purification du dérivé monoaldéhydique par HPLC en phase inverse paraît être une étape limitante dans la mesure où notre objectif est d'obtenir un polymère possédant des cavités de β -CD le long de la chaîne à l'échelle de plusieurs grammes. En effet, la β -CD peut interagir avec les chaînes aliphatiques de la phase inverse, la purification par HPLC ne semble donc pas la meilleure méthode pour une séparation correcte et efficace des différents dérivés.

En revanche, puisque la présence de groupements chargés sur des oligosaccharides augmente de façon significative leurs volumes hydrodynamiques, la fonctionnalisation des aldéhydes en acides carboxyliques correspondants semble une stratégie intéressante pour séparer les différents composés par chromatographie d'exclusion stérique à une échelle préparative. Nous avons donc cherché à introduire une fonction acide carboxylique sur la β -CD modifiée.

1.3.2 Synthèse d'un dérivé de la β -CD monofonctionnalisé par une fonction acide carboxylique

Comme nous l'avons précisé au début de ce chapitre, l'introduction de la fonction acide carboxylique sur la cavité de β -CD repose sur la formation d'une liaison oxime. La synthèse du dérivé 6¹-(*O*-carboxyméthoxy-imino)-6¹-désoxy-cyclomaltoheptaose (**16**) (avec $n = 1$), que nous nommerons dans la suite β -CD monoacide, s'appuie sur le couplage des différents dérivés aldéhydiques de la β -CD (**14'**) (obtenus selon les conditions de l'expérience 2 du tableau II-1) avec de la *O*-(carboxyméthyl)hydroxylamine (**15**) en milieu aqueux à pH = 4,8, valeur supérieure au pK_a de l'oxyamine ($pK_a \sim 4,5$) (schéma II-5).

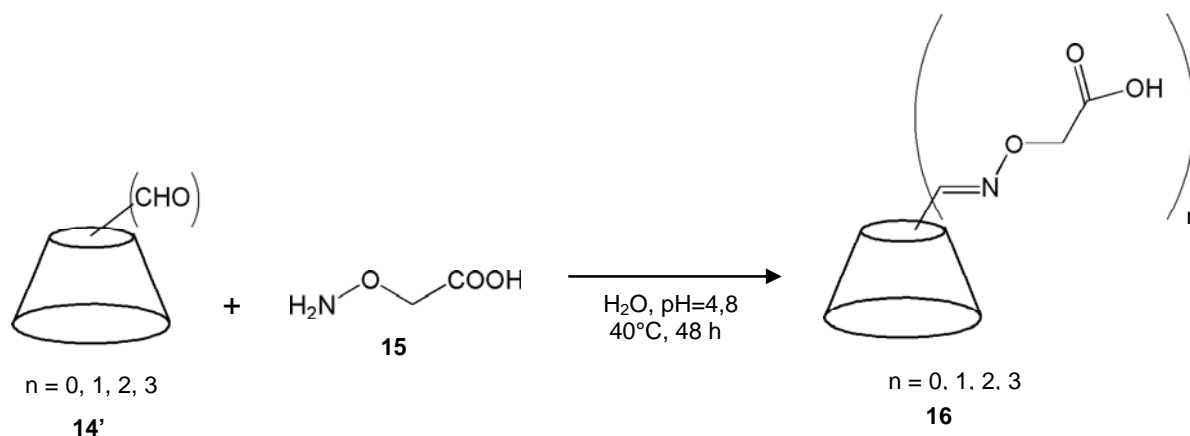


Schéma II- 5: Synthèse de la 6¹-(*O*-carboxyméthoxy-imino)-6¹-désoxy-cyclomaltoheptaose ou β -CD monoacide ((**16**) avec $n=1$)

Le milieu réactionnel est agité durant 48 heures à 40°C, température qui améliore la solubilité dans l'eau de la β -CD oxydée (**14**).

Comme le montre la figure II-8, les différents dérivés obtenus (mono, di, tri et initial) ont été séparés de façon efficace par chromatographie d'exclusion stérique, par élution avec NaNO_3 0,05 M sur un gel poreux de type Biogel P4.

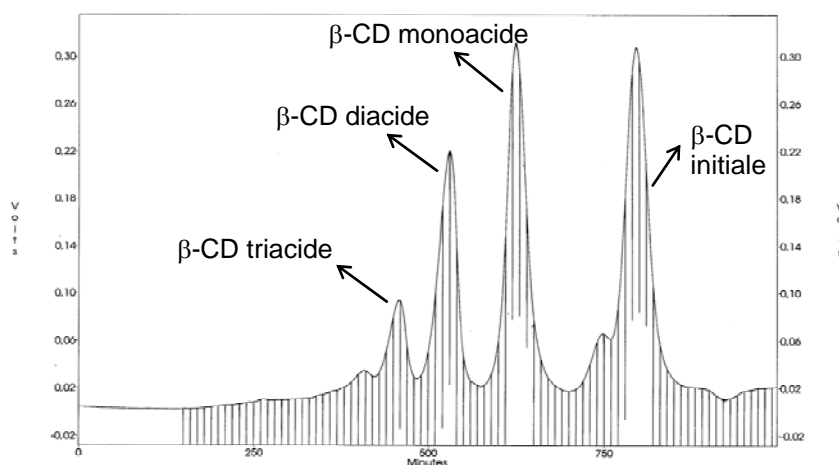


Figure II- 8: Chromatogramme d'exclusion stérique du produit brut issu du couplage entre la β -CD oxydée par la DMP et la *O*-(carboxyméthyl)hydroxylamine ; (éluant : NaNO_3 , 0,05 M)

Les différents produits sont séparés selon leur volume hydrodynamique respectif.

Les proportions massiques de la β -CD initiale, de β -CD mono, di et tri acide, calculées par comparaison de l'aire des différents pics du chromatogramme (figure II-8) sont respectivement de 40, 29, 22, 7 et sont en assez bon accord avec les résultats trouvés par spectrométrie de masse (tableau II-1). A ce stade de la synthèse, il serait possible de greffer la β -CD monoacide (**16**) sur le HA-ADH (**8**) via un couplage de type peptidique entre les fonctions hydrazide du HA-ADH et l'acide carboxylique de la β -CD monoacide. Nous avons donc tenté de coupler la β -CD monoacide (**16**) au HA-ADH (**8**). Pour se faire, la β -CD monoacide est préalablement activée sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimide [**56**] via la DCC. Néanmoins, ces essais n'ont pas été concluants puisque les dérivés de HA que nous avons obtenus sont très faiblement substitués (DS \sim 1 %) ce qui peut être dû, en partie, à l'hydrolyse partielle de l'ester intermédiaire [**57**] en milieu aqueux.

1.3.3 Synthèse d'un dérivé monoaldéhydique protégé de la β -CD

Ces tentatives non concluantes nous ont conduits à introduire une fonction aldéhyde sur la β -CD monoacide toujours dans l'optique de mettre à profit la haute réactivité entre un aldéhyde et une fonction hydrazide.

Dans cet objectif, nous avons fait réagir le β -CD monoacide avec la 2,2-diméthoxyéthylamine, disponible commercialement, en utilisant des conditions de couplage peptidique [58] en présence de HOBT [22] et de DIC (schéma II-6). Le β -CD modifiée est purifiée par précipitation dans l'acétone.

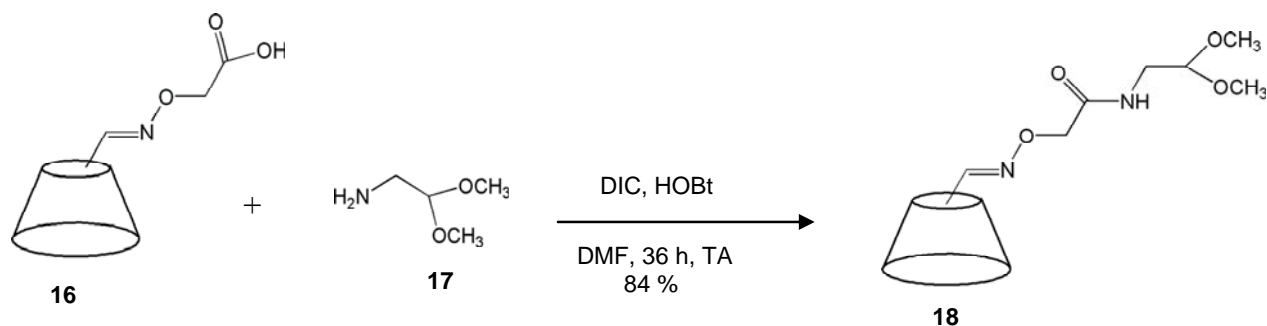


Schéma II- 6 : Synthèse de 6¹-[O-((N-(2,2 diméthoxyéthyl)-amidométhoxy)-imino)]-6¹-désoxy-cyclomaltoheptaose ou β -CD monoacétal (18)

Ainsi, on récupère une β -CD monofonctionnalisée par un aldéhyde protégé (18) : 6¹-[O-((N-(2,2diméthoxyéthyl)-amidométhoxy)-imino)-6¹-désoxy-cyclomaltoheptaose, que nous nommerons par la suite β -CD monoacétal, avec un très bon rendement de 84%.

La β -CD monoacétal a été caractérisée entièrement par RMN ¹H et ¹³C à une et deux dimensions et sa pureté a été vérifiée par spectrométrie de masse (ESI-MS).

I.3.4 Caractérisation structurale des dérivés de β -CD

Afin de caractériser la structure de chacun des dérivés de la β -CD (16) et (18) synthétisés, nous avons eu recours à des expériences de RMN proton ¹H et carbone ¹³C, mono et bidimensionnelles. Une étude par spectrométrie de masse haute résolution a également été effectuée.

I.3.4.1 Analyse structurale des composés par RMN

Dans un premier temps, les spectres proton et carbone à une dimension de la β -CD monoacide (16) et de la β -CD monoacétal (18) ont été mesurés dans D₂O. Toutefois, la RMN à une dimension ne suffit pas pour attribuer tous les protons et les nombreux signaux ¹³C. De plus, il faut souligner que les protons des unités glucose de la partie cyclodextrine sont

inéquivalents en raison de la perte de symétrie de la β -CD provoquée par la monosubstitution. Ils ont donc tous un déplacement chimique différent.

Pour réaliser l'attribution des spectres RMN ^1H et ^{13}C des dérivés de β -CD, nous avons donc eu recours à la RMN bidimensionnelle. La stratégie générale employée a consisté à effectuer l'attribution des signaux proton et carbone par des expériences bidimensionnelles de type COSY, TOCSY et HMQC.

Celles-ci nous fournissent de précieuses informations sur les couplages scalaires entre protons (COSY, TOCSY) et entre protons et carbones (HMQC). L'illustration est faite sur l'exemple de la β -CD monoacétal (**18**).

1.3.4.1.1 Attribution du spectre proton de la β -CD monoacétal (**18**)

Sur le spectre RMN ^1H monodimensionnel du composé (**18**) présenté sur la figure II-9, enregistré à 298 K dans D_2O , certains signaux peuvent être facilement identifiés.

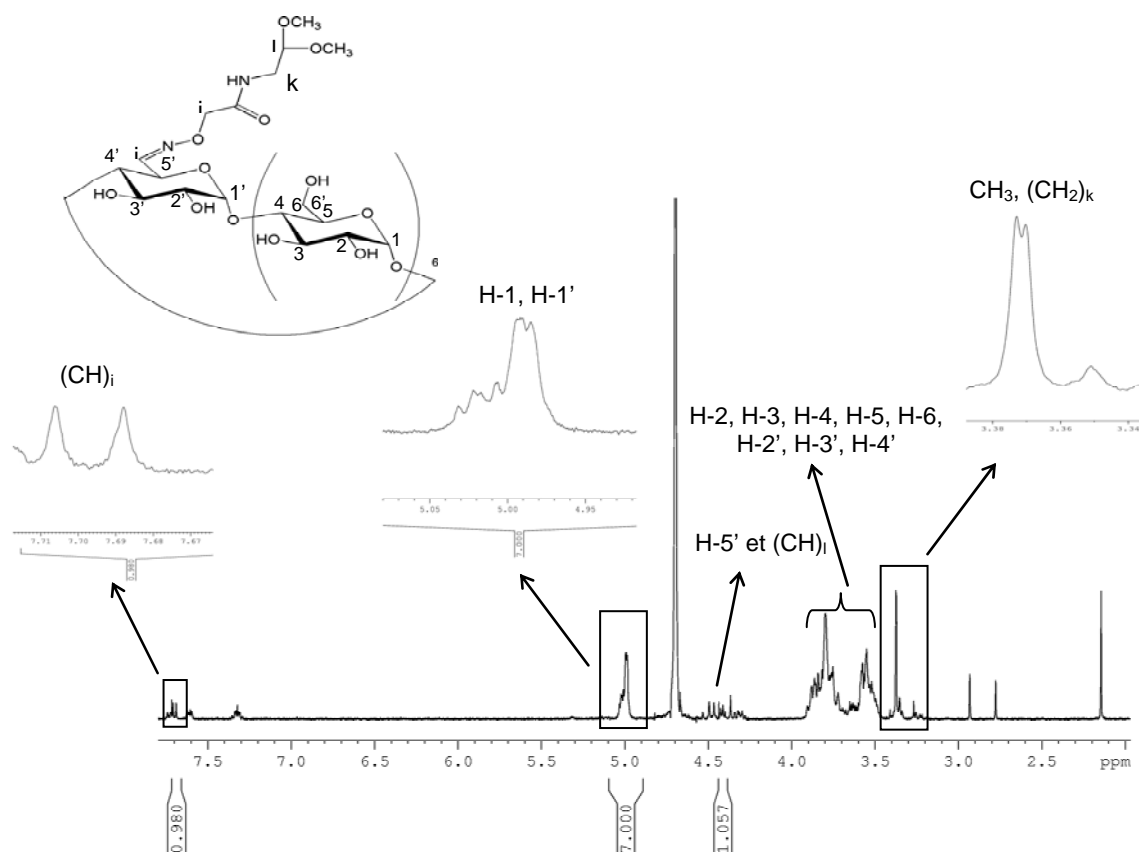


Figure II- 9: Spectre RMN ^1H (400 MHz, 298 K, D_2O , 6 mg/mL) de la β -CD monoacétal (**18**)

Les différentes expériences TOCSY et l'expérience COSY vont permettre d'attribuer les signaux des protons H-1 à H-6 portés par les unités glucose en prenant comme proton de départ le proton anomère H-1. Il est également possible d'attribuer les signaux des protons H-1' à H-6' portés par l'unité glucose monofonctionnalisée en prenant comme proton de départ le proton porté par l'alcène (H_i) facilement identifiable à 7,69 ppm (figure II-10).

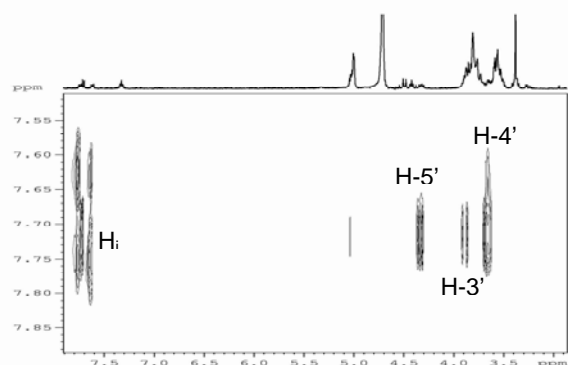


Figure II- 10: Agrandissement de la carte TOCSY (400 MHz, 298 K, D₂O, 20 mg/mL, t_m=100 ms) de la β-CD monoacétal (18)

1.3.4.1.2 Attribution de la carte 2D HMQC de la β-CD mono acétal (18)

La séquence HMQC (figure II-11) a été utilisée pour l'attribution complète des signaux ¹³C à partir des taches de corrélation hétéronucléaires via les couplages ¹J_{C-H}.

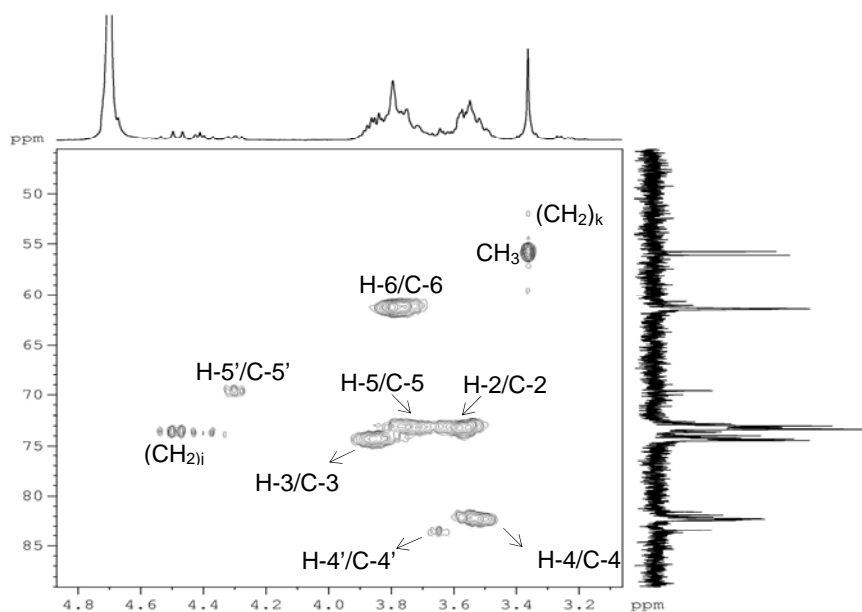


Figure II- 11 : Agrandissement de la carte HMQC de la β-CD monoacétal (100 MHz, 298 K, D₂O, 20 mg/mL)

Les mêmes expériences ont été effectuées avec la β -CD monoacide (**16**).

1.3.4.2 Analyse par spectrométrie de masse

Pour valider la structure des produits et évaluer leur pureté, nous avons également eu recours à la spectrométrie de masse basse et haute résolution.

Les spectres de masse de la β -CD monoacide et de la β -CD monoacétal purifiées ont été acquis à l'aide d'une source électrospray (Q-TOF). Les cations et les anions formés dans la source d'ionisation sont détectés grâce à un détecteur à temps de vol. Le spectre de masse basse résolution du composé (**18**) est présenté figure II-12 et indique uniquement la présence de la β -CD monoacétal correspondant au pic de $[M+Na]^+$ à m/z 1315,4.

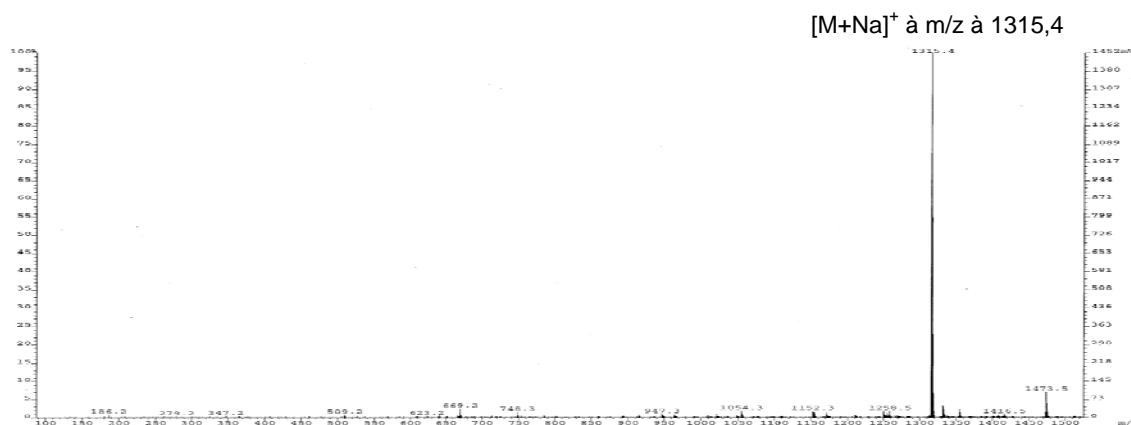


Figure II- 12 : Spectre de masse basse résolution ESI de la β -CD monoacétal dans CH_3OH/H_2O (1/1) avec détection en mode positif

Les amas isotopiques mesurés sur l'ion $[M+Na]^+$ de la β -CD monoacétal (**18**) (figure II-13 (a)) sont en accord avec les amas isotopiques théoriques (figure II-13 (b)), calculés à partir des formules brutes. Une mesure de masse exacte a été effectuée sur l'ion $[M+Na]^+$ avec une résolution de 6000 en utilisant le polyéthylèneglycol (PEG) comme étalon interne. La masse théorique est de 1315,4287 et la masse mesurée est 1315,4285.

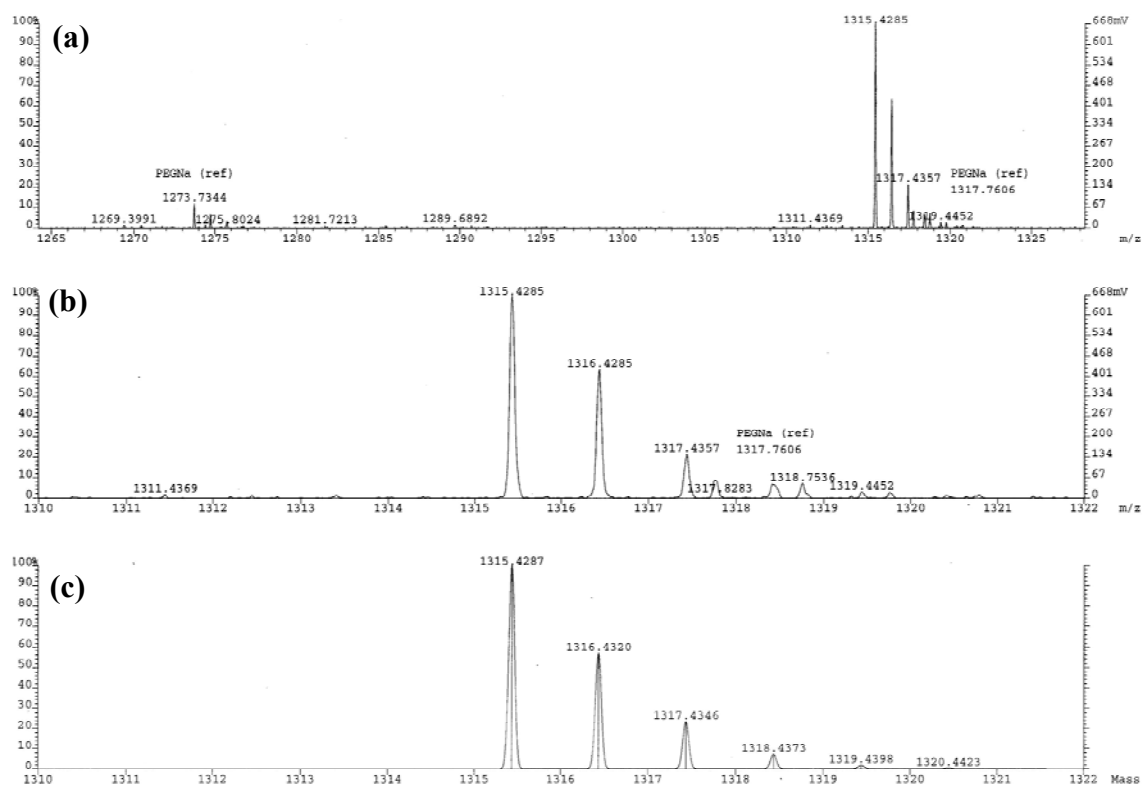


Figure II- 13: Amas isotopiques expérimentaux (a) et leur agrandissement (b), et amas isotopiques théoriques (c) de l'ion $[M+Na]^+$ de la β -CD monoacétal (18)

Toutes ces analyses confirment l'intégrité de la β -CD monoacétal (18). L'analyse RMN et les spectres de masse haute et basse résolution de la β -CD monoacide (16) non présentés ici confirment également sa structure et sa pureté.

Nous avons donc synthétisé deux dérivés monofonctionnalisés de la β -CD. La préparation de ces produits a été effectuée à l'échelle de plusieurs grammes. Chacun de ces produits a fait l'objet d'une caractérisation structurale par spectroscopie RMN 1H et ^{13}C mono et bidimensionnelle. Une analyse complémentaire par spectrométrie de masse a permis de confirmer la formule brute de ces dérivés et de contrôler leur pureté. Il sera dans un deuxième temps important de vérifier que les β -CDs modifiées conservent leurs propriétés d'inclusion.

I.4 . Synthèse des dimères de β -CD et d'adamantane

La stratégie que nous avons employée consiste à effectuer une synthèse commune pour les premiers intermédiaires conduisant à un dérivé carboné "biantenné" qui sera lors de la dernière étape fonctionnalisé soit par la β -CD monofonctionnalisée soit par l'adamantane comme le montre la figure II-14.

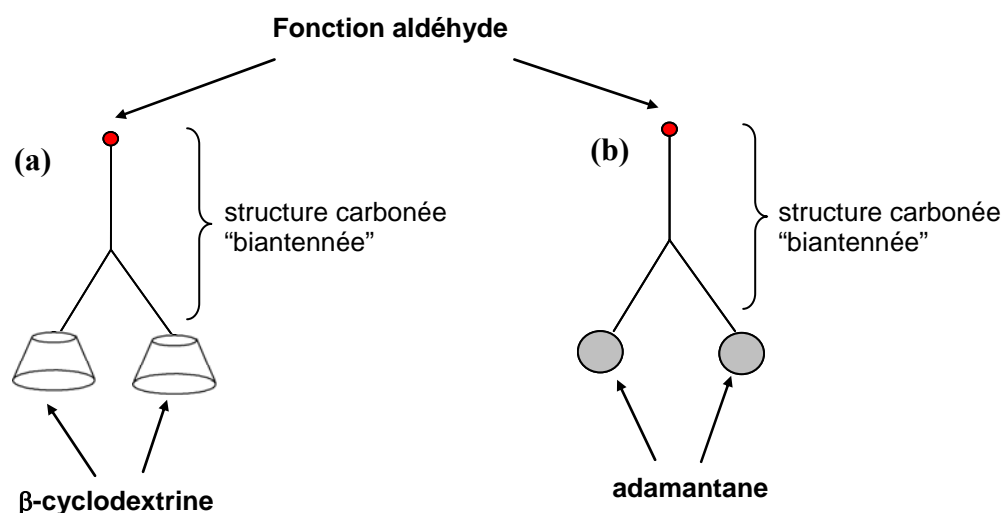
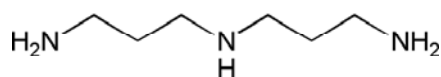


Figure II- 14 : Représentation schématique des dimères de β - cyclodextrine (a) et d'adamantane (b) ; les fonctions aldéhyde signalées sur (a) et (b) permettront le greffage covalent sur le polymère

I.4.1 Synthèse d'un dérivé carboné "biantenné" pour la synthèse des dimères de β -CD et d'adamantane

La synthèse du squelette carboné "biantenné" a été effectuée à partir de la bis(3-aminopropyl)amine (**19**) communément nommée norspermidine dont la structure est rappelée sur la figure II-15.



19

Figure II- 15 : Structure de la norspermidine

Pour les raisons expliquées au début du chapitre, notre choix s'est porté sur l'introduction d'une fonction aldéhyde sur l'amine secondaire. Les amines primaires sont utilisées pour introduire l'AD et la β -CD. Le squelette carboné "biantenné" est obtenu en 4 étapes et le schéma de synthèse est représenté sur le schéma II-7.

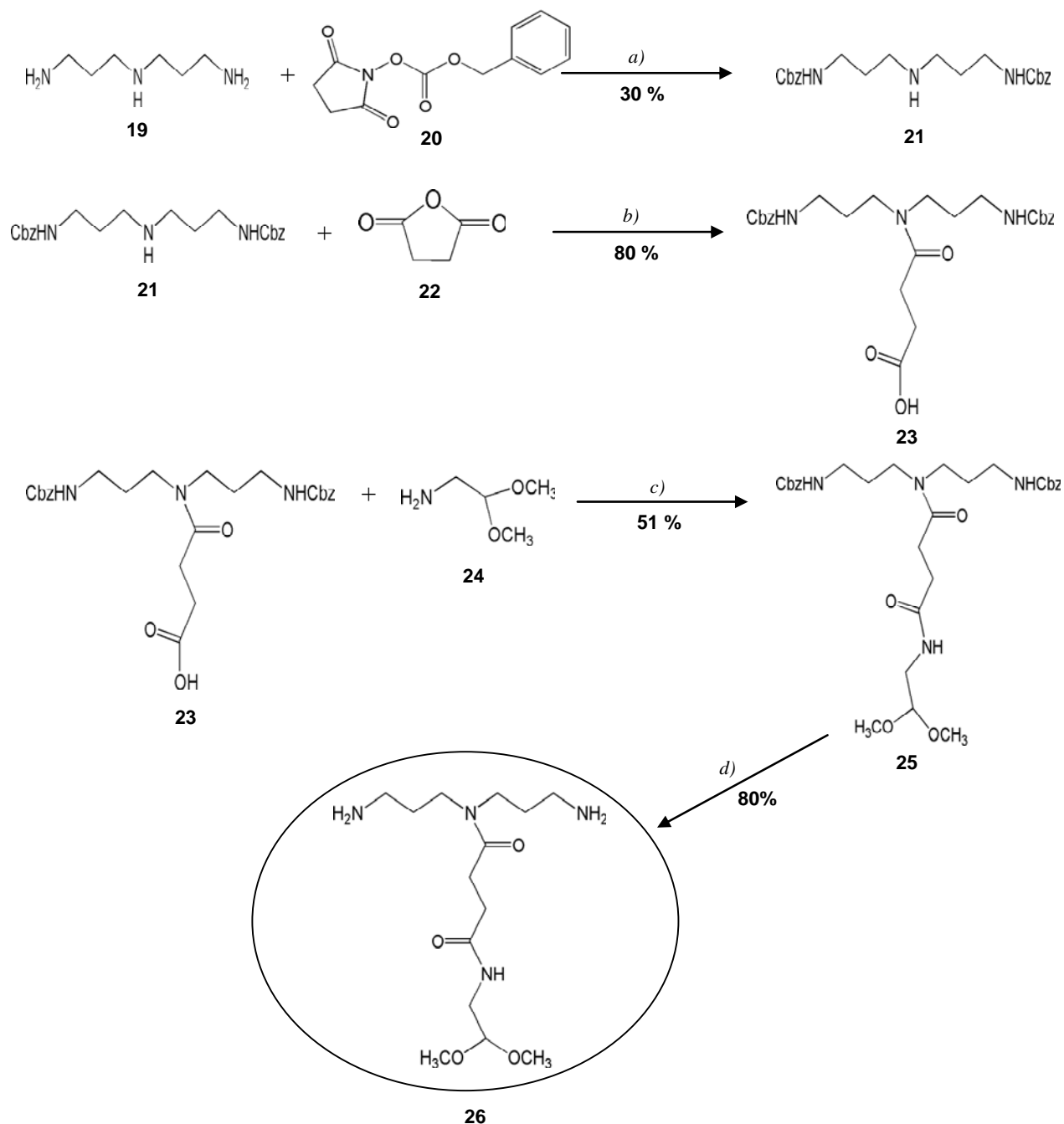


Schéma II- 7 : Préparation du squelette carboné " biantenné "
Conditions : a) CH_2Cl_2 , TA, 48h ; b) pyridine, CH_2Cl_2 , TA, 1h ; c) Et_3N , HOBt, DCC, DMF, TA, 48h ; d) Pd/C , H_2 , TA, 3h. Abréviations : Cbz, benzyloxycarbonyle

La modification sélective de la fonction amine secondaire de la norspermidine (**19**) nécessite une étape de protection des amines primaires. Les fonctions amine primaires sont protégées par des groupements benzyloxycarbone (Cbz) [59], relativement résistants à une grande variété de conditions expérimentales et ne nécessitant pas de conditions drastiques lors de la déprotection [60,61]. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice. Le rendement n'est pas satisfaisant (seulement 30 %) ce qui peut s'expliquer par la formation des composés tri- et mono- protégés et par la présence d'une fraction du composé initial.

Le composé (**23**) a été obtenu par réaction de la diamine protégée (**21**) avec l'anhydride succinique (**22**) [62] dans le dichlorométhane. L'attaque nucléophile de l'amine secondaire sur le carbone électrophile de l'anhydride succinique conduit à l'ouverture du cycle et à la formation d'un acide carboxylique. La présence de la pyridine dans le milieu permet d'exacerber la nucléophilie de l'amine secondaire ce qui favorise l'attaque sur le cycle. La réaction est très efficace puisqu'il suffit d'une heure pour obtenir un très bon rendement de 80 %. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice.

La fonction acide carboxylique provenant de l'ouverture du cycle de l'anhydride succinique offre la possibilité de créer des liaisons amide. Le composé (**25**) est donc obtenu par un couplage de type peptidique avec la 2,2-diméthoxyéthylamine (**24**), dans le DMF, en présence des deux réactifs de couplage, le DCC [21] et le HOBt [22] et de la triéthylamine. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice. Le rendement moyen de la réaction (51 %) est probablement lié à une perte partielle du produit, piégé dans le précipité de DCU formé lors de la réaction.

Les fonctions amine du composé (**25**) sont facilement déprotégées par une hydrogénolyse [60,61] dans le méthanol en présence d'une quantité catalytique de palladium sur charbon avec un rendement tout à fait satisfaisant de 80 %.

Le squelette carboné "biantenné" (**26**) et les composés intermédiaires (**21**, **23**, **25**) ont été entièrement caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C . Leur structure et leur pureté ont été confirmées par spectrométrie de masse basse et haute résolution.

Pour le composé (**23**), comme pour les composés (**25**) et (**26**), on observe un dédoublement des signaux RMN (figure II-17) caractéristiques des protons et des carbones des deux branches (a) et (a') (figure II-16).

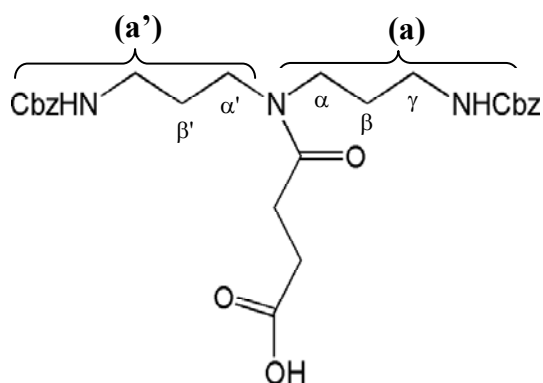


Figure II- 16: Inéquivalence magnétique des deux branches (a) et (a') du composé (23)

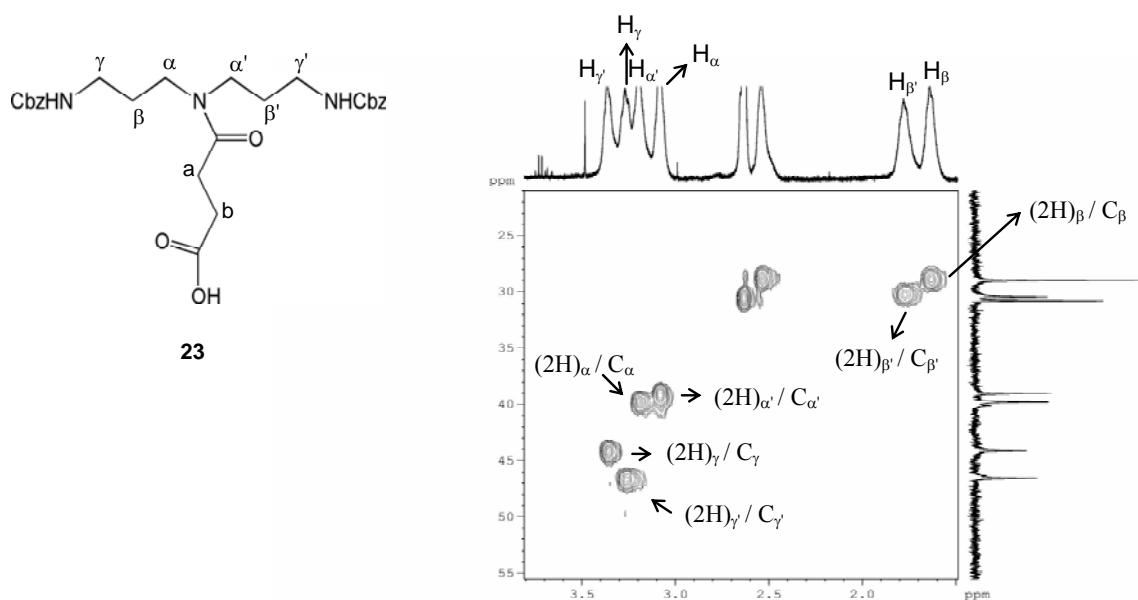


Figure II- 17 : Agrandissement de la carte HMQC du composé (23) (400 MHz, 298K, CDCl₃, 20 mg/mL)

En effet, les spectres RMN ^1H et ^{13}C montrent une inéquivalence entre les protons α et α' , β et β' , γ et γ' , les 2 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) et les protons des deux cycles aromatiques (figure II-17). Par exemple, les protons des groupements $(\text{CH}_2)_\gamma$ et $(\text{CH}_2)_{\gamma'}$ ne sont pas magnétiquement équivalents puisqu'ils ont des déplacements chimiques différents : 2 protons de l'un des 2 CH_2 apparaissent sous forme de multiplet à $\delta = 3,25$ ppm et les 2 autres protons apparaissent à $\delta = 3,1$ ppm. Il en est de même pour les déplacements chimiques des carbones : 1 carbone des

deux groupements (CH₂) γ ou γ' apparaît à 46,9 ppm et l'autre à 44, 2 ppm. Toutefois, les deux protons portés par le même carbone, par exemple (CH₂) γ sont chimiquement et magnétiquement équivalents puisque les spectres RMN ne nous indiquent aucun couplage géminal.

Ce phénomène s'explique vraisemblablement par l'existence d'un équilibre entre 2 formes mésomères comme montré sur le schéma II-8. Les paires d'électrons libres sur l'atome d'azote, sur l'atome d'oxygène et la double liaison du carbonyle C=O provoquent un phénomène de résonance [63].

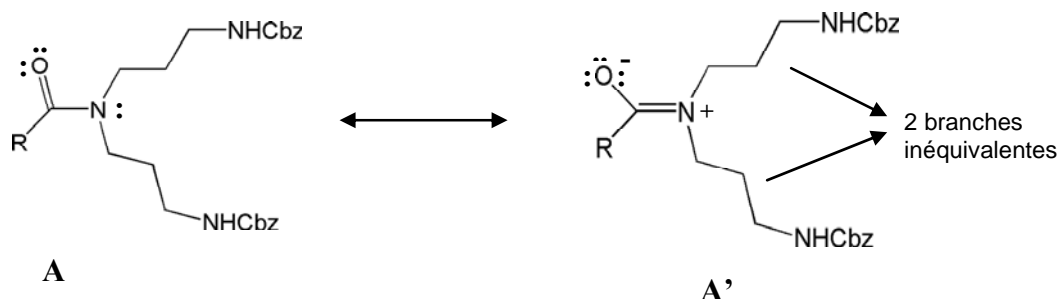


Schéma II- 8: Formules limites de résonance

A température ambiante, cet échange est plus lent que l'échelle des temps de RMN ce qui explique que la molécule est "verrouillée" dans une certaine conformation : le mésomère A'. Etant donné que la simple liaison C-N acquiert un caractère de double liaison, la libre rotation autour de la liaison C-N de l'amide est limitée ce qui conduit à la formation de 2 isomères : un *cis* et l'autre *trans* [64-66].

Lorsque la température augmente, la vitesse de rotation autour de la liaison C-N devient de plus en plus importante : on observe le mésomère A. Il y a donc libre rotation autour de la liaison C-N ce qui entraîne un échange perpétuel des 2 isomères initialement *trans* et *cis*, plus rapide que l'échelle des temps de la RMN.

Plusieurs spectres RMN ¹H du composé (23) ont été effectués à différentes températures (de 298 K à 353 K). A 353 K, aucun dédoublement de signaux n'est observé (figure II-18).

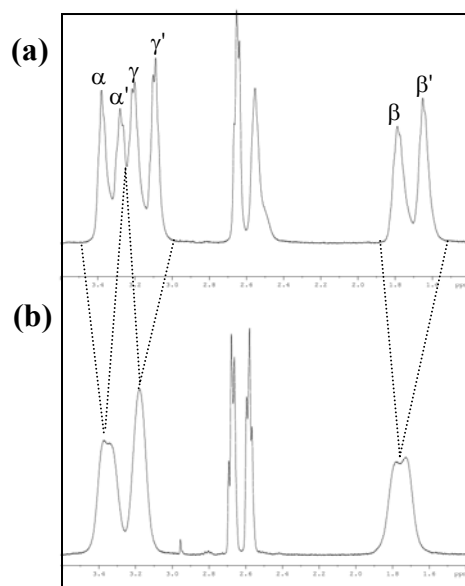


Figure II- 18 : Agrandissement des spectres RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , 6 mg/mL) du composé (23) sur la gamme de 1,5 à 3,5 ppm à 298 K (a) et à 353 K (b)

On n'observe alors plus qu'un seul déplacement au barycentre des deux précédents.

Les caractérisations que nous venons de présenter indiquent que nous avons bien obtenu la structure "biantennée" désirée qui servira d'espèce intermédiaire pour synthétiser le dimère de β -cyclodextrine et le dimère d'adamantane.

1.4.2 Obtention des dimères de β -CD et d'adamantane

Comme nous l'avons détaillé au début de ce chapitre, le greffage des β -cyclodextrines et des groupements adamantane sur le squelette carboné "biantenné" s'appuie sur des couplages de type peptidique (schéma II-9).

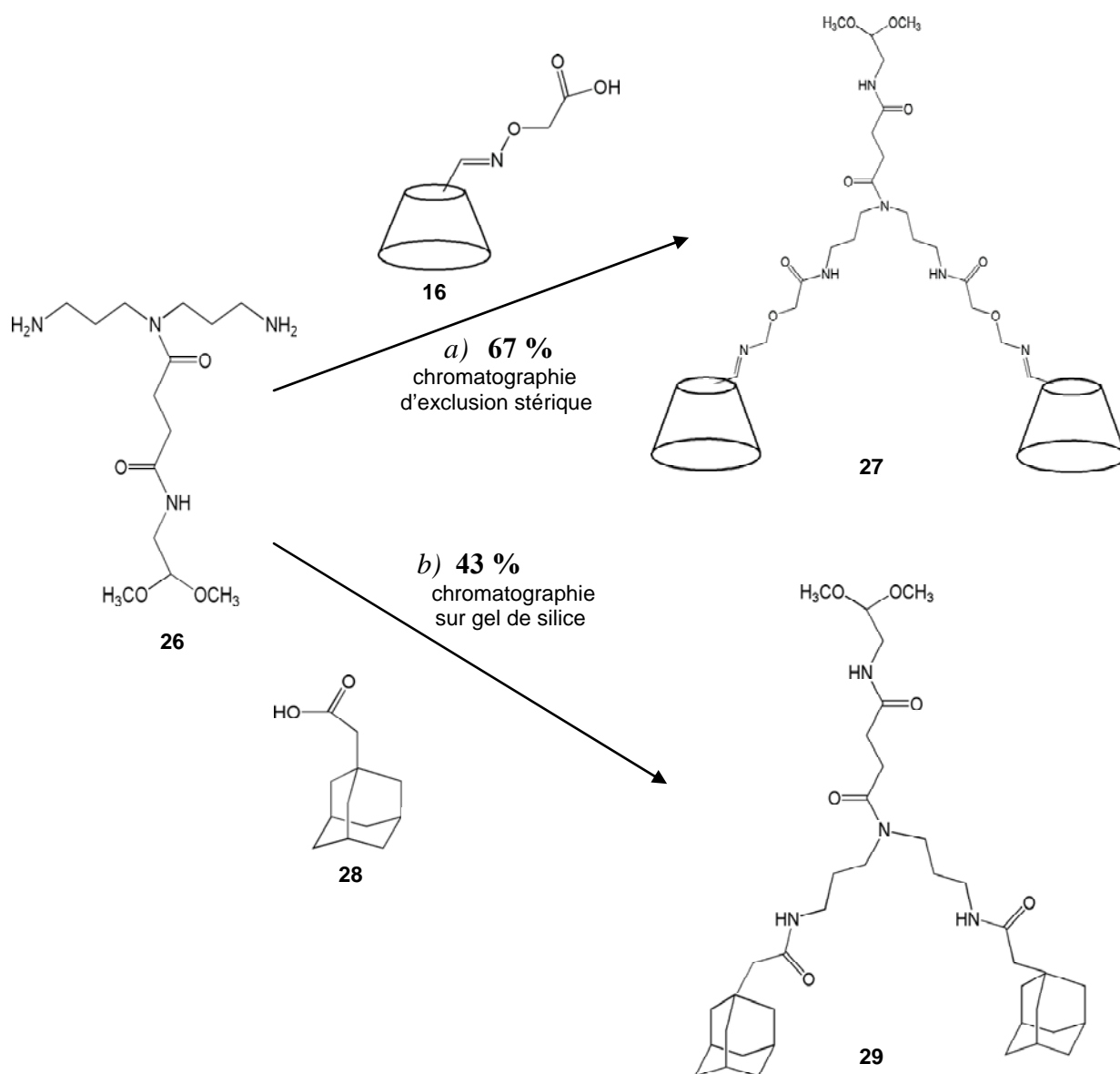


Schéma II- 9 : Synthèse des dimères de β -CD (27) et d'adamantane (29)
Conditions : a) DIC, HOBt, DMF, TA, 24h ; b) Et₃N, DCC, HOBt, DMF, TA, 48h

La synthèse du dimère de β -cyclodextrine (**27**), résultant du couplage entre le composé (**26**) et la β -CD monoacide (**16**), a été effectuée dans des conditions similaires à celles utilisées pour la synthèse de la β -CD monoacétal c'est-à-dire en présence de DIC et de HOBt dans le DMF avec un rendement tout à fait acceptable de 67 %.

La synthèse du dimère d'adamantane (**29**) s'appuie sur le couplage entre le composé (**26**) et l'acide (1-adamantyl)acétique (**28**) en présence de DCC, de HOBt et de Et₃N dans le DMF avec un rendement assez faible de 43 %, ce qui peut être dû, comme expliqué auparavant, à la perte partielle du produit dans le précipité de DCU.

Dans les deux cas, il est nécessaire d'utiliser un excès d'acide carboxylique par rapport au composé (**26**) soit 2,2 éq. molaires de β -CD monoacide (**16**) et 2,2 éq. molaires d'acide (1-adamantyl)acétique (**28**) pour s'assurer que la bifonctionnalisation soit effective. Les conditions expérimentales utilisées pour ces deux synthèses sont récapitulées dans le tableau II-2 :

	Composé (26)	CD-COOH (16)	DIC	HOBt		Rendement
Dimère de β -CD (27)	1	2,2	8,8	4,4		67 %
	Composé (26)	AD-(COOH) (28)	DCC	HOBt	Et ₃ N	Rendement
Dimère d'AD (29)	1	2,2	2,6	2,2	1,1	43 %

Tableau II- 2 : Résumé des conditions expérimentales (en équivalent molaire) utilisées pour la synthèse des dimères de β -CD (**27**) et d'adamantane (**29**)

Les dimères de β -CD et d'adamantane ne sont pas purifiés de la même façon. Concernant le dimère de β -CD, le milieu réactionnel est précipité dans l'acétone afin d'éliminer les réactifs en excès mais cette méthode ne permet pas de séparer les différents composés obtenus (composé constitué d'une seule molécule de β -CD et β -CD initiale). Ceux-ci ont été séparés par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Biogel en utilisant de l'eau comme éluant. Quant au dimère d'adamantane, il est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice.

Les dimères de β -CD et d'adamantane ont été entièrement caractérisés par RMN et par spectrométrie de masse haute et basse résolution.

1.4.2.1 Analyse structurale des composés par RMN

Afin de caractériser la structure du dimère de β -CD (**27**) relativement complexe, nous avons eu recours à des expériences de RMN du proton et du carbone, mono et

bidimensionnelle analogues à celles utilisées pour la caractérisation des monomères de β -CD monofonctionnalisés. Le spectre RMN proton enregistré dans D_2O à 298 K est présenté figure II-19.

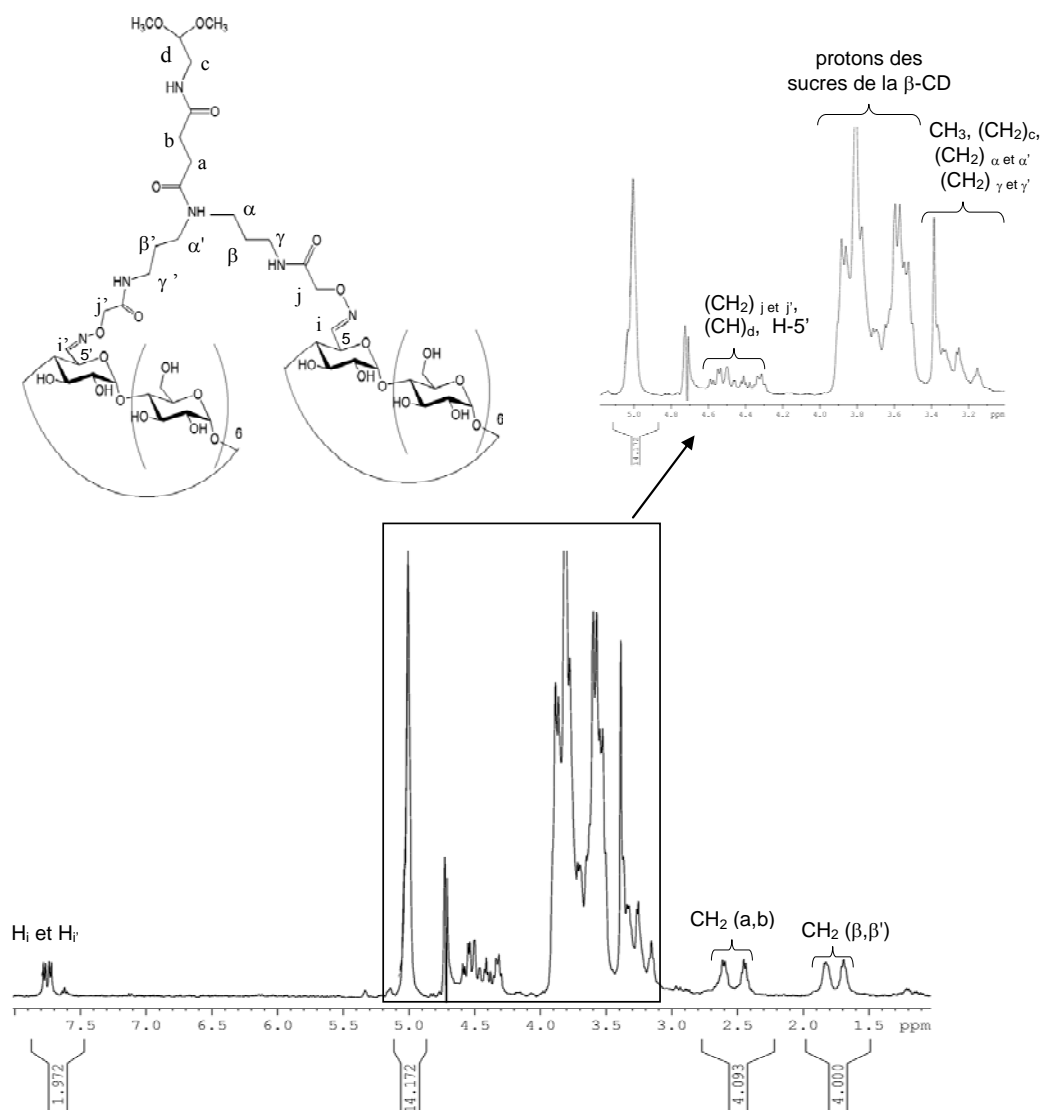


Figure II- 19: Spectre RMN 1H du dimère de β -CD (27) (400 MHz, 298 K, D_2O , 6mg/mL)

Ce spectre RMN 1H montre bien la présence du composé attendu avec ses signaux caractéristiques. On observe toujours le phénomène de dédoublement des signaux dû à la présence simultanée des isomères *cis* et *trans*. Par exemple, les protons H_i et $H_{i'}$ sont associés

à des doublets de déplacements chimiques différents. Grâce à l'intégration des signaux caractéristiques, par exemple, des 2 CH₂ (β et β') de l'unité "biantennée" carbonée et des protons anomères H-1 des β-CDs, nous pouvons confirmer la présence de deux cavités de β-CD par unité "biantennée".

Le dimère d'adamantane a également été caractérisé par RMN et grâce à l'intégration des signaux caractéristiques des protons de l'unité "biantennée" et des protons des groupements adamantane, nous nous sommes assurés de la présence des 2 molécules d'adamantane par unité carbonée "biantennée".

1.4.2.2 Analyse par spectrométrie de masse

Le spectre de masse basse résolution du composé (27) (figure II-20) indique la présence de plusieurs composés.

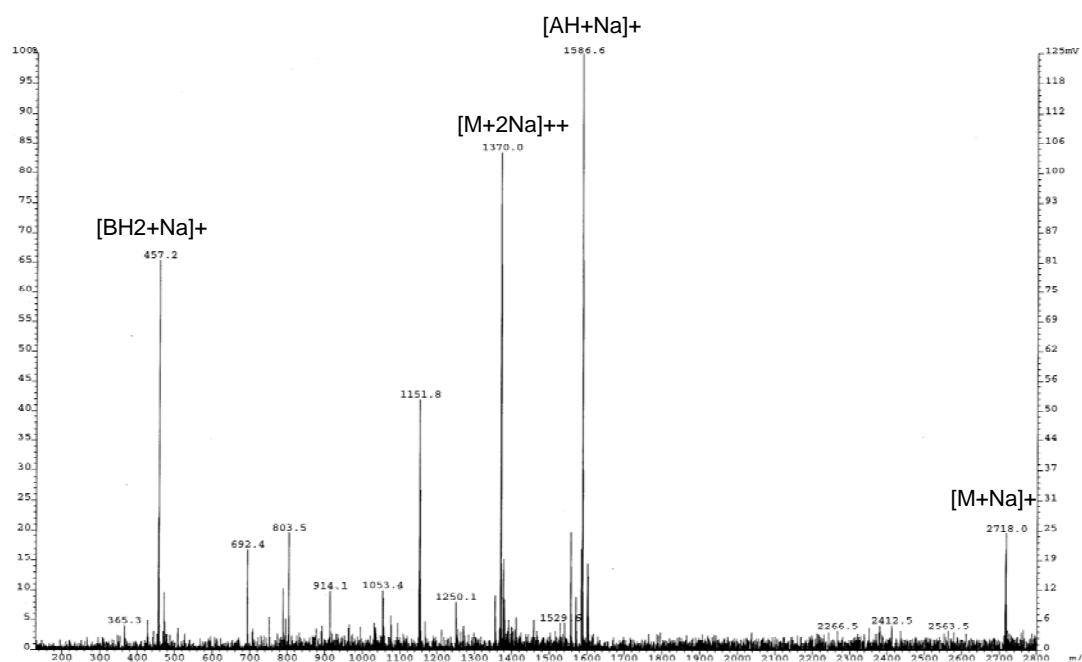


Figure II- 20 : Spectre de masse basse résolution ESI en mode positif du composé (27) dans CH₃OH/H₂O (1/1)

On observe les ions dichargé $[M+2Na]^{++}$ à m/z 1370 et monochargé $[M+Na]^+$ à m/z 2718 du composé (27). L'ion noté $[BH_2+Na]^+$ à m/z 457 correspond à un composé issu de la décomposition du dérivé (27). L'ion noté $[AH+Na]^+$ m/z 1586,6 correspond au composé avec une seule cavité de β -CD. L'ion m/z 1151,8 peut correspondre à une fragmentation de (27) conduisant à l'obtention d'un nitrile sur une β -CD. Cet ion, possédant une fonction nitrile, a également été observé sur le spectre de masse de la β -CD monoacide ce qui prouve que les différents composés observés sur le spectre sont formés lors du processus d'ionisation et non lors de la synthèse chimique.

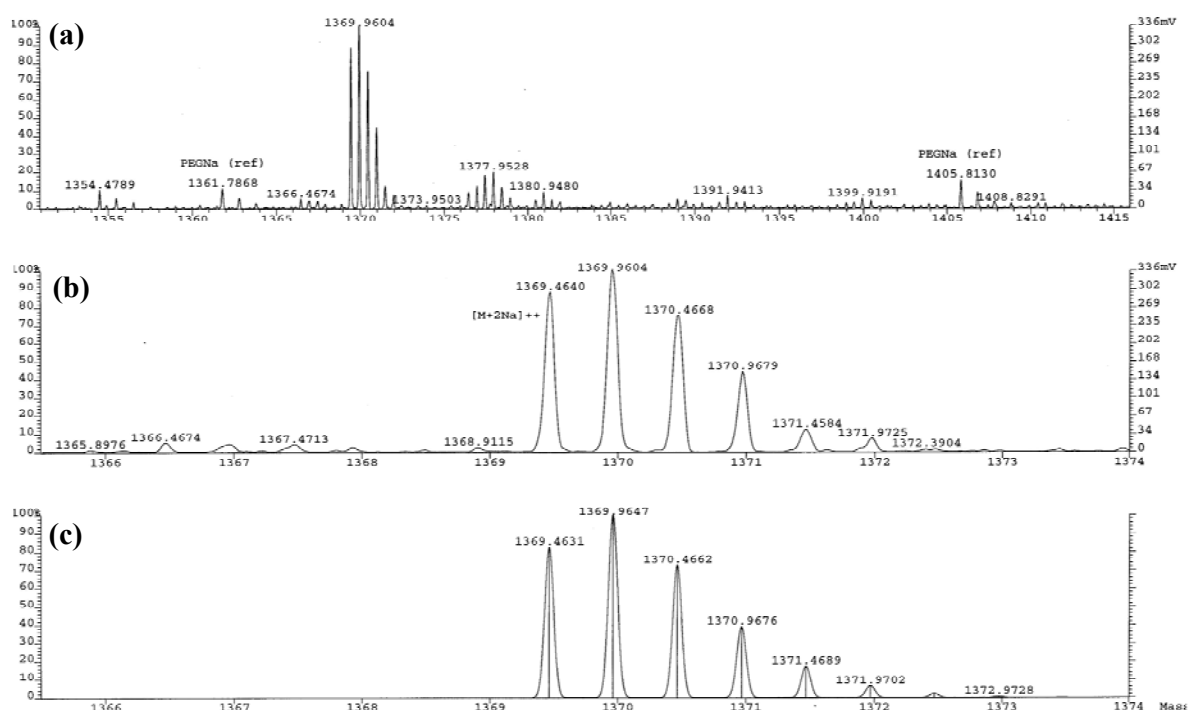


Figure II- 21 : Amas isotopique expérimentaux (a) et leur agrandissement (b), et amas isotopiques théoriques (c) de l'ion $[M+2Na]^{++}$ du dimère de β -CD (27)

La mesure en haute résolution a été effectuée sur l'ion dichargé $[M+2Na]^{++}$. Les amas isotopiques de l'ion $[M+2Na]^{++}$ du composé (27) (figure II-21 (b)) sont en accord avec les amas isotopiques théoriques (figure II-21 (c)), calculés à partir des formules brutes. Une mesure de masse exacte a été effectuée sur l'ion $[M+2Na]^{++}$ avec une résolution de 8000 en utilisant du PEG comme étalon interne. Le m/z théorique est de 1369,4631 et le m/z mesuré est de 1369,4640.

La pureté et la structure du dimère d'adamantane ont également été vérifiées par spectrométrie de masse.

L'étape suivante est le greffage de ces différentes molécules sur la chaîne polysaccharidique de hyaluronane. Puisque les greffons présentent des structures chimiques relativement complexes, l'optimisation des conditions expérimentales de chacun des couplages s'est avérée nécessaire.

I.5 Greffage des différents composés sur le hyaluronane : obtention des dérivés HA(CD), HA(AD), HA(CD)₂ et HA(AD)₂

I.5.1 Principe du greffage

Comme expliqué au début de ce chapitre, le couplage des monomères et des dimères de β -CD et d'adamantane avec le HA-ADH repose sur une réaction de type amination réductrice, plus particulièrement sur la formation d'une liaison hydrazone stabilisée par une réduction. King et *coll.* ont optimisé l'étape de réduction et ont montré que la cinétique de la réaction dépend directement du pH. Elle est plus rapide à une valeur de pH faible (valeur optimale du pH : 3,6) [7]. Toutefois, étant donné qu'une valeur de pH ≤ 4 provoque l'hydrolyse partielle de l'hydrazone intermédiaire, nous avons choisi d'effectuer la réaction à une valeur de pH intermédiaire, égal à 5,1. Par ailleurs, il est nécessaire d'utiliser un large excès de réducteur avec un temps de réaction suffisamment long (20 heures minimum).

Le but étant d'étudier l'influence de l'énergie et de la stabilité des jonctions interchaînes sur les propriétés physico-chimiques des assemblages supramoléculaires, nous nous sommes fixés comme objectif la synthèse de dérivés HA(CD) et HA(CD)₂ avec le même taux de greffage en cavité de cyclodextrine, à savoir 5 %, c'est-à-dire 5 cavités de β -CD en moyenne toutes les 100 unités disaccharidiques et la synthèse de dérivés HA(AD) et HA(AD)₂ avec le même taux de greffage en AD, soit 6 %.

I.5.2 Synthèse du HA porteur de monomères de β -CD, HA(CD) et du HA porteur de dimères de β -CD, HA(CD)₂

Le greffage du monomère et du dimère de β -CD sur le HA porteur de bras hydrazide a nécessité la déprotection de la fonction aldéhyde. Le β -CD monoacétal (**18**) et le dimère de β -CD (**27**) sont donc traités en milieu aqueux acide [39] à 55°C pendant 3 heures. On obtient ainsi les composés (**30**) et (**31**) (figure II-22).

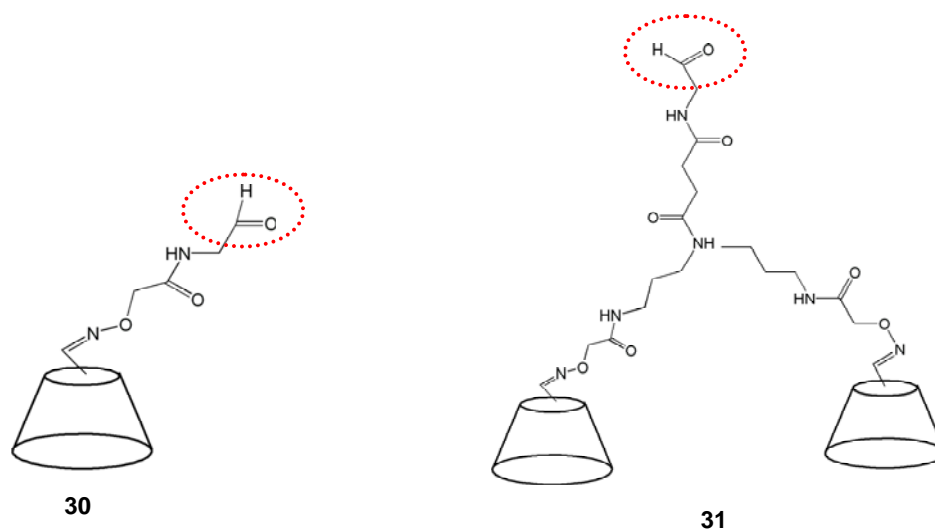


Figure II- 22 : Monomère de β -CD et dimère de β -CD possédant une fonction aldéhyde obtenus après déprotection de la β -CD monoacétal (**18**) et du dimère de β -CD (**27**)

Ces dérivés de β -CD possédant une fonction aldéhyde sont ensuite mis en réaction avec le HA porteur de bras hydrazide (HA-ADH), solubilisé en milieu aqueux, en présence d'un large excès de NaCNBH_3 à $\text{pH} = 5,1$ selon le schéma II-10 :

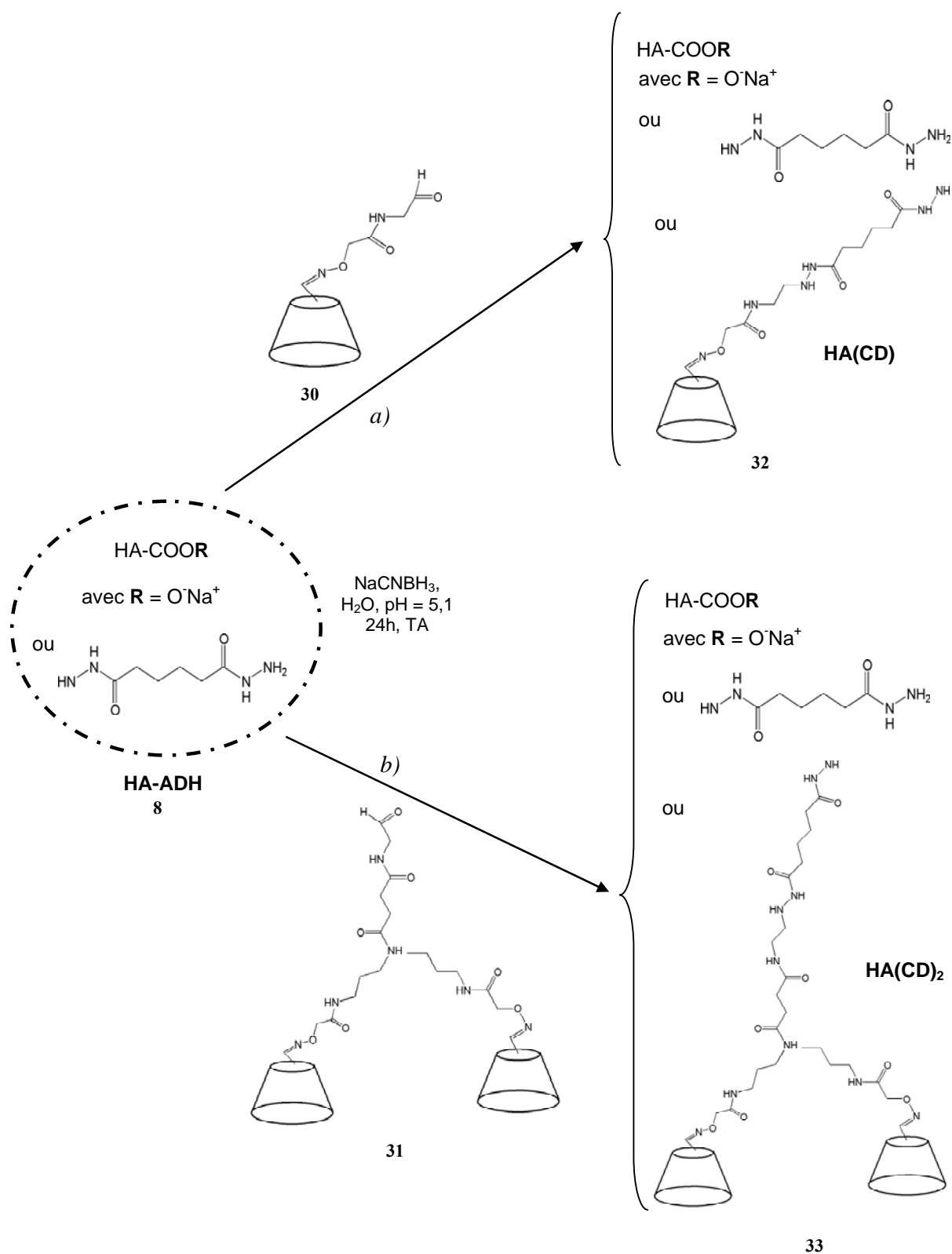


Schéma II- 10: Synthèse des dérivés HA(CD) (32) a) et HA(CD)₂ (33) b)

Les conditions expérimentales utilisées pour la synthèse des dérivés HA(CD) *a*) et HA(CD)₂ *b*) sont récapitulées dans le tableau II-3.

<i>a</i>)	HA (eq. molaire)	monomère CD-acétal (eq. molaire)	NaCNBH ₃ (eq. molaire)	rendement massique	taux de greffage en CD	taux* d'hydratation*
	1	0,3	9	77 %	5 % ± 1%	9 %
<i>b</i>)	HA (eq. molaire)	dimère (CD) ₂ -acétal (eq. molaire)	NaCNBH ₃ (eq. molaire)	rendement massique	taux de greffage en CD	taux d'hydratation*
	1	0,15	4,5	88 %	5 % ± 1%	9 %

* mesuré par thermogravimétrie

Tableau II- 3 : Récapitulatif des conditions utilisées pour la synthèse du HA(CD) et du HA(CD)₂

Comme montré dans le tableau ci-dessus, ces réactions ne sont pas quantitatives. Pour les 2 réactions *a*) et *b*), il est nécessaire d'utiliser un excès de β-CD monoacétal (**18**) et un excès de dimère de β-CD (**27**) par rapport au taux de greffage désiré. Dans le but d'optimiser ces réactions de couplage avec le polymère, nous avons étudié d'une part l'influence de la quantité de réducteur (ajout de 20 éq. molaires de NaCNBH₃) et d'autre part le temps de réaction (5 jours au lieu de 24 heures). Ces conditions expérimentales n'apportent aucune amélioration puisque le taux de greffage en β-CD est toujours de 5 %. Etant donné que ce type de réaction est bien connu au laboratoire et qu'elle est, avec d'autres aldéhydes, quantitative, il est probable que le problème soit lié à l'aldéhyde [**67**].

Pour la réaction *b*), la synthèse du dérivé HA(CD)₂, la quantité de dimère de β-CD (**27**) ajoutée au HA-ADH est 2 fois plus faible que celle du monomère de β-CD (**18**) en raison des 2 cavités de cyclodextrine par unité carboné "biantennée" et parce que l'on souhaite obtenir des polymères avec le même nombre de β-CD par chaîne.

Ces réactions sont laissées sous vive agitation pendant 24 heures et une légère augmentation de pH est observée. Cet accroissement de pH peut s'expliquer par la réduction partielle concomitante de la liaison oxime présente sur le monomère et le dimère de β-CD par NaCNBH₃ [**68,69**]. En effet, la réduction de cette liaison s'accompagne d'une augmentation de pH puisqu'elle consomme des ions H⁺. Afin de maintenir le pH à 5,1, une solution d'HCl 0,1 M est utilisée. La réduction de la liaison hydrazone est largement favorisée puisque le pH de la réaction n'est pas optimal pour la réduction totale de la liaison oxime (pH = 3-4). Le

milieu réactionnel est ensuite ajusté à $\text{pH} = 7,5$, ce qui permet l'ionisation totale des groupements carboxylate du hyaluronane et favorise donc sa solubilité.

Les dérivés $\text{HA}(\text{CD})$ et $\text{HA}(\text{CD})_2$ sont purifiés par une ultrafiltration puis isolés par lyophilisation. Il s'est avéré, en effet, que la précipitation en milieu hydroalcoolique salin (afin d'écranter les répulsions électrostatiques) n'est pas une bonne méthode de purification pour isoler ces dérivés. Les dérivés $\text{HA}(\text{CD})$ et $\text{HA}(\text{CD})_2$ isolés dans de telles conditions montrent des comportements fortement associatifs en solution liés vraisemblablement à des interactions fortes de type liaisons hydrogène dues aux cavités de β -CD pendantes le long des chaînes macromoléculaires. Ces interactions créées *in situ* semblent irréversibles puisque les tentatives effectuées pour les dissocier, par resolubilisation du produit en milieu aqueux à $\text{pH} 13$ puis chauffage de la solution à 50°C pendant 2 heures suivis d'une reprecipitation du produit, n'ont pas été concluantes.

Les rendements massiques, 77 % et 88 %, obtenus pour ces 2 réactions sont tout à fait satisfaisants.

Les dérivés $\text{HA}(\text{CD})$ (**32**) et $\text{HA}(\text{CD})_2$ (**33**) ont été entièrement caractérisés par RMN proton à 353 K et les spectres ((**A**) et (**B**)) obtenus, présentés sur la figure II-23, nous ont permis de déterminer les DS des polymères, donc les taux de greffage en β -CD.

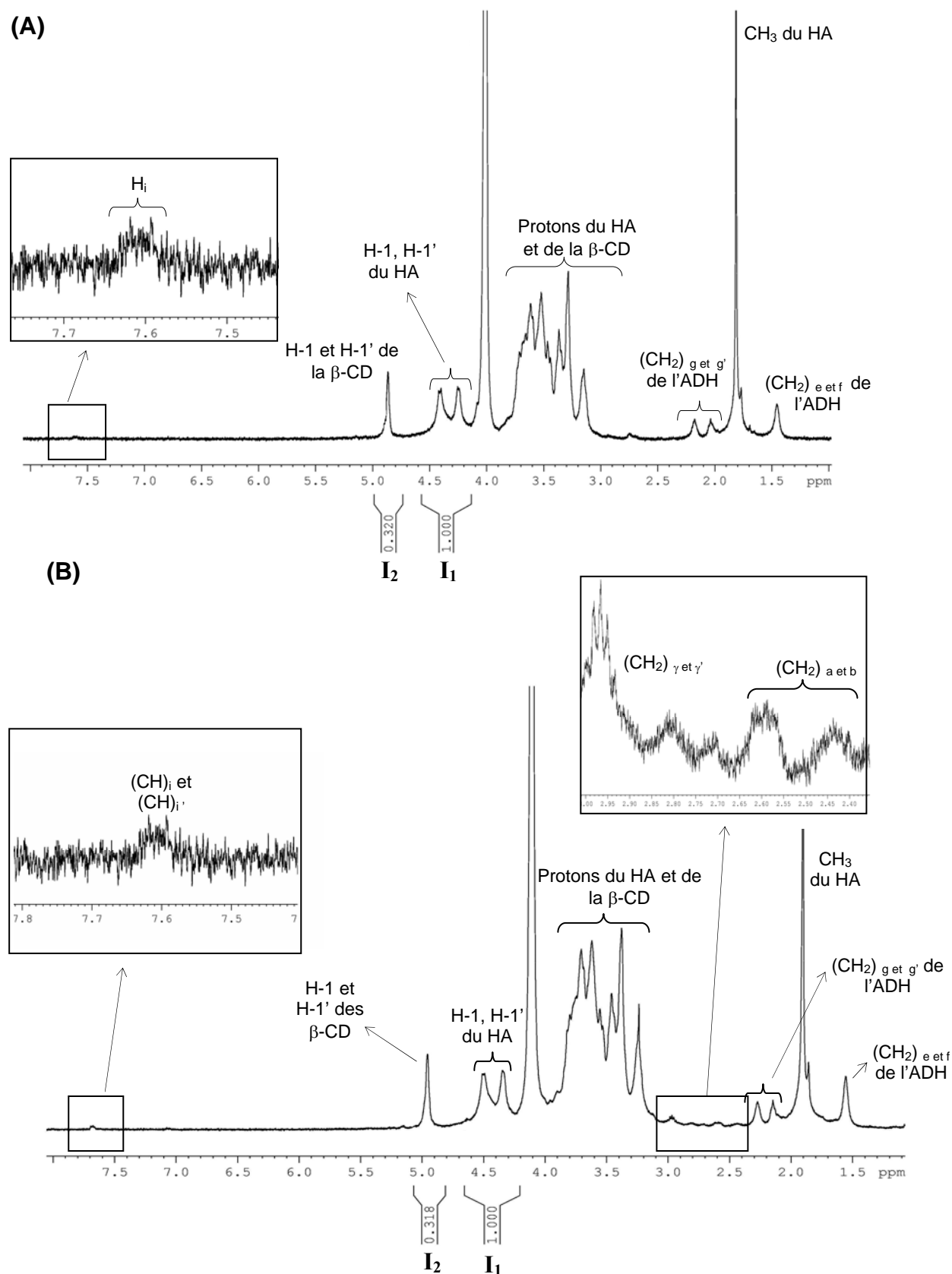


Figure II- 23: Spectres RMN ^1H (400 MHz, 353 K, D_2O , 6 mg/mL) du dérivé $\text{HA}(\text{CD})$ (spectre (A)) et du dérivé $\text{HA}(\text{CD})_2$ (spectre (B))

Tout d'abord, de façon quantitative, nous voyons que les taux de greffage en β -CD sont similaires pour les dérivés HA(CD) et HA(CD)₂ puisque les intégrations des signaux caractéristiques des protons anomères : H-1 et H-1' (**I**₂) des β -CDs pour les 2 spectres (**A**) et (**B**) sont très proches (0,318 et 0,311).

Pour le dérivé HA(CD)₂ (figure II-23, spectre (**B**)), nous observons en plus les signaux caractéristiques des protons de l'unité carbonée "biantennée" ((CH₂)_a et b, (CH₂) _{γ} et γ') avec une très faible intensité. Ce manque de sensibilité ne nous permet d'ailleurs ni de distinguer les multiplicités des signaux ni d'observer les 2 doublets de H_i et H_{i'} mettant en évidence les isomères *cis* et *trans*.

Les taux de greffage en β -CD, pour les deux polymères modifiés sont calculés de façon similaire, c'est-à-dire par intégration des signaux caractéristiques des protons anomères des β -CD (H-1, H-1') en considérant les protons anomères du hyaluronane comme référence interne.

$$\text{Taux de greffage en } \beta\text{-CD} = (\mathbf{I}_2) / (\mathbf{n} \times \mathbf{I}_1) = 0,320 / 7 = 0,046 \text{ (spectre (A))}$$

$$\text{Taux de greffage en } \beta\text{-CD} = (\mathbf{I}_2) / (\mathbf{n} \times \mathbf{I}_1) = 0,318 / 7 = 0,045 \text{ (spectre (B))}$$

où $n = 7$ est le nombre de protons anomères des cavités de β -CD.

Nous pouvons donc admettre que le taux de greffage en β -CD pour les 2 dérivés HA(CD) et HA(CD)₂ est égal à **5 % \pm 1 %**. Les propriétés physico-chimiques de ces polymères modifiés seront discutées en détail dans le chapitre III.

1.5.3 Synthèse du HA porteur de monomères d'adamantane, HA(AD) et du HA porteur de dimères d'adamantane, HA(AD)₂

La synthèse des dérivés HA(AD) et HA(AD)₂ s'appuie sur des conditions similaires à celles décrites dans la partie 1.5.2 pour les dérivés HA(CD) et HA(CD)₂ c'est-à-dire des conditions d'amination réductrice. Néanmoins, étant donné la nature hydrophobe de l'adamantane, le greffage sur le polymère est effectué en milieu hydroalcoolique (eau/EtOH).

La première étape mène à l'obtention du monomère et du dimère d'adamantane possédant une fonctionnalité aldéhydique. Le monomère d'adamantane est le 2-(1-adamantyl)aldéhyde, obtenu par oxydation au dichromate de pyridinium du 2-(1-

adamantyl)éthanol. Quant au dimère d'adamantane, la fonction aldéhyde est déprotégée dans un mélange à base d'acide trifluoroacétique (TFA) : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{TFA}/\text{H}_2\text{O})$ [70].

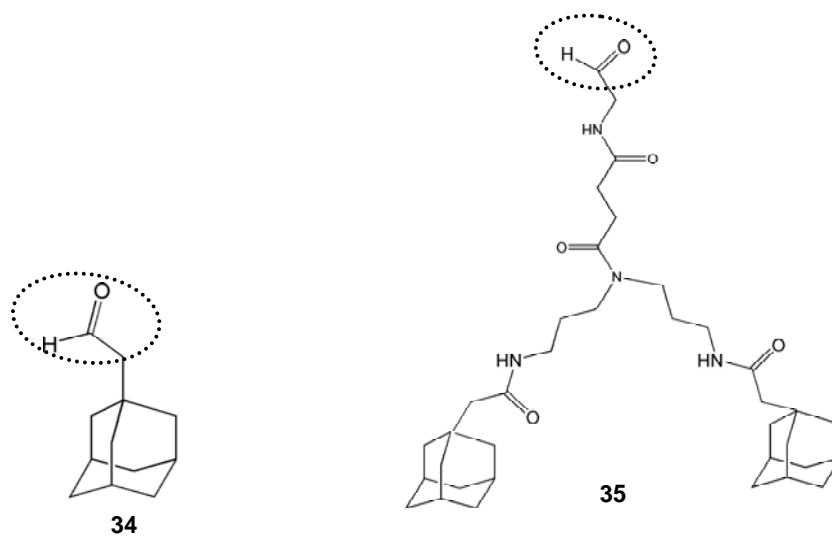


Figure II- 24 : Monomère d'adamantane (34) et dimère d'adamantane (35) possédant une fonction aldéhyde

Ces dérivés aldéhydiques d'adamantane réagissent avec le HA-ADH en milieu hydroalcoolique, en présence de NaCNBH_3 à $\text{pH} = 5,1$. Le schéma réactionnel de la synthèse des dérivés $\text{HA}(\text{AD})$ et $\text{HA}(\text{AD})_2$ est représenté sur le schéma II-11.

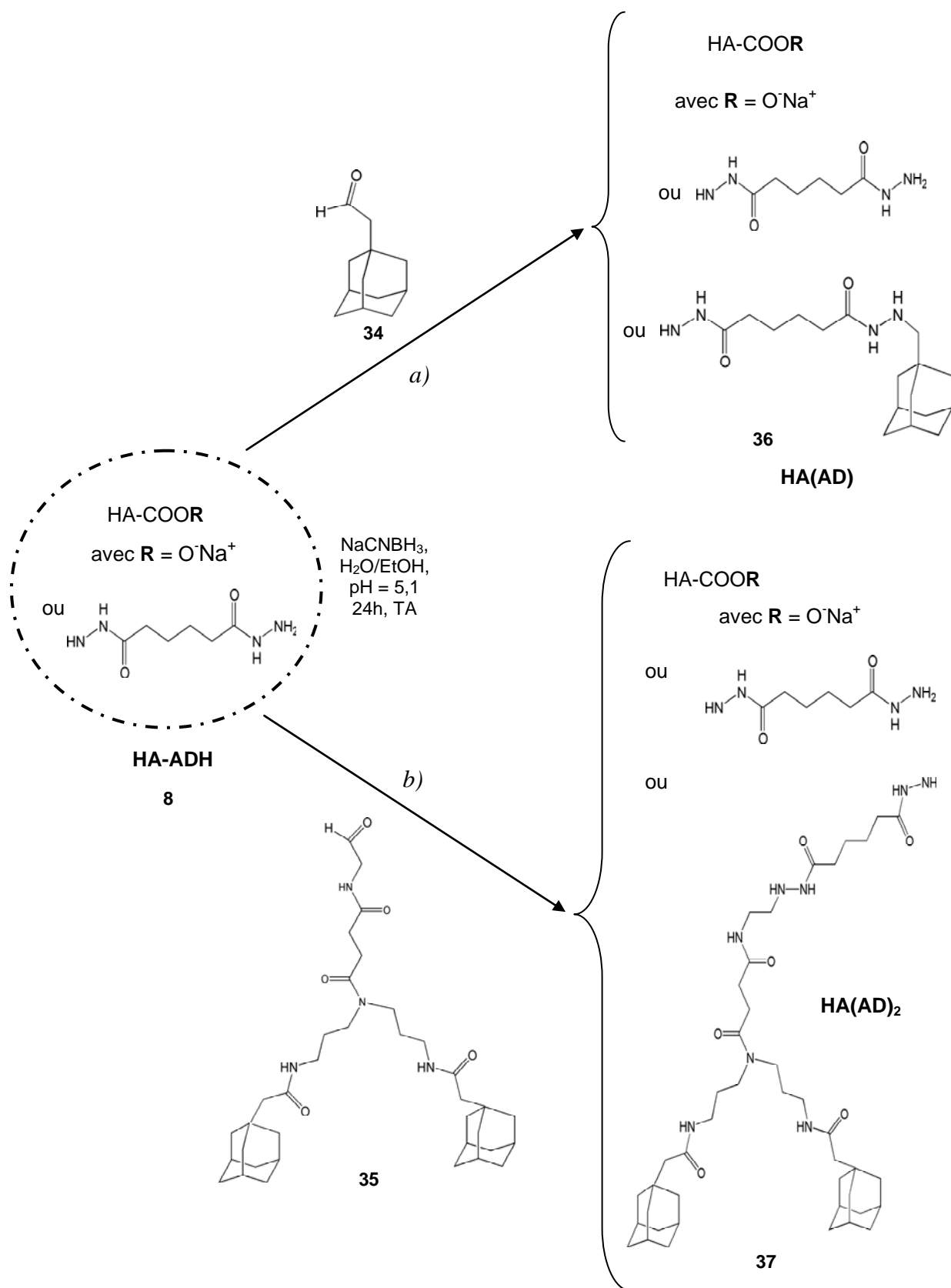


Schéma II- 11: Synthèse des dérivés HA(AD) (36) a) et HA(AD)₂ (37) b)

Les conditions expérimentales utilisées pour les deux synthèses **a)** et **b)** sont résumées dans le tableau II-4.

a)	HA (eq. molaire)	monomère AD-CHO (eq. molaire)	NaCNBH ₃ (eq. molaire)	rendement massique	taux de greffage en AD	taux d'hydratation*
	1	0,25	7,5	90 %	6 % ± 1%	15 %
b)	HA (eq. molaire)	dimère (AD) ₂ -acétal (eq. molaire)	NaCNBH ₃ (eq. molaire)	rendement massique	taux de greffage en AD	taux d'hydratation*
	1	0,1	4,5	70 %	6 % ± 1 %	25 %

* déterminé par thermogravimétrie

Tableau II- 4 : Récapitulatif des conditions expérimentales utilisées pour la synthèse des dérivés HA(AD) a) et HA(AD)₂ b)

Comme dans le cas du couplage avec les dérivés de β -CD, la réaction n'est pas quantitative puisqu'il est nécessaire d'ajouter un excès de AD-CHO et de dimère (AD)₂-acétal par rapport au taux de greffage souhaité. Compte tenu des 2 molécules d'adamantane par dimère, 0,1 eq. molaires de (AD)₂-CHO suffisent pour obtenir un taux de greffage en AD de 6%. Les polymères modifiés sont isolés et purifiés par précipitation avec de l'EtOH après écrantage des charges grâce à un ajout de NaCl et par différents lavages successifs. La purification par précipitation, suivie par une étape de séchage à l'air, peut expliquer les taux d'hydratation plus élevés que ceux obtenus pour les dérivés HA(CD) et HA(CD)₂, isolés par lyophilisation. Par ailleurs, contrairement aux dérivés HA(CD) et HA(CD)₂, on ne constate pas de problème de reproductibilité concernant les propriétés en milieu aqueux des produits isolés par précipitation, ce qui tend à confirmer que les cavités de β -CDs greffées sur le polymère en sont responsables.

Les rendements massiques de ces couplages (90 % et 70 %) sont tout à fait satisfaisants.

Comme dans le cas des dérivés HA(CD) et HA(CD)₂, les degrés de substitution des polymères modifiés, donnant accès aux taux de greffage en AD, ont été déterminés grâce à l'analyse par RMN proton à 353 K (figure II-25).

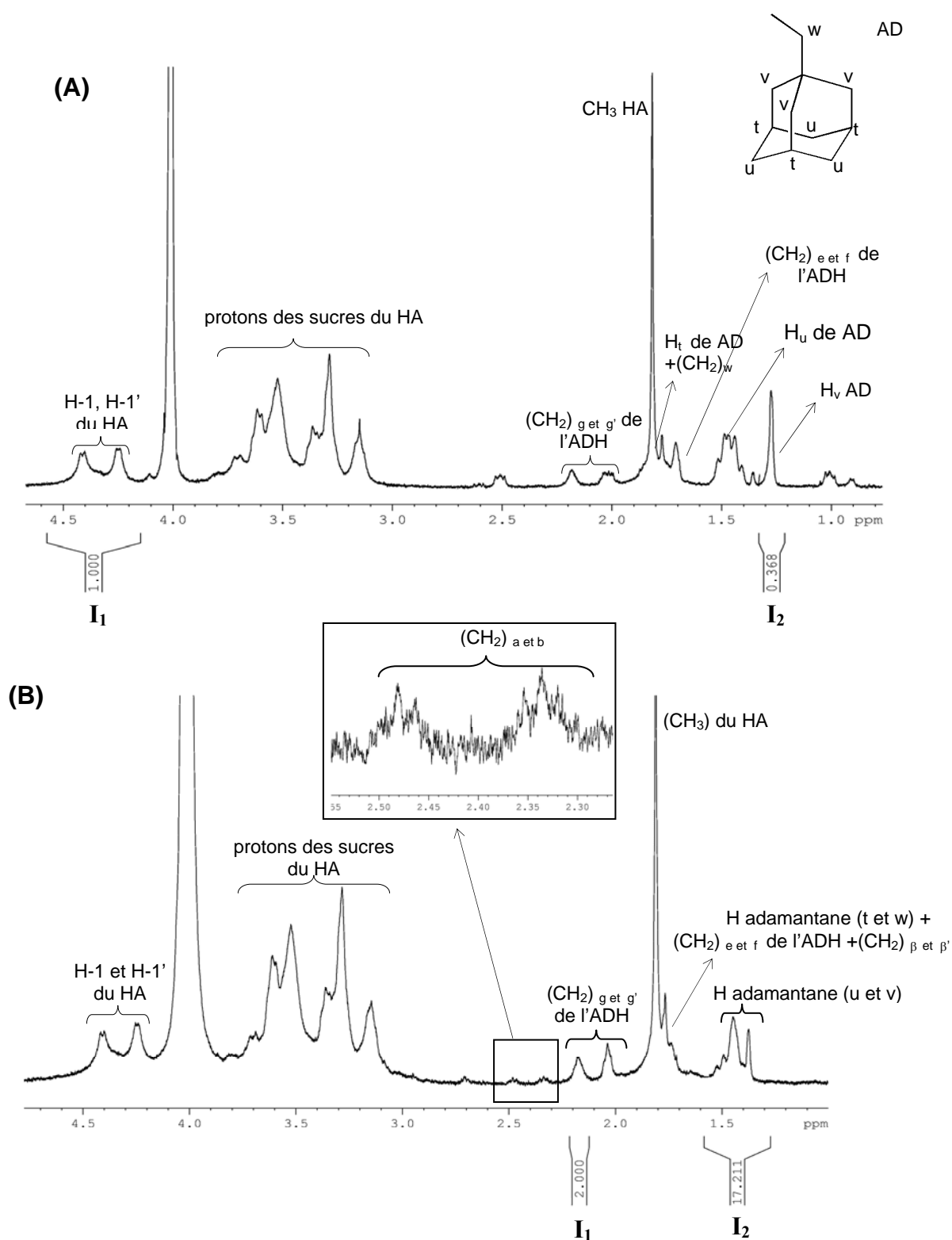


Figure II- 25 : Spectres RMN ¹H (400 MHz, 353 K, D₂O, 6 mg/mL) du dérivé HA(AD) (spectre (A)) et du HA(AD)₂ (spectre (B))

Le DS du HA(AD) en monomère d'adamantane est calculé par intégration des signaux caractéristiques des protons H_v de la molécule d'adamantane (figure II-25, spectre (A)) en prenant comme référence interne les protons anomères du hyaluronane :

$$\text{DS} = (I_2) / (n \times I_1) = 0,368 / 6 = 0,061 \text{ (spectre (A))}$$

où $n = 6$ correspond aux 6 protons H_v de l'adamantane; le taux de greffage en adamantane est donc de $6 \% \pm 1\%$.

Pour le dérivé HA(AD)₂ (spectre (B)), nous observons en plus les signaux caractéristiques des protons de l'unité carbonée "biantennée" ((CH₂)_{a et b'}) avec, comme pour le HA(CD)₂, une très faible intensité. Dans le cas de ce polymère (spectre (B)), il ne serait pas correct de considérer les protons anomères du hyaluronane comme référence interne égale à 1. En effet, le pic résiduel de l'eau relativement large fausse l'intégration des protons H-1 et H-1' du HA.

Etant donné que le DS du HA-ADH dont dérive le HA(AD)₂ vaut 8 %, nous avons choisi comme référence interne un groupement CH₂ (I₁) du bras hydrazide greffé sur le HA. Le taux de greffage en AD est déterminé *via* l'intégration des protons H_u et H_v de la molécule d'adamantane.

$$\text{Taux de greffage en AD} = ((I_2) / (n)) \times \text{DS (HA-ADH)} = (17,2 / 24) \times 0,08 = 0,057 \text{ (spectre (B))}$$

où $n = 24$ correspond au nombre de protons H_u et H_v de la molécule d'adamantane apparaissant à ce déplacement chimique, et le DS (HA-ADH) a été déterminé préalablement (partie 1.2.2.1).

Le taux de greffage en AD est donc de $6 \% \pm 1\%$ ce qui correspond à un DS en dimères d'AD de 3 % puisqu'il y a deux molécules d'AD par dimère.

Les propriétés physico-chimiques et le comportement en milieu aqueux de ces dérivés du HA seront présentés dans le chapitre III.

Nous avons donc synthétisé différents dérivés du hyaluronane originaux modifiés chimiquement de façon contrôlée et sélective en introduisant en position 6 de l'unité

glucuronique des greffons de structure chimique variée à base de β -CD et à base d'adamantane.

II Synthèses de molécules modèles pour l'étude physico-chimique

Le chapitre III consistera, entre autre, à déterminer l'énergie des différents complexes d'inclusion par des expériences de microtitration calorimétrique. Etant donné que les propriétés thermodynamiques varient d'un complexe à un autre selon la structure des molécules hôte et invité, il est nécessaire de toutes les étudier d'un point de vue thermodynamique. Il semble naturel de s'intéresser en premier lieu aux molécules libres hôtes et invitées non greffées sur le hyaluronane :

- i. à base de β -CD : les β -CD naturelles et monofonctionnalisées sous forme de monomère et la β -CD sous forme de dimère
- ii. à base d'adamantane : l'AD sous forme de monomère et de dimère

Tous nos systèmes sont étudiés en milieu aqueux. Toutefois, l'acide (1-adamantyl)carboxylique et le dimère d'adamantane ne sont pas solubles dans l'eau. Il a donc fallu synthétiser de nouveaux dérivés de structure similaire mais hydrosolubles.

La stratégie a consisté à contrebalancer l'hydrophobie de ces molécules en introduisant un groupement carboxylate hydrophile dans le cas du monomère d'AD et par analogie, 2 groupements carboxylate dans le cas du dimère (figure II-26).

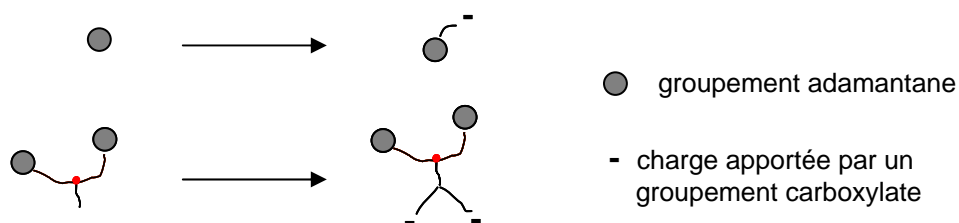


Figure II- 26 : Représentation schématique de l'introduction de charges sur les molécules à base d'adamantane

II.1 Synthèse du sel de sodium de l'acétate d'adamantane

Afin d'obtenir un groupement adamantane soluble dans l'eau, il suffit de traiter l'acide 1-(adamantyl)acétique par une solution aqueuse de NaOH 0,3 M (addition de 1,1 éq. molaires de NaOH). Après lyophilisation, on récupère alors un sel de sodium de l'acétate d'adamantane hydrosoluble (figure II-27).

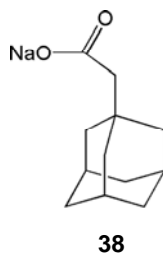


Figure II- 27 : Structure chimique du sel de sodium de l'acétate d'adamantane (ADAc)

II.2 Synthèse de l'unité "biantennée" hydrosoluble à base d'adamantane

La synthèse de ce dimère d'adamantane avec deux fonctions carboxylate repose sur un schéma de synthèse similaire à celui décrit précédemment pour la préparation du dimère d'adamantane (**29**). La 2,2-diméthoxyéthylamine est ici remplacée par l'acide L-aspartique protégé sous forme de di-*tert*-butyl-ester (**39**) (schéma II-12).

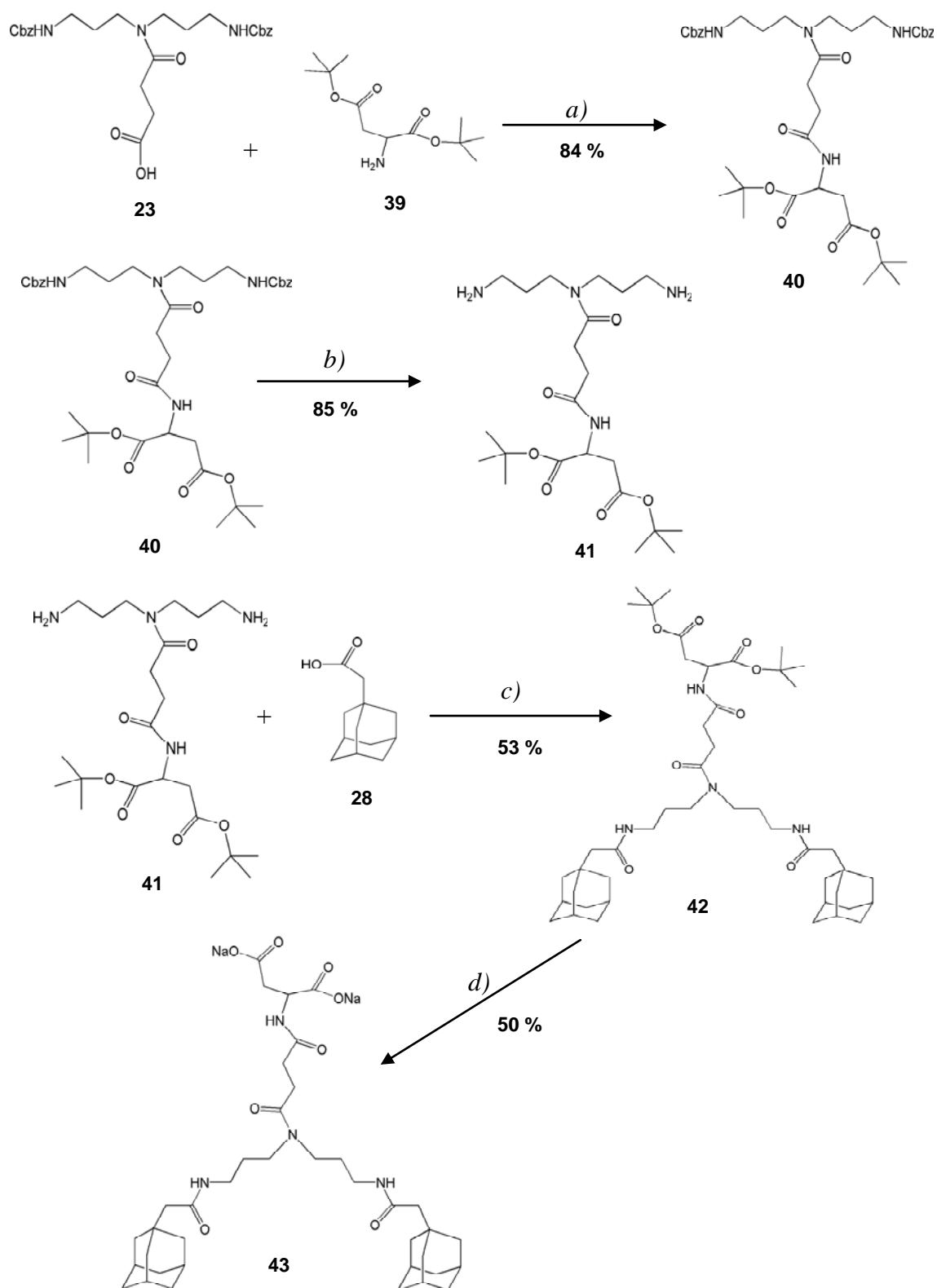


Schéma II- 12 : Préparation du dimère d'adamantane soluble dans l'eau
Conditions : a) Et₃N, HOBt, DCC, DMF, TA, 36h; b) Pd/C, H₂, MeOH, TA, 3h ; c) Et₃N, HOBt, DCC, DMF, TA, 36h ; d) CH₂Cl₂/TFA puis NaOH, TA, 12h. Abréviation : Cbz, benzyloxycarbonyle

Le couplage de l'acide L-aspartique protégé sous forme de di-*tert*-butyl-ester (**39**) avec le composé (**23**) dont la synthèse a été précédemment décrite s'effectue *via* un couplage de type peptidique. Le composé (**40**) est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec un rendement tout à fait satisfaisant (84%).

Les fonctions amine du composé (**40**) sont déprotégées par une hydrogénolyse [**61**] dans le méthanol en présence de palladium sur charbon avec un rendement tout à fait satisfaisant (85 %).

Le greffage des groupements acide 1-adamantyl acétique (**28**) sur le composé (**41**) s'appuie également sur un couplage de type peptidique et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice.

Les fonctions ester sont hydrolysées dans un mélange CH₂Cl₂/TFA à température ambiante pendant 1 heure [**71**]. Le diacide obtenu, solubilisé dans un mélange EtOH/H₂O (1/1, v/v) est traité par une solution aqueuse de NaOH 0,3 M (addition de 2,2 éq. molaires de NaOH). La solution est agitée pendant 12 heures à température ambiante afin d'atteindre l'équilibre puis elle est évaporée et lyophilisée.

Conclusion

Nous avons mis au point des conditions de synthèse optimales permettant l'obtention de monomères et de dimères de β -CD et d'adamantane à l'échelle de plusieurs centaines de mg jusqu'au g. Chacun de ces produits a fait l'objet d'une caractérisation structurale par spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C mono- et bidimensionnelle. Une analyse complémentaire par spectrométrie de masse a permis de confirmer la formule brute de ces composés et de contrôler leur pureté.

Ces dérivés ont ensuite été introduits de manière contrôlée et sélective sur le HA conduisant à des polymères hôtes et invités originaux représentés schématiquement sur la figure II-28.

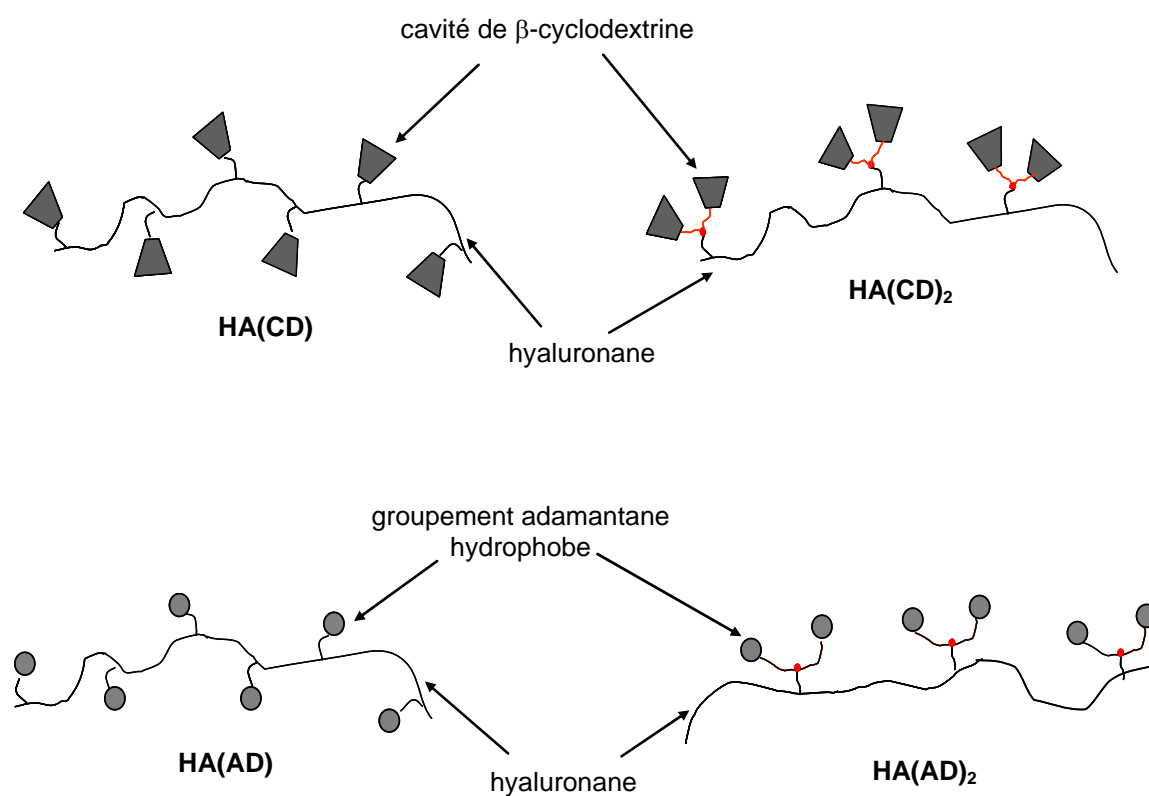


Figure II- 28 : Représentation schématique des différents polymères hôtes et invités à base de hyaluronane

Nous avons accès, dans un premier temps, à des polymères possédant des monomères de β -CD et des dimères de β -CD aléatoirement greffés le long de la chaîne, le HA(CD) et le HA(CD)₂, possédant le même nombre de cavités de β -CD par chaîne de polymère (5 %).

Dans un deuxième temps, nous avons obtenu des dérivés du HA portant des monomères d'adamantane et des dimères d'adamantane greffés également de façon aléatoire sur le polysaccharide, le HA(AD) et le HA(AD)₂, avec le même nombre de molécules d'adamantane par chaîne macromoléculaire (6 %). Ceci permettra une comparaison rigoureuse des propriétés physico-chimiques de ces différents dérivés.

Le mélange de ces différents polymères hôtes et invités devrait conduire à la formation d'assemblages supramoléculaires stabilisés par des jonctions labiles interchaînes, les complexes d'inclusion β -CD/AD, comme nous avons pu l'observer à partir d'échantillons de chitosanes modifiés [72].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Lemieux, G.A.; Bertozzi, C.R. (1998) **Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells**, *Reviews*, 16, 506-512.
- [2] Muir, T.W. (1995) **A chemical approach to the construction of multimeric protein assemblies**, *Structure*, 3, 649-652.
- [3] www.solulink.com
- [4] Zatspein T.S.; Stetsenko D.A.; Arzumanov A.A.; Romanova E.A.; Gait M.J.; Oretskaya T.S. (2002) **Synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates with single and multiple peptides attached to 2'-aldehydes through thiazolidine, oxime, and hydrazine linkages**, *Bioconjug. Chem.*, 13, 822-830.
- [5] Achilles K.; Kiedrowski G.V. (2005) **Kinetic model studies on the chemical ligation of oligonucleotides via hydrazone formation**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 1229-1233.
- [6] Shao J.; Tam, J.P. (1995) **Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages**, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 3893-3899.
- [7] King T.P.; Zhao S.W.; Lam, T. (1986) **Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage**, *Biochemistry*, 25, 5774-5779.
- [8] Baymak, M.S.; Celik, H.; Ludvik, J.; Lund, H.; Zuman, P. (2004) **Diprotonated hydrazones and oximes as reactive intermediates in electrochemical reductions**, *Tetrahedron Lett.*, 45, 5113-5115.
- [9] Gaertner, H.F.; Rose K.; Cotton, R.; Timms, D.; Camble, R.; Offord, RE. (1992) **Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments**, *Bioconjug. Chem.*, 13, 262-268.
- [10] Desbrières, J. (2004) **Autoassociative natural polymer derivatives: the alkylchitosans. Rheological behavior and temperature stability**, *Polymer*, 45, 3285-3295.
- [11] Yalpani, M.; Hall, L.D. (1984) **Some chemical and analytical aspects of polysaccharide modifications. Formation of branched-chains, soluble chitosan derivatives**, *Macromolecules*, 17, 272-281.
- [12] Liu C.F.; Tam J.P. (1994) **Chemical ligation approach to form a peptide bond between two unprotected peptide segments. Concept and model study**, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 4149-4153.

- [13] Jencks, W.P. (1959) **Studies on the mechanism of oxime and semicarbazone formation**, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 475-481.
- [14] Ratner S.; Clarke, H.T. (1937) **The action of formaldehyde upon cysteine**, *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 200-206.
- [15] Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. (2001) **Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: chemoselective oxime and thiazolidine formation**, *Chem. Eur. J.*, 7, 3976-3984.
- [16] Brask J.; Jensen, K.J. (2000) **Carbopeptides: chemoselective ligation of peptide aldehydes to an aminoxy-functionalized D-galactose template**, *J. Peptide Sci.*, 6, 290-299.
- [17] Rose, K. (1994) **Facile synthesis of homogeneous artificial proteins**, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 30-33.
- [18] Inman J.K.; Dintzis H.M. (1969) **The derivatization of cross-linked polyacrylamide beads. Controlled introduction of functional groups for the preparation of special purpose, biochemical adsorbents**, *Biochemistry*, 8, 4074-4082.
- [19] Cervigny, S.E.; Dumy, P.; Mutter, M. (1996) **Synthesis of glycopeptides and lipopeptides by chemoselective ligation**, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 35, 1230-1232.
- [20] Forget, D. ; Renaudet, O. ; Defrancq, E. ; Dumy, P. (2001) **Efficient preparation of carbohydrate-oligonucleotide conjugates (COCs) using oxime bond formation**, *Tetrahedron Lett.*, 42, 7829-7832.
- [21] Sheehan, J.C.; Hess, G.P. (1955) **A new method of forming peptide bonds**, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1067-1068.
- [22] Koning, W.; Geiger, R. (1970) **A new method for the synthesis of peptides: activation of the carboxy group with dicyclohexylcarbodiimide and 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine**, *Chem. Ber.*, 103, 2024-2034.
- [23] Windridge, G.C.; Jorgensen, E.C. (1971) **1-Hydroxybenzotriazole as a racemization-suppressing reagent for the incorporation of im-Bezyl-L-histidine into peptides**, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 6318-6319.
- [24] Auzély-Velty, R.; Perly, B.; Zemb, T.; Jehan, P.; Guenot, P.; Dalbiez, J-P; Djedaïni-Pilar, F. (1999) **Cholesteryl-Cyclodextrin: Synthesis and insertion into phospholipid membranes**, *Carbohydr. Res.*, 318, 82-90.
- [25] Dahl, L. B.; Laurent, T.C. (1988) **Preparation of biologically intact radioiodinated hyaluronan of high specific radioactivity: Coupling of ¹²⁵I-tyramine-cellobiose to amino groups after partial N-deacetylation**, *Anal. Biochem.*, 175, 397-407.
- [26] Curvall, M.; Lindberg, B.; Lonngren, J. (1975) **Structural studies of the capsular polysaccharide of Klebsiella type 28**, *Carbohydr. Res.*, 41, 235-239.

- [27] Jiang, B.; Drouet, E.; Milas, M.; Rinaudo, M. (2000) **Study on TEMPO-mediated selective oxidation of hyaluronan and the effects of salt on the reaction kinetics**, *Carbohydr. Res.*, 327, 455-461.
- [28] Kawaguchi, Y.; Matsukawa, K.; Gama, Y.; Ishigami, Y. (1992) **The effects of polysaccharide chain length in coating liposomes with partial palmitoyl hyaluronates**, *Carbohydr. Polym.*, 18(2), 139-142.
- [29] Della Valle, F.; Crescenzi V.; Callegaro, L. (1992) **Gellan esters**. Eur. Pat. Appl. No. 92 400 352 8.
- [30] Pelletier, S.; Hubert, P.; Payan, E.; Choplin, L.; Dellacherie, E. (2001) **Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: Rheological properties**, *J. Biomed. Mater. Res.*, 54, 102-104.
- [31] Sheenan, J.C.; Hlavka, J.J. (1956) **The use of water-soluble and basic carbodiimides in peptide synthesis**, *J. Org. Chem.*, 21, 439-441.
- [32] Danishefsky, I.; Siskovic, E. (1971) **Conversion of carboxyl groups of mucopolysaccharides into amides of amino acid esters**, *Carbohydr. Res.*, 16, 199-205.
- [33] Kuo, J-W.; Swann, D.A.; Preswitch, G.D. (1991) **Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides**, *Bioconjug. Chem.*, 2, 232-241.
- [34] Tengblad, A. (1978) **Affinity chromatography on immobilized hyaluronate and its application to the isolation of hyaluronate binding properties from cartilage**, *Biochim. Biophys. Acta*, 578, 281-289.
- [35] Ogamo A.; Matsuzaki K.; Uchiyama H.; Nagasawa K. (1982) **Preparation and properties of fluorescent glycosaminoglycans labeled with 5-aminofluorescein**, *Carbohydr. Res.*, 105, 69-85.
- [36] Inoue Y.; Nagasawa K. (1982) **On the reaction of N-acetylchondrosine, N-acetylchondrosine 6-sulfate, chondroitin 6-sulfate, and heparin with 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide**, *Carbohydr. Res.*, 111, 113-125.
- [37] Rasshofer, W. (1983) *Methoden Org.Chem.* (Houben-Weyl) E4, 883-910.
- [38] Pouyani, T.; Kuo, J-W.; Harbison, G.S.; Preswitch, G. D. (1992) **Solid-State NMR of N-Acylureas derived from the reaction of hyaluronic acid with isotopically-labeled carbodiimides**, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5972-5976.
- [39] Bulpitt, P.; Aeschliman, D. (1999) **New strategy for chemical modification of hyaluronic acid : preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels**, *J. Biomed. Mater. Res.*, 47, 152-169.

- [40] Pouyani, T.; Harbison, G.S.; Preswitch, G.D. (1994) **Novel hydrogels of hyaluronic acid: Synthesis, surface, morphology, and solid-state NMR**, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 7515-7522.
- [41] Preswitch, G.D.; Marecak, D.M.; Marecek, J.F.; Vercruyse, K.P.; Ziebell, M.R. (1998) **Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives**, *J. Control. Release*, 53, 93-103.
- [42] Rakestraw S.L.; Tompkins, R.G.; Yarmush, M.L. (1990) **Preparation and characterization of immunoconjugates for antibody-targeted photolysis**, *Bioconjug. Chem.*, 1, 212-221.
- [43] Vercruyse, K.P.; Marecak, D.M.; Marecek, J.F.; Preswitch, G.D. (1997) **Synthesis and in vitro degradation of new polyvalent hydrazide cross-linked hydrogels of hyaluronic acid**, *Bioconjug. Chem.*, 8, 686-694.
- [44] Melton, L.D.; Slessor, K.N. (1971) **Synthesis of monosubstituted cyclohexaamyloses**, *Carbohydr. Res.*, 18, 29-37.
- [45] Martin, K.A.; Czarnik, W. (1994) **Facile preparation of the b-cyclodextrinyl aldehyde**, *Tetrahedron Lett.*, 35, 6781-6782.
- [46] Nace, H.R.; Monagle, J.J. (1959) **Reactions of sulfoxides with organic halides. Preparation of aldehydes and ketones**, *J. Org. Chem.*, 24, 1792-1793.
- [47] Kornblum, N.; Jones, W.J.; Anderson, G.J. (1959) **A new and selective method of oxidation. The conversion of alkyl halides and alkyl tosylates to aldehydes**, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4113-4114.
- [48] Horton, D, Luetzow, A. E., Theander, O. (1973) *Carbohydr. Res.*, 26, 1.
- [49] Gibson, A.R.; Maleton, L.D.; Slessor, K.N. (1973) **ω -Aldehyde sugars prepared by ninhydrin oxidation**, *Can. J. Chem.*, 52, 3905-3912.
- [50] Horton, D, Luetzow, A. E., Theander, O., (1973), *Carbohydr. Res.*, 27, 268.
- [51] Huff, J.B.; Bieniarz, C. (1994) **Synthesis and reactivity of 6- β -cyclodextrin monoaldehyde: an electrophilic cyclodextrin for the derivatization of macromolecules under mild conditions**, *J. Org. Chem.*, 59, 7511-7516.
- [52] Dess, D.B.; Martin, J.C. (1983) **Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones**, *J. Org. Chem.*, 48, 4155-4156.
- [53] Dess, D.B.; Martin, J.C. (1991) **A useful 12-I-5 triacetoxypersulfonane (the Dess-Martin Persulfonane) for the selective oxidation of primary or secondary alcohols and a variety of related 12-I-5 species**, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 7277-7287.

- [54] Cornwell, M. J.; Huff, J.B.; Bieniarz, C. (1995) **A one-step synthesis of cyclodextrin monoaldehydes**, *Tetrahedron Lett.*, 36, 8371-8374.
- [55] Petter, R.C.; Salek, J.S.; Sikorski, C.T.; Kuramavel, G.; Lin, F-T. (1990) **Cooperative binding by aggregated mono-6-(alkylamino)- β -cyclodextrins**, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 3860-3868.
- [56] Paquet, A., (1975) **Succinimidyl esters of fatty acids for amino acid acylations**, *Can. J. Chem.*, 54, 733-737
- [57] Dordi, B.; Schönherr, Vansco, G.J. (2000) **Reactivity in the confinement of self-assembled monolayers : Chain length effects on the hydrolysis of *N*-Hydroxy succinimide ester disulfides on gold**, *Langmuir*, 19, 5780-5786.
- [58] Auzély-Velty, R.; Rinaudo, M. (2001) **Chitosan derivatives bearing pendant cyclodextrin cavities: Synthesis and inclusion performance**, *Macromolecules*, 34, 3574-3580.
- [59] Green, T.W.; Wuts, P.G.M. (1999) **Protective groups in organic synthesis**; 3rd edition ; Wiley : New York, p 531-537.
- [60] Hattori, K.; Sajiki, H.; Hirota, K. (2000) **Pd/C(en)-catalized chemoselective hydrogenation with retention of the *N*-Cbz protective group and its scope and limitations**, *Tetrahedron*, 56, 8433-8441.
- [61] Bergman, M.; Zervas, L. (1932) *Ber.*, 65, 1192-1201.
- [62] Yingyongnarongkul, B-E.; Howarth, M.; Elliott, T.; Bradley, M. (2004) **Solid-phase synthesis of 89 polyamine-based cationic lipids for DNA delivery to mammalian cells**, *Chem. Eur. J.*, 10, 463-473.
- [63] Macomber, R.S. (1998) **A complete introduction to modern NMR spectroscopy**, John Wiley & Sons, Inc., New-York, p 158-159.
- [64] Quintanilla-Licea, R.; Colunga-Valladares, J.F.; Caballero-Quintero, A.; Rodriguez-Padilla, C.; Tamez-Guerra, R.; Gomez-Flores, R.; Waksman, N. (2002) **NMR detection of isomers arising from restricted rotation of C-N amide bond of *N*-formyl-*O*-toluidine and *N,N'*-bis-formyl-*O*-toluidine**, *Molecules*, 7, 662-673.
- [65] Ullrich, S.; Tarczay, G.; Tong, X.; Dessent, C.E.H.; Müller-Dethlefs, K. (2001) **A ZEKE photoelectron spectroscopy and *ab initio* study of the *cis*- and *trans*-isomers of formanilide: characterizing the cationic amide bond ?**, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3, 5450-5458.
- [66] Dumy, P.; Keller, M.; Ryan, D.E.; Rohweder, B.; Wöhr, T.; Mutter, M. (1997) **Pseudo-prolines as a molecular hinge: Reversible induction of *cis* amide bonds into peptide backbones**, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 918-925.
- [67] Yamamoto, Y. ; Nagasaki, Y. ; Kato, M. ; Kataoka, K. (1999) **Surface charge modulation of poly(ethyleneglycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles :**

- conjugation of charged peptides**, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 16, 135-146.
- [68] Forget, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P., **Efficient preparation of carbohydrate-oligonucleotide conjugates (COCs) using oxime bond formation**, *Tetrahedron Lett.*, 42, 7829-7832.
- [69] Borch, R.F.; Bernstein, M.D.; Dupont Durst, H. (1971) **The cyanohydrin borate anion as a selective reducing agent**, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2897-2904.
- [70] Ellison, R.A.; Lukenbach, E.R.; Chiu, C-W. (1975) **Cyclopentenone synthesis of a key prostaglandin intermediate**, *Tetrahedron Lett.*, 8, 499-502.
- [71] Byran D.B.; Hall R.F.; Holden K.G.; Huffman W.F. (1977) **Gleason JGNuclear analogues of beta-lactam antibiotics. 2 The total synthesis of 8-oxo-4-thia-z-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acids**, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 2353-2355.
- [72] Charlot, A.; Auzély-Velty, R.; Rinaudo, M. (2003) **Specific interactions in model charged polysaccharide systems**, *J. Phys. Chem. B*, 107, 8248-8254.

CHAPITRE III.

**ÉTUDE PHYSICO - CHIMIQUE DES ASSEMBLAGES
SUPRAMOLECULAIRES A BASE DE HYALURONANE**

INTRODUCTION	132
I COMPORTEMENT EN MILIEU AQUEUX DES MOLECULES ET DES MACROMOLECULES HOTES ET INVITEES	133
I.1 Caractérisation des complexes par titration microcalorimétrique	133
I.1.1 Propriétés d'inclusion des monomères et des dimères de β -CD libres vis-à-vis des dérivés d'adamantane libres	133
I.1.1.1 Propriétés d'inclusion des monomères de β -CD libres	134
I.1.1.2 Propriétés d'inclusion des dimères de β -CD libres	141
I.1.2 Propriétés d'inclusion des polymères hôtes et invités.....	149
I.1.2.1 Hyaluronane porteur de monomères de β -CD, HA(CD) et de dimères de β -CD, HA(CD) ₂	149
I.1.2.2 Hyaluronane porteur de monomères d'AD, HA(AD) et de dimères d'AD, HA(AD) ₂	153
I.2 Propriétés en solution des polymères hôtes et invités seuls.....	157
I.2.1 Viscosimétrie capillaire	157
I.2.2 Viscosités mesurées à l'aide d'un viscosimètre Low Shear 30.....	159
I.2.2.1 Hyaluronane initial.....	159
I.2.2.2 Dérivés HA(CD) et HA(AD).....	161
I.2.3 Analyse du comportement en écoulement des polymères hôtes et invités.....	163
I.2.3.1 "Réponse" des polymères HA(AD), HA(CD), HA(AD) ₂ , et HA(CD) ₂ suite à l'application d'une rampe continue de contrainte en écoulement	164
I.2.3.2 Cas particulier du hyaluronane porteur de dimères d'AD, HA(AD) ₂	165
II ETUDE RHEOLOGIQUE DES DIFFERENTS ASSEMBLAGES SUPRAMOLECULAIRES A BASE DE HYALURONANE.....	168
II.1 Formation des assemblages supramoléculaires.....	168
II.1.1 Modèles théoriques développés.....	171
II.1.2 Résultats expérimentaux.....	173
II.2 Influence de différents paramètres sur les propriétés viscoélastiques des assemblages	176
II.2.1 Influence de la force ionique	176
II.2.2 Influence de la concentration en polymère.....	176
II.2.3 Influence de la température	179
II.2.3.1 Variation de G' et G'' en fonction de la température.....	179
II.2.3.2 Variation de G' et G'' en fonction de la fréquence à différentes températures	180
II.2.4 Influence de l'ajout d'une molécule compétitive : le β -CD naturelle.....	186
II.3 Etude du comportement en écoulement des mélanges.....	189
II.3.1 Etude de la déstructuration des deux types d'assemblages supramoléculaires.....	190
II.3.2 Cinétique de restructuration.....	191
II.3.3 Effet de la température	191
CONCLUSION	194
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	196

Introduction

Nous avons présenté dans le chapitre précédent l'obtention de molécules et macromolécules hôtes et invitées de structures différentes. L'un des objectifs de ce travail est de jouer sur la taille donc sur l'énergie des complexes d'inclusion interchaînes stabilisant les assemblages supramoléculaires.

L'étude et la compréhension des propriétés physico-chimiques des différents systèmes obtenus reposent sur la caractérisation et la comparaison des différents complexes mis en jeu ainsi que sur l'analyse des propriétés en solution des polymères modifiés seuls.

Les techniques physico-chimiques que nous avons choisies pour répondre à ces besoins sont la titration microcalorimétrique isotherme (ITC) et la rhéologie. La combinaison de ces deux techniques permet une analyse des propriétés microscopiques (ITC) et macroscopiques (rhéologie) des systèmes mis en oeuvre. Le lien entre les données thermodynamiques et le comportement rhéologique des systèmes formés permettra de mieux comprendre la relation entre leurs structures et leurs propriétés.

Nous exposerons dans une première partie une étude détaillée du comportement en milieu aqueux des différentes molécules et macromolécules hôtes et invitées. Les propriétés de complexation des monomères et des dimères de β -CD et d'AD libres et des polymères hôtes et invités seront analysées à travers l'étude des données thermodynamiques obtenues par des expériences d'ITC. Des mesures de viscosité permettront de mieux appréhender les propriétés en solution des macromolécules hôtes et invitées.

Après une étude des polymères hôtes et invités seuls, nous chercherons alors à déterminer les propriétés viscoélastiques des assemblages supramoléculaires résultant de leur mélange. La deuxième partie de ce chapitre concerne la caractérisation du comportement rhéologique des deux assemblages obtenus, à savoir les mélanges de HA(AD)/HA(CD) et de HA(AD)₂/HA(CD)₂. Nous présenterons, notamment, l'influence de divers paramètres externes (force ionique, concentration en polymère, température, addition d'une molécule compétitive) sur les propriétés viscoélastiques des deux types de mélange.

I Comportement en milieu aqueux des molécules et des macromolécules hôtes et invitées

I.1 Caractérisation des complexes par titration microcalorimétrique

En milieu aqueux, les cyclodextrines naturelles et modifiées chimiquement forment des complexes d'inclusion avec une grande variété de molécules organiques (voir chapitre I) [1,2]. La formation de tels complexes de type hôte-invité entre des petites molécules organiques et les cyclodextrines s'avère un excellent modèle pour étudier les interactions non-covalentes en milieu aqueux telles que les interactions spécifiques enzyme-substrat [3] qui présentent des constantes d'association du même ordre de grandeur que les complexes de type hôte-invité [4].

Il existe une grande variété de méthodes expérimentales permettant d'accéder aux grandeurs thermodynamiques caractérisant les complexes d'inclusion de cyclodextrine. Ces méthodes incluent les différents types de calorimétrie [5], le dichroïsme circulaire [6], la fluorescence [7], la spectroscopie UV [8], la résonance magnétique nucléaire [9], la spectroscopie ESR (résonance de spin électronique) [10], l'électrophorèse capillaire [11], la détermination de la solubilité [12]...

La calorimétrie, en particulier l'ITC, est la seule méthode qui permette d'accéder directement à l'enthalpie standard de la réaction : ΔH° , à température constante, à la constante d'association K_a et à la stœchiométrie n du complexe. Le principe de base et les fondements théoriques de l'ITC sont présentés dans la partie expérimentale (chapitre IV). Nous avons donc choisi cette méthode pour étudier les propriétés de complexation des différents dérivés que nous avons synthétisés.

I.1.1 Propriétés d'inclusion des monomères et des dimères de β -CD libres vis-à-vis des dérivés d'adamantane libres

Les propriétés de complexation dépendent étroitement de la structure des molécules hôtes et invitées [1,13]. Il est donc essentiel d'étudier les propriétés de la reconnaissance moléculaire pour toutes les molécules hôtes et invitées.

I.1.1.1 Propriétés d'inclusion des monomères de β -CD libres

Il est bien connu que les β -CDs modifiées présentent des propriétés de complexation différentes des β -CD naturelles dont elles dérivent et ces propriétés dépendent également de la nature et de la structure du groupement greffé sur la cavité de β -CD [14-16].

Pour l'étude des propriétés d'inclusion des monomères de β -CD libres, nous avons choisi d'utiliser le sel de sodium d'acétate d'adamantane (ADAc) comme molécule invitée modèle. Ce dérivé est parfaitement soluble en milieu aqueux puisqu'il est dissout sous sa forme saline totalement dissociée. Nous avons donc cherché, dans un premier temps, à comparer les grandeurs thermodynamiques des complexes d'inclusion β -CD naturelle (**9**)/ADAc (**38**) (figure III-1 a)) avec celles des complexes β -CD monoacide (**16**)/ADAc et β -CD monoacétal (**18**)/ADAc figure III-1 b) et c)).

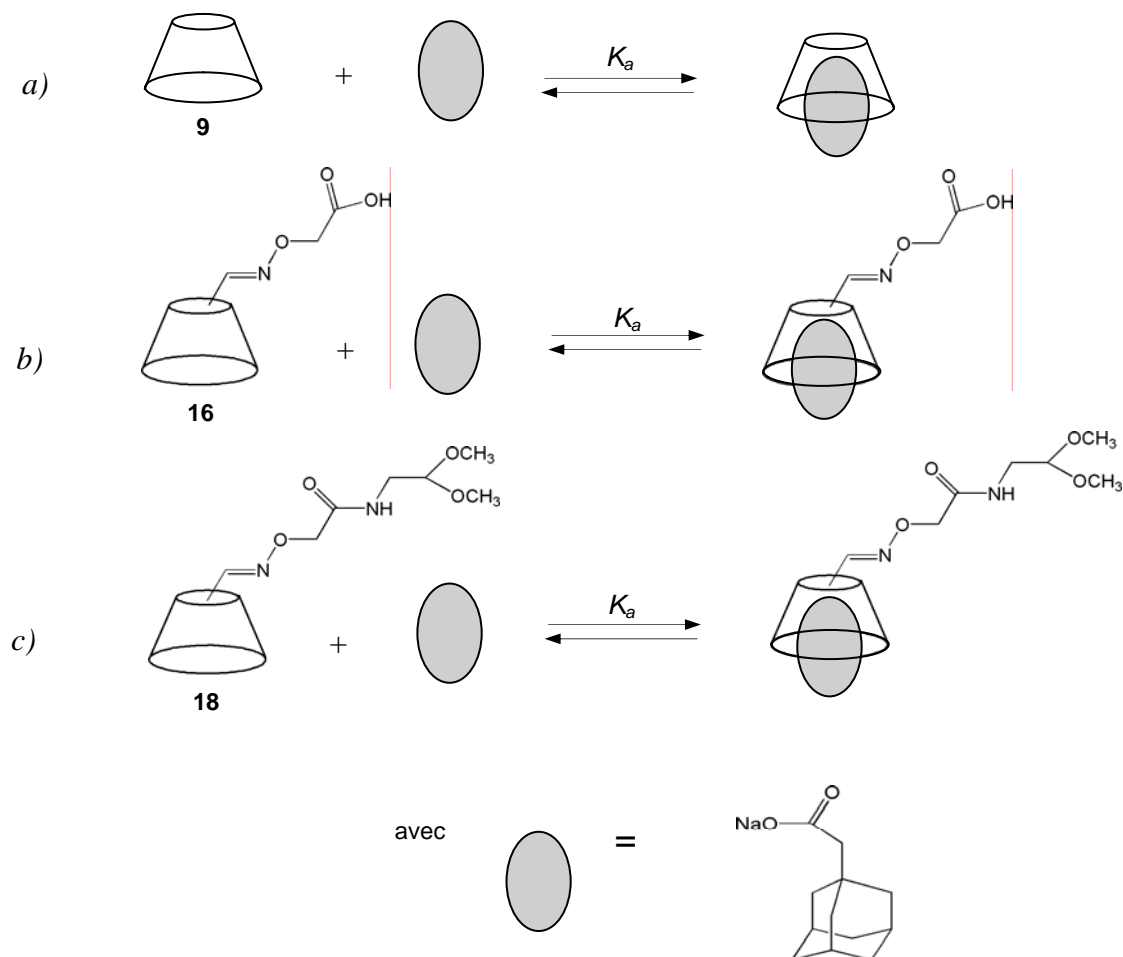


Figure III- 1 : Complexes de type hôte-invité formé en milieu aqueux entre les différents monomères de β -CD et l'ADAc

Ces complexes sont en échange dynamique et sont caractérisés par une constante d'association K_a . L'association et la dissociation des deux espèces (récepteur = R et ligand = L) sont gouvernées par un équilibre thermodynamique et la constante d'association est reliée aux concentrations des espèces à l'équilibre :

$$K_a = \frac{[RL]}{([R] \times [L])} \quad \text{éq. III- 1}$$

Le phénomène de reconnaissance moléculaire en chimie, notamment pour les complexes β -CD/molécule invitée, et en biologie, implique des interactions non-covalentes telles que les interactions hydrophobes, de van der Waals, électrostatiques (ion-ion, dipôle-dipôle, dipôle-dipôle induit), liaisons hydrogène... Les interactions non-covalentes impliquées dans le processus de complexation avec les β -CD dépendent de la structure de la β -CD (modification chimique), de celle de la molécule invitée et sont directement liées aux grandeurs thermodynamiques déterminées expérimentalement.

Dans les processus de reconnaissance moléculaire, particulièrement dans les systèmes supramoléculaires biologiques, le phénomène de coopérativité joue un rôle central. Dans le cas des β -CDs sous forme de monomères, les interactions faibles stabilisant les complexes d'inclusion ne sont pas toujours coopératives par nature et peuvent agir de façon indépendante.

La formation d'un complexe d'inclusion à base de β -CD en milieu aqueux implique :

- i. la pénétration de la partie hydrophobe de la molécule invitée dans la cavité de la β -CD et donc la déshydratation de la molécule organique invitée,
- ii. la libération de molécules d'eau présentes naturellement dans la cavité de β -CD [17],
- iii. le changement de conformation de la molécule de β -CD dû à la complexation [18].

Des expériences d'ITC ont été effectuées en titrant des solutions de β -CD naturelle puis de monoacide et de monoacétal ((9), (16) et (18)) par une solution d'ADAc (24 additions de 10 μ L). Les concentrations en ligand et en récepteur utilisées (tableau III-1) ont été ajustées en fonction de la constante d'association.

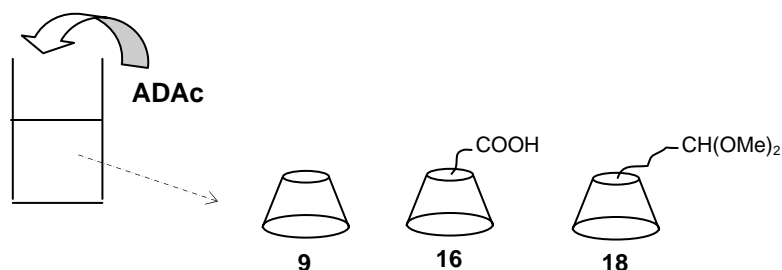


Figure III- 2 : Addition de l'ADAc sur les différentes molécules de β -CD

Un exemple d'expérience d'ITC est donné sur la figure III-3.

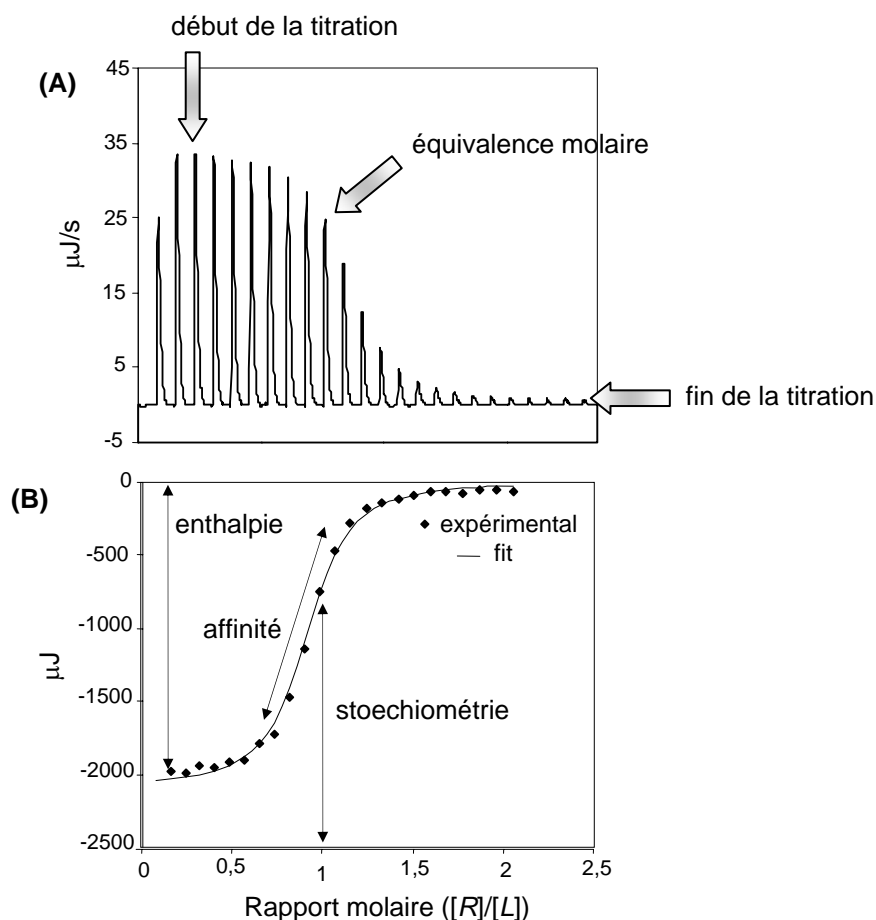


Figure III- 3 : Titration calorimétrique d'une solution de β -CD naturelle (9) (0,798 mM) par une solution d'acétate d'adamantane (38) (8,807 mM) (addition de 24 aliquots) dans l'eau à 25°C- Expériences effectuées sur le calorimètre CSC 4200 de Calorimetry (cf chapitre IV)

Sur le thermogramme (A) de la figure III-3, chaque pic représente la puissance appliquée par l'appareil, après chaque addition d'ADAc, nécessaire pour maintenir la même température dans les 2 cellules (voir chapitre IV). L'aire de chacun de ces signaux correspond donc à la quantité d'énergie libérée (exothermique) lors d'une addition de ligand et, est liée

au nombre de complexes β -CD/ADAc qui se forment. Au début de la titration, les pics ont une amplitude élevée ce qui s'explique par la formation d'un nombre important de complexes. La présence d'un tel plateau est significative d'une constante d'association élevée. En effet, l'amplitude des premiers pics est constante car toutes les molécules d'ADAc se lient à la β -CD en large excès à ce stade de la titration. De plus, comme figuré sur la courbe (B), l'inflexion marquant la rupture entre le plateau initial et le plateau final reflète l'affinité entre les deux espèces. Autour de l'équivalence molaire correspondant à la stoechiométrie de l'interaction, l'amplitude des signaux diminue car il y a de moins en moins de sites disponibles pour la complexation. A la fin de la titration, toutes les β -CD disponibles sont saturées par l'ADAc et les pics observés correspondent alors à l'effet de dilution du ligand.

Les données expérimentales sont ajustées par une courbe de titration théorique (figure III-3 (B)) en utilisant un modèle à un site avec comme paramètres ajustables, l'enthalpie standard de la complexation ΔH° , la constante d'association K_a et la stoechiométrie n .

Les grandeurs thermodynamiques caractéristiques des complexations entre l'ADAc et les différents dérivés de β -CD sont présentées dans le tableau III-1.

dérivé de β -CD	[NaCl] (M)	[CD] (mM)	[AD] (mM)	$K_a \times 10^{-4}$ (M^{-1})	ΔH° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)	n (nAD:1CD)
β -CD	0	0,798	8,81	(7,5 \pm 0,9)	-25,8 \pm 1,2	2,00 \pm 1,13	-27,8 \pm 0,8	0,90 \pm 0,02
	0,1	0,798	8,78	(8,5 \pm 1,1)	-25,9 \pm 0,9	2,21 \pm 0,98	-28,1 \pm 0,7	0,97 \pm 0,08
(16)	0	0,686	6,905	(4,6 \pm 0,7)	-25,5 \pm 2,3	1,09 \pm 0,26	-26,6 \pm 0,7	0,84 \pm 0,03
	0,1	0,707	6,81	(7,0 \pm 0,3)	-27,2 \pm 0,5	0,43 \pm 0,39	-27,6 \pm 0,9	0,72 \pm 0,03
(18)	0	0,731	7,44	(1,9 \pm 0,4)	-32,6 \pm 0,1	-8,19 \pm 0,06	-24,4 \pm 0,5	0,95 \pm 0,17
	0,1	0,747	7,47	(5,6 \pm 0,9)	-26,3 \pm 0,8	0,78 \pm 0,82	-27,1 \pm 0,3	0,85 \pm 0,04

Tableau III- 1 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par des expériences d'ITC en titrant des solutions de β -CD, de β -CD monoacide (16) et de β -CD monoacétal (18) par une solution d'ADAc à 25°C dans deux concentrations en NaCl différentes, 0 M et 0,1 M

Les incertitudes de ces valeurs prennent en compte les incertitudes de l'appareillage relativement faibles et les incertitudes dues aux conditions expérimentales. Ces dernières, variant d'une expérience à l'autre, affectent les mesures obtenues. Ces conditions expérimentales portent sur la masse des produits, le volume de solvant, le temps d'agitation et les conditions opératoires de l'expérience. Les incertitudes dues aux conditions expérimentales ont été évaluées en répétant la même expérience 2 à 3 fois.

Connaissant la constante d'association et l'enthalpie de la réaction, nous pouvons facilement accéder à la variation d'énergie libre standard ΔG° de la complexation puisque :

$$\Delta G^\circ = -RTLn(K_a) = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{éq.III - 2}$$

où ΔH° et ΔS° sont respectivement la variation d'enthalpie et d'entropie, K_a est la constante d'association, T est la température absolue et R est la constante des gaz parfaits égale à 8,314 JK⁻¹mol⁻¹.

Une interaction hôte-invité favorisée correspond d'une part, à une valeur de ΔG° négative, ce qui implique une valeur de ΔH° négative et une valeur de $T\Delta S^\circ$ positive et d'autre part, à une constante K_a élevée. Les valeurs de ΔG° calculées, les valeurs de ΔH° et celles de K_a présentées dans le tableau III-1 montrent que ces complexations sont exothermiques et très favorables. Les valeurs de n tendent asymptotiquement vers 1 : il se forme des complexes 1:1, c'est-à-dire qu'une cavité de β -CD interagit avec une molécule d'adamantane. La différence entre la valeur théorique de 1 et les valeurs expérimentales qui sont plus faibles peut être attribuée au fait que les β -CDs ne sont pas toutes disponibles pour la complexation. Ceci peut s'expliquer par une légère agrégation des β -CDs en milieu aqueux à ces concentrations, résultant vraisemblablement de l'établissement de liaisons hydrogène entre les couronnes externes hydrophiles des β -CDs [2,19,20]. L'écart le plus important entre la valeur de n et 1 est observé pour la β -CD monoacide ($n = 0,7$ et $0,8$), probablement à cause de la présence du groupement carboxylate susceptible de favoriser la formation de liaisons hydrogène supplémentaires.

1.1.1.1 Interactions mises en jeu lors du processus d'interaction

Comme expliqué auparavant, nous pouvons accéder à la valeur de ΔG° et connaître alors très précisément les contributions enthalpique et entropique dans l'énergie d'interaction. Il est ainsi possible de préciser les forces contribuant à la formation des complexes.

L'enthalpie est liée à la structure du complexe et du solvant tandis que l'entropie est reliée à l'ordre. En particulier, l'augmentation des degrés de liberté (en rotation et en translation), de la dynamique de conformation et du solvant sont sources de désordre.

Nous retrouvons un caractère commun pour les trois types de β -CD : une forte contribution exothermique enthalpique (ΔH° négatif) et une très faible contribution entropique. Ce phénomène a été observé pour la majorité des complexes de type hôte-invité à base de β -CD [1,4]. Les interactions hydrophobes sont généralement connues pour jouer un rôle important dans la stabilité des interactions entre deux molécules apolaires en milieu aqueux [21]. L'effet hydrophobe "classique" se traduit par une contribution entropique importante dans l'énergie totale [22,23]. Ceci s'explique par le fait que les molécules d'eau sont plus ordonnées à proximité d'un soluté apolaire. Dans le cas des complexes à base de β -CD, la forte contribution enthalpique et la faible contribution entropique ont été nommées par quelques auteurs "effet hydrophobe non-classique" [24,25]. Les valeurs importantes de l'enthalpie indiquent que les interactions hydrophobes ne sont pas les seules intervenant dans le processus de complexation. Les interactions dispersives de van der Waals sont impliquées dans la complexation hôte-invité à base de β -CD, particulièrement lorsqu'il s'agit de molécules d'adamantane comme molécules invitées. En effet, les forces de van der Waals, à très faible portée, sont importantes dans le cas des complexes β -CD/ADAc où la distance β -CD/ADAc est faible en raison de la qualité de l'inclusion de l'ADAc dans β -CD [13]. Par ailleurs, étant donné que la partie acétate de la molécule d'ADAc est à l'extérieur de la cavité de β -CD, nous pouvons penser qu'il se forme des liaisons hydrogène entre le carboxylate de l'ADAc et les groupements hydroxyle présents sur la surface de la couronne hydrophile de la β -CD. Toutes ces interactions secondaires contribuent aux effets enthalpiques observés.

1.1.1.2 Effet de la monofonctionnalisation de la β -CD

Comme la β -CD est monofonctionnalisée sur le plus petit côté et que l'adamantane s'inclue par le plus grand côté, la présence du bras espaceur à la surface de la cavité ne devrait pas gêner les propriétés d'inclusion. Le tableau III-1 montre que les valeurs de l'enthalpie pour les trois types de β -CD sont du même ordre de grandeur ce qui suggère des processus d'interaction comparables, c'est-à-dire des complexes de structures similaires.

Toutefois, concernant la β -CD monoacétal (**18**) dans NaCl 0,1 M, la valeur de K_a est légèrement plus faible que pour les deux autres β -CDs. Nous avons alors vérifié si le bras

greffé sur la cavité de la β -CD n'avait pas tendance à s'inclure partiellement dans la cavité de la β -CD puisque ce phénomène a déjà été observé dans le cas de β -CDs modifiées chimiquement [20,26].

L'expérience RMN bidimensionnelle T-ROESY nous a permis de mettre en évidence des proximités spatiales entre les protons méthyle du groupement acétal et les protons de la cavité de la β -CD (figure III-4)

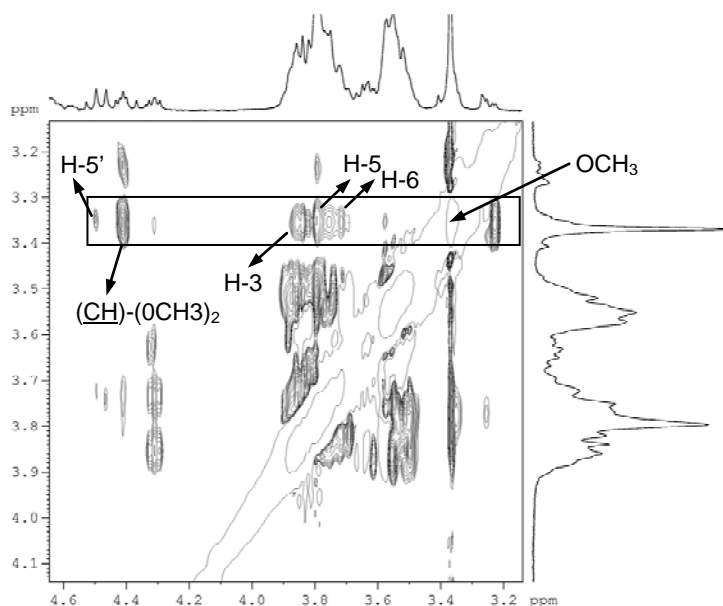


Figure III- 4 : Contours partiels de la carte T-ROESY du dérivé β -CD monoacétal (18) (400 MHz, D_2O , 298 K, 20 mg/mL, $t_m = 150$ ms)

La présence de taches de corrélation entre les protons des groupements CH_3 du bras et les protons H-3, H-5, H-5' et H-6 de la β -CD souligne une inclusion du bras à l'intérieur de la cavité [27]. Cependant, ces résultats ne nous permettent pas de savoir si l'inclusion du bras espaceur est intra- ou intermoléculaire. Quant à la β -CD monoacide, la carte T-ROESY n'indique aucune interaction entre le bras espaceur et la cavité de la β -CD.

1.1.1.1.3 Effet de la charge des molécules hôtes et invitées

La présence de charges sur la β -CD comme sur la molécule invitée a une influence sur les propriétés de complexation. Il a été rapporté dans la littérature que les β -CD mono- et

diamines montrent des constantes plus ou moins élevées avec des molécules invitées chargées positivement ou négativement [1,29,30].

Le groupement carboxylate, permettant la solubilité en milieu aqueux de l'ADAc, confère à cette molécule invitée une charge négative dans l'eau distillée à pH 5,6. Des répulsions électrostatiques et une moins bonne désolvatation de la cavité sont donc susceptibles d'entraîner une diminution de la constante d'association pour le complexe ADAc/ β -CD monoacide. Nous avons donc réalisé les expériences ITC dans l'eau et dans NaCl 0,1 M. La constante d'association des complexes ADAc/ β -CD monoacide dans NaCl 0,1 M est plus élevée et se rapproche de celle du complexe ADAc/ β -CD naturelle. Ceci peut provenir de l'écrantage des répulsions électrostatiques entre les charges négatives de la β -CD monoacide et de l'ADAc. Par ailleurs, la présence de sel entraîne une légère augmentation de la constante d'association pour le complexe β -CD/ADAc, qui peut être liée à l'hydrophobicité renforcée de l'ADAc dans le sel.

Dans NaCl 0,1 M, les paramètres thermodynamiques des trois complexes sont proches ce qui indique que les dérivés de cyclodextrine conservent leurs propriétés d'inclusion malgré la modification chimique.

1.1.1.2 Propriétés d'inclusion des dimères de β -CD libres

Différentes expériences d'ITC ont donc été effectuées afin de mettre en évidence l'augmentation de la constante d'association dans le cas d'interactions divalentes impliquant les dimères de β -CD et d'AD. Etant donné la structure de ces dimères, plusieurs questions se posent.

Les monomères de β -CD présentent une légère auto-association en milieu aqueux qui dépend de la concentration. Il semble donc naturel de se demander si les dimères de β -CD ont également tendance à s'auto-associer. Par ailleurs, la nature amphiphile du dimère d'adamantane due à la présence des deux charges des groupements carboxylate et des deux molécules hydrophobes d'adamantane est susceptible d'induire la formation de micelles en milieu aqueux. De plus, comme la structure des dimères offre plusieurs conformations pour la complexation, on peut s'interroger sur la nature des complexes β -CD/AD. Le schéma III-1 illustre différentes situations possibles pour la complexation entre les dimères de β -CD et d'AD.

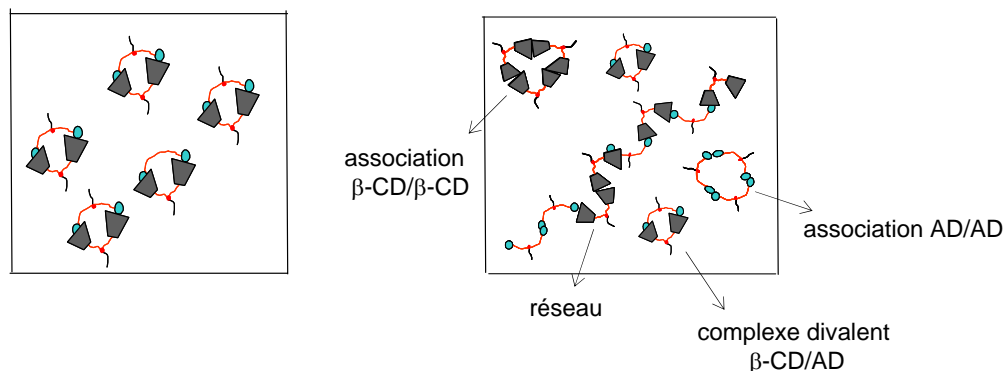


Schéma III- 1 : Représentation schématique d'une solution constituée uniquement d'interactions divalentes (à gauche) et constituée de différentes interactions concomitantes (à droite)

I.1.1.2.1 Titration des dimères de β -CD

Nous avons réalisé des expériences d'ITC dans l'eau en titrant le dimère de β -CD (27) par le monomère d'AD (38) (expérience A) d'une part, et par le dimère d'AD (38) (expérience B) d'autre part, et ce, à différentes concentrations (figure III-5).

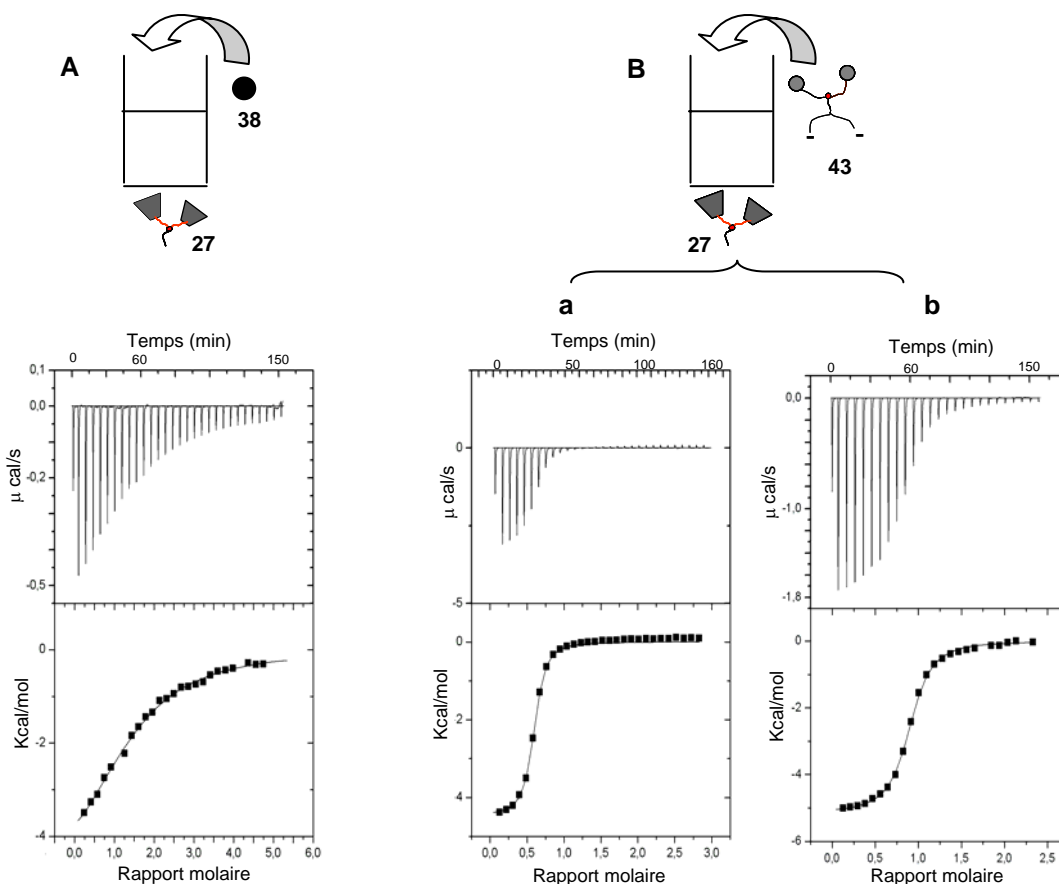


Figure III- 5 : Titration calorimétrique du dimère de β -CD (27) par l'ADAc (38) (expérience A) et par le dimère d'AD (38) (expériences B-a et B-b) dans l'eau à 25°C. Expériences effectuées avec le calorimètre VP-ITC de Microcal.

Il est possible grâce à des expériences d'ITC de mesurer la concentration micellaire critique de tensioactifs [31,32]. De telles expériences reposent sur la dilution de solutions concentrées de tensioactifs dans l'eau. Nous avons vérifié, par des expériences similaires que le dimère d'adamantane ne s'auto-associait pas aux concentrations utilisées pour les expériences B-a et B-b (figure III-5).

Les grandeurs thermodynamiques obtenues grâce aux expériences A, B-a et B-b sont présentées dans le tableau III-2. Les concentrations des molécules hôtes et invitées pour les expériences B-a et B-b sont respectivement les concentrations des dimères de β -CD et celles des dimères d'adamantane. La concentration de la molécule hôte de l'expérience A est la concentration du dimère de β -CD.

Exp.	[hôte] (mM)	[invité] (mM)	$K_a \times 10^{-6}$ (M^{-1})	ΔH° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)	n (n invité:1 hôte)
A	0,019	0,45	(0,076 \pm 0,06)	-22,8 \pm 0,6	5,04 \pm 0,56	-27,8 \pm 0,9	1,5 \pm 0,03
B-a	0,092	1,167	(1,08 \pm 0,11)	-37,3 \pm 0,7	-2,88 \pm 0,09	-34,4 \pm 0,4	0,56 \pm 0,02
B-b	0,047	0,569	(1,14 \pm 0,09)	-43,1 \pm 1,1	-8,55 \pm 0,98	-34,6 \pm 0,7	0,90 \pm 0,08

Tableau III- 2 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par les expériences d'ITC A, B-a et B-b

Les expériences de calorimétrie (A) et (B) ont été effectuées en vue de comparer les interactions monovalentes et divalentes en milieu aqueux. Pour un complexe 2 :1 (2 AD liés à 1 dimère de β -CD), n doit tendre vers 2. Pour la courbe de titration A, n vaut 1,5, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'une partie des β -CDs n'est pas disponible pour la complexation, en raison d'interactions entre les cavités de β -CD, comme observé dans le cas des monomères de β -CD. Les valeurs de la constante K_a (76 000 M^{-1}) sont caractéristiques d'une simple interaction β -CD/AD présentée dans le tableau III-1. Les deux molécules de β -CD du dimère (27) peuvent donc être considérées comme 2 sites indépendants pour la complexation.

La courbe de titration B-b montre un point d'inflexion correspondant à un rapport molaire tendant vers 1 indiquant la formation d'un complexe 1 : 1 c'est à dire qu'un dimère de β -CD interagit avec un dimère d'AD.

Pour l'expérience B-a, les concentrations en dimère sont deux fois plus grandes que celles utilisées dans B-b et on note une stoechiométrie n de 0,56. Ces résultats soulignent d'une part l'auto-association des β -CDs et d'autre part le fait qu'elle est favorisée quand la concentration augmente. Cet écart de la valeur de n par rapport à 1 est vraisemblablement lié à des phénomènes d'association des dimères de β -CD, favorisés lorsque la concentration augmente. Ceci peut être observé qualitativement à partir du thermogramme B-a qui montre la saturation des cavités de β -CD à la 9^{ième} injection alors que celle-ci apparaît à la 18^{ième} injection dans le cas de l'expérience B-b. Tout se passe comme si la concentration en dimère de β -CD dans B-a était deux fois plus faible.

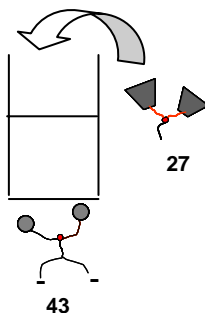
Les grandeurs thermodynamiques obtenues pour l'expérience B-b sont typiques d'une interaction divalente. En effet, la constante d'association, de l'ordre de $1\ 140\ 000\ \text{M}^{-1}$ est 15 fois plus grande que la constante K_a d'une simple interaction β -CD/AD (expérience A). Ceci peut être observé qualitativement à partir des thermogrammes A et B-b. On constate en effet l'absence de plateau au cours des premières additions dans l'expérience A ce qui reflète ainsi une constante d'association beaucoup plus faible. L'enthalpie ΔH° de - 43,1 kJ/mol, dans le cas des dimères est environ le double de l'enthalpie trouvée pour la mono-complexation entre (27) et (38) (-22,8 kJ/mol), ce qui indique que les 2 complexes formés par dimère sont identiques. Ceci est en accord avec les théories qui prédisent que la variation d'enthalpie dans le cas d'interactions multivalentes est la somme des enthalpies correspondantes à la complexation monovalente [33,34].

Dans le cas de la complexation entre les dimères, la contribution entropique devient non favorable. La valeur fortement négative de la variation d'entropie $T\Delta S^\circ$ trouvée pour l'expérience B-b peut s'expliquer par la restriction de mobilité des 2 dimères (27) et (43) et par la diminution des degrés de liberté provoquées par l'interaction divalente. Néanmoins, une interprétation correcte en terme d'entropie pour les interactions multivalentes est loin d'être triviale [35]. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Reinhoudt et *coll.* [36,37] et de Breslow et *coll.* qui ont trouvé des constantes d'association très élevées dans le cas d'interactions divalentes entre dimères [38-40].

Les paramètres thermodynamiques obtenus pour la complexation entre les 2 dimères sont donc directement liés à ceux d'une simple interaction β -CD/AD. Ils prouvent ainsi la formation d'interactions divalentes impliquant la formation de 2 complexes β -CD/AD, de structure similaire, par dimère.

I.1.1.2.2 Titration du dimère d'AD par celui de β -CD

De façon à confirmer les paramètres thermodynamiques obtenus pour la complexation entre les dimères de β -CD et d'AD, nous avons titré la solution de dimère d'AD (**43**) par une solution de dimère de β -CD (**27**).



[invité] (mM)	[hôte] (mM)	$K_a \times 10^{-6}$ (M^{-1})	ΔH° (kJ/mol)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)	n (n invité :1 hôte)
0,045	0,591	(1,37 \pm 0,09)	-37,9 \pm 1,1	-2,89 \pm 0,06	-35,0 \pm 0,7	1,10 \pm 0,03

Tableau III- 3 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par la titration d'une solution de dimère d'AD par une solution de dimère de β -CD

Nous obtenons des valeurs de K_a et d'énergie similaires à celles obtenues lors de la titration dans le sens inverse (expérience B-b).

Les grandeurs thermodynamiques obtenues dans le cas des dimères, en particulier la constante d'association très élevée de l'ordre de 10^6 , s'explique par l'établissement d'interactions divalentes coopératives entre les dimères, c'est-à-dire que les 2 cavités de β -CD du dimère (**27**) se lient chacune aux 2 molécules d'adamantane du dimère (**43**). Toutefois, nous pouvons noter une tendance à l'auto-association des dimères de β -CD, favorisée quand la concentration augmente, qui rend indisponible une partie des CDs pour la complexation.

I.1.1.2.3 RMN des complexes

Les phénomènes d'auto-organisation et de complexation peuvent être mis en évidence par des expériences RMN 1H .

La figure III-6 montre les spectres RMN ^1H partiels (région des protons de l'AD) effectués sur les complexes dimère de $\beta\text{-CD}$ /monomère d'AD, dimère de $\beta\text{-CD}$ /dimère d'AD, sur l'ADAc et sur le dimère d'AD libres.

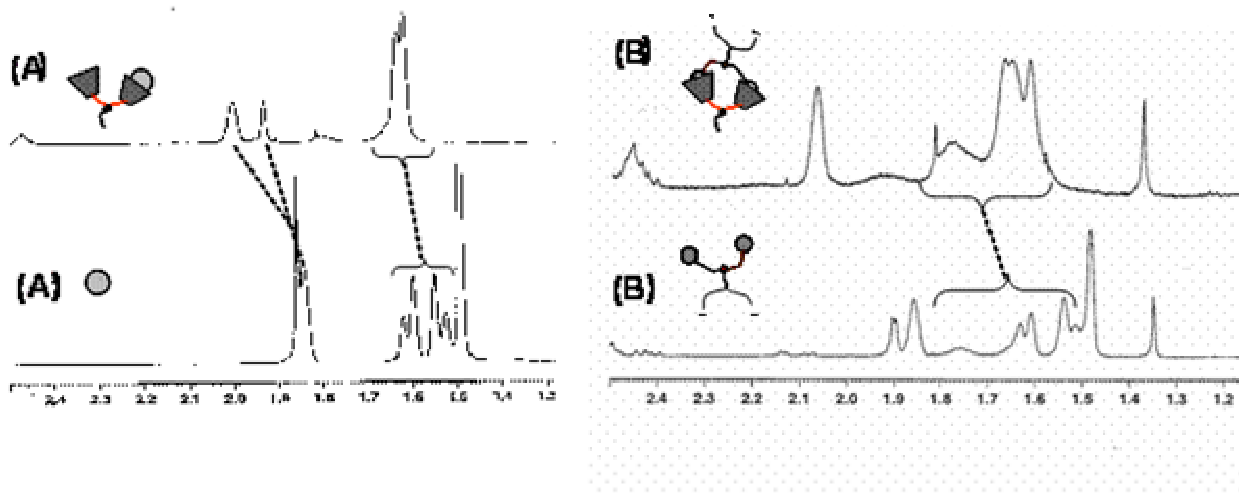


Figure III- 6 : Spectres RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 298 K, 6 mg/mL) partiels (A) du complexe dimère de $\beta\text{-CD}$ /monomère d'AD, (B) du complexe dimère de $\beta\text{-CD}$ /dimère d'AD, (A') de l'ADAc et (B') du dimère d'AD

Les spectres (A) et (A') mettent en évidence des variations de déplacement chimique des protons de l'AD. Ces variations sont la conséquence du changement d'environnement chimique dû à l'inclusion de l'AD dans la cavité de CD. Toutefois, aucun élargissement des raies n'est observé sur le spectre (A). Si l'on compare l'allure des spectres (B) et (B'), il apparaît de manière flagrante que les raies sont beaucoup plus larges pour le complexe entre les dimères. Cet élargissement des raies traduit une restriction de mobilité pour les AD qui peut s'expliquer par le fait que la complexation des deux groupements AD avec un dimère de CD empêche la rotation des AD à l'intérieur de la cavité. Ces observations confirment que chacune des 2 molécules d'adamantane d'un dimère d'AD complexe avec chacune des 2 cavités de CD d'un dimère de $\beta\text{-CD}$.

Pour le dimère de $\beta\text{-CD}$ seul, à 25°C , les protons i et i' , inéquivalents de par la présence d'isomères *cis* et *trans*, apparaissent chacun sous forme de doublet à des déplacements chimiques légèrement différents (figure III-7 (spectre (C))). Sur le spectre (B), cette multiplicité est moins visible mais elle existe encore alors que sur le spectre (A), les 2 protons i et i' ne sont plus distinguables et on observe un massif large.

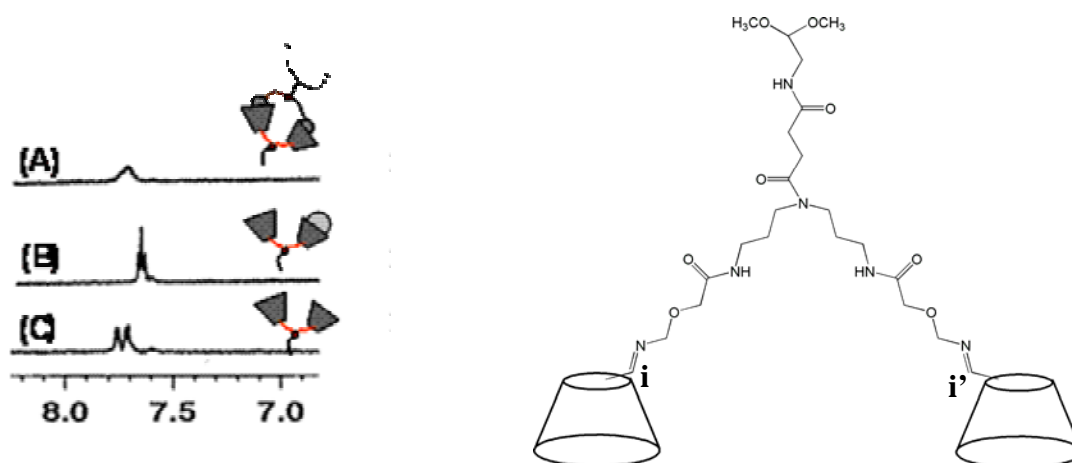


Figure III- 7 : Signaux RMN (500 MHz, D₂O, 298 K, 6 mg/mL) des 2 protons de la double liaison (i et i') du dimère de β-CD seul (spectre (C)), en présence du monomère d'AD (spectre (B)) et en présence du dimère d'AD (spectre (A)) avec [AD] = [CD]

L'élargissement des raies mis en évidence par RMN ¹H, pour les spectres correspondants au mélange des 2 dimères, corrobore les résultats de calorimétrie et souligne le caractère divalent de l'interaction lorsque 2 dimères se rencontrent.

1.1.1.2.4 Modélisation moléculaire

Des études par modélisation moléculaire ont conduit à la même conclusion quant au mode de complexation entre les dimères de β-CD et d'AD.

Le but d'une analyse conformationnelle est de prédire les conformations préférentielles adoptées par les molécules et les énergies qui leurs sont associées. L'analyse consiste tout d'abord à générer un système de coordonnées définissant les molécules et à décrire une fonction d'énergie potentielle associée (champ de force CVFF : Consistant Valence Force Field). Les conformations les plus stables sont déterminées par dynamique moléculaire à N-V-T constants (N étant le nombre d'atomes, V le volume et T la température) à 400 K. La démarche scientifique est la suivante :

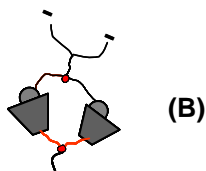
- i. Etude conformationnelle des dimères de β-CD et d'AD libres



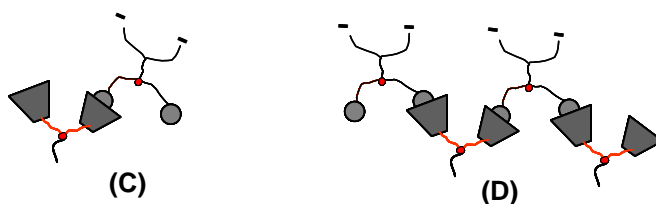
ii. Etude conformationnelle du complexe monovalent β -CD/AD



iii. Etude conformationnelle du complexe divalent



iv. Etude conformationnelle des complexes “défauts” conduisant à la formation d’oligomères et éventuellement de réseaux



Type de complexe	(A)	(B)	(C)	(D)
E_{in} (kJ/mol/CD)	-125	-451	-422	-280

Tableau III- 4 : Energie d’interaction déterminées par modélisation moléculaire pour différents types de structure (précisions estimées à 10%)

Les énergies d’interaction présentées dans le tableau III-4 correspondent à la différence entre l’énergie totale déterminée pour chacune de ces associations et l’énergie des dimères considérés individuellement. Ces énergies sont des énergies moyennes.

En valeur absolue, les énergies d’interaction trouvées par modélisation moléculaire sont différentes de celles obtenues par calorimétrie. Ceci peut s’expliquer par le fait que les paramètres de la fonction potentielle ne sont pas parfaitement adaptés à cette classe de molécule. En effet, la modélisation, étant effectuée dans le vide, ne prend ni en compte les effets de solvation ni les phénomènes d’auto-association en milieu aqueux.

Les valeurs d'énergie présentées dans le tableau III-4 laissent tout de même penser que le processus de complexation le plus stable correspond à la formation du complexe divalent (figure III-8).

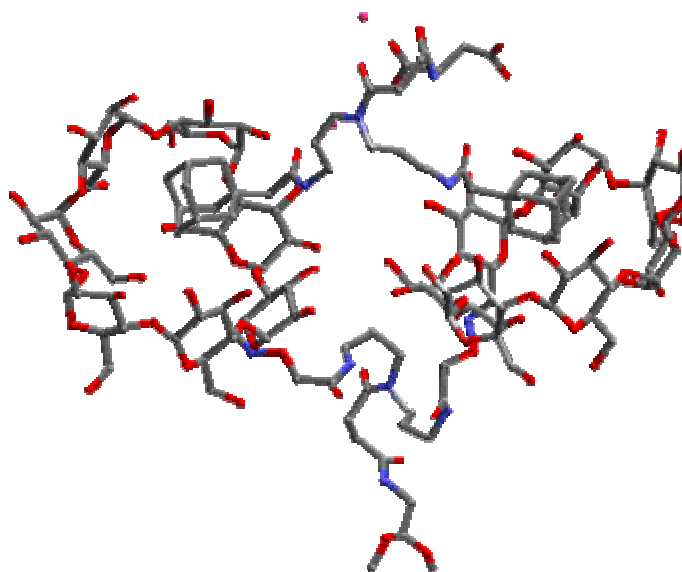


Figure III- 8 : Structure tridimensionnelle du complexe divalent “idéal” entre le dimère de β -CD et celui d'AD

Les expériences de calorimétrie nous permettront de savoir si les propriétés de complexation sont conservées avec les polymères.

I.1.2 Propriétés d'inclusion des polymères hôtes et invités

I.1.2.1 Hyaluronane porteur de monomères de β -CD : HA(CD) et de dimères de β -CD : HA(CD)₂

I.1.2.1.1 Propriétés de complexation du HA(CD)

Après l'étude des processus de complexation entre les monomères libres de CD et d'AD d'une part et les dimères d'AD et de CD d'autre part, nous avons cherché à évaluer l'influence de la chaîne polymère sur la formation des complexes.

Dans un premier temps, l'interaction entre l'ADAc et le polymère porteur de monomères de β -CD (**32**) a été caractérisée thermodynamiquement. En particulier, nous avons comparé les paramètres thermodynamiques issus de cette complexation avec ceux d'une simple interaction β -CD/ADAc présentée dans la partie I.1.1 (figure III-9) et nous

avons cherché à évaluer l'influence de la force ionique en effectuant la même titration dans l'eau, dans NaCl 0,025 M et 0,1 M.

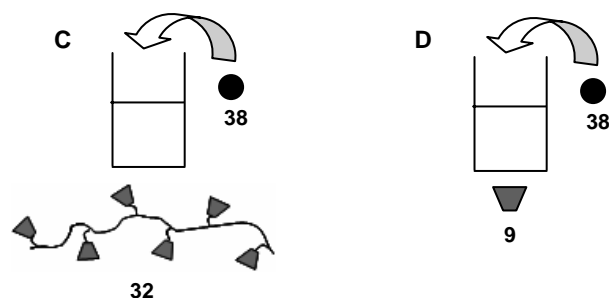


Figure III- 9 : Titration d'une solution de polymère HA(CD) par une solution d'ADAc (expérience C) et d'une solution de β -CD naturelle par une solution d'ADAc (expérience D)

Exp.	[NaCl] (M)	[CD] (mM)	[AD] (mM)	$K_a \times 10^{-4}$ (M^{-1})	ΔH^0 (kJ/mol)	$T\Delta S^0$ (kJ/mol)	ΔG^0 (kJ/mol)	n (n invité:1 hôte)
C-a	0	0,112	1,902	(2,5 \pm 0,1)	-32,9 \pm 3,8	-7,81 \pm 0,23	-25,1 \pm 0,2	0,69 \pm 0,03
C-b	0,025	0,117	1,851	(5,9 \pm 0,9)	-29,4 \pm 0,7	-2,19 \pm 0,06	-27,2 \pm 0,7	0,76 \pm 0,02
C-c	0,1	0,112	1,747	(4,7 \pm 0,8)	-22,7 \pm 1,3	3,95 \pm 1,09	-26,6 \pm 0,4	1,04 \pm 0,04
D	0	0,798	8,81	(7,5 \pm 0,9)	-25,8 \pm 1,2	2,00 \pm 1,13	-28,1 \pm 0,8	0,90 \pm 0,02

Tableau III- 5 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par des expériences d'ITC en titrant des solutions de HA(CD) (C) et de β -CD (D) par l'ADAc à 25°C

Les concentrations prises en compte lors du traitement des données expérimentales correspondent aux concentrations en cavité de β -CD et en molécules d'ADAc. Elles ont été calculées en considérant le taux d'hydratation du polymère. Les concentrations en polymère HA(CD) (32) correspondantes (expériences C-a, C-b et C-c) sont inférieures à la concentration critique de recouvrement C^* ($\sim 1,7$ g/L pour le HA(CD)) ce qui limite la formation d'interactions polymère/polymère pouvant gêner la complexation.

Le tableau III-5 montre, que lorsque la concentration en cavités de β -CD est considérée, la stœchiométrie n tend vers 1. Pour ces calculs, les CDs sont considérées individuellement c'est-à-dire non greffées sur le polymère. Nous avons en parallèle traité les données expérimentales en considérant non plus la concentration en β -CD mais la

concentration en unités de répétition de polymère modifié et ce, en utilisant un modèle à un site, comme nous l'avons fait pour les dimères. En effet, concernant les dimères de β -CD et d'AD, nous avons pris en compte la concentration en dimère et non pas celle des cavités de β -CD. Par ce nouveau calcul, les valeurs des énergies et de la constante d'association obtenues sont inchangées mais la stœchiométrie n est égale à 0,03. Cette valeur reflète le nombre de sites accessibles pour la complexation par unité de répétition. Elle correspond au taux de greffage en CD. L'écart entre la valeur expérimentale et théorique (5 %) s'explique par le fait qu'une partie des CDs (~24 %, cf tableau III-5, expérience C-b)) n'est pas disponible pour la complexation.

Le comportement avec la concentration en sel est relativement complexe. Du fait de la nature polyanionique du HA(CD) et de la nature anionique de l'ADAc, on doit s'attendre à des effets non négligeables de la force ionique sur la complexation entre l'ADAc et les CDs greffées. En effet, comme nous avons pu le constater dans le cas de la complexation de l'ADAc et de la β -CD monoacide, l'addition de sel permet d'écranter les répulsions électrostatiques entre les deux partenaires chargés négativement favorisant ainsi le processus d'inclusion.

Néanmoins, nous devons prendre en considération dans le cas présent un paramètre supplémentaire, la conformation du polymère. Celle-ci dépend en effet de la force ionique du solvant. Le tableau III-5 rassemble les caractéristiques thermodynamiques des systèmes C et D dans différentes conditions de solvant.

La concentration en NaCl optimale donnant la constante d'association K_a la plus élevée ($59\,000\text{ M}^{-1}$) est égale à 0,025 M. Dans de telles conditions, on constate une légère association des CDs greffées ($n = 0,76$ au lieu de 1) et une constante d'association proche de celle de la β -CD monoacide (**16**) présentée auparavant dans NaCl 0,1 M. Une concentration en NaCl de 0,1 M pourrait améliorer les propriétés de complexation des cavités de β -CD greffées par écrantage des répulsions électrostatiques mais en contrepartie une force ionique trop élevée tend à favoriser les interactions polymère-polymère comme nous le verrons par la suite.

La comparaison des expériences C-b et D montre que la constante d'association K_a ($59\,000\text{ M}^{-1}$) avec le polymère est plus faible que celle trouvée avec les espèces libres ($75\,000\text{ M}^{-1}$). Cette diminution de la constante d'association peut s'expliquer par la contribution entropique qui devient non favorable probablement à cause de la restriction de mobilité imposée par la chaîne polymère pendant la complexation.

I.1.2.1.2 Propriétés de complexation du HA(CD)₂

De la même façon que précédemment, nous avons cherché à comparer les caractéristiques thermodynamiques et la stabilité des différents complexes représentés sur la figure III-10.

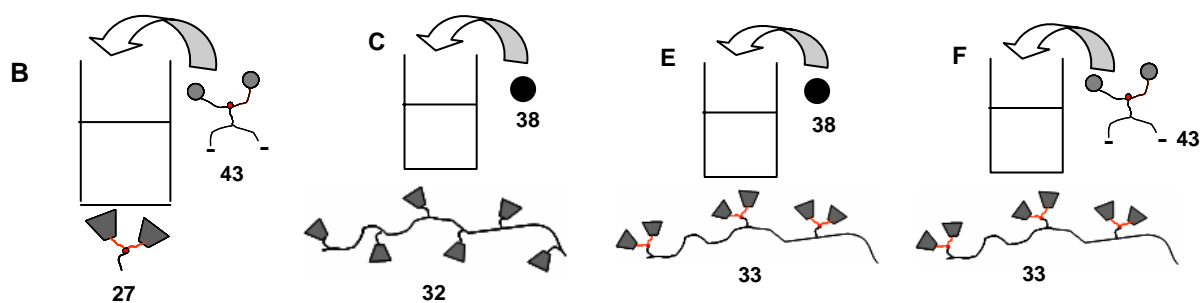


Figure III- 10 : Titration d'une solution de dimère de β -CD (27) par une solution de dimère d'AD (43) (expérience B), d'une solution de HA(CD) par une solution d'ADAc (expérience C), d'une solution de HA(CD)₂ par une solution d'ADAc (expérience E) et d'une solution de HA(CD)₂ par une solution de dimère d'AD (expérience F) à 25°C

Exp	[NaCl] (M)	[hôte] (mM)	[invité] (mM)	$K_a \times 10^{-5}$ (M ⁻¹)	ΔH^0 (kJ/mol)	$T\Delta S^0$ (kJ/mol)	ΔG^0 (kJ/mol)	n (n invité:1 hôte)
B-b	0	0,047	0,569	(11,4 ± 0,9)	-43,1 ± 1,1	-8,55 ± 0,98	-34,5 ± 0,7	0,90 ± 0,08
C-b	0,025	0,117	1,851	(0,59 ± 0,09)	-29,4 ± 0,7	-2,19 ± 0,6	-27,2 ± 0,09	1,13 ± 0,02
E	0,025	0,0396	0,992	(0,43 ± 0,04)	-26,0 ± 0,2	0,43 ± 0,03	-26,4 ± 0,5	2,12 ± 0,01
F-a	0,025	0,0312	0,449	(0,69 ± 0,07)	-75,2 ± 4,1	-47,60 ± 0,02	-27,6 ± 0,6	1,03 ± 0,04
F-b	0,1	0,0319	0,452	(1,63 ± 0,09)	-56,6 ± 0,8	-26,87 ± 0,05	-29,7 ± 0,5	1,04 ± 0,03
F-c	0,2	0,0302	0,448	(2,15 ± 0,11)	-45,5 ± 0,4	-15,08 ± 0,07	-30,7 ± 0,7	1,10 ± 0,10

Tableau III- 6 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par les expériences d'ITC B-b, C-b, E, F-a, F-b et F-c

Les titrations des polymères HA(CD) et HA(CD)₂ par le monomère d'ADAc (expériences C-b et E) donnent des valeurs thermodynamiques du même ordre de grandeur à l'exception de la stœchiométrie n qui est égale à 2 dans le cas du HA(CD)₂. Ceci signifie que

2 molécules d'ADAc sont complexées par 1 dimère de β -CD. La stœchiométrie n de 1,03 de l'expérience F-a nous indique qu'un dimère d'ADAc forme un complexe avec un dimère de β -CD greffé sur la chaîne polymère. Ces résultats reflètent une interaction divalente entre les dimères de β -CD, greffés sur le hyaluronane et les dimères d'ADAc libres.

En revanche, lorsque l'on compare la titration des polymères HA(CD) et HA(CD)₂ respectivement par le monomère d'AD et par le dimère d'AD (expériences C-b et F-a, -b et -c), on s'aperçoit que les valeurs des variations d'enthalpie ΔH° et d'entropie ΔS° sont totalement différentes. La contribution de l'entropie pour les expériences F devient défavorable ce qui s'explique par une restriction des degrés de liberté pendant la complexation. Cette contribution défavorable est néanmoins largement compensée par la contribution enthalpique favorable ($\Delta H^\circ = -75,2$ kJ/mol), ce qui se traduit par des valeurs de constante d'association supérieures pour les systèmes impliquant des interactions divalentes.

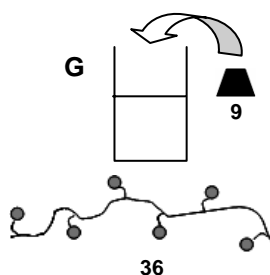
Toutefois les constantes d'association sont plus faibles que celles obtenues pour la complexation entre les dimères libres $K_a = 1\,140\,000$ M⁻¹ (expérience B-b). Cette différence, peut s'expliquer d'une part, par l'effet de la chaîne polymère (effet entropiquement défavorable) et d'autre part, par les répulsions électrostatiques entre la chaîne polymère et le dimère d'AD (**43**) qui porte 2 charges négatives. On peut remarquer en effet que plus la concentration en sel est élevée, plus la constante K_a l'est également.

Ces résultats sont très encourageants puisque l'effet des interactions divalentes, lorsque le dimère est greffé sur la chaîne polymère, est notable.

1.1.2.2 Hyaluronane porteur de monomères d'AD: HA(AD) et de dimères d'AD: HA(AD)₂

1.1.2.2.1 Propriétés de complexation du HA(AD)

Les caractéristiques thermodynamiques et les constantes d'association obtenues par la titration d'une solution de polymère HA(AD) par une solution de β -CD (figure III-11) en faisant varier la force ionique sont données dans le tableau III-7.

Figure III- 11 : Titration d'une solution de polymère HA(AD) par une solution de β -CD

	[NaCl] (M)	[AD] (mM)	[CD] (mM)	$K_a \times 10^{-4}$ (M^{-1})	ΔH^0 (kJ/mol)	$T\Delta S^0$ (kJ/mol)	ΔG^0 (kJ/mol)	n (n CD:1AD)
G-a	0	0,299	5,83	(1,3 \pm 0,1)	-51,3 \pm 1,1	-27,84 \pm 0,07	-23,5 \pm 0,6	1,56 \pm 0,03
G-b	0,025	0,301	6,04	(3,1 \pm 0,6)	-32,0 \pm 0,8	-6,38 \pm 0,03	-25,6 \pm 0,07	2,05 \pm 0,02
G-c	0,1	0,298	5,44	(2,5 \pm 0,4)	-38,8 \pm 0,9	-13,72 \pm 0,11	-25,1 \pm 0,04	2,00 \pm 0,04

Tableau III- 7 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par des expériences ITC en titrant une solutions de HA(AD) par une solution de β -CD à 25°C

Les grandeurs thermodynamiques trouvées pour 3 concentrations salines différentes (0 M, 0,025 M et 0,1 M) sont très surprenantes. En effet, les variations d'enthalpie et les stœchiométries ne sont pas représentatives de l'interaction β -CD/AD (~ -25 kJ/mol). Il nous est d'ailleurs à ce jour difficile d'expliquer la stœchiométrie $n = 2$ obtenue pour ces complexes de type 1:1.

1.1.2.2 Propriétés de complexation du HA(AD)₂

Dans un deuxième temps, les complexations entre le HA(AD)₂/ β -CD et HA(AD)₂/dimère de β -CD ont été caractérisées (figure III-12). Les expériences ITC ont été effectuées avec NaCl 0,025 M comme solvant, cette concentration en sel permet de limiter les répulsions électrostatiques entre les espèces hôtes et invitées sans pour autant entraîner d'importantes interactions polymère/polymère (tableau III-8).

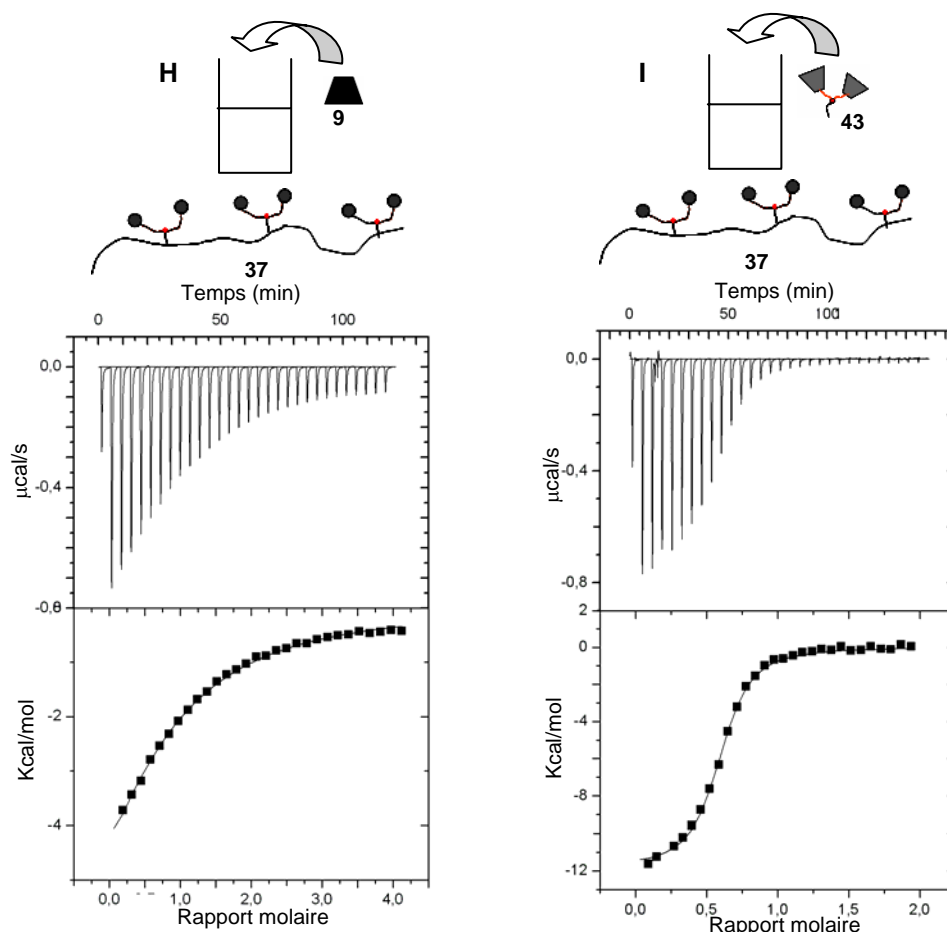


Figure III- 12 : Titration calorimétrique d'une solution de HA(AD)₂ (37) par une solution de β-CD libre (30 additions de 10 µL) (38) (expérience H) et de dimère de β-CD (43) (expérience I) dans NaCl 0,025 M à 25°C

Exp.	[NaCl] (M)	[invité] (mM)	[hôte] (mM)	$K_a \times 10^{-6}$ (M ⁻¹)	ΔH^0 (kJ/mol)	$T\Delta S^0$ (kJ/mol)	ΔG^0 (kJ/mol)	n (n hôte: 1 invité)
H	0,025	0,0384	0,706	$0,023 \pm 0,045$	$-43,9 \pm 0,3$	$-19,02 \pm 0,03$	$-24,9 \pm 0,5$	$0,70 \pm 0,01$
I	0,025	0,0266	0,230	$1,79 \pm 0,10$	$-49,3 \pm 0,4$	$-13,63 \pm 0,09$	$-36,7 \pm 0,6$	$0,59 \pm 0,01$

Tableau III- 8 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par les expériences d'ITC H et I

Les résultats les plus frappants sont les valeurs de stœchiométrie n . En effet, l'expérience H qui met en évidence l'interaction entre le dimère d'AD greffé sur le polymère et la β-CD naturelle devrait donner une stœchiométrie de 2 alors qu'elle est de 0,7. L'expérience I devrait conduire à une stœchiométrie de 1 pour l'interaction entre les 2 dimères alors qu'elle est égale à 0,59. Ces différences entre la théorie et l'expérience

suggèrent que seulement une partie des dimères d'AD greffés est complexée de manière effective par les β -CDs sous forme de monomères ou de dimères. Ceci peut provenir de la formation d'interactions hydrophobes intra- et interchaînes compétitives entre les molécules d'AD. Ce phénomène d'auto-association défavorisant la complexation a déjà été mis en évidence pour des polymères synthétiques [11,41] et dans le cas du chitosane hydrophobiquement modifié [42].

L'interaction divalente entre les 2 dimères est soulignée par la constante d'association K_a de $1\,790\,000\text{ M}^{-1}$ qui est nettement plus élevée que pour l'interaction monovalente $K_a = 23\,000\text{ M}^{-1}$. Dans ce cas, l'interaction divalente n'est pas gênée par les répulsions électrostatiques observées pour l'interaction entre le $\text{HA}(\text{CD})_2$ et le dimère d'AD. L'augmentation de K_a due au caractère divalent de la complexation se traduit sur les thermogrammes (figure III-12, expériences H et I) par une diminution plus lente de l'amplitude des signaux au début de la titration comme expliqué au début de ce chapitre.

L'étude des phénomènes de complexation impliquant des dérivés de CD et d'AD libres et greffés sur les polymères nous a permis de dégager un certain nombre de paramètres structuraux et expérimentaux qui interviennent dans la complexation. Il est important de souligner que toutes les enthalpies trouvées expérimentalement sont supérieures à l'énergie thermique kT .

Il s'avère que les complexes entre la β -CD et les dérivés d'adamantane sont stabilisés par l'établissement d'interactions hydrophobes mais aussi par des interactions de van der Waals à faible portée, jouant un rôle important dans le cas de la complexation avec les dérivés d'adamantane. Il en ressort également que les cavités de β -CD s'auto-associent légèrement en milieu aqueux.

L'augmentation très importante de la constante d'association et les différences d'énergie, en particulier l'accroissement de la variation d'enthalpie et le rôle central de l'entropie lors de la complexation entre les dimères ont mis en évidence la formation d'interactions divalentes se traduisant par la formation de 2 complexes indépendants. L'étude des complexes par RMN et par modélisation moléculaire a permis de confirmer l'établissement de ces interactions divalentes.

Concernant les polymères hôtes et invités, la création d'interactions divalentes a également été observée. Toutefois, il s'avère que les propriétés d'inclusion sont affectées par la restriction de mobilité due à la chaîne polymère, par les répulsions électrostatiques dans le

cas du HA(CD) et du HA(CD)₂ complexant les dérivés chargés d'adamantane et par la formation d'interactions hydrophobes AD/AD dans le cas du HA(AD)₂. Le processus de complexation, monovalent ou divalent, pour les polymères hôtes et invités, est donc gêné par rapport à celui des espèces libres.

Il aurait été très intéressant de pouvoir accéder aux données thermodynamiques issues du mélange entre un polymère hôte et un polymère invité car dans ce cas, les interactions mises en jeu sont multivalentes. Pour des raisons de limitation au niveau de l'appareillage cela n'a pas été réalisable (cf chapitre IV).

I.2 Propriétés en solution des polymères hôtes et invités seuls

Cette partie est consacrée à l'analyse du comportement en milieu aqueux des polymères hôtes et invités seuls. Comme ces polymères sont fonctionnalisés, ils peuvent avoir des propriétés en solution différentes de celles du polymère initial. En effet, d'après les résultats d'ITC, les propriétés en solution de ces polymères semblent jouer un rôle important sur les processus de complexation. Il nous paraît donc important d'évaluer ces propriétés au travers de mesures viscosimétriques dans les régimes dilués et semi-dilués afin de mieux comprendre par la suite, le mécanisme d'association entre les polymères hôtes et invités.

I.2.1 Viscosimétrie capillaire

Le comportement rhéologique des polymères dépend de leur concentration en solution. Comme il sera expliqué dans le chapitre IV, plusieurs régimes peuvent être définis. Il est alors essentiel d'introduire une concentration critique, la concentration critique de recouvrement appelée C^* .

- Le régime dilué est défini pour une concentration $C < C^*$. Dans ce régime, les chaînes sont isolées et indépendantes les unes des autres.
- Le régime semi-dilué est défini pour une concentration $C > C^*$. les chaînes commencent à se rapprocher et à s'interpénétrer. Elles s'enchevêtrent alors progressivement quand la concentration augmente.

Une estimation possible de la concentration critique de recouvrement C^* est déterminée en considérant [43] :

$$C^*[\eta] = 1 \quad \text{éq. III - 3}$$

où $[\eta]$ est la viscosité intrinsèque en mL/g.

La figure III-13 représente l'évolution de la viscosité réduite η_{red} des solutions des dérivés de HA(CD), HA(CD)₂, HA-ADH et du HA initial.

En régime dilué, η_{red} évolue de façon linéaire avec la concentration selon la relation de Huggins :

$$\eta_{red} = [\eta] + k' C [\eta]^2 \quad \text{éq. III- 4}$$

où k' est la constante de Huggins.

La relation de Huggins permet d'accéder à la valeur de $[\eta]$. En effet, l'extrapolation des droites représentées sur la figure III-13 à $C = 0$ permet de déterminer la viscosité intrinsèque $[\eta]$, qui est liée à la masse molaire du polymère (relation de Mark-Houwink) et de déduire la constante de Huggins, k' , qui dépend de la qualité du solvant. Par exemple, k' est compris entre 0,3 et 0,4 en bon solvant et 0,5 et 0,8 en solvant θ . Les viscosités intrinsèques ainsi obtenues pour les différents polysaccharides sont indiquées sur la figure III-13. En raison de la nature amphiphile du HA(AD) et du HA(AD)₂, il n'a pas été possible de mesurer la viscosité intrinsèque $[\eta]$ par viscosimétrie capillaire (effet tensioactif).

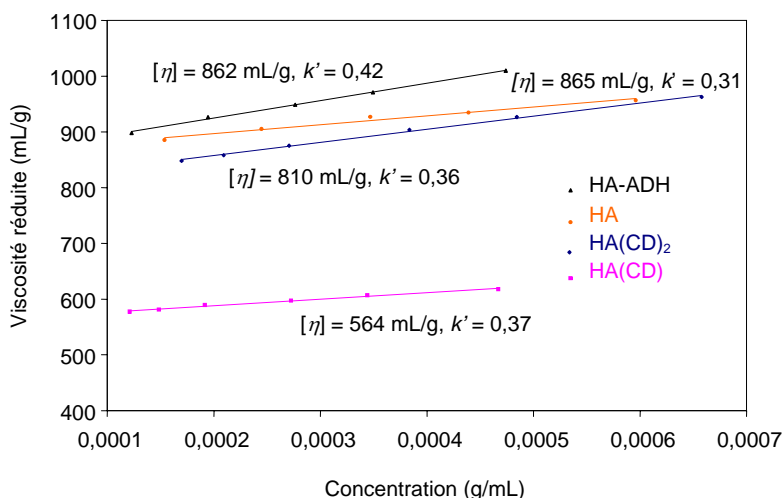


Figure III- 13 : Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour des solutions de HA initial, HA-ADH, HA(CD)₂ et HA(CD) dans NaCl 0,1 M à 25°C

Les concentrations critiques de recouvrement, ainsi estimées sont présentées dans le tableau III-9.

	HA	HA-ADH	HA(CD)	HA(CD) ₂
C* (g/L)	1,15	1,16	1,77	1,23

Tableau III- 9 : Concentration critique de recouvrement du HA, HA-ADH, HA(CD) et HA(CD)₂

Ce tableau indique que le bras hydrazide ne modifie pas de façon significative le comportement en milieu aqueux dans la mesure où le HA initial et le HA-ADH ont des viscosités intrinsèques quasi-identiques. Les comportements des dérivés HA(CD) et HA(CD)₂ sont, quant à eux, différents, en particulier pour le dérivé HA(CD). Ces différences de comportement seront expliquées par la suite.

I.2.2 Viscosités mesurées à l'aide d'un viscosimètre Low Shear 30

I.2.2.1 Hyaluronane initial

Comme la viscosité varie avec la concentration en fonction du régime dans lequel on se trouve, nous avons cherché à définir les principales caractéristiques du comportement rhéologique du polysaccharide précurseur, le hyaluronane, dans NaCl 0,025 M et 0,1 M à 25°C.

La figure III-14 représente la variation de la viscosité newtonienne en fonction de la concentration et la figure III-15 représente la variation de la viscosité spécifique (pour $\dot{\gamma} \rightarrow 0$) en fonction de la concentration en polymère (en log-log).

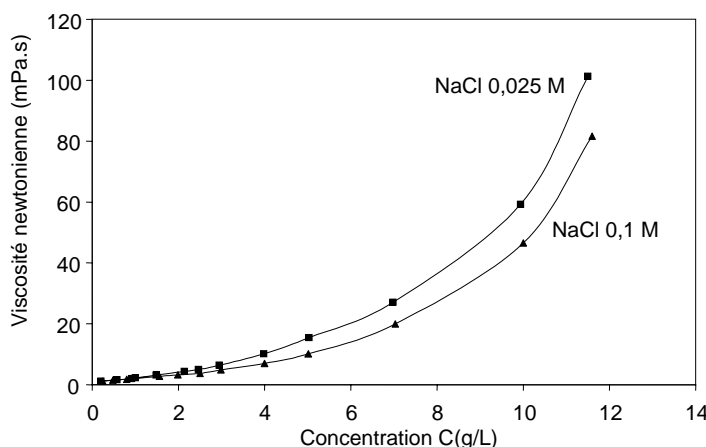


Figure III- 14: Variation de la viscosité newtonienne en fonction de la concentration d'une solution de HA dans NaCl 0,025 M et 0,1 M à 25°C

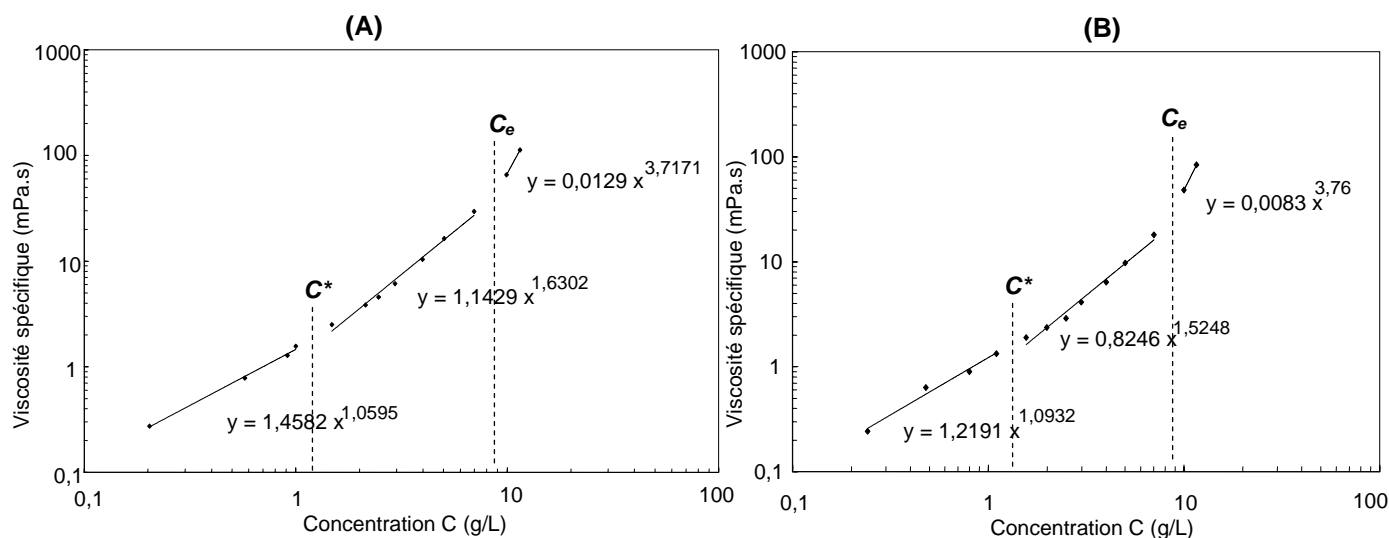


Figure III- 15 : Variation de la viscosité spécifique en fonction de la concentration du HA dans NaCl 0,025 M (A) et dans NaCl 0,1 M (B) à 25°C

La figure III-14 montre que les comportements du HA dans NaCl 0,025 M et 0,1 M sont proches avec toutefois une viscosité un peu plus faible dans NaCl 0,1 M attribuée à une conformation légèrement différente du polymère due aux effets de sel. La figure III-15 indique que les lois de puissance décrivant la variation de la viscosité avec la concentration sont similaires. Nous pouvons donc considérer que, dans NaCl 0,025 M, les interactions électrostatiques à longue portée sont suffisamment écrantées et que le comportement du polysaccharide semi-rigide est alors assimilable à longue distance à celui d'un polymère neutre.

Trois régimes de concentration peuvent être identifiés :

- a. Le régime dilué, pour $C < C^*$ ($C^* = 1,15$ g/L (0,00286 monomol/L)). Dans ce régime, la viscosité réduite augmente modérément avec la concentration (de façon linéaire).
- b. Le régime semi-dilué non-enchevêtré, $C^* < C < C_e$ où C_e est la concentration à laquelle les enchevêtrements deviennent élastiquement effectifs. Au dessus de C^* , la dépendance de la viscosité suit une loi de puissance en 1,6. A $C_e \sim 9$ g/L (0,022 monomol/L), une cassure dans la variation de la viscosité avec la concentration est observée, et la puissance vaut 3,7. Ces lois d'échelle décrivant la variation de la viscosité avec la concentration sont en bon accord avec les prédictions théoriques pour les polyélectrolytes [44] en milieu salin et pour les polymères neutres [45,46]. Ces théories prédisent qu'avec les polymères non-associatifs, la dépendance en concentration de la viscosité en régime semi-dilué non-enchevêtré pour $C < C^* < C_e$

reste modérée avec en bon solvant $\eta \sim C^{5/4}$. Dans ce régime, les propriétés viscoélastiques de la solution sont contrôlées par la dynamique de Rouse [47].

- c. Le régime semi-dilué enchevêtré avec $C_e < C < C^{**}$ où C^{**} marque le début du régime concentré. Pour ce régime, les théories prédisent une croissance plus rapide avec $\eta \sim C^{15/4}$ ce qui est en accord avec la puissance de 3,7 trouvée expérimentalement. Dans ce régime, la viscoélasticité de la solution est décrite par le modèle de la reptation classique [45].

1.2.2.2 Dérivés HA(CD) et HA(AD)

Les mesures de viscosité des solutions de HA(CD) et de HA(AD) ont été effectuées à différentes concentrations dans NaCl 0,025 M et 0,1 M.

Les résultats obtenus à partir des solutions préparées avec NaCl 0,025 M sont représentés sur la figure III-16.

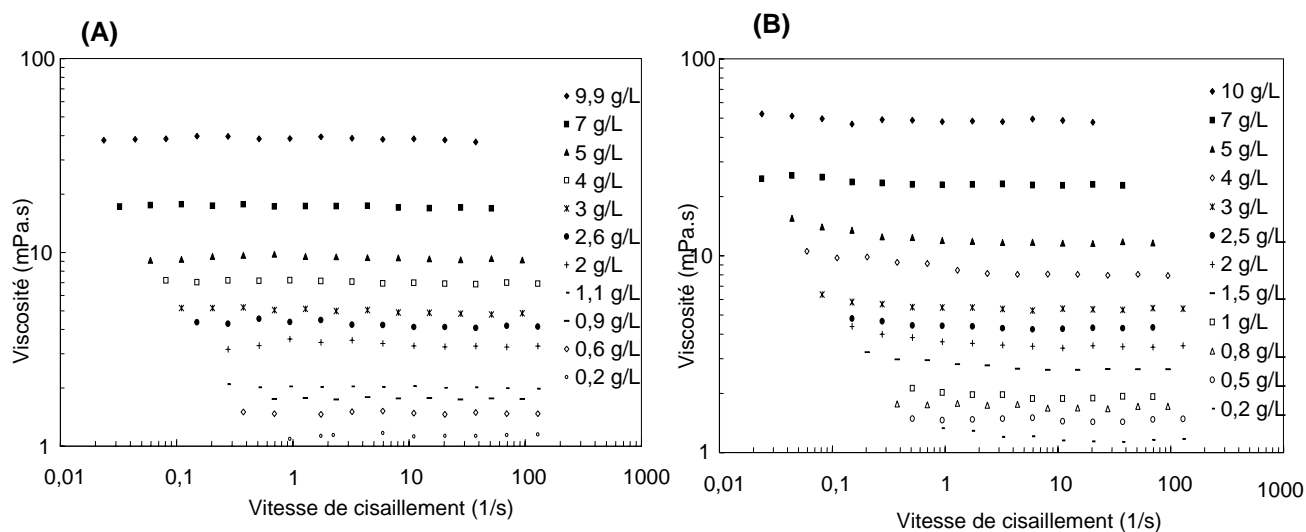


Figure III- 16 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement du HA(CD) (A) et du HA(AD) (B) dans NaCl 0,025 M à 25°C

Ces figures montrent que le comportement du HA(CD) et du HA(AD) dans NaCl 0,025 M est newtonien pour la gamme de vitesse de cisaillement étudiée. Cela signifie que la viscosité des solutions de polymères, à une concentration donnée, ne varie pas avec la vitesse de cisaillement imposée. Le comportement newtonien observé sur cette gamme de vitesses et

la masse molaire relativement faible du HA (300 000 g/mol), montrent que pour ces concentrations les enchevêtrements sont assez peu nombreux et de ce fait ne gouvernent pas la dynamique des chaînes.

Afin d'évaluer plus précisément l'effet de l'introduction des monomères de β -CD et d'AD sur la chaîne des monomères et l'influence de la concentration en sel sur le comportement de la chaîne polymère, nous avons mesuré la viscosité newtonienne en fonction de la concentration (figure III-17) à deux forces ioniques différentes.

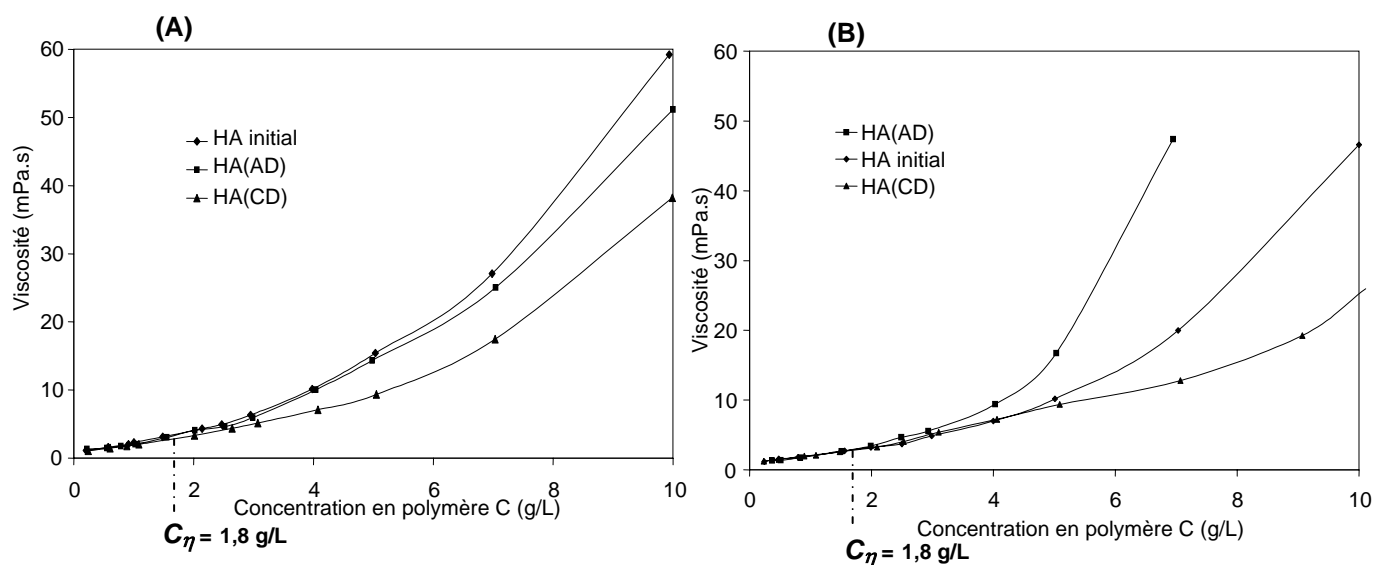


Figure III- 17 : Variation de la viscosité au plateau Newtonien en fonction de la concentration en polymère pour le HA(CD), le HA(AD) et le HA initial dans NaCl 0,025 M (A) et dans NaCl 0,1 M (B) à 25°C

Que ce soit dans NaCl 0,025 M ou dans NaCl 0,1 M, les comportements en milieu aqueux des trois polymères sont très proches jusqu'à $C_{\eta} \sim 1,8$ g/L, concentration égale à $1,5 \times C^*$ du hyaluronane initial ($C^* = 1,15$ g/L).

En revanche, quand $C > C_{\eta} \sim 1,8$ g/L, les propriétés en solution deviennent différentes ce qui peut être attribué à la formation d'interactions interchaînes et/ou intrachaînes dues à la présence des cavités de β -CD et des groupements adamantane.

Considérons en premier lieu le cas du HA(AD) dans NaCl 0,1 M. Sa viscosité est plus élevée que celle du HA initial et cette différence de viscosité est d'autant plus marquée que la concentration en polymère est importante. Cette augmentation de viscosité peut s'expliquer par l'établissement d'interactions hydrophobes interchaînes *via* les groupements adamantane greffés. Un comportement similaire avait été observé dans le cas du chitosane porteur de groupements adamantane [42,48].

Toutefois, compte tenu de la structure volumineuse des groupements adamantane, les auto-associations AD/AD sont moins fortes que dans le cas des hyaluronanes alkylés [49].

Dans NaCl 0,025 M, ce comportement auto-associatif est largement défavorisé puisque les valeurs de viscosité du HA et du HA(AD) sont relativement proches (figure III-17). Dans NaCl 0,1 M, la formation d'agrégats est favorisée car d'une part, les répulsions électrostatiques intra- et interchaînes du HA sont écrantées et d'autre part, le sel renforce l'hydrophobie des groupements adamantane. Les agrégats formés sont des agrégats "ouverts" qui contribuent à une augmentation de la viscosité.

Le dérivé HA(CD) présente un tout autre comportement. Dans NaCl 0,1 M, la viscosité du HA(CD) est plus faible que celle du HA initial et cette différence est plus marquée pour des concentrations élevées. Ce comportement peut s'expliquer par l'établissement de liaisons hydrogène inter- et/ou intrachaînes entre les cavités de β -CD pendantes conduisant à la formation d'agrégats compacts. Ces agrégats contribuant à faire diminuer la viscosité, contrairement au HA(AD), ont été également mis en évidence par chromatographie d'exclusion stérique. Dans NaCl 0,025 M, la différence de viscosité entre le HA(CD) et le HA est moins marquée ; ces résultats indiquent donc qu'une augmentation en sel favorise la formation de ces associations que ce soit pour le HA(AD) ou pour le HA(CD).

Une concentration en NaCl égale à 0,025 M est donc préférable pour l'élaboration des réseaux HA(AD)/HA(CD) visés. Ces résultats corroborent ceux de calorimétrie exposés dans la partie I.1.2, qui ont montré que la concentration en sel la plus favorable pour les processus de complexation dans le cas des polymères est 0,025 M.

I.2.3 Analyse du comportement en écoulement des polymères hôtes et invités

Certains matériaux peuvent se déformer après l'application d'une contrainte ou d'un gradient de cisaillement et retrouver leur état initial après un temps de récupération plus ou moins long. Ce phénomène est réversible et est décrit par un cycle d'hystérésis. Il existe un grand nombre de systèmes utilisés dans la vie de tous les jours présentant ces particularités comme les peintures, les encres, les revêtements, certains détergents liquides, les suspensions d'argile et de charbon, certaines crèmes et produits pharmaceutiques, les lubrifiants [50]... Cette liste n'est pas exhaustive.

1.2.3.1 "Réponse" des polymères HA(AD), HA(CD), HA(AD)₂, et HA(CD)₂ suite à l'application d'une rampe continue de contrainte en écoulement

Les résultats des mesures au LS 30 décrits précédemment indiquent la formation d'associations intra- et interchaînes dues à la présence des groupements AD et des molécules de β -CD. Des travaux récents au laboratoire ont mis en évidence un caractère fortement associatif pour des dérivés du HA hydrophobiquement modifiés. Les solutions aqueuses de tels dérivés ont un comportement thixotrope révélant la présence d'agrégats déformables [51]. Celui-ci a été clairement mis en évidence par des expériences d'écoulement consistant à appliquer un gradient de cisaillement de façon linéaire de 0 à 5 s⁻¹ en 1 minute et à retourner à 0 s⁻¹ à la même vitesse [50]. Ce type d'expérience fournit des informations sur la déstructuration des réseaux de polymères résultante de l'application d'un gradient de cisaillement, sur la cinétique de restructuration du système et donc sur la durée de vie des agrégats [49,51].

La figure III-18 montre les résultats obtenus sur des solutions de HA(AD), HA(AD)₂, HA(CD), HA(CD)₂ et HA initial, tous à la même concentration.

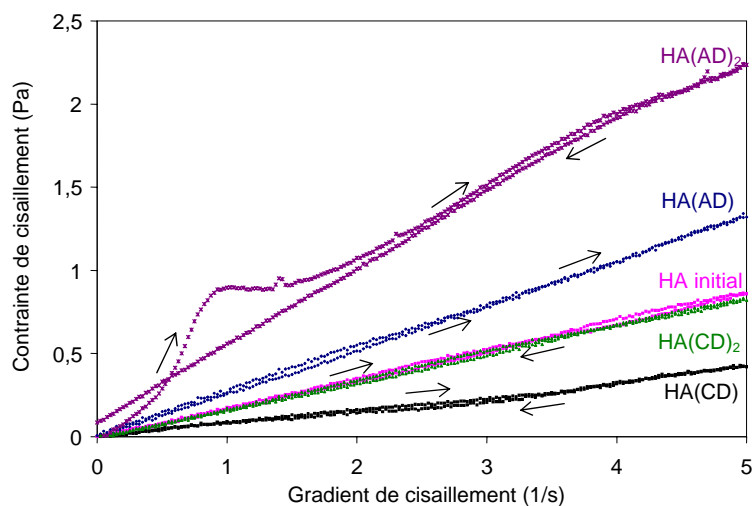


Figure III- 18 : Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour une solution de HA(AD)₂, HA(AD), HA initial, HA(CD)₂ et HA(CD) à 7 g/L dans NaCl 0,025 M à 25°C

La figure III-18 montre que pour les dérivés HA(CD), HA(CD)₂, HA(AD) et pour le HA initial, la contrainte de cisaillement évolue de façon linéaire avec le gradient de cisaillement traduisant leur comportement newtonien. La pente correspond à la viscosité de la solution puisque :

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad \text{éq. III - 5}$$

où σ est la contrainte, η la viscosité et $\dot{\gamma}$ le gradient de cisaillement.

L'évaluation de la pente des droites sur la figure III-18 permet de montrer que pour une concentration égale à 7 g/L, on a $\eta_{\text{HA(AD)}} > \eta_{\text{HA}} > \eta_{\text{HA(CD)}}$, en accord avec les résultats du LS 30 présentés dans la partie I.2.2.2. La viscosité des solutions de HA(CD)₂ est très proche de celle du HA initial.

Dans le cas du dérivé de HA(AD)₂, l'apparition d'un seuil de contrainte apparent (autour de 1,2 Pa, figure III-18 courbe violette) correspondant à un gradient de cisaillement vers 0,8 s⁻¹, souligne le caractère non-linéaire de l'évolution entre la contrainte et le cisaillement. La structure du HA(AD)₂ reste inchangée jusqu'à un gradient de cisaillement de 0,8 s⁻¹ pour ensuite être modifiée. Cette déstructuration provient de la dissociation ou d'un réarrangement d'agrégats hydrophobes AD/AD [49]. Notons également que cette courbe est décrite par un cycle d'hystérésis indiquant que le retour de la solution de HA(AD)₂ vers son état initial n'est pas instantané. Etant donné que seule la solution de HA(AD)₂ présente un seuil de contrainte apparent, nous l'attribuons aux interactions entre les dimères d'AD greffés le long de la chaîne.

Nous avons donc exploré plus en détail la réponse de la solution de HA(AD)₂ suite à l'application d'une rampe continue de contrainte en écoulement et ce, après différents temps d'attente t afin d'obtenir des informations sur la cinétique de restructuration (figure III-19).

1.2.3.2 Cas particulier du hyaluronane porteur de dimères d'AD, HA(AD)₂

La figure III-19 montre les résultats obtenus.

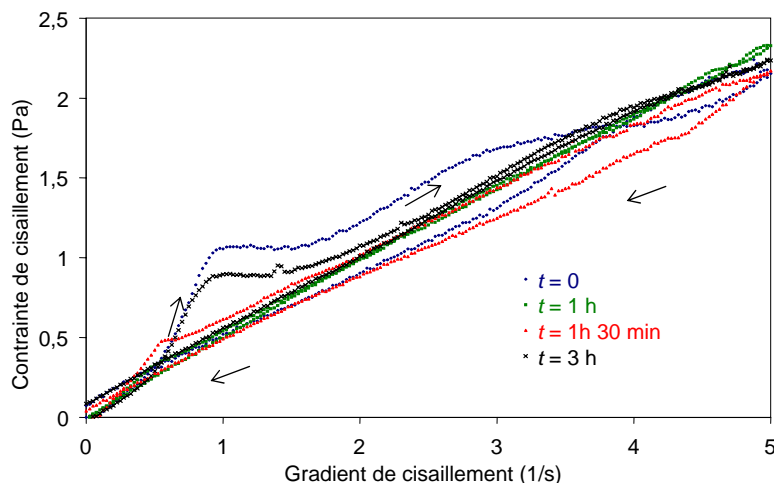


Figure III- 19 : Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour une solution de HA(AD)₂ à 7 g/L dans NaCl 0,025 M à 25°C après différents temps d'attente (*t*)

La figure III-19 indique que le temps de relaxation du système est plus long que la durée de l'expérience. Il est possible d'estimer le temps que mettent les agrégats à se reformer. Il est de 3 h, temps auquel le cycle d'hystérésis (noir) est quasiment superposé au cycle initial (bleu).

1.2.3.2.1 Effet de la force ionique

La même expérience a été effectuée dans 2 concentrations en sel différentes : 0,025 M et 0,1 M.

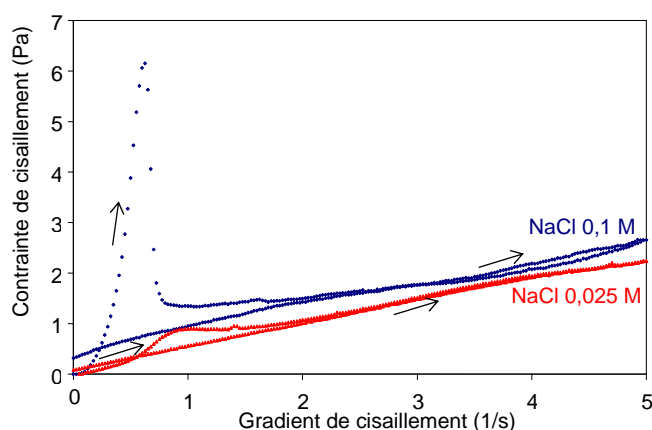


Figure III- 20 : Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour une solution de HA(AD)₂ à 7 g/L dans NaCl 0,025 M et 0,1 M à 25°C

La figure III-20 montre que la déstructuration est beaucoup plus marquée dans NaCl 0,1 M ce qui suggère que les agrégats sont favorisés à cette concentration en sel.

1.2.3.2.2 Effet de la température

L'influence de la température sur le comportement en milieu aqueux du HA(AD)₂ a été mis en évidence en effectuant la même expérience à différentes températures : 5°C, 25°C et 55°C (figure III-21).

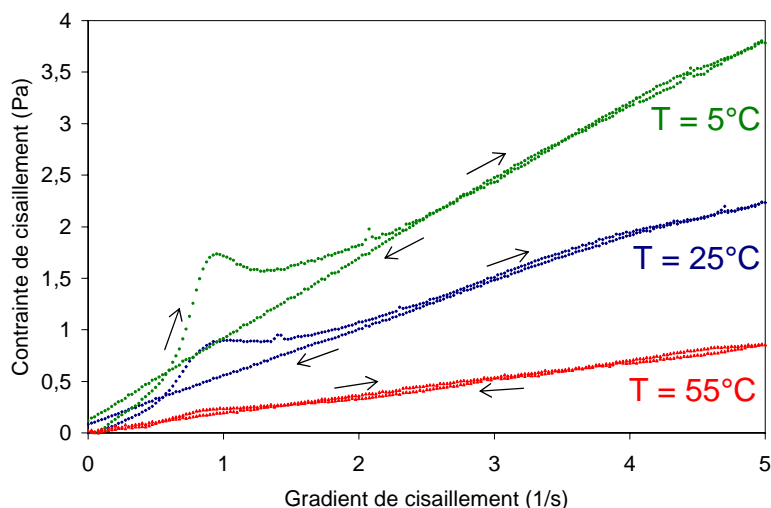


Figure III- 21: Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour une solution de HA(AD)₂ à 7 g/L dans NaCl 0,025 M à différentes températures

La figure III-21 montre que les agrégats sont plus importants à basse température puisque l'ampleur de la déstructuration est plus marquée à 5°C. La température influe sur les agrégats hydrophobes AD/AD et joue également un rôle très important sur la mobilité des chaînes de HA. En effet, une augmentation de la température entraîne une déstabilisation progressive des liaisons hydrogène intrachâînes et interchâînes du HA. Il est donc nécessaire de considérer une balance entre les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques qui, quant à elles, ne sont pas modifiées par une variation de température.

L'analyse des propriétés en solution, *via* des mesures de viscosité, a montré que les dérivés de HA(CD) et de HA(CD)₂ présentent un caractère newtonien avec toutefois une viscosité plus faible que celle du polymère précurseur dans le cas du HA(CD). Cette différence de comportement est attribuée à la formation d'agrégats compacts due aux interactions entre les cavités de β -CD pendantes.

Les solutions de HA(AD) et de HA(AD)₂ présentent un caractère auto-associatif dû aux interactions entre les groupements hydrophobes d'adamantane. Cette auto-association est beaucoup plus marquée dans le cas de la solution de HA(AD)₂. En effet, l'examen du

comportement en milieu aqueux du HA(AD)₂ a mis en évidence la présence d'un seuil de contrainte apparent se traduisant par la dissociation et/ou le réarrangement réversible d'agrégats lorsque l'on applique une vitesse de cisaillement. La formation de ces agrégats est renforcée dans NaCl 0,1 M et à basse température. Cette auto-association assez marquée du HA(AD)₂, qui a été également mise en évidence par calorimétrie, rentrera donc en compétition avec la formation des complexes d'inclusion interchaînes lors du mélange des polymères hôtes et invités.

II Etude rhéologique des différents assemblages supramoléculaires à base de hyaluronane

Après avoir examiné le comportement des solutions des polymères seuls, nous avons abordé l'étude des propriétés viscoélastiques des différents mélanges obtenus, nous nous focaliserons à présent sur l'influence de paramètres externes comme la concentration en sel, la concentration en polymère, la température et l'ajout d'une molécule compétitive.

II.1 Formation des assemblages supramoléculaires

Les interactions multivalentes impliquent la complexation simultanée de multiples ligands avec de multiples récepteurs se traduisant par une très forte augmentation de la constante d'association et de la sélectivité. Les interactions multivalentes se produisent naturellement dans certains processus biologiques tels que la reconnaissance entre les cellules qui dépend essentiellement de la formation des multiples complexes récepteur-ligand à la surface de ces cellules, ou encore l'adhésion d'une bactérie ou d'un virus à la surface d'une cellule [52]. Les mécanismes de complexation mis en jeu dans ces systèmes sont relativement complexes car ils diffèrent des processus de complexation monovalents. Comme nous l'avons vu dans le chapitre bibliographique, de nombreux travaux ont été consacrés à l'élaboration de systèmes supramoléculaires synthétiques impliquant des complexes multivalents à base de cyclodextrine.

Les assemblages supramoléculaires obtenus dans le cadre de notre travail sont très prometteurs puisqu'ils constituent de nouveaux modèles synthétiques impliquant la formation d'interactions multivalentes. En effet, lorsqu'on ajoute une solution de HA(CD) à une

solution aqueuse de HA(AD) et une solution de HA(AD)₂ à une solution de HA(CD)₂, on observe macroscopiquement une évolution très rapide conduisant à un “gel” transparent et stable (figures III-22 et III-23). Ces systèmes de polymères sont issus de la formation simultanée de multiples complexes de type hôte-invité entre d’une part des motifs de β -CD et d’AD et d’autre part des dimères de β -CD et d’AD chacun greffés sur des chaînes polysaccharidiques.

Nous avons choisi d’étudier ces deux assemblages supramoléculaires par des expériences de rhéologie et plus particulièrement par des mesures en régime dynamique. Comme il est expliqué dans le chapitre IV, des mesures en régime dynamique permettent de déterminer les propriétés viscoélastiques d’un échantillon. Ces expériences vont permettre d’étudier les composantes élastique (G') et visqueuse (G'') des systèmes en les soumettant à une contrainte (ou déformation) sinusoïdale à fréquence variable.

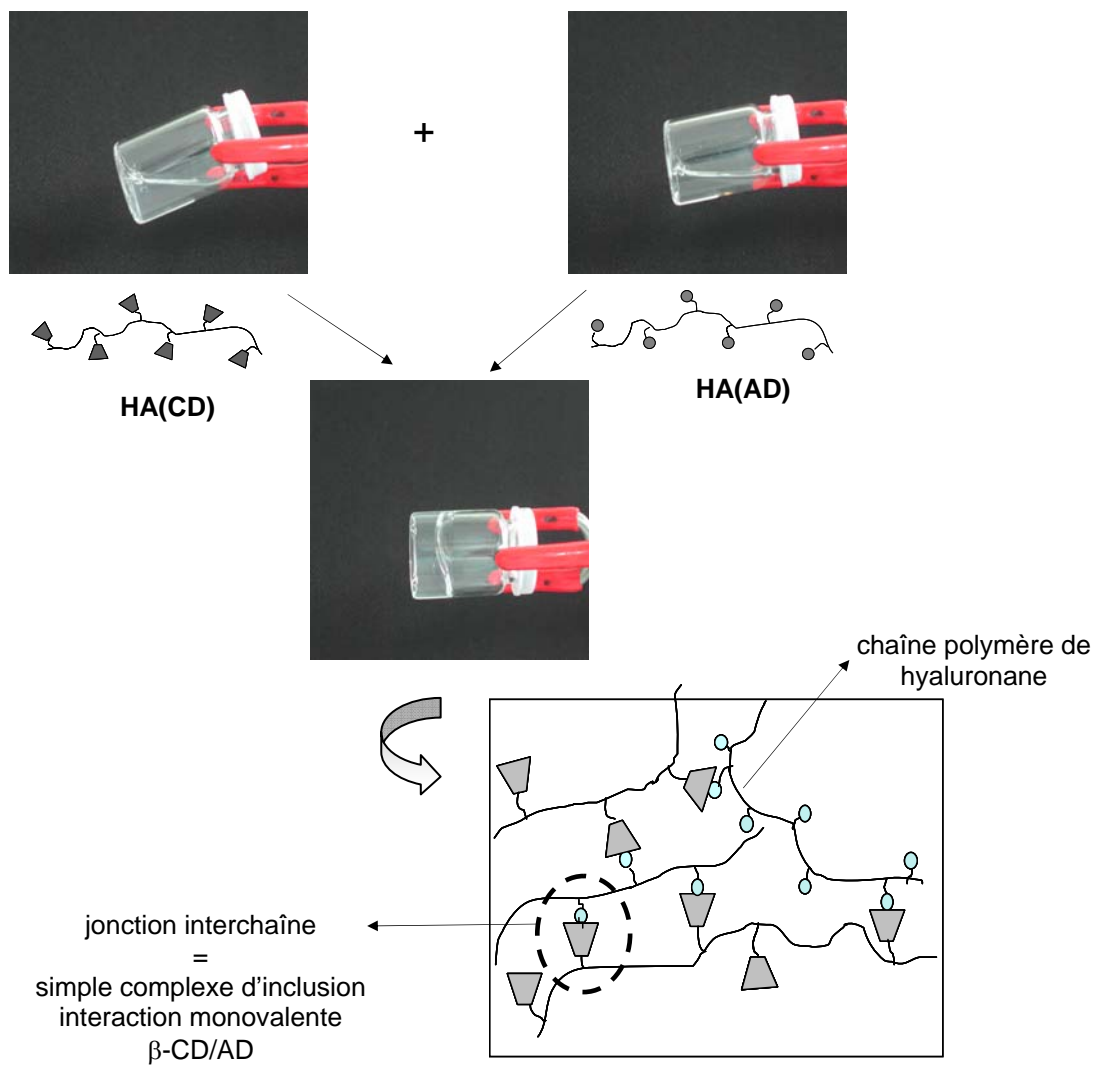


Figure III- 22 : Photographies et représentation schématique des solutions de HA(CD) et de HA(AD) seuls et de l'assemblage supramoléculaire résultant du mélange de ces 2 polymères modifiés à T ambiante

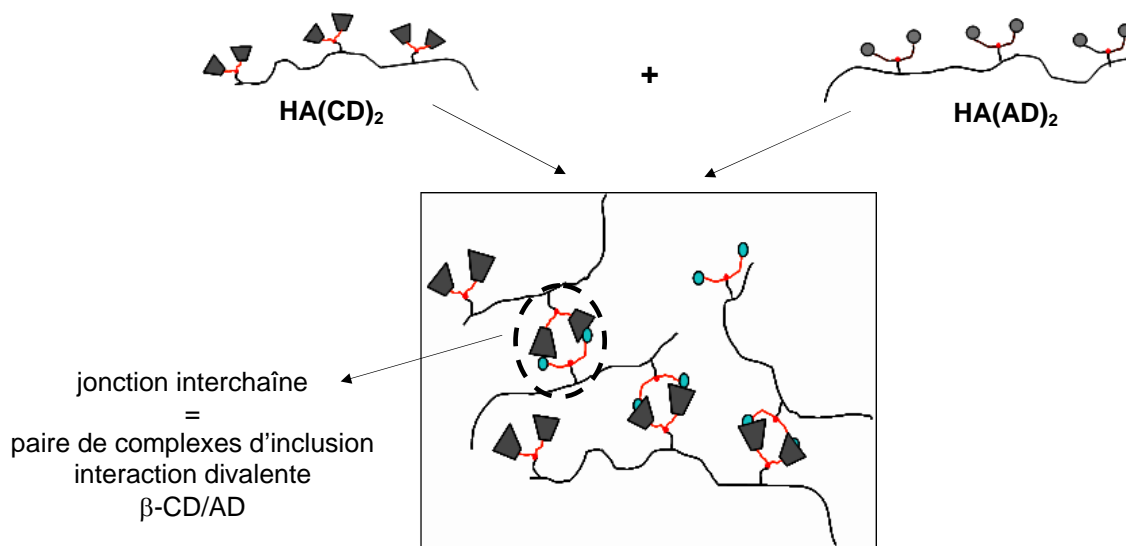


Figure III- 23 : Représentation schématique du réseau tridimensionnel HA(AD)₂/HA(CD)₂

Avant tout, il est essentiel de rappeler que le temps de relaxation d'un système, défini par le modèle de Maxwell, est défini comme l'inverse de la fréquence correspondante au maximum du module de perte G'' [53]. En pratique, il est rare que la dynamique des systèmes de polymères associatifs soit caractérisée par un temps de relaxation unique [54,55]. Les théories prédisent une distribution des temps de relaxation. Un maximum de G'' n'est alors plus distinguable, ce qui est généralement le cas pour les polysaccharides, et le temps de relaxation terminal τ est alors déterminé en première approximation à partir du point de croisement des modules G' et G'' [55]. Dans le cadre de cette approximation, nous considérons donc que le temps de relaxation du système τ est défini comme l'inverse de la fréquence correspondante au point d'intersection de G' et de G'' . Ce temps peut être considéré comme celui nécessaire à la macromolécule pour se désengager du réseau dans lequel elle est retenue.

Les systèmes macromoléculaires constitués de chaînes connectées par des points de jonction temporaires ont suscité un intérêt croissant depuis quelques années et plusieurs approches théoriques ont été développées pour décrire les "réseaux physiques transitoires" ainsi formés. Avant de présenter les résultats expérimentaux obtenus sur nos assemblages supramoléculaires, nous allons rappeler certains de ces modèles.

II.1.1 Modèles théoriques développés

Différents modèles théoriques concernant les polymères associatifs ont été considérés pour décrire leur comportement, en particulier leur dynamique.

Le modèle développé par Tanaka et Edwards [56], décrit la dynamique des solutions non enchevêtrées de polymères téléchéliques fonctionnalisés par des groupes terminaux hydrophobes. Ce modèle ne peut cependant pas être appliqué dans notre cas puisque les sites associatifs sont répartis aléatoirement le long de la chaîne polymère. La dynamique des réseaux réversibles non-enchevêtrés stabilisés par l'association par paires de groupements greffés le long de la chaîne polymère (appelés groupements collants) a été modélisée plus récemment [57-58]. Le comportement rhéologique de ces solutions de polymères associatifs non-enchevêtrés est décrit par un modèle de "Rouse collant" ("sticky Rouse"). Le mouvement des chaînes est lié directement à l'association et à la dissociation des liaisons réversibles les connectant. Seules les associations interchaînes, jouant le rôle de points de friction, contribuent à la viscoélasticité et dominent la dynamique aux temps longs. La dynamique est

donc entièrement gouvernée par le nombre de groupements collants (“stickers”) par chaîne et par leur temps de vie moyen.

La dépendance en concentration de la dynamique de ces systèmes est liée à la transformation des associations intramoléculaires en associations intermoléculaires.

En régime enchevêtré, ces systèmes suivent le modèle de la “reptation collante” (“sticky reptation”) qui peut être considéré comme le modèle de Rouse collant confiné dans un tube de reptation [54,58]. La dynamique des chaînes est liée à la fois à la topologie environnante due à l’enchevêtrement des chaînes et aux jonctions réversibles interchaînes. L’élasticité dans ce régime est principalement contrôlée par la densité d’enchevêtrement et dépend fortement de la concentration en polymère.

Afin de modéliser de façon exhaustive les lois de puissance de η , de τ et de G_0 (le module G' au plateau) dans le régime semi-dilué, Rubinstein et Semenov ont pris en compte 2 paramètres [58] :

- La transformation d’associations intramoléculaires en associations intermoléculaires quand la concentration augmente.
- La renormalisation du temps de vie des associations due au déficit de nouveaux partenaires pour la complexation. En effet, un partenaire s’associe et se dissocie de nombreuses fois avec le même partenaire avant d’en trouver un nouveau, augmentant ainsi le temps de vie apparent de l’association.

Ces 2 paramètres sont pris en compte dans les régimes semi-dilués enchevêtrés et non-enchevêtrés. Rubinstein et Semenov ont défini 2 domaines dans le régime non-enchevêtré et 3 dans le régime enchevêtré qui dépendent chacun de la concentration en polymère. Les lois de puissance prévues, dans la gamme de concentration utilisée pour notre système, sont résumées dans le tableau III-10.

	Régime non-enchevêtré		Régime enchevêtré	
	intra→ inter	inter	intra→ inter	inter
η	$M^1 C^{5,9}$	$M^1 C^{1,1}$	$M^3 C^{8,5}$	$M^3 C^{3,75}$
τ	$M^2 C^{4,9}$	$M^2 C^{0,15}$	$M^2 C^{6,2}$	$M^3 C^{1,45}$
G_0	$M^1 C^1$	$M^1 C^1$	$C^{2,3}$	$C^{2,3}$

Tableau III- 10 : Lois d’échelle prévues pour la rhéologie des polymères associatifs en régime semi-dilué non-enchevêtré et enchevêtré

II.1.2 Résultats expérimentaux

II.1.2.1 Propriétés viscoélastiques du mélange HA(AD)/HA(CD)

Afin d'évaluer l'influence de la formation des complexes d'inclusion multivalents sur le comportement viscoélastique des solutions de hyaluronane, nous avons comparé les propriétés viscoélastiques d'une solution de hyaluronane à 30 g/L à celles d'un mélange HA(AD)/HA(CD) à 10 g/L de même masse molaire initiale. Les résultats sont présentés sur la figure III-24.

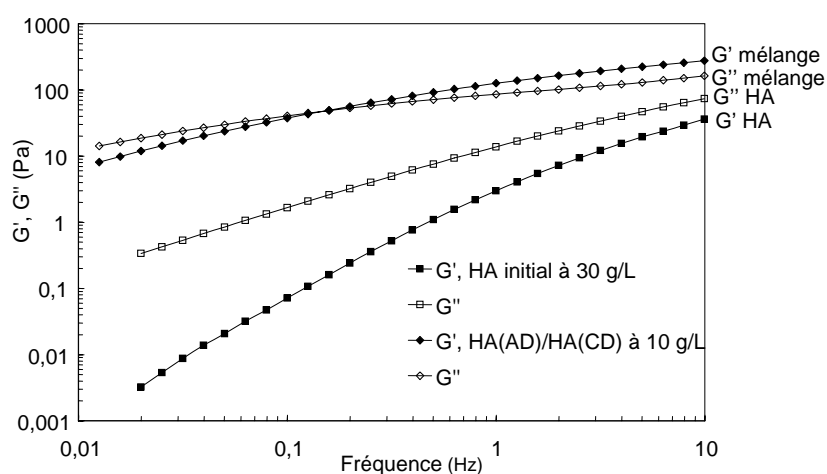


Figure III- 24 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour le HA natif à 30 g/L et pour le mélange HA(AD)/HA(CD) à 10 g/L dans NaCl 0,025 M à 25°C

Les modules G' et G'' pour le mélange sont beaucoup plus élevés que pour le HA initial, et ce, pour une concentration 3 fois moins importante. Il est intéressant de souligner que pour une concentration de 10 g/L, le hyaluronane naturel donne une solution de viscosité assez faible. La figure III-24 montre que le mélange présente un caractère viscoélastique. Le module G' est supérieur au module G'' pour une fréquence supérieure à 0,1 Hz, reflétant un comportement de type gel sur cette gamme de fréquences. Aucun plateau n'est vraiment observable pour le module G' et la diminution des modules G' et G'' avec la fréquence indique que les assemblages relaxent.

Les propriétés viscoélastiques du mélange HA(AD)/HA(CD) ressemblent à celles de solutions de polymères de haute masse molaire et/ou de concentration élevée. A hautes fréquences, c'est à dire à des échelles de temps plus courtes que la durée de vie moyenne d'un pontage physique, le système a un comportement de gel physique. Dans ce domaine où G' est

plus élevé que G'' , le caractère élastique domine. A basses fréquences c'est à dire aux temps longs, le réseau s'écoule et le comportement s'apparente à celui d'une solution. Pour nos systèmes, la réticulation ne fait que remplacer les enchevêtrements.

Le mélange de ces 2 polymères modifiés conduit donc à la formation de réseaux temporaires stabilisés par des liaisons faibles et réversibles qui fluctuent dans le temps.

Les jonctions résultent de la complexation spécifique entre les cavités de β -CD et les groupements adamantane aléatoirement greffés le long de la chaîne polymère. Ces complexes d'inclusion jouent le rôle de jonctions labiles interchaînes et se comportent comme des groupements collants. Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre I, cette complexation présente des similitudes avec les hydrogels établis par des phénomènes de reconnaissance moléculaire tels que les interactions spécifiques entre les protéines [59-61].

Les propriétés rhéologiques de tels systèmes seront reliées au nombre de complexes formés mais aussi à leur durée de vie contrairement aux gels chimiques.

Dans beaucoup de systèmes formés par les polysaccharides, comme présenté dans le chapitre I, la formation de zones de jonctions est nécessaire pour la formation de gels physiques stables. Une jonction interchaîne dont l'énergie est de l'ordre de kT ne suffit pas pour maintenir la cohésion du système. Dans le cas présent, la valeur de l'énergie des jonctions correspondant aux enthalpies déterminées par calorimétrie est nettement supérieure à l'énergie thermique kT . Une coopérativité n'est donc pas indispensable et quelques nœuds de réticulation, qui agissent de façon ponctuelle, suffisent pour obtenir un comportement de type gel.

II.1.2.2 Comparaison des propriétés viscoélastiques des 2 types de mélange

Nous avons comparé le comportement rhéologique des 2 assemblages supramoléculaires : HA(AD)/HA(CD) et de HA(AD)₂/HA(CD)₂ à une même concentration de 10 g/L. Nous rappelons que le HA(AD) et le HA(AD)₂ possèdent le même nombre de groupements adamantane par chaîne polymère (6 %) et le HA(CD) et le HA(CD)₂ possèdent le même nombre de cavités de β -CD (5 %).

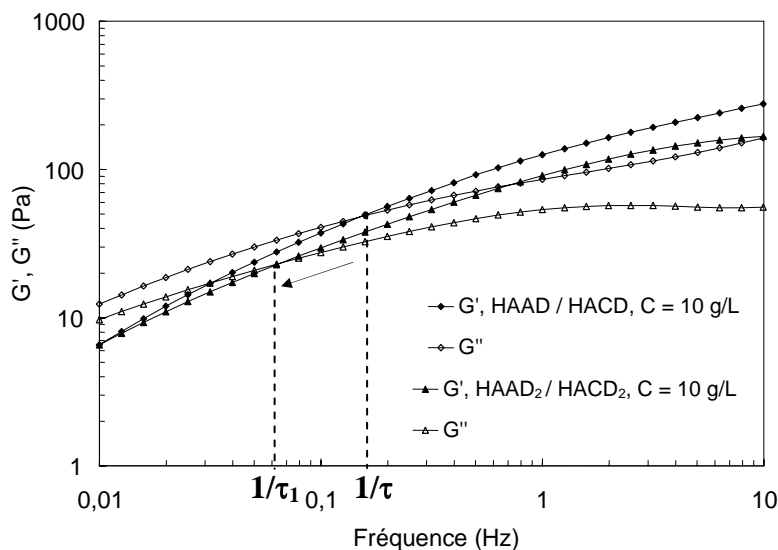


Figure III- 25 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour les mélanges HA(AD)/HA(CD) et HA(AD)₂/HA(CD)₂ à 10 g/L dans NaCl 0,025 M à 25°C

Sur la figure III-25, on remarque que pour le mélange HA(CD)₂/HA(AD)₂, le rapport G'/G'' est plus élevé à fréquences élevées et le temps de relaxation (τ_1) plus long. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus par titration microcalorimétrique. Dans le cas du mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂, une jonction interchaîne met en jeu une interaction divalente puisqu'elle est constituée de 2 complexes d'inclusion. L'enthalpie de liaison et la constante d'association pour ce mélange sont plus élevées que celles du mélange HA(AD)/HA(CD) ce qui explique que le temps de relaxation soit plus long. En revanche, les modules G' et G'' pour le système HA(AD)₂/HA(CD)₂ sont plus faibles. Ces modules sont liés à la densité de jonctions efficaces par chaîne macromoléculaire. Or, une jonction implique 2 complexes d'inclusion dans le cas de HA(AD)₂/HA(CD)₂ et 1 seul dans le cas de HA(AD)/HA(CD). Pour ces raisons, et étant donné que nous avons le même nombre de groupement d'AD par chaîne de HA(AD) et de HA(AD)₂ et le même nombre de molécules de β -CD par chaîne de HA(CD) et de HA(CD)₂, la densité de jonctions est deux fois plus faible dans le cas du mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂. Les valeurs observées pour G' et G'' sont alors plus faibles.

On aurait pu s'attendre à des différences de comportements plus importantes compte tenu de l'augmentation remarquable de la constante d'association mise en évidence dans le cas des interactions divalentes pour les espèces libres. L'intérêt des interactions multivalentes est probablement contrecarré par l'effet des chaînes polymères qui entraînent des restrictions stériques et par la présence d'agrégats importants dans le cas du HA(AD)₂ rentrant en compétition avec la formation des complexes d'inclusion.

II.2 Influence de différents paramètres sur les propriétés viscoélastiques des assemblages

II.2.1 Influence de la force ionique

L'effet polyélectrolyte joue un rôle majeur dans la formation des assemblages supramoléculaires [42,62]. Les propriétés des réseaux formés par ces différents polymères hôtes et invités sont contrôlées par la balance complexe entre les interactions attractives dues à la formation des complexes d'inclusion β -CD/AD et les répulsions électrostatiques entre les chaînes dues aux groupements carboxylate du hyaluronane. Cette balance entre ces interactions de nature différente peut être modulée par une variation de la concentration en sel puisque l'écrantage des sites ioniques du HA entraîne une diminution des répulsions électrostatiques entre les macromolécules hôtes et invités.

Nous avons estimé une concentration en NaCl optimale permettant la formation de réseaux homogènes, égale à 0,025 M. Quand $[\text{NaCl}] \geq 0,05$ M, le mélange n'est plus stable : macroscopiquement, on observe un phénomène de synérèse allant jusqu'à une séparation de phase lorsque la concentration en NaCl augmente (pour $C_{\text{sel}} = 0,1$ M). Ce phénomène a également été observé dans le cas de dérivés du chitosane hydrophobiquement modifiés [63].

II.2.2 Influence de la concentration en polymère

Pour des concentrations correspondantes au régime dilué du HA initial, du HA(AD) et du HA(CD) seuls, les 2 mélanges conduisent à des solutions hétérogènes constituées de microgels dispersés dans le solvant. Aucune mesure de viscosité de ces échantillons n'a été possible. Nous pouvons donc considérer que ces concentrations sont inférieures au seuil de gélification. A partir d'une concentration de 0,004 monomol/L (soit $\sim 1,7$ g/L) qui est environ une fois et demi plus grande que la concentration C^* du hyaluronane initial, un réseau totalement homogène est observé pour les 2 types de mélanges. Les propriétés viscoélastiques des 2 types de mélange ont alors été étudiées dans une gamme de concentrations se situant entre les concentrations C^* et C_e du HA initial c'est-à-dire de $C = 2$ g/L (0,0045 monomol/L) à $C = 10$ g/L (0,022 monomol/L) pour le mélange HA(AD)/HA(CD) et de $C = 4$ g/L (0,00835 monomol/L) à $C = 10$ g/L (0,021 monomol/L) pour le mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂, où C est la concentration totale en g/L, exprimée également en unité disaccharidique de répétition en

monomol/L avec $[AD] = [CD]$. Nous avons donc effectué des mesures de G' et de G'' des deux mélanges en régime dynamique à différentes concentrations C avec $C^* < C < C_e$ (figure III-26).

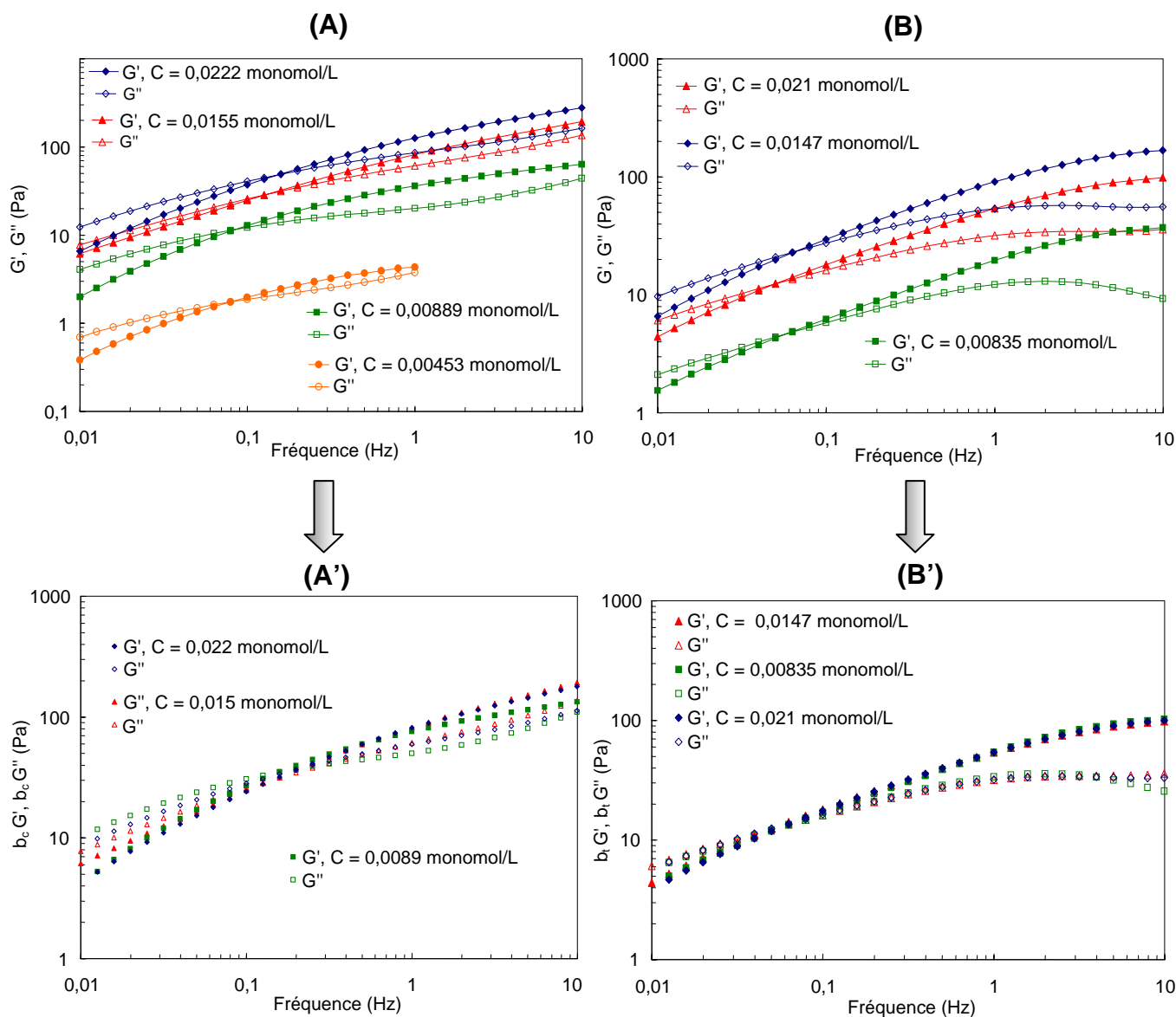


Figure III- 26 : Variations des modules G' et G'' en fonction de la fréquence à différentes concentrations en polymère et courbes maîtresses obtenues après superposition pour les mélanges HA(AD)/HA(CD) (A et A') et HA(AD)₂/HA(CD)₂ (B et B') ($[AD] = [CD]$) dans NaCl 0,025 M à 25°C (courbe de référence 7 g/L soit 0,015 monomol/L pour les 2 mélanges)

Le comportement rhéologique des 2 types de mélange, dans cette gamme de concentration, est très proche de celui de solutions viscoélastiques de polymères enchevêtrés [53]. La figure III-26 montre l'influence de la concentration en polymère sur les modules G' et G'' . Elle indique que les 2 mélanges HA(AD)/HA(CD) (rhéogramme (A)) et HA(AD)₂/HA(CD)₂ (rhéogramme (B)) répondent de la même façon à une variation de

concentration. En effet, les modules G' et G'' augmentent avec la concentration en polymère. En revanche, le temps de relaxation caractéristique τ , reflétant la dynamique du système, ne semble pas être affecté par une variation de la concentration en polymère dans cette gamme de concentrations.

Nous avons essayé d'obtenir des courbes maîtresses par translation des courbes le long des axes de la fréquence et des modules. C'est une superposition en temps-concentration. Les courbes ont pu être superposées à la courbe de référence ($C = 7 \text{ g/L} = 0,015 \text{ monomol/L}$) uniquement par une translation verticale. Le même facteur de translation est appliqué pour G' et pour G'' . La superposition dans le cas du HA(AD)/HA(CD) est moins correcte, ce qui peut être attribué à des imprécisions expérimentales pendant la préparation des échantillons.

Etant donné que la gamme de concentrations utilisées pour les mélanges correspondent au régime semi-dilué non-enchevêtré du HA initial et que le temps de relaxation τ des 2 mélanges ne varie pas avec la concentration en polymère, nous pouvons considérer que dans cette gamme de concentrations les enchevêtrements des chaînes ne sont pas prédominants. La dynamique gouvernée par la formation des complexes d'inclusion et leur durée de vie moyenne peut être expliquée par le modèle de Rouse collant [57,58]. Le fait que le temps de relaxation reste constant avec la variation de concentration correspond, dans une certaine mesure, aux lois d'échelle théoriques prédites (tableau III-10) par Rubinstein et Semenov pour le domaine où les associations intermoléculaires prédominent dans le régime non-enchevêtré ($\tau \sim M^2 C^{0,15}$).

Par ailleurs, comme seulement une translation verticale permet d'obtenir les courbes maîtresses, on peut considérer que la variation du module G' varie de la même façon avec la concentration quelque soit la fréquence. La figure III-27 représente la variation du module G' (au point d'intersection de G' et de G'') en fonction de la concentration en polymère, qui varie comme la densité de jonctions potentielles.

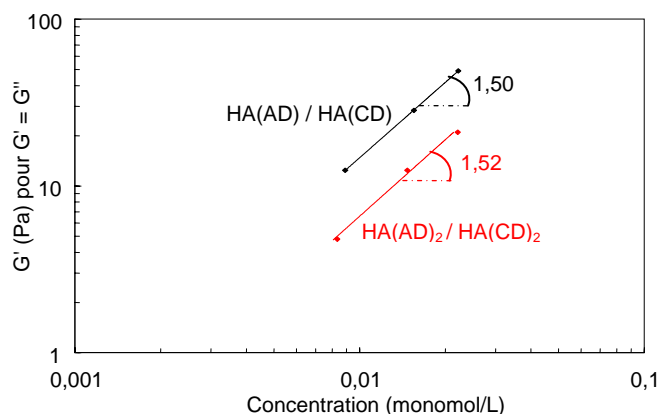


Figure III- 27 : Dépendance du module G' (correspondant au point d'intersection entre G' et G'') avec la concentration en polymère pour les mélanges HA(AD)/HA(CD) et HA(AD)₂/HA(CD)₂ dans NaCl 0,025 M à 25°C

La loi de puissance de 1,5 trouvée expérimentalement pour les 2 mélanges ne correspond ni à la valeur théorique déterminée en régime non-enchevêtré (C^1) ni à celle correspondant au régime enchevêtré ($C^{2,3}$) (tableau III-10). Nous pouvons penser que ces concentrations se situent dans un régime intermédiaire pour lequel on observe un début d'enchevêtrements. Les différences par rapport aux valeurs théoriques peuvent également s'expliquer par le fait que le polymère utilisé est un polysaccharide semi-rigide et que les théories ont été établies sur des polymères synthétiques flexibles.

Il est intéressant de noter que la viscosité correspondante donnée par $\eta = G_0\tau$ varie $\sim C^{1,6}$ puisque τ est constant. Cette puissance de 1,6 correspond à celle trouvée pour la variation de la viscosité en fonction de la concentration trouvée pour le HA initial (figure III-15) en régime semi-dilué non-enchevêtré.

II.2.3 Influence de la température

II.2.3.1 Variation de G' et G'' en fonction de la température

Nous avons suivi l'évolution des modules G' et G'' des mélanges HA(AD)/HA(CD) (figure III-28 (A)) et HA(AD)₂/HA(CD)₂ (figure III-28 (B)) à une valeur de fréquence fixée, lors d'une rampe en température.

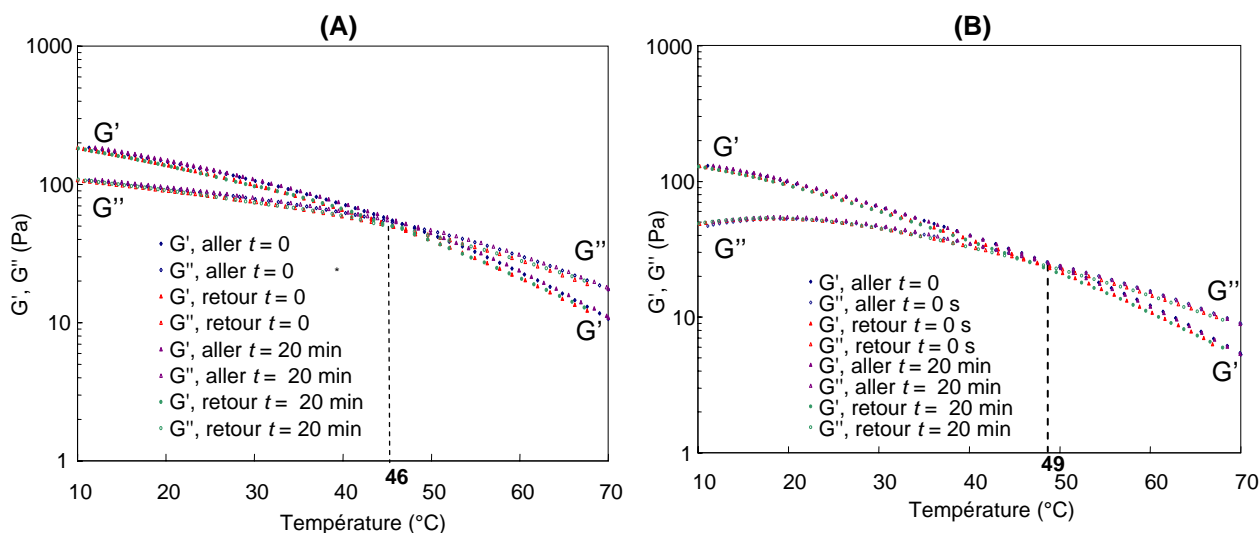


Figure III- 28 : Variation des modules G' et G'' avec la température pour les mélanges HA(AD)/HA(CD) (A) et HA(AD)₂/HA(CD)₂ (B) à une concentration totale de 10 g/L avec $[AD] = [CD]$ dans NaCl 0,025 M à une fréquence de 1 Hz

Une élévation de température fluidifie les deux types de mélange puisque qu'à partir de 46°C et 49°C respectivement pour HA(AD)/HA(CD) et HA(AD)₂/HA(CD)₂, le module G'' devient supérieur au module G' , à une fréquence de 1 Hz (figure III-28). Globalement, une augmentation de température entraîne une diminution des modules caractéristiques G' et G'' , ce qui confirme le caractère essentiellement enthalpique des assemblages supramoléculaires. L'élasticité purement entropique d'un gel augmente avec la température.

Pour chaque mélange, nous avons réitéré la rampe en température après 20 minutes. La superposition parfaite des courbes indique que la modification des propriétés viscoélastiques engendrées par une modification de température est entièrement réversible.

II.2.3.2 Variation de G' et G'' en fonction de la fréquence à différentes températures

Afin de mieux comprendre l'effet de la température sur le comportement rhéologique des 2 mélanges, nous avons étudié la variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence et ce, pour différentes températures (figure III-29).

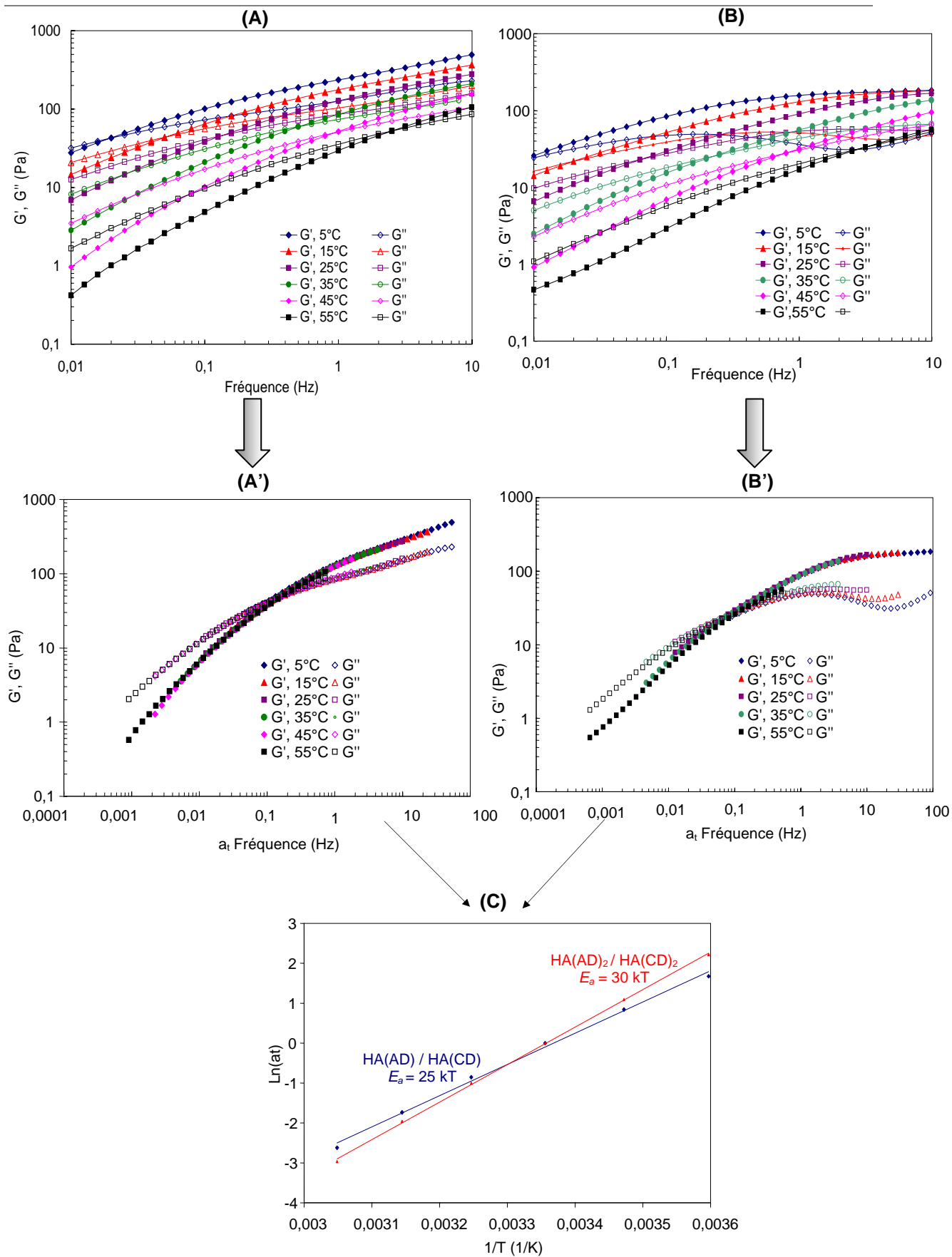


Figure III- 29 : Variations des modules G' et G'' en fonction de la fréquence à différentes températures pour HA(AD)/HA(CD) (A) et pour HA(AD)₂/HA(CD)₂ (B) à 10 g/L ([AD] = [CD]) dans NaCl 0,025 M à 25°C ; courbes maîtresses obtenues (A' et B') et variations de $\ln(a_t)$ en fonction de $1/T$ (C)

La figure III-29 (rhéogrammes (A) et (B)) montre une diminution des modules G' et G'' lorsque la température augmente pour les 2 mélanges comme observé avec les rampes de température. Cette diminution des modules est accompagnée d'un déplacement du point de croisement des modules vers les fréquences élevées indiquant que le temps de relaxation pour les 2 systèmes diminue quand la température augmente.

Une superposition temps-température (ou méthode des variables réduites) nous a permis d'obtenir des courbes maîtresses pour les modules G' et G'' (rhéogrammes A' et B') [53,64]. La température de 25°C a été choisie comme la température de référence. Cette superposition permet également d'étendre la gamme de fréquences explorées. Pour un mélange donné, le même facteur de translation horizontale pour G' et G'' est appliqué. Ce principe de superposition temps-température s'applique théoriquement pour les solutions de polymères enchevêtrés. Nous voyons que ce principe est parfaitement transposable au HA(AD)/HA(CD) ce qui n'est pas tout à fait le cas pour le mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂. En effet, à hautes fréquences les courbes représentant l'évolution des modules G'' ne se superposent pas aussi bien. Par ailleurs, l'allure des courbes représentant l'évolution des modules G' et G'' du mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂ présente des similitudes avec le modèle de Maxwell, évoqué au début de cette partie, dans la mesure où l'on distingue un maximum pour G'' à basses températures et à hautes fréquences.

D'une façon générale, une translation verticale est liée à la variation du nombre de groupements collants par chaîne et à la variation de la concentration en polymère et une translation horizontale reflète la modification du mécanisme de relaxation par la température. Dans de nombreux travaux, la courbe maîtresse est obtenue par des translations verticale et horizontale [65-67]. Pour nos systèmes, aucune translation verticale significative n'est nécessaire ce qui s'explique par le même nombre de groupes interactifs à chaque température. Ce phénomène a également été observé pour des solutions enchevêtrées de polyacrylamide associatifs [68].

Etant donné l'importante contribution enthalpique dans la stabilité des complexes à base de β -CD, nous avons calculé la constante d'association et le nombre maximum de complexes susceptibles de se former à trois températures (5°C, 25°C et 50°C). Les relations qui nous ont permis de calculer ces données sont les suivantes :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad \text{éq. III- 6}$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{éq. III- 7}$$

donc

$$K_a = \exp\left(-\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{T\Delta S^\circ}{RT}\right) \quad \text{éq. III- 8}$$

où ΔG° est la variation d'énergie libre, ΔH° est la variation d'enthalpie en kJ/mol ici < 0 , ΔS° est la variation d'entropie, K_a est la constante d'association en M^{-1} , $R = 8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ est la constante des gaz parfaits et T est la température absolue en K.

Le nombre de complexes maximum susceptibles de se former a été calculé à partir de la valeur de K_a , des concentrations totales en AD et en β -CD et de la relation suivante :

$$K_a = \frac{[\text{complexes AD} / \beta - \text{CD}]}{[\beta - \text{CD}] \times [\text{AD}]} \quad \text{éq. III- 9}$$

où K_a est la constante d'association et les concentrations sont les concentrations des espèces à l'équilibre.

Les calculs effectués portent sur le mélange HA(AD)/HA(CD) à 10 g/L avec $[\text{AD}]_{\text{total}} = [\beta\text{-CD}]_{\text{total}} = 6,06 \times 10^{-4} \text{ M}$, en considérant $\Delta H^\circ = -29\,400 \text{ J/mol}$, $\Delta S^\circ = 7,35 \text{ J/mol}$ à 25°C . Ces valeurs ont été déterminées par ITC pour la titration du HA-CD par des monomères d'AD libres dans NaCl 0,025 M. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III-11.

T (°C)	5	25	50
$K_a (M^{-1})$	138 151	58 837	19 871
[complexes β -CD/AD] M	$5,45 \times 10^{-4}$	$4,9 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-4}$

Tableau III- 11 : Constantes d'association et nombre de complexes de β -CD/AD déterminés à différentes températures

Ce tableau montre une diminution non négligeable de la constante d'association lorsque la température augmente. En revanche, la diminution du nombre de complexes (aptes à se former) avec la température est relativement faible puisque ce nombre varie de $5,45 \times 10^{-4}$ à $4,4 \times 10^{-4}$.

L'application d'une translation horizontale implique que le mécanisme de relaxation reflétant la dynamique du système est modifié par une variation de température (relation avec la constante d'association K_a). Le temps de relaxation diminue avec une augmentation de température. La température joue un rôle très important sur la vitesse d'échange et par conséquent sur la durée de vie moyenne des complexes β -CD/AD. De plus, la mobilité des chaînes polysaccharidiques est très sensible à une variation de température. En effet, quand la température augmente, la viscosité du solvant diminue et la flexibilité du HA est augmentée dans la mesure où les ponts hydrogène intrachânes, présents initialement sur le polymère, sont progressivement déstabilisés [69].

L'énergie d'activation E_a requise pour la relaxation du système peut être estimée grâce à la variation de $\ln(a_t)$ en fonction de $1/T$. Cette énergie suit une loi de type Arrhénius:

$$a_t = B \exp(E_a/RT) \quad \text{éq. III- 10}$$

où a_t est le facteur de translation horizontale, R la constante des gaz parfaits égale à $8.314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, T la température absolue en K et B un facteur de fréquence.

La pente de chacune des droites $\ln(a_t)$ fonction de $1/T$ pour les 2 systèmes nous donne les valeurs de E_a (figure III-29 (C)) au facteur R près. Cette énergie peut être assimilée à la barrière d'énergie potentielle qu'une chaîne polymère doit franchir pour se désengager du reste des chaînes [53,56].

Le tableau III-12 présente les valeurs d'énergie d'activation déterminées pour le HA initial, le HA(AD)₂, et pour les 2 mélanges à différentes concentrations en polymère.

	Concentration en polymère	E_a (kJ/mol)	E_a
HA initial*	7 g/L	20	8 kT
HA initial*	10 g/L	22,5	9 kT
HA initial	30 g/L	27,5	11 kT
HA(AD)/HA(CD)	7 g/L	57,5	23 kT
HA(AD)/HA(CD)	10 g/L	62,5	25 kT
HA(AD) ₂	10 g/L	22,5	9 kT
HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂	7 g/L	67,5	27 kT
HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂	10 g/L	75	30 kT

*cf [69].

Tableau III- 12 : Energies d'activation déterminées pour différents systèmes (1 kT = 2,5 kJ/mol)
(la précision des mesures est estimée à 5 %)

Ces valeurs d'énergie d'activation incluent l'énergie d'activation du solvant. Au laboratoire, il a été montré que l'énergie d'activation du hyaluronane dépend de la concentration en polymère. La valeur de l'énergie d'activation pour un hyaluronane de masse $\sim 300\,000$ g/mol augmente jusqu'à une concentration en polymère égale \sim à 30 g/L pour atteindre une valeur maximum et ensuite diminuer très légèrement (figure III-30) [69].

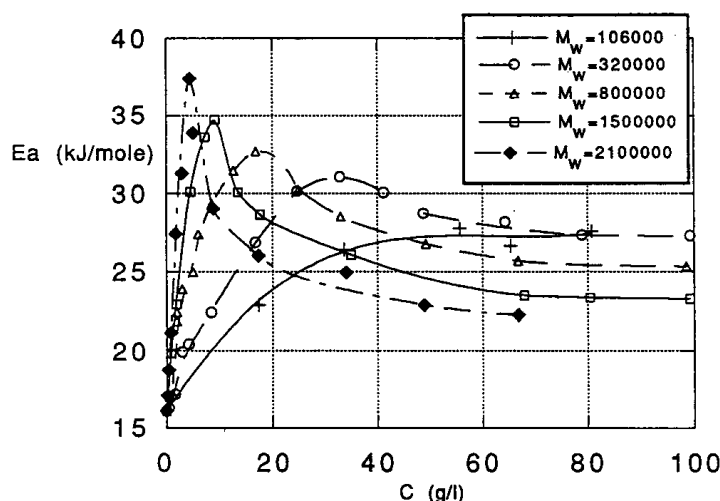


Figure III- 30 : Variation de l'énergie d'activation en fonction de la concentration pour des HA de masses molaires différentes, reproduction de la réf. [69]

On peut donc penser que le même phénomène se produit avec les 2 mélanges, à savoir une augmentation de l'énergie d'activation avec la concentration pour atteindre un maximum et ensuite se stabiliser. Le tableau III-12 montre que les énergies d'activation trouvées pour les mélanges sont beaucoup plus importantes que celles du HA natif, quelque soit la concentration du HA. Ceci s'explique par le fait que la dynamique des mélanges est totalement différente de celle du polymère précurseur. En effet, considérons le cas du mélange HA(AD)/HA(CD) à 10 g/L. L'énergie d'activation du mélange est de 62,5 kJ/mol et celle du HA natif à la même concentration est de 22,5 kJ/mol. La différence entre ces deux énergies, c'est-à-dire 40 kJ/mol est liée à la présence des groupements collants. Toutefois cette valeur ne correspond pas à la valeur de l'énergie d'un complexe AD/ β -CD déterminée par titration calorimétrique (- 26 kJ/mol). L'excédent pourrait refléter le caractère multivalent de la complexation. Les complexes d'inclusion constituent donc des jonctions ponctuelles agissant de façon non indépendante vis-à-vis de la dynamique de la chaîne. Par ailleurs, les valeurs d'énergie d'activation plus importantes trouvées pour le mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂ par rapport à HA(AD)/HA(CD) sont vraisemblablement liées à la nature divalente de l'interaction

β -CD/AD dans le cas du mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂. En effet, comme nous l'avons vu par microcalorimétrie, l'énergie des jonctions constituées par 2 dimères est plus élevée que celle constituée par 2 monomères, ce qui explique que l'énergie requise pour la relaxation E_a dans le cas de HA(AD)₂/HA(CD)₂ soit plus importante.

II.2.4 Influence de l'ajout d'une molécule hôte compétitive : la β -CD naturelle

Puisque les réseaux résultent d'interactions sélectives entre la β -CD et l'adamantane, nous pouvons penser que l'addition d'une molécule hôte compétitive déplace l'équilibre de complexation. La dissociation des assemblages supramoléculaires dépendra donc de la constante d'association entre la molécule hôte ajoutée et les groupements adamantane greffés sur les chaînes polymères.

Nous avons choisi d'ajouter la molécule de β -CD naturelle. La figure III-31 montre les propriétés viscoélastiques obtenues après des ajouts de β -CD naturelle à différentes concentrations. La β -CD est solubilisée dans un minimum de solvant (50 μ L au maximum) puis ajoutée directement sur le "gel". Les réseaux sont ensuite agités pour obtenir une bonne homogénéité et laissés au repos pendant 1 heure.

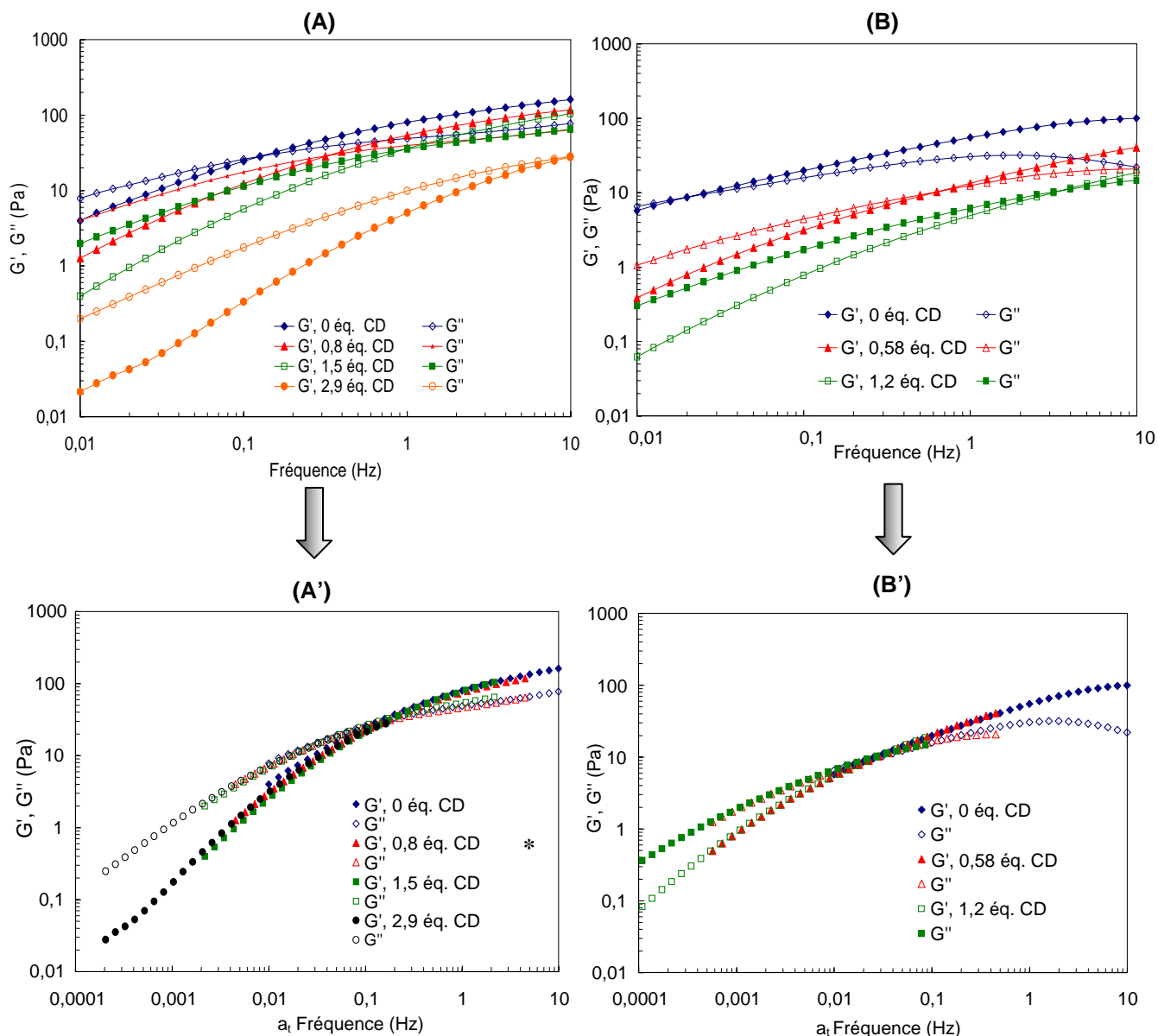


Figure III- 31 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour les systèmes HA(AD)/HA(CD) (A) et pour HA(AD)₂/HA(CD)₂ (B) ($C = 0,015$ monomol/L = 7 g/L, $[AD] = [CD]$) seuls et en présence de β -CD libre ajoutée à différentes concentrations et courbes maîtresses obtenues après superposition ((A') et (B')) ; solvant, NaCl 0,025 M à 25 °C, courbe de référence 0 éq. CD

La figure III-31 montre que pour les 2 réseaux, l'addition de β -CD entraîne une diminution du temps de relaxation et des modules G' et G'' . Ces diminutions sont d'autant plus marquées que la concentration en β -CD est grande.

Par un principe analogue à la superposition temps-température, nous avons essayé de superposer les courbes de façon à obtenir une courbe maîtresse (figure III-31, courbe (A') et (B')). Il s'avère que pour les deux types de mélanges, seule une translation le long de l'axe des fréquences est nécessaire à l'obtention de la courbe maîtresse.

On peut considérer que ces expériences de compétition consistent à “faire varier” la densité de jonctions interchaînes effectives. En effet, les molécules de β -CD libres additionnées s’associent avec les groupements adamantane greffés sur le polymère, contribuant ainsi à une diminution de la densité des jonctions interchaînes efficaces. En revanche, le nombre maximum de groupements collants par chaîne macromoléculaire reste le même ce qui peut expliquer qu’aucune translation verticale n’est nécessaire à l’obtention des courbes maîtresses.

L’application des translations horizontales signifie que le mécanisme de relaxation est modifié par l’ajout de β -CDs libres. La diminution du temps de relaxation observée reflète une augmentation de la dynamique du système. La dynamique, en particulier la vitesse d’échange des complexes d’inclusion, est totalement modifiée dans la mesure où un groupement adamantane greffé a le choix de s’associer soit avec une cavité de β -CD greffée soit avec une molécule libre. Le système n’est pas figé mais il est caractérisé par un échange dynamique.

Par ailleurs, on observe que dans le cas du mélange HA(AD)/HA(CD), l’addition de 2,9 éq. molaires de β -CD libres entraîne une diminution de G' d’un facteur 10 (~ 150 Pa à ~ 15 Pa) alors que pour le mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂ la diminution de G' d’un facteur 10 (~ 100 Pa à ~ 10 Pa) nécessite seulement l’ajout de 1,2 éq. molaires de β -CD. La dissociation du réseau HA(AD)₂/HA(CD)₂ requiert donc une quantité de β -CD moins importante. Ceci peut s’expliquer par le fait que, comme évoqué auparavant, la densité de jonctions interchaînes est deux fois plus faible dans le cas de HA(AD)₂/HA(CD)₂ et une seule cavité de β -CD suffit pour dissocier un complexe divalent, ce qui laisse penser que la dissociation complète du réseau nécessite deux fois moins de β -CDs libres.

L’effet de l’addition des β -CD libres sur le mélange HA(AD)/HA(CD) peut être représenté schématiquement (schéma III-2). Le même phénomène est observé avec le mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂.

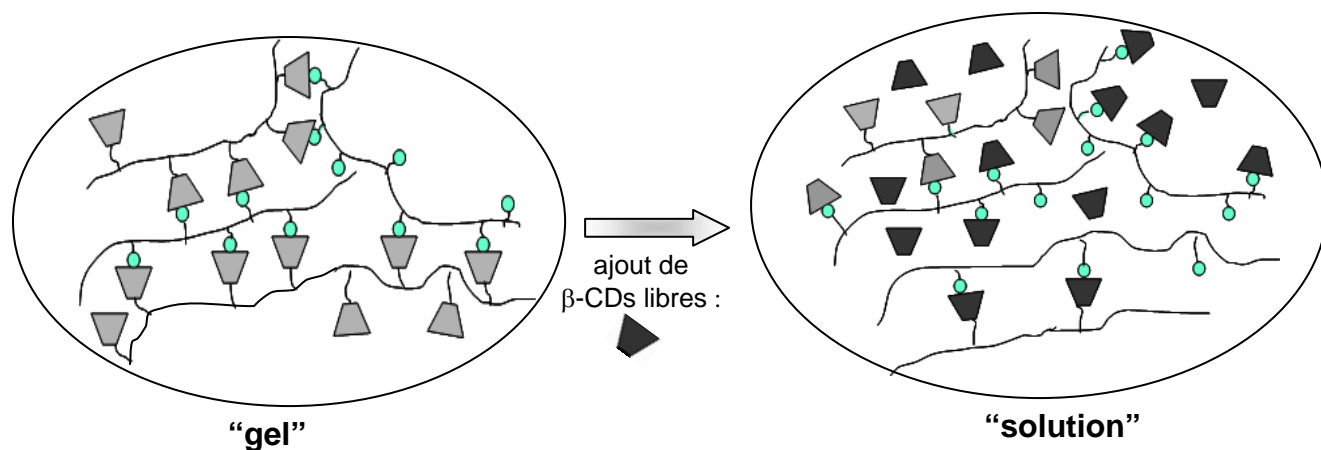


Schéma III- 2 : Dissociation partielle de l'assemblage supramoléculaire HA(AD)/HA(CD) après addition de β -CD libres

Ces observations diffèrent totalement des travaux effectués par Reinhoudt et *coll.* qui ont montré que les assemblages formés entre des polymères hydrophobiquement modifiés invités et des β -CDs adsorbées sur une surface d'or étaient irréversibles et ne pouvaient pas être dissociés par l'addition de molécules compétitives hôtes ou invitées [70].

Les assemblages macromoléculaires que nous avons obtenus peuvent donc être considérés comme des systèmes sensibles à l'addition de molécules hôtes compétitives. En effet, l'addition de β -CD en tant que molécule hôte compétitive se traduit macroscopiquement par une transition d'un comportement de type gel à l'état de solution. La réponse est fonction de la constante d'association entre les molécules libres et greffées et est totalement réversible.

II.3 Etude du comportement en écoulement des mélanges

Comme il a été montré dans le cas de la solution de HA(AD)₂, certaines solutions ou certains solides possèdent un caractère thixotrope. Nous avons cherché à voir si les 2 assemblages supramoléculaires présentent un tel comportement.

II.3.1 Etude de la déstructuration des deux types d'assemblages supramoléculaires

Des expériences consistant à appliquer des rampes continues de contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement ont été effectuées sur les mélanges HA(AD)/HA(CD) et HA(AD)₂/HA(CD)₂, (concentrations en polymère identiques de 0,015 monomol/L soit 7 g/L) (figure III-32).

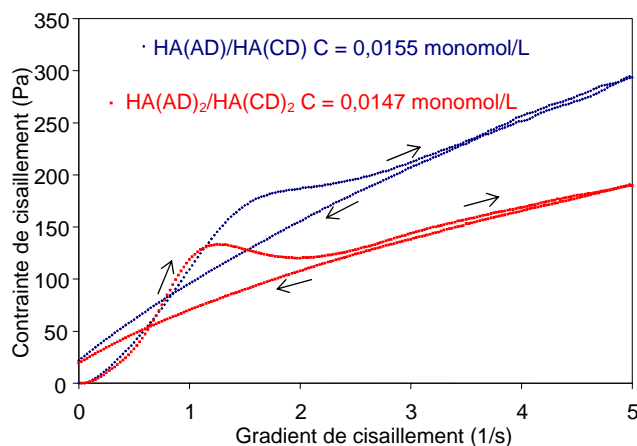


Figure III- 32 : Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour HA(AD)/HA(CD) et HA(AD)₂/HA(CD)₂ avec C = 0,015 monomol/L soit 7 g/L dans NaCl 0,025 M à 25°C

La figure III-32 montre la présence d'un seuil de contrainte critique apparent pour les 2 mélanges correspondant respectivement à une vitesse de cisaillement de 1 s⁻¹ pour le système HA(AD)₂/HA(CD)₂ et de 1,6 s⁻¹ pour le mélange HA(AD)/HA(CD) traduisant une dissociation et/ou à un réarrangement des interactions stabilisant les assemblages formés. Les valeurs des seuils de contrainte apparent, ~140 Pa pour le mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂ et ~170 Pa pour le système HA(AD)/HA(CD), sont beaucoup plus élevées que celle trouvée pour les solutions de HA(AD)₂ qui est égale à 1,3 Pa ce qui signifie que dans le cas des mélanges, les interactions sont beaucoup plus fortes et stables.

L'existence de tels seuils de contrainte apparents a été trouvée pour des systèmes se comportant comme des réseaux temporaires stabilisés par des liaisons faibles et réversibles [71,72].

II.3.2 Cinétique de restructuration

La même expérience a été répétée afin d'évaluer le temps nécessaire requis par les 2 mélanges pour retrouver leur état initial (figure III-33).

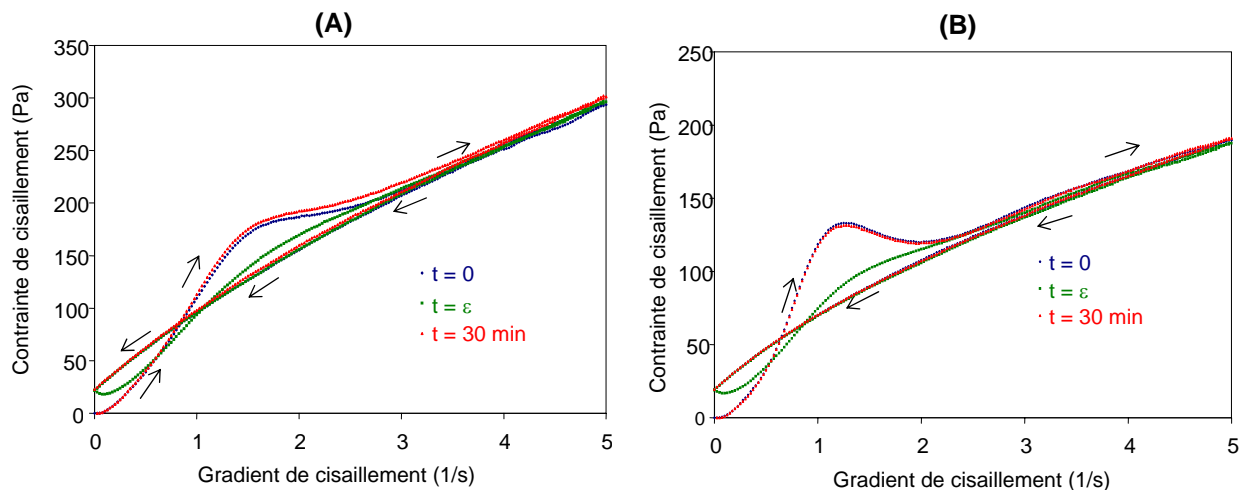


Figure III- 33 : Effet du temps sur la variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour les systèmes HA(AD)/HA(CD) (A) et HA(AD)₂/HA(CD)₂ (B) à C = 0,015 monomol/L dans NaCl 0,025 M à 25°C

La figure III-33 indique qu'un temps de 30 min est suffisant pour un retour à l'état initial puisque les cycles d'hystérésis se superposent parfaitement. La relaxation (30 min) est nettement plus courte que dans le cas le HA(AD)₂ (3 heures minimum) probablement en raison des déstructurations occasionnées dans les mélanges et dans la solution de HA(AD)₂, qui n'ont pas la même origine. Dans le cas des mélanges, le cisaillement agit principalement sur les complexes d'inclusion interchaînes et non sur l'auto-association des polymères.

II.3.3 Effet de la température

Les expériences ont été effectuées à différentes températures (5°C, 25°C et 50°C) et ce pour chacun des 2 mélanges (figure III-34).

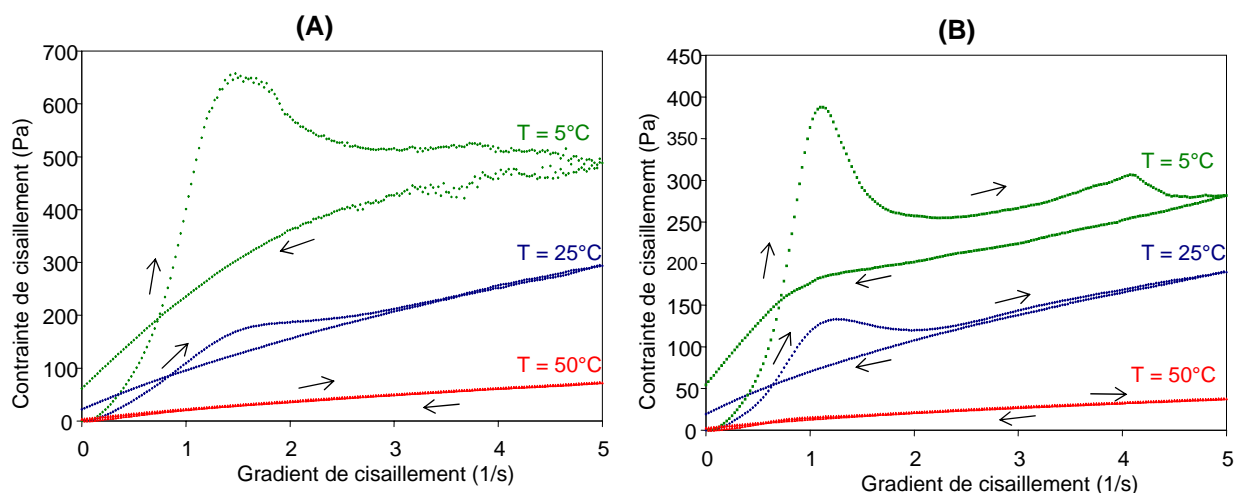


Figure III- 34 : Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour HA(AD)/HA(CD) (A) et pour HA(AD)₂/HA(CD)₂ à C = 0,015 monomol/L ([AD] = [CD]) à différentes températures dans NaCl 0,025M

L'ampleur de la déstructuration plus importante à basse température signifie que les réseaux temporaires sont plus "solides" à basse température. Ces observations corroborent les résultats obtenus à partir des rampes de température qui ont montré que pour les 2 mélanges le module élastique G' est plus élevé que le module de perte G'' à basse température et à partir des expériences en dynamique effectuées à différentes températures. La disparition du seuil de contrainte apparent est liée à la durée de vie plus courte des complexes et à la flexibilité plus marquée du HA à haute température.

L'étude rhéologique nous a permis de mieux comprendre le comportement de ces mélanges originaux. Les résultats obtenus pour le comportement rhéologique des mélanges HA(AD)/HA(CD) et HA(AD)₂/HA(CD)₂ indiquent qu'ils se comportent comme des réseaux temporaires qui relaxent à basse fréquence. Les complexes d'inclusion entre monomères de β -CD et d'AD d'une part, et entre dimères de β -CD et dimères d'AD d'autre part, constituent des jonctions physiques interchaînes. Les propriétés viscoélastiques de ces réseaux sont sensibles à la variation de différents paramètres externes comme la force ionique, la concentration en polymère, la température et l'ajout d'une molécule compétitive.

Il en résulte que la concentration en NaCl optimale pour la formation des assemblages supramoléculaires stables et homogènes considérés dans ce travail est égale à 0,025 M.

La comparaison entre les lois d'échelle expérimentales et théoriques pour le HA initial et pour les 2 mélanges nous ont permis d'identifier différents régimes. Dans la gamme de concentration choisie, il ressort que les réseaux se forment dans le régime semi-dilué dans lequel les enchevêtrements ne sont pas prédominants. L'augmentation de la concentration provoque un accroissement des modules G' et G'' sans modifier la valeur du temps de relaxation. La dynamique des systèmes obéit au modèle de Rouse collant et est principalement contrôlée par le nombre de groupements collants par chaîne, par leur durée de vie (donc leur vitesse d'échange) et par leur énergie.

Par ailleurs, il s'avère que le principal effet de la température est "l'activation" du mécanisme de relaxation. Le temps de vie des jonctions interchaînes et la mobilité de la chaîne sont augmentés. L'application du principe de temps-température nous permet d'accéder à l'énergie d'activation des systèmes. Les valeurs importantes des énergies requises pour la relaxation des 2 mélanges reflètent la présence des groupements collants le long des chaînes. Ce ralentissement est d'ailleurs plus marqué pour les mélanges HA(AD)₂/HA(CD)₂.

L'ajout d'une molécule compétitive dissocie en partie les complexes d'inclusion et entraîne donc une diminution du nombre des jonctions interchaînes efficaces et une modification du processus de relaxation.

Nous avons également mis en évidence que les mélanges, après avoir subi une déformation impliquant une dissociation et/ou un réarrangement des complexes d'inclusion interchaînes, relaxent après un temps relativement faible de 30 min.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté le comportement en milieu aqueux des molécules et macromolécules hôtes et invitées que nous avons synthétisées. L'examen des comportements en solution a été principalement effectué par des expériences de titration calorimétrique qui ont permis une analyse détaillée des propriétés d'inclusion de chaque entité moléculaire et par des mesures de viscosité qui ont permis d'appréhender les propriétés en solution des polymères hôtes et invités.

Nous avons, dans une deuxième partie, caractérisé les propriétés viscoélastiques des 2 assemblages supramoléculaires obtenus : le mélange HA(AD)/HA(CD) stabilisé par des complexes d'inclusion β -CD/AD simples et le mélange HA(AD)₂/HA(CD)₂ stabilisé par des paires de complexes d'inclusion β -CD/AD. Les 2 mélanges se comportent comme des réseaux physiques dont les nœuds de réticulation subissent des fluctuations temporelles et thermiques. Les deux systèmes révèlent un comportement différent en corrélation avec la structure du complexe d'inclusion. Dans le cas des mélanges HA(AD)₂/HA(CD)₂, les modules G' et G'' sont plus faibles étant donné que le nombre de groupements collants est deux fois plus faible. La dynamique du système est diminuée en raison de l'énergie plus importante des jonctions interchaînes.

Ces assemblages supramoléculaires constituent une nouvelle classe d'hydrogels physiques dont les nœuds de réticulation sont ici bien définis et contrôlés. Ils constituent également des modèles très intéressants impliquant des interactions multivalentes ponctuelles.

Par ailleurs, leurs propriétés viscoélastiques sont modulables par une variation de différents paramètres chimiques et physiques. Les réponses des 2 types de mélange à la modification de ces paramètres externes sont relativement similaires. En conséquence, dans la gamme de concentration choisie, la dynamique des systèmes est essentiellement contrôlée par le nombre de "stickers" efficaces par chaîne et par leur durée de vie.

Il nous a semblé intéressant de comparer le comportement des hydrogels à base de hyaluronane, obtenus dans le cadre de ce travail, avec celui des assemblages obtenus préalablement à partir du chitosane (chit) [42]. Cette comparaison permet, entre autre, de mettre en évidence le rôle de la chaîne polysaccharidique. Les deux systèmes se comportent de façon analogue par rapport à une modification de la concentration (dans la gamme de concentration choisie). En effet, il s'avère que le temps de relaxation des deux systèmes ne varie pratiquement pas avec la concentration. L'effet de la température est globalement le

même à savoir une translation horizontale pour obtenir les courbes maîtresses, liée à l'activation de la dynamique. Toutefois, on note une différence au niveau des valeurs des énergies de relaxation E_a . A la même concentration en polymère, l'énergie E_a du mélange chit- β -CD (10%) /chit-AD (5%) ($E_a= 37$ kT) est plus élevée que celles déterminées pour les assemblages à base de hyaluronane (25 kT et 30 kT). Ceci peut s'expliquer par le fait que pour les systèmes à base de chitosane, la distance entre les complexes interchaînes β -CD/AD, en corrélation avec la structure de l'unité de répétition, est deux fois plus courte. Le nombre de groupements collants est donc plus élevé dans le cas du chitosane ce qui renforce le caractère multivalent de la complexation. De plus, le chitosane est plus rigide que le HA ce qui laisse supposer que l'effet de la température sur la mobilité des chaînes peut être différent. Quant à l'influence de la force ionique, nous avons montré que l'apparition de la séparation de phase est déplacée à une concentration en sel plus élevée ($C_{sel} = 0,2$ M pour le chitosane contre 0,1 M pour le HA), ce qui est lié à la densité de charges plus importante pour le chitosane.

Tout au long du travail, nous avons cherché à établir le lien étroit existant entre ce qui se passe à l'échelle moléculaire local, décrit par les expériences de microcalorimétrie de titration, et les propriétés macroscopiques, mises en évidence par la rhéologie. Ces deux points de vue complémentaires nous ont permis de mieux comprendre le comportement de ces nouveaux assemblages supramoléculaires à base de hyaluronane modifié chimiquement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Rekharsky, M.V.; Inoue, Y. (1998) **Complexation thermodynamics of cyclodextrins**, *Chem. Rev.*, 98, 1875-1917.
- [2] Szejtli, J. (1998) **Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry**, *Chem. Rev.*, 98, 1743-1753.
- [3] Akkaya, E.U.; Czarnik, A.W. (1988) **Synthesis and reactivity of cobalt (III) complexes bearing primary- and secondary-side cyclodextrin binding sites. A Tale of Two CD's.**, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 8553-8554.
- [4] Houk, K.N.; Leach, A.G.; Kim, S.P.; Zhang, X. (2003) **Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 4872-4897.
- [5] Jelesarov, I.; Bosshard, H.R. (1999) **Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of bimolecular recognition**, *J. Mol. Recogni.*, 12, 3-18.
- [6] Kano, K.; Yoshiyasu, K.; Yasuoka, H.; Hata, S.; Haschimoto, S. (1992) **Chiral recognition by cyclic oligosaccharides. Enantioselective complexation of bilirubin with β -cyclodextrin through hydrogen bonding in water**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans, 2*, 1265-1269.
- [7] Jobe, D.J.; Verall, R.E.; Palepu, R.; Reinsborough, V.C. (1988) *J. Phys. Chem.*, 92, 3582-3586.
- [8] Matsui, Y.; Mochida, K. (1979) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 52, 2808-2814.
- [9] Amato, M.E.; Djedaini-Pilard, F.; Perly, B.; Scarlata, G.J. (1992) **High-field NMR techniques and molecular modelling in the study of the inclusion complex of the cognition activator suronacrine (HP-128) with cyclodextrins**, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, 2065-2069.
- [10] Kotake, Y.; Janzen, E.G. (1989) **Effect of pH and salt concentration on bimodal inclusion of a nitroxide by cyclodextrins**, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 7319-7323.
- [11] Ravoo, B.J.; Jacquier, J-C. (2002) **Host-guest interactions between β -cyclodextrin and hydrophobically modified poly(isobutene-*alt*-maleic acid) studied by affinity capillary electrophoresis**, *Macromolecules*, 35, 6412-6416.
- [12] Breslow, R.; Zhang, B. (1996) **Cholesterol recognition and binding by cyclodextrin dimers**, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 8495-8496.
- [13] Eftink, M.R.; Andy, M.L.; Bystrom, K.; Perlmutter, H.D.; Kristol, D.S. (1989) **Cyclodextrin inclusion complexes : studies of the variation in the size of alicyclic guests**, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 6765-6772.

- [14] Liu, Y.; Yang E-C.; Yang, Y-W., Zhang, H-Y.; Fan, Z.; Ding, F.; Cao, R. (2004) **Thermodynamics of the molecular and chiral recognition of cycloalkanols and camphor by modified β -cyclodextrins possessing simple aromatic tethers**, *J. Org. Chem.*, 69, 173-180.
- [15] Bortolus, P.; Marconi G.; Monti, S.; Mayer, B. (2002) **Chiral discrimination of camphorquinone enantiomers by cyclodextrins: a spectroscopic and photophysical study**, *J. Phys. Chem. A*, 106, 1686-1694.
- [16] Inoue, Y.; Hakushi, T.; Liu, Y.; Tong, L-H.; Shen, B-J., Jin, D-S. (1993) **Thermodynamics of molecular recognition by cyclodextrins. 1. Calorimetric titration of inclusion complexation of naphthalene sulfonates with α -, β -, and, γ -cyclodextrins: enthalpy-entropy compensation**, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 475-481.
- [17] Lindner, K.; Saenger, W. (1978) **β -Cyclodextrin dodecahydrate: crowding of water molecules within a hydrophobic cavity**, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 17, 694-695.
- [18] Saenger, W. (1980) **Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry**, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19, 344-362.
- [19] Connors, K.A. (1997) **The stability of cyclodextrin complexes in solution**, *Chem. Rev.*, 97, 1325-1357.
- [20] Lecourt, T.; Sinaÿ, P.; Chassenieux, C.; Rinaudo, M.; Auzély-Velty, R. (2004) **Complexation between a hydrophobically modified chitosan and cyclodextrin homodimers singly or doubly connected through their primary sides : Effects of their molecular architecture on the polymer properties in solutions**, *Macromolecules*, 37, 4635-4642.
- [21] Lokzijl, W., Engberts, J.B.F.N. (1993) **Hydrophobic effects : opinion and facts**, *Angew. Chem.*, 105, 1610-1648.
- [22] Dill, K.A. *J. Biol. Chem.*, 272, 701-704.
- [23] Frank, H. S.; Evans, M. W. (1945) **Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixtures; partial molar entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes**, *J. Chem. Phys.*, 13, 507-532.
- [24] Roseman M.; Jencks W.P. (1975) **Interactions of urea and other polar compounds in water**, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 1875-1917.
- [25] VanderJagt, D.L.; Killian, F.L.; Bender, M.L. (1970) **Cycloamyloses as enzyme models. Effects of inclusion complex formation on intramolecular participation**, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 1016-1022.
- [26] Venema, F.; Nelissen, H.F.M.; Berthault, P.; Birlirakis, N.; Rowan, A.E.; Feiters, M.C.; Nolte, R.J.M. (1998) **Synthesis, conformation, and binding properties of**

- cyclodextrin homo and heterodimers connected through their secondary sides, *Chem. Eur. J.*, 4, 2237-2250.**
- [27] Auzély-Velty, R.; Rinaudo, M. (2001) **Chitosan derivatives bearing pendant cyclodextrin cavities: synthesis and inclusion performance, *Macromolecules*, 34, 3574-3580.**
- [28] Inoue, Y.; Liu, Y.; Tong, L-H.; Shen, B-J., Jin, D-S. (1993) **Calorimetric titration of inclusion complexation with modified β -cyclodextrins. Enthalpy-Entropy compensation in host-guest complexation : from ionophore to cyclodextrin and cyclophane, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 10637-10644.**
- [29] Kano, K. (1997) **Review commentary Mechanisms for chiral recognition by cyclodextrins, *J. Phys. Org. Chem.*, 10, 286-291.**
- [30] Rekharsky, M.V.; Inoue, Y. (2002) **Complexation and chiral recognition thermodynamics of 6-amino-6-deoxy- β -cyclodextrin with anionic, cationic, and neutral chiral guests: counterbalance between van der Waals and coulombic interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 813-826.**
- [31] Bijma, K.; Blandamer, M.J.; Engberts, J.B.F.N. (1998) **Effect of counterions and headgroup hydrophobicity on properties of micelles formed by alkylpyridinium surfactants. 2. Microcalorimetry, *Langmuir*, 14, 79-83.**
- [32] Bijma, K.; Engberts, J.B.F.N. (1994) **Thermodynamics of micelle formation by 1-methyl-4-alkylpyridinium halides, *Langmuir*, 10, 2578-2582.**
- [33] Tarun, K.; Brewer, C.F. (2004) **Multivalent protein-carbohydrate interactions : isothermal titration microcalorimetry studies, *Methods in enzymology*, 379, 107-128.**
- [34] Huskens, J. ; Mulder, A. ; Auletta, T. ; Nijhuis C.A. ; Ludden, M.J.W. ; Reinhoudt, D.N. (2004) **A model for describing the thermodynamics of multivalent host-guest interactions at interfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 6784-6797.**
- [35] Rao, J.; Lahiri, J.; Weis, R.M.; Whitesides, G.M. (2000) **Design, synthesis, and characterization of a high-affinity trivalent system derived from vancomycin and L-Lys-D-Ala-D-Ala, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 2698-2710.**
- [36] Michels, J.J.; Huskens, J.; Reinhoudt, D.N. (2002) **Noncovalent binding of sensitizers for lanthanide (III) luminescence in an EDTA-bis(β -cyclodextrin) ligand, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 2056-2063.**
- [37] Mulder, A.; Auletta, T.; Sartori, A.; Del Ciotto, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D.N. (2004) **Divalent binding of a bis(adamantyl)-functionalized calix[4]arene to β -cyclodextrin-based hosts: an experimental and theoretical study on multivalent binding in solution and at self-assembled monolayers, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 6627-6636.**

- [38] Breslow, R.; Greenspoon, N.; Guo, T.; Zarycki, R. (1989) **Very strong of appropriate substrates by cyclodextrin dimers**, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 8296-8297.
- [39] Breslow, R.; Halfon, S.; Zhang, B. (1995) **Molecular recognition by cyclodextrin dimers**, *Tetrahedron*, 51, 377-388.
- [40] Zhang, B.; Breslow, R. (1997) **Ester hydrolysis by a catalytic cyclodextrin dimer enzyme mimic with a metallobipyridyl linking group**, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 1676-1681.
- [41] Ravoo, B.J.; Jacquier, J-C.; Wenz, G. (2003) **Molecular recognition of polymers by cyclodextrin vesicles**, *Angew. Chem.*, 115, 2112-2216.
- [42] Charlot, A.; Auzély-Velty, R.; Rinaudo, M. (2003) **Specific interactions in model charged polysaccharide systems**, *J. Phys. Chem.*, 107, 8248-8254.
- [43] Macosko, C.W.G. (1994) **Rheology : Principles, Measurements and Applications**, Macosko, C. W., Ed.; VCH Publishers, Inc.
- [44] Dobrynin, A.V.; Colby, R.H.; Rubinstein, M. (1995) **Scaling theory of polyelectrolyte solutions**, *Macromolecules*, 28, 1859-1871.
- [45] DeGennes, P.G. (1979) **Scaling Concepts in Polymer Physics**, Cornell University Press : Thaca, New York.
- [46] Doi, M.; Edwards, S.F. (1986) **The theory of polymer dynamics**, Claderon Press : Oxford, England, 1986.
- [47] Rouse, P.E. (1953) **A theory of the linear viscoelastic properties of dilute solutions of coiling polymers**, *J. Chem. Phys.*, 21, 1272-1280.
- [48] Auzély-Velty, R.; Rinaudo, M. (2001) **New Supramolecular assemblies of a cyclodextrin-grafted chitosan through specific complexation**, *Macromolecules*, 35, 7955-7962.
- [49] Creuzet, C.; Kadi, S.; Rinaudo, M.; Auzély-Velty, R. **New associative systems based on alkylated hyaluronic acid. Synthesis and aqueous solution properties (submitted)**
- [50] Barnes, H.A. (1997) **Thixotropy-a review**, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.*, 70, 1-33.
- [51] Tam, K.C.; Jenkins, R.D.; Winnik, M.A.; Bassett, D.R. (1998) **A structural model of hydrophobically modified urethane-ethoxylate (HEUR) associative polymers in shear flows**, *Macromolecules*, 31, 4149-4159.
- [52] Mammen, M.; Choi, S-K.; Whitesides, G/M. (1998) **Polyvalent interactions in biological systems : implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 2754-2794.

- [53] Ferry, J.D. (1980) **Viscoelastic properties of polymers**, Wiley, J. and Sons : New-York.
- [54] Leibler, L.; Rubinstein, M.; Colby, R.H. (1991) **Dynamics of reversible networks**, *Macromolecules*, 24, 4701-4707.
- [55] Regalado, E.J.; Selb, J.; Candau, F. (1999) **Viscoelastic behavior of semidilute solutions of multistickers polymer chains**, *Macromolecules*, 32, 8580-8588.
- [56] Tanaka, F.; Edwards, S.F. (1992) **Viscoelastic properties of physically cross-linked networks. Transient network theory**, *Macromolecules*, 25, 1516-1523.
- [57] Rubinstein, M.; Semenov, A. (1998) **Thermoreversible gelation in solution of associating polymers.2 Linear dynamics**, *Macromolecules*, 31, 1386-1397.
- [58] Rubinstein, M.; Semenov, A. (2001) **Dynamics of entangled solutions of associating polymers**, *Macromolecules*, 34, 1058-1068.
- [59] Salem, K.A.; Rose, F.R.A.J.; Oreffo, R.O.C.; Yang, X.; Davies M.C.; Mitchell, J.R.; Roberts, C.J.; Stolnik-Trenkic S.; Tendler, S.J.B.; Williams, P.M. (2003) **Porous polymer and cell composites that self-assemble in situ**, *Adv. Mater.*, 15, 210-213.
- [60] Miyata, T.; Asami, N.; Uragami, T. (1999) **A reversibly antigen-responsive hydrogel**, *Nature*, 399, 766-769.
- [61] Obaidat, A.A.; Park, K. (1996) **Characterization of glucose dependant gel-sol phase transition of the polymeric glucose-concanavalin A hydrogels system**, *Pharmac. Res.*, 13, 989-995.
- [62] Pezron, A.R.; Leibler, L.; Lafuma, F. (1989) **Complex Formation in polymer-ion solutions. 2. Polyelectrolyte effects**, *Macromolecules*, 22, 2656-2662.
- [63] Rinaudo, M.; Auzély-Velty, R.; Vallin, C.; Mullagaliev, I. (2005) **Specific interactions in modified chitosan systems** (*submitted*)
- [64] Gibbs, D.A.; Merrill, E.W.; Smith, K.A. (1968) **Rheology of hyaluronic acid**, *Biopolymers*, 6, 777-791.
- [65] Pezron, A.R.; Leibler, L. (1990) **Rheology of Galactomannan-Borax gels**, *J. Pol. Sci., Part B :Pol. Phys.*, 28, 2445-2461.
- [66] Schultz, R.K.; Myers, R.R. (1969) **The chemorheology of poly(vinyl alcohol)-borate gels**, *Macromolecules*, 2, 281-285.
- [67] Kesavan, S.; Prud'homme, R.K. (1992) **Rheology of guar and HPG cross-linked by borate**, *Macromolecules*, 25, 2026-2032.
- [68] Caputo, M-R.; Selb, J.; Candau, F. (2004) **Effect of temperature on the viscoelastic behavior of entangled solutions of multistickers associating polyacrylamides**, *Polymer*, 45, 231-240.

- [69] Roure, I. (1997) Thesis, **Rhéologie et dimensions des chaînes de hyaluronane en solution**, Université Joseph Fourier, Grenoble, France
- [70] Crespo-Biel, O.; Péter M.; Bruinink, C.M.; Ravoo, B.J.; Reinhoudt, D.N.; Huskens, J. (2005) **Multivalent host-guest interactions between β -cyclodextrin self-assembled monolayers and poly(isobutene-*alt*-maleic acid)s modified with hydrophobic guest moieties**, *Chem. Eur. J.*, 11, 2426-2432.
- [71] Tsitsilianis, C.; Iliopoulos, I.; Ducouret, G. (2000) **An associative polyelectrolyte end-capped with short polystyrene chains. Synthesis and rheological behavior**, *Macromolecules*, 33, 2936-2943.
- [72] Delben, F.; Lapasin, R.; Pricl, S. (1990) **Flow properties of N-(carboxymethyl) chitosan aqueous systems in the sol and gel domains**, *Int. J. Biol. Macromol.*, 12, 9-13.

CHAPITRE IV.

PARTIE EXPERIMENTALE

I PRODUITS CHIMIQUES ET SOLVANTS	206
II MATERIELS ET METHODES GENERALES	206
II.1 Purification	206
II.1.1 Cas des polymères modifiés	206
II.1.1.1 <i>Diafiltration</i>	206
II.1.1.2 <i>Précipitation</i>	206
II.1.2 Cas des petites molécules	206
II.1.2.1 <i>Chromatographie en phase normale</i>	206
II.1.2.2 <i>Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)</i>	207
II.2 Spectrométrie de masse	207
II.3 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire	208
II.3.1 Généralités	208
II.3.2 Séquences utilisées	208
II.3.3 Caractérisation des polysaccharides modifiés	209
II.3.4 Nomenclature	209
II.4 Détermination du taux d'hydratation	210
II.5 Chromatographie d'exclusion stérique	210
II.6 Rhéologie.....	211
II.6.1 Préparation des échantillons	211
II.6.2 Rappels sur la viscosité	212
II.6.3 Rappels sur la viscoélasticité.....	213
II.6.4 Rhéomètres	213
II.6.4.1 <i>Viscosimètre capillaire</i>	213
II.6.4.2 <i>Low Shear 30</i>	214
II.6.4.3 <i>AR 1000</i>	216
II.6.4.4 <i>ARES-RFS</i>	219
II.7 Microtitration calorimétrique isotherme	219
II.7.1 Principe de la titration microcalorimétrique isotherme	219
II.7.2 Appareillage	222
III SYNTHESSES	223

I Produits chimiques et solvants

La majorité des réactifs et des solvants proviennent de la société SIGMA-ALDRICH SARL et FLUKA (division de SIGMA-ALDRICH SARL), et ont été utilisés sans purification préalable. La β -cyclodextrine initiale provient de la société Roquette frères SA (Lestrem, France).

Tous les solvants anhydres proviennent de SIGMA-ALDRICH et FLUKA et ont été utilisés tels quels. Ils sont conservés sur tamis moléculaire.

Les solvants deutériés D_2O et $CDCl_3$ sont fournis par la société SDS (France).

Le hyaluronane utilisé a une masse molaire moyenne en masse de 300 000 g/mol et provient de la société ARD (Pomacle, France). Il est obtenu par fermentation bactérienne (bactérie *Spectrococcus zooepidemicus*).

II Matériels et méthodes générales

II.1 Purification

II.1.1 Cas des polymères modifiés

II.1.1.1 Diafiltration

La diafiltration des solutions de polysaccharides modifiés est effectuée avec des membranes Amicon PM30 (seuil de coupure 30 000 g/mol) en poly(éthersulfone), YC05 (seuil de coupure 500 g/mol) en acétate de cellulose et YM 10 (seuil de coupure 10 000 g/mol) en cellulose régénérée. Les diafiltrations sont arrêtées lorsque la conductivité du filtrat est stable et atteint une valeur inférieure à 10 μS .

II.1.1.2 Précipitation

La purification des polysaccharides modifiés est effectuée principalement par précipitation à l'éthanol dans les proportions EtOH/H₂O ((60/40) (v/v)) suivie de lavages dans différentes proportions ((EtOH/H₂O) (70/30), (75/25), (80/20) et (90/10)).

II.1.2 Cas des petites molécules

II.1.2.1 Chromatographie en phase normale

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est réalisée sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice (MERCK 60 F₂₅₄) en utilisant des systèmes d'éluants appropriés. Les composés sont révélés sous lumière UV (longueur d'onde = 254 nm) (pour les composés chromophores), puis par trempage dans des révélateurs spécifiques suivi d'une étape de chauffage à 300°C. Les révélateurs utilisés sont :

- un mélange phosphomolybdique (50 g d'acide phosphomolybdique solubilisé dans 1 L d'éthanol) pour la majorité des intermédiaires,
- une solution aqueuse d'acide sulfurique à 10 % (en volume) pour les dérivés de cyclodextrine,
- une solution à 0,2 % (en masse) de ninhydrine dans l'éthanol pour les composés possédant une fonction amine primaire.

Les séparations par chromatographie rapide sont réalisées sous pression d'air comprimé sur colonne de gel de silice (Merck Geduran SI 60 ; 40-63) avec l'éluant indiqué.

II.1.2.2 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La séparation des β -cyclodextrines mono-, di- et trifonctionnalisées et la purification des dimères de β -CD sont effectuées par chromatographie d'exclusion stérique à température ambiante. Les échantillons solubilisés dans l'eau sont injectés sur des colonnes de Biogel P-4 (Bio-Rad, USA) (4 × 100 cm, taille d'exclusion = 400 g/mol) et P-6 (4 × 100 cm, taille d'exclusion = 600 g/mol) en éluant avec de l'eau ultrapure ou avec une solution aqueuse de nitrate de sodium (0,05 M). La vitesse d'élution est de 80 mL/h. La détection se fait via un réfractomètre différentiel et les fractions sont récupérées avec un collecteur. L'élimination du sel est effectuée par diafiltration avec des membranes Amicon YC05 (seuil de coupure 500 g/mol). Les produits sont ensuite lyophilisés.

II.2 Spectrométrie de masse

Les mesures par spectrométrie de masse basse et haute résolution ont été réalisées avec un spectromètre Micromass ZabSpec-TOF (technique électrospray) par le service de spectrométrie de masse du Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO-Rennes).

II.3 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire

II.3.1 Généralités

Les spectres RMN du proton et du carbone ont été réalisés principalement sur un appareil Bruker Avance 400 opérant aux fréquences de 400 MHz (^1H) et 125 MHz (^{13}C), équipé d'une sonde QNP.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane utilisé comme référence interne et en utilisant les solvants indiqués. Les constantes de couplage (J) sont mesurées en Hertz (Hz).

Les produits hydrosolubles sont solubilisés dans l'eau lourde : D_2O . La référence utilisée est alors le pic résiduel de l'eau pour les spectres proton (étalonné à 4,7 ppm pour une température de 298 K et à 4,09 ppm pour une température de 353 K).

Les composés solubles en milieu organique sont solubilisés dans le CDCl_3 , la référence utilisée est alors le signal du CH_3Cl pour les spectres RMN ^1H (étalonné à $\delta = 7,23$ ppm) ou le pic central du signal du CH_3Cl pour les spectres RMN ^{13}C (étalonné à $\delta = 77$ ppm).

Les expériences bidimensionnelles homo ou hétéronucléaires sont calibrées par analogie avec les spectres à une dimension correspondants.

II.3.2 Séquences utilisées

Le spectre RMN ^1H standard donne des informations sur les protons de la molécule étudiée, telles que les déplacements chimiques (δ), les intensités des signaux et les constantes de couplage (J). Le spectre de RMN ^{13}C standard renseigne sur les déplacements chimiques (δ) des carbones de la molécule étudiée. Les spectres monodimensionnels sont acquis sur 16 K points et transformés sur 32 K points (zero-filling). Pour la majorité des spectres ^1H , un traitement à l'aide d'une fonction exponentielle ($\text{LB} = 0,3$) et une correction de la ligne de base sont effectués.

L'expérience DEPT-135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfert) permet de différencier les carbones liés à un nombre pair de protons des carbones liés à un nombre impair de protons.

L'expérience de corrélation de déplacement chimique bidimensionnelle homonucléaire de type COSY (CORrelated SpectroscopY) met en évidence les noyaux de même nature possédant entre eux un couplage scalaire vicinal ou géminal.

L'expérience de corrélation de déplacement chimique bidimensionnelle hétéronucléaire inverse de type HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) permet de mettre en évidence deux noyaux de nature différente possédant entre eux un couplage fort. Les corrélations $^{13}\text{C}/^1\text{H}$, via les couplages $^1\text{J}_{\text{C,H}}$, permettent d'associer chaque carbone aux protons qui lui sont liés.

L'expérience de corrélation de déplacement chimique bidimensionnelle TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) met en évidence les noyaux de même nature possédant entre eux un couplage scalaire plus ou moins grand selon le temps de mélange imposé pendant le spin-lock.

L'expérience bidimensionnelle ROESY (Rotational nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) met en évidence les noyaux de même nature proches spatialement sans être couplés scalairement. Les spectres bidimensionnels sont acquis sur 2K points en F2 avec 256 incréments de temps en F1. Les expériences phasées sont acquises en mode TPPI (Time Proportional Phase Increment) et transformées en matrice 1K×1K points.

II.3.3 Caractérisation des polysaccharides modifiés

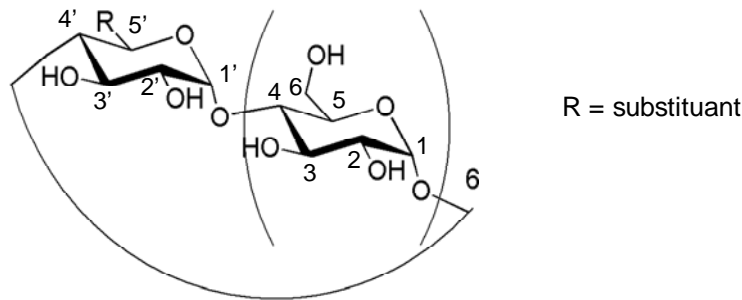
Les polymères modifiés sont caractérisés par RMN ^1H sur un appareil Bruker Avance 400 à 353 K avec suffisamment de scans (32 minimum) pour obtenir un rapport signal sur bruit correct. En augmentant la température, l'agitation thermique est favorisée ainsi que les mouvements Browniens ce qui augmente le temps de relaxation transversal T_2 . Or, la largeur à mi-hauteur des signaux RMN ^1H est directement liée au temps de relaxation transversale T_2 (en $1/T_2$). Un accroissement de la température affine donc les pics et nous avons vérifié avec un étalon interne (l'acétate de sodium) qu'à 353 K, les signaux des protons du HA n'étaient pas sous estimés. Les DS sont calculés par intégration de certains signaux caractéristiques des protons des greffons en prenant comme référence interne les protons anomères du polysaccharide.

II.3.4 Nomenclature

La notation utilisée pour la description des spectres est la suivante : s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), m (massif ou multiplet), t (triplet).

Afin que l'attribution des signaux des protons caractéristiques des molécules intermédiaires soit claire, une lettre est associée à chaque proton.

Concernant l'attribution des signaux caractéristiques des protons des unités "sucre" modifiées et non-modifiées des cyclodextrines et des deux unités "sucre", modifiées et non-modifiées, constituant l'unité de répétition du HA, les protons sont numérotés de la façon suivante : (H-1' à H-5') pour les unités "sucre" modifiées et (H-1 à H-6) pour les unités "sucre" non-modifiées.



II.4 Détermination du taux d'hydratation

De par la nature de leur squelette, les polysaccharides sont hygroscopiques. Il est donc nécessaire de connaître la teneur en eau totale contenue dans les différents polymères étudiés pour pouvoir déterminer avec précision les concentrations en solution. La détermination est effectuée par thermogravimétrie (thermobalance SETARAM 92-12). L'échantillon est chauffé de 20 à 130°C à une vitesse de 5°C / min puis stabilisé pendant 1 h à 130°C. Le taux d'hydratation τ_h est donné par la relation :

$$\tau_h = \Delta m / m_s \quad \text{éq. IV - 1}$$

où $\Delta m = m_h - m_s$, m_h étant la masse du polysaccharide hydraté et m_s , la masse du polysaccharide sec.

II.5 Chromatographie d'exclusion stérique

Cette technique donne accès à des grandeurs physiques telles que les masses molaires moyennes, le rayon de giration ou encore la viscosité intrinsèque des échantillons. La technique consiste à fractionner l'échantillon, selon le volume hydrodynamique des polymères, puis à analyser les fractions à l'aide de différents détecteurs.

Les polysaccharides à analyser sont solubilisés dans l'éluant à une concentration de 0,5 à 1 g/L puis filtrés sur des membranes SARTORIUS de porosité 0,2 μm . Les solutions sont injectées à travers des colonnes (2 colonnes en série Shodex OH pak 804 et 805) sur un appareil WATERS GPCV Alliance 2000. Le solvant utilisé est le nitrate de sodium 0,1 M. En sortie de colonne, la solution est analysée par 3 détecteurs montés en série :

- un réfractomètre différentiel qui permet de déterminer la concentration de chaque fraction,
- un viscosimètre capillaire qui permet d'accéder à la viscosité relative de chaque fraction. La détermination de la concentration en polymère par réfractométrie, permet de calculer la viscosité réduite η_{red} pour chaque fraction qui peut être assimilée à la viscosité intrinsèque $[\eta]_i$ du fait de la faible concentration en polymère.
- Un appareil de diffusion de la lumière DAWN DSP-F de la société Wyatt Technology Corporation (Santa Barbara, USA) permet d'accéder à la masse molaire et au rayon de giration R_G à partir de la méthode de Zimm, qui représente l'évolution de $KC/R(\theta)$ en fonction de $\sin^2(\theta/2)$. Le programme ASTRA assure le traitement des données pour obtenir les masses molaires moyennes en nombre et en masse. Il permet également d'accéder à la viscosité intrinsèque $[\eta]$ puisque R_G est fonction de M et $[\eta]_i$ est fonction de M_i .

II.6 Rhéologie

II.6.1 Préparation des échantillons

Les polysaccharides natifs et modifiés sont tout d'abord laissés pendant 1 heure en solution aqueuse pour permettre leur gonflement et sont ensuite agités (à faible vitesse) à température ambiante pendant environ 12 heures.

Après solubilisation totale des polysaccharides modifiés, les mélanges conduisant aux gels sont obtenus en ajoutant la solution de polysaccharide la moins visqueuse à la plus visqueuse. Le mélange est agité vivement au Vortex pendant quelques minutes. Un léger chauffage permet d'homogénéiser les mélanges. Avant d'effectuer toute mesure, les gels sont laissés au repos pendant deux heures.

II.6.2 Rappels sur la viscosité

La détermination expérimentale de la viscosité constitue actuellement l'une des méthodes les plus répandues en chimie macromoléculaire pour caractériser les polymères en solution. La viscosité d'un fluide se manifeste par sa résistance à la déformation ou à l'écoulement. Elle est due aux forces attractives qui s'exercent entre des éléments voisins et s'opposent aux mouvements relatifs les uns par rapport aux autres. La viscosité de la solution permet de caractériser le polymère en solution. La viscosité des solutions dépend de la masse molaire du polymère, de sa concentration, de sa structure et de ses interactions avec le solvant. Newton fut le premier à formuler une description mathématique de la viscosité, qu'il définit comme étant le rapport entre la contrainte de cisaillement τ et la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$:

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad \text{éq. IV - 2}$$

Différents types de viscosité caractéristiques sont habituellement utilisées, η_{rel} la viscosité relative, η_{sp} la viscosité spécifique, η_{red} la viscosité réduite (exprimée en mL/g) et $[\eta]$ la viscosité intrinsèque (exprimée en mL/g) définies par :

$$\eta_{rel} = \eta / \eta_0 \quad \text{éq. IV - 3}$$

$$\eta_{sp} = (\eta - \eta_0) / \eta_0 \quad \text{éq. IV - 4}$$

$$\eta_{red} = (\eta - \eta_0) / \eta_0 C \quad \text{éq. IV - 5}$$

$$[\eta] = \lim_{\substack{C \rightarrow 0 \\ \dot{\gamma} \rightarrow 0}} (\eta - \eta_0) / \eta_0 C \quad \text{éq. IV - 6}$$

où η et η_0 sont respectivement les viscosités de la solution de polymère à la concentration C en g/mL et celle du solvant pur.

L'étude de la viscosité en fonction de la concentration permet de distinguer plusieurs régimes (figure IV-1):

- le régime dilué dans lequel les chaînes sont isolées et indépendantes les unes des autres (figure IV-1 (a)),
- lorsque la concentration C atteint une concentration critique appelée C^* (figure IV-1 (b)), les chaînes commencent à s'interpénétrer (figure IV-1 (c)). C'est le début du

régime semi-dilué : les chaînes s'enchevêtrent progressivement et forment un réseau physique.

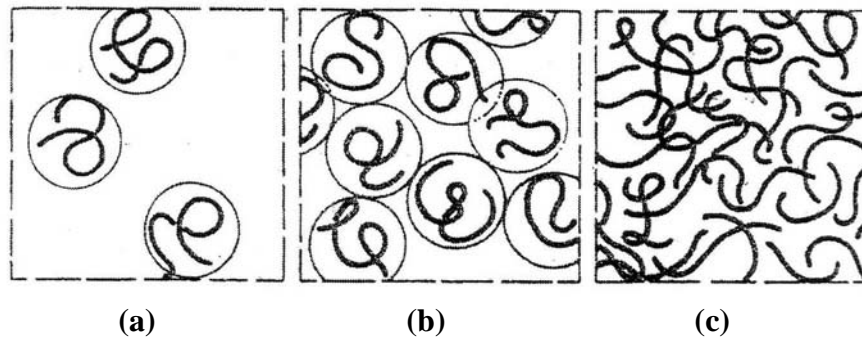


Figure IV- 1 : Influence de la concentration des polymères en solution

II.6.3 Rappels sur la viscoélasticité

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.

II.6.4 Rhéomètres

II.6.4.1 Viscosimètre capillaire

Nous avons utilisé le viscosimètre capillaire SCHOTT AVS 360 de type Ubbelohde à niveau suspendu. Le mouvement de cisaillement est engendré en imposant une différence de pression entre les 2 extrémités d'un tube cylindrique de faible section, dans lequel s'écoule la solution. Cet appareil placé dans un thermostat maintenu à température constante mesure le temps d'écoulement d'un volume défini par deux traits de repère. La seule force de pesanteur est responsable de l'écoulement.

La loi de Poiseuille permet de relier la viscosité et le temps d'écoulement :

$$\eta = \frac{\pi a^4}{8lV} Pt \quad \text{éq. IV - 7}$$

où a est le rayon du capillaire, l sa longueur, V la quantité de liquide qui traverse le tube pendant t (s) et P la pression sous laquelle se fait l'écoulement. P est proportionnelle à la masse volumique, ρ , d'où η peut s'écrire :

$$\eta = A\rho t \quad \text{éq. IV - 8}$$

où A est une constante du tube.

De ce fait,

$$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C} \approx \frac{t - t_0}{t_0 C} \quad \text{éq. IV - 9}$$

car en solution diluée $\rho \sim \rho_0$

Ce type de viscosimètre est utilisé pour des solutions très diluées. L'utilisation de cet appareil permet d'étudier les polymères en régime dilué, et notamment, d'obtenir la viscosité intrinsèque $[\eta]$ et k' la constante de Huggins à l'aide de la relation de Huggins (éq. IV-10).

La viscosité intrinsèque est une grandeur utile pour caractériser les dimensions des chaînes et est assimilable à un volume spécifique hydrodynamique du polymère. A dilution infinie, on peut supposer que les interactions entre les molécules de soluté disparaissent et que la caractéristique $[\eta]$ correspond à l'état où la particule serait isolée des autres au sein du milieu continu. Plusieurs théories décrivent la variation de la viscosité avec la concentration.

La plus utilisée, en régime dilué, est celle de Huggins :

$$\eta_{red} = [\eta] + k'[\eta]^2 C \quad \text{éq. IV - 10}$$

où k' est la constante de Huggins qui tient compte des différentes interactions existant dans le milieu.

II.6.4.2 Low Shear 30

C'est un rhéomètre de type Couette, rotatif, à cylindres coaxiaux (figure IV-2).

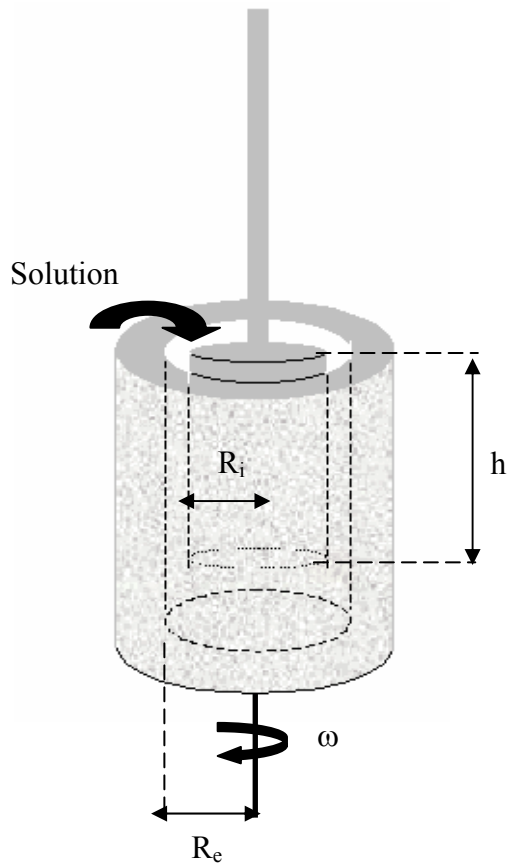


Figure IV- 2 : Schéma du rhéomètre LS 30

La solution étudiée est placée entre les deux cylindres de rayons R_i et R_e . Le cylindre extérieur, entraîné par un moteur à une vitesse de rotation ω , uniforme et parfaitement définie, exerce un couple T sur le cylindre intérieur (hauteur h), par l'intermédiaire de la substance mesurée. La mesure du couple appliqué au cylindre interne permet de déterminer la viscosité du liquide, pour chaque vitesse de rotation ω , donnée par la relation:

$$\eta = \frac{T}{\omega} \left(\frac{R_e^2 - R_i^2}{4\pi R_e^2 R_i^2 h} \right) \quad \text{éq. IV - 11}$$

Le gradient de cisaillement exercé sur l'échantillon, contenue dans l'entrefer, est défini par la vitesse de rotation du cylindre extérieur et peut être considéré comme constant en tout point de la solution, si l'entrefer est étroit ($R_e - R_i < 1 \text{ mm}$). Il s'exprime alors:

$$\dot{\gamma} = \omega \frac{R_e^2 + R_i^2}{R_e^2 - R_i^2} \quad \text{éq. IV - 12}$$

Ce type de rhéomètre est principalement utilisé pour les solutions de faible viscosité. La gamme de gradients de cisaillement varie de 10^{-2} à 128 s^{-1} .

II.6.4.3 AR 1000

L'AR 1000 utilisé (TA instruments) est un rhéomètre qui fonctionne à contrainte imposée. Nous avons utilisé des géométries cône-plan en acier ou en aluminium (cônes 4 cm, 4 degrés et 6 cm, 1 degré) pour effectuer les mesures sur des solutions de haute viscosité et les gels.

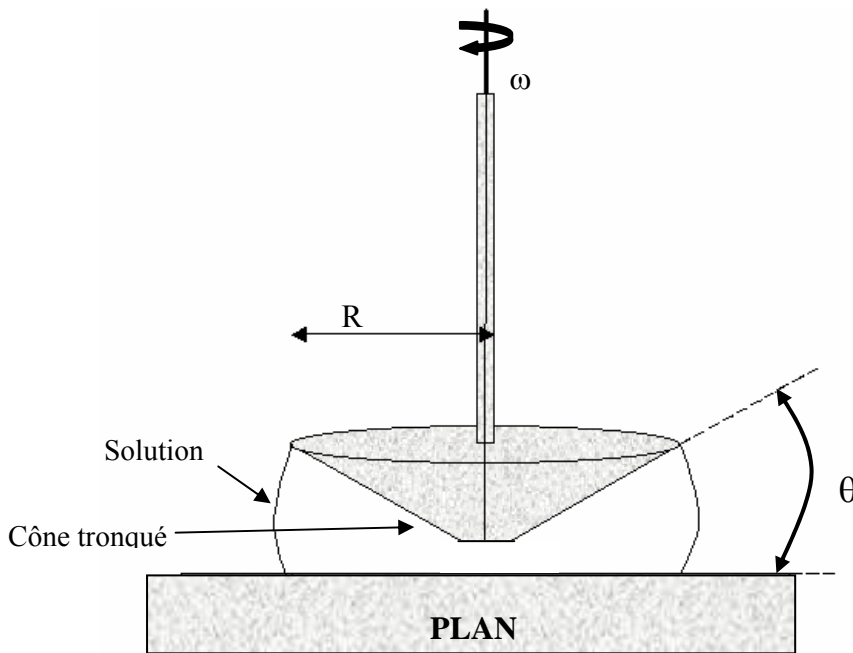


Figure IV- 3 : Schéma du rhéomètre AR 1000

L'échantillon à étudier est placé entre un cône de rayon R et d'angle θ et une surface plane perpendiculaire à l'axe du cône. Le plan reste immobile, c'est le cône qui tourne. La température est maintenue par régulation thermique (effet Peltier). L'échantillon est protégé par un film d'huile de silicone, afin d'éviter les problèmes d'évaporation lors des mesures en température. Ce type de rhéomètre peut être utilisé à la fois en mode écoulement et en mode dynamique.

- Écoulement

Ce mode permet de mesurer des viscosités plus élevées que celles obtenues avec le Low Shear 30. Le cône est soumis à un couple de rotation T . Comme l'angle θ est petit, on considère que la contrainte et le gradient de cisaillement sont constants dans l'espace où se trouve l'échantillon. La vitesse angulaire ω correspondante est mesurée et permet d'accéder directement à la viscosité. Les relations donnant celle entre la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$, la contrainte et la viscosité sont :

$$\dot{\gamma} = \omega / \tan \theta \quad \text{éq. IV - 13}$$

$$\tau = 3T / 2\pi R^3 \quad \text{éq. IV - 14}$$

$$\eta = 3T \tan \theta / 2\pi R^3 \omega \quad \text{éq. IV - 15}$$

- Dynamique

Les propriétés viscoélastiques d'un matériau peuvent être déterminées par des sollicitations dynamiques. L'échantillon est soumis à une contrainte (ou déformation) qui varie de façon sinusoïdale en fonction de la fréquence imposée. La déformation (ou contrainte) résultante est une sinusoïde de même fréquence et présente un déphasage par rapport à la contrainte. Les équations correspondantes sont les suivantes :

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cos(\omega t) \quad \text{éq. IV - 16}$$

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t + \delta) \quad \text{éq. IV - 17}$$

où σ_0 et γ_0 sont les amplitudes maximales de la contrainte et de la déformation, ω la pulsation (rad.s^{-1}) et δ est le déphasage de la déformation par rapport à la contrainte

Le matériau peut être complètement caractérisé par le module de rigidité complexe $G^*(\omega)$ qui est défini comme le rapport de la contrainte $\sigma^*(t)$ sur la déformation $\gamma^*(t)$

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma^*(t)}{\gamma^*(t)} \quad \text{éq. IV - 18}$$

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad \text{éq. IV - 19}$$

où σ^* et γ^* sont respectivement la déformation et la contrainte complexe et $G^*(\omega)$ est le module de rigidité complexe.

Les 2 modules déterminants sont $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$. La grandeur $G'(\omega)$ représente la réponse du matériau en phase avec la contrainte (ou déformation) appliquée, c'est le module de stockage. Le terme $G''(\omega)$ est la réponse différée du matériau, c'est le module de perte.

Dans le cas d'un solide élastique parfait,

$$G'(\omega) = G, G''(\omega) = 0 \quad \text{éq. IV - 20}$$

Dans le cas d'un liquide visqueux newtonien :

$$G'(\omega) = 0, G''(\omega) = \eta\omega \quad \text{éq. IV - 21}$$

A partir des valeurs de G' et G'' , il est possible d'accéder à la viscosité complexe définie par la relation :

$$\eta^*(\omega) = \eta'(\omega) - i\eta''(\omega) = G'(\omega)/\omega - iG''(\omega)/\omega \quad \text{éq. IV - 22}$$

D'où le module de viscosité complexe :

$$|\eta^*| = (G'^2 + G''^2)^{1/2}/\omega \quad \text{éq. IV - 23}$$

Avant toute mesure rhéologique, les échantillons sont laissés au repos 1 heure sur le plan. Toutes les mesures dynamiques présentées dans cette partie ont été réalisées dans le régime linéaire. Dans ce domaine, les modules de conservation (G') et de perte (G'') ne dépendent pas de la contrainte ou de la déformation imposée. Le régime linéaire permet d'observer la dynamique du système dans sa structure d'origine et non pas dans une structure détruite par une trop grande déformation.

Le régime linéaire a été déterminé en suivant l'évolution de G' et de G'' en fonction de la déformation à une fréquence donnée, généralement égale à 1 Hz. On relève ainsi le pourcentage de déformation pour lequel G' et G'' sont constants. Cela a été réalisé pour chaque échantillon à chaque température. La détermination du régime linéaire dépend de la fréquence imposée ; il est donc nécessaire pour certains échantillons de le chercher à

différentes fréquences. Pour nos échantillons, la déformation permettant de travailler dans le régime linéaire n'excède pas 15 %. Ce pourcentage de déformation est d'autant plus important que l'échantillon se comporte comme une solution.

II.6.4.4 ARES-RFS

L'ARES-RFS (Advanced Rheometric Expansion System) utilisé (TA instruments) fonctionne à déformation imposée contrairement à l'AR1000. Nous avons utilisé des géométries cône-plan ou plan-plan en titane (cônes 5 cm, 0,04 radians et plan 2,5 cm) pour effectuer les mesures sur des solutions de haute et basse viscosité et sur les gels. La géométrie (cône ou plan) reste fixe et la déformation est imposée par le moteur se situant en dessous du plan Peltier. Le moteur et le capteur de déplacement sont séparés. La température est maintenue par régulation thermique. Afin d'éviter les problèmes d'évaporation lors des mesures en température, une huile de silicone protège l'échantillon.

L'ARES, comme l'AR1000, peut travailler en mode écoulement et en dynamique mais également en mode transitoire (par exemple pour des expériences à relaxation de contrainte).

II.7 Microtitration calorimétrique isotherme

II.7.1 Principe de la titration microcalorimétrique isotherme

L'ITC (Isothermal Titration microCalorimetry) est une expérience réalisée à température constante en titrant une solution de "récepteur" contenue dans la cellule de réception par une solution de "ligand". Après chaque addition d'une petite quantité de ligand dans la cellule de réception, le transfert thermique (chaleur absorbée ou dégagée) est mesuré par rapport à la cellule de référence remplie de solvant. Cette variation de chaleur est compensée par une puissance électrique (J/s) qui maintient une différence de température entre les cellules la plus faible et la plus constante possible. Ces deux cellules sont placées dans une enceinte adiabatique. L'addition du ligand est effectuée *via* une seringue de précision pilotée automatiquement par un ordinateur. Le contenu de la cellule de travail est agité par un moteur électrique (figure IV-4).

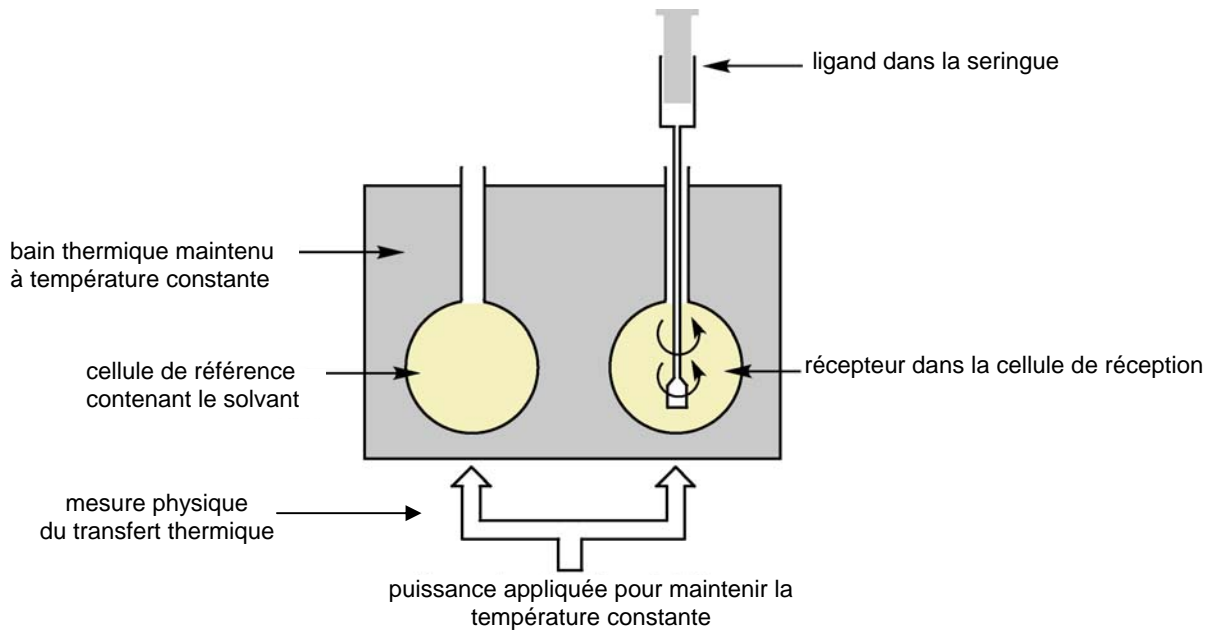


Figure IV- 4 : Schéma du dispositif d'ITC

Dans une expérience ITC, chaque pic de puissance correspond à la chaleur dégagée après addition du ligand sur le récepteur. Les grandeurs thermodynamiques ont été calculées en utilisant un “modèle à un site” dont les équations de base sont présentées ci-après. Ce modèle considère un nombre n (1 en l’occurrence) de sites, caractérisés par la même constante d’association K_a et la même variation d’enthalpie ΔH° . Par une régression non-linéaire aux moindres carrés, il est possible d’accéder aux 3 paramètres ΔH , K_a et n à partir d’une seule expérience d’ITC.

Dans les équations suivantes, K_a est la constante d’association, n le nombre de sites qui complexent, V_0 est le volume de la cellule de réception, M_t et $[M]$ sont les concentrations à l’instant t et initiale du “récepteur” dans la cellule de réception, X_t et $[X]$ sont les concentrations à l’instant t et initiale du “ligand” dans la cellule de réception et Θ est la fraction des sites occupés par le ligand X .

$$K_a = \frac{\Theta}{(1 - \Theta)[X]} \quad \text{éq. IV- 24}$$

$$X_t = [X] + n\Theta M_t \quad \text{éq. IV- 25}$$

La combinaison des équations IV-24 et IV-25 donne :

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_a M_t} \right] + \frac{X_t}{nM_t} = 0 \quad \text{éq. IV- 26}$$

La chaleur totale dégagée Q est donnée par :

$$Q = n\Theta M_t \Delta H V_0 \quad \text{éq. IV- 27}$$

Les équations IV.24 et IV.25 donnent une équation quadratique en Θ dont la solution, injectée dans l'équation IV.26, donne:

$$Q = \frac{nX_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{M_t}{nX_t} + \frac{1}{nK_a X_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{M_t}{nX_t} + \frac{1}{nK_a X_t} \right)^2 - \left(\frac{4M_t}{nX_t} \right)} \right] \quad \text{éq. IV - 28}$$

La valeur de Q , liée aux 3 paramètres ajustables : K_a , n et ΔH° , peut être calculée à la fin de la $i^{\text{ème}}$ injection et est désignée $Q(i)$. L'expression correcte pour la chaleur dégagée à la $i^{\text{ème}}$ injection est donc :

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad \text{éq. IV- 29}$$

Où dV_i est le volume de ligand ajouté à la solution contenue dans la cellule de réception.

L'ajustement des données expérimentales implique :

- i. des estimations initiales (qui peuvent être faites assez précisément aux moyens d'un logiciel d'analyse de données) de n , K_a et de ΔH°
- ii. la détermination de $\Delta Q(i)$ pour chaque injection et la comparaison de ces valeurs avec celles de la chaleur mesurée expérimentalement

- iii. l'amélioration des valeurs initiales de n , K_a et de ΔH° par des méthodes Marquardt
- iv. et l'itération de la procédure décrite ci-dessus afin d'obtenir le meilleur ajustement possible

Pour chaque expérience, la chaleur de dilution correspondante a été déterminée, soit en injectant le ligand à la même concentration que celle utilisée pour les expériences de titration dans la solution de solvant sans récepteur, soit en considérant l'amplitude des derniers signaux. Les enthalpies de dilution déterminées sont soustraites des enthalpies mesurées *via* les expériences de titration ce qui nous permet d'accéder à l'enthalpie nette de réaction.

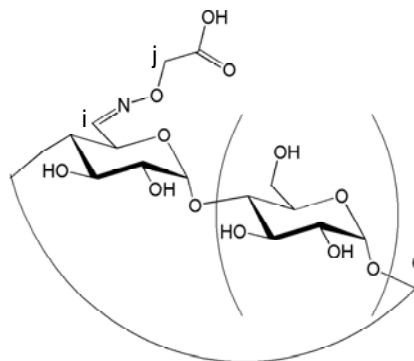
II.7.2 Appareillage

Nous avons utilisé deux calorimètres :

- i. Le calorimètre de type CSC 4200 de Calorimetry Sciences Corp. (Utah, USA) distribué par Setaram (Lyon). 24 additions de 10 μL de ligand introduit dans une seringue de 250 μL pilotée automatiquement sont injectées à la solution de récepteur dans la cellule de réception (1,3 mL). L'intervalle de temps entre 2 injections est fixé à 300 s, la vitesse d'agitation à 250 tours/min et température à 25 °C. La cellule de réception, facile d'accès pour le nettoyage, permet de réaliser des expériences avec des solutions de polymère. Le logiciel Bindworks permet le traitement des données expérimentales.
- ii. Le calorimètre VP-ITC de MicroCal (Nothampton, USA). 30 additions de 10 μL de ligand introduit dans une seringue pilotée automatiquement sont injectées à la solution de récepteur dans la cellule de réception (1,4478 mL). L'intervalle de temps entre deux injections est fixé à 300s, la vitesse d'agitation à 300 tours/min et la température à 25 °C. La cellule de réception non accessible interdit des expériences avec des solutions de polymères visqueuses qui sont difficiles à éliminer totalement. Pour ce type d'appareil, avant chaque expérience, toutes les solutions ("récepteur" et "ligand") sont dégazées et mises à température à l'aide d'un thermoVac. Les données expérimentales sont traitées avec le logiciel Origin (Microcal).

III Synthèses

6¹-[O-(carboxyméthoxy)-imino]-6¹-désoxy-cyclomaltoheptaose (**16**) :



16

A une solution de β -cyclodextrine (4 g, 3,52 mmol), dans le DMSO (105 mL) sous azote, préalablement séchée sous vide à 85°C pendant 12 heures est ajouté lentement une solution de Dess-Martin Périodinane (1,73 g, 3,52 mmol) dans le DMSO (5 mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 45 minutes à température ambiante. Le milieu est concentré à l'évaporateur rotatif (température du bain = 50°C) jusqu'à l'obtention d'une huile (environ 10 mL). L'huile résiduelle est précipitée dans de l'acétone (400 mL). Le produit brut est isolé par filtration sur creuset avec un fritté 4 et resolubilisé dans le DMSO (15 mL) pour éliminer les impuretés par une nouvelle précipitation à l'acétone (3 précipitations au total). La cyclodextrine oxydée (présentant 1 à 3 fonctions aldéhyde), obtenue après filtration est séchée sous pression réduite à 25°C pendant 24 heures et est ensuite solubilisée dans l'eau pour être récupérée après lyophilisation (4,62 g). A une solution aqueuse (300 mL) de β -CD oxydée (4,3 g, 3,79 mmol) à 40°C, la *O*-(carboxyméthyl)hydroxylamine (415 mg, 3,79 mmol) est ajoutée. Le pH est ajusté à 4,8 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,5 M). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 48 heures à 40°C puis est neutralisé à pH 7 par addition d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,5 M). Après évaporation de l'eau, le mélange est purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Biogel P4 pour obtenir la β -cyclodextrine monoacide (**16**) pure dans une solution de nitrate de sodium à 0,05 M. La solution de (**16**) est ultrafiltrée sur une membrane Amicon YC05 et le produit est isolé après lyophilisation (0,835 g, 0,7 mmol).

Formule brute: $C_{44}H_{71}O_{37}N$

Rendement: 18%

Taux d'hydratation : 5 %

CCM: $R_f = 0,47$ (DMF/H₂O/*n*-BuOH : 1/1/2 (v/v/v))

ESI-HRMS (haute résolution avec détection en mode positif):

Calculé pour $C_{44}H_{71}NO_{37}Na$ $[M+Na]^+$, théorique : $m/z = 1228,3603$; trouvée : $m/z = 1228,3597$

Calculé pour $C_{44}H_{71}NO_{37}K$ $[M+K]^+$, théorique : $m/z = 1244,33420$; trouvée : $m/z = 1244,3365$

Calculé pour $C_{44}H_{70}NO_{37}Na_2$ $[M-H+2Na]^+$, théorique : $m/z = 1250,34221$; trouvée : $m/z = 1250,3431$

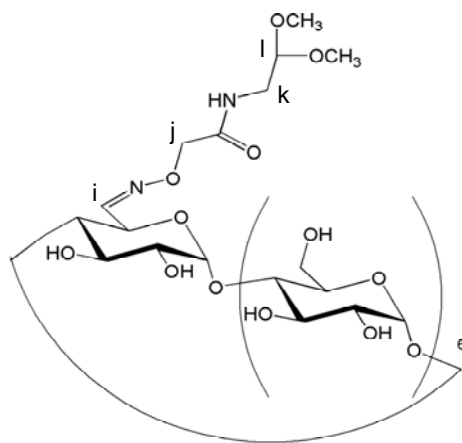
Calculé pour $C_{44}H_{70}NO_{37}NaK$ $[M-H+Na+K]^+$, théorique : $m/z = 1266,31615$; trouvée : $m/z = 1266,3160$

Calculé pour $C_{44}H_{69}NO_{37}Na_3$ $[M-2H+3Na]^+$, théorique : $m/z = 1272,32415$; trouvée : $m/z = 1272,3250$

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm) δ 7,62 (d, 1H, *J* 7.41Hz, (CH)_i), 5,01 (d, 1H, H-1'), 4,97-4,88 (m, 6H, H-1), 4,35 (s, 2H, (CH₂)_j), 4,29 (dd, 1H, H-5'), 3,90-3,84 (m, 6H, H-3), 3,87(m, 1H, H-3'), 3,86-3,65 (m, 12H, H-6), 3,83-3,73 (m, 6H, H-5), 3,65-3,45 (m, 12H, H-2, H-4), 3,62 (m, 2H, H-2', H-4')

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz) δ (ppm) δ 177,9 (1C, C=O), 150,2 (1C, (CH)_i), 103,1, 102,9, 102,8 (C-1, C-1'), 83,7 (C-4'), 82,3, 82,2, 81,6 (C-4), 73,6 (1C, CH₂)_j, 74,4, 74,3, 74,2, 74,1 (C-3, C-3'), 73,6, 73,3, 73, 72,8, 72,6 (C-5, C-2, C-2'), 70 (1C, C-5'), 61,5, 61,3, 60,7 (C-6).

6^I-[O-((N-(2,2 diméthoxyéthyl)-amidométhoxy)-imino)]-6^I-désoxy-cyclomaltoheptaose
(18):



18

A une solution de β -CD monoacide carboxylique (**16**) (0,5 g, 0,42 mmol), sous azote, dans le DMF anhydre (40 mL), sont ajoutés successivement le *N*-hydroxybenzotriazole (0,113 g, 0,84 mmol), le *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (0,212 g, 1,68 mmol) et le 2,2-diméthoxyéthylamine (0,057 g, 0,55 mmol), tous solubilisés au préalable dans un minimum de DMF. Le mélange réactionnel est laissé sous vive agitation à température ambiante pendant 36 heures. Le milieu est concentré jusqu'à l'obtention d'une huile (environ 10 mL). L'huile résiduelle est précipitée dans l'acétone (400 mL). Le produit brut est isolé par filtration sur creuset avec un fritté 4, lavé 3 fois avec de l'acétone (40 mL). Après filtration, il est séché sous vide à 25°C pendant 12 heures. Le précipité est resolubilisé dans l'eau et lyophilisé. Le composé (**18**) (0,448 g, 0,35 mmol) est isolé sous forme d'une fine poudre blanche.

Formule brute: C₄₈H₈₀O₃₈N₂

Rendement: 84 %

Taux d'hydratation : 5 %

CCM: R_f = 0,57 (DMF/H₂O/*n*-BuOH : 1/1/2 (v/v/v))

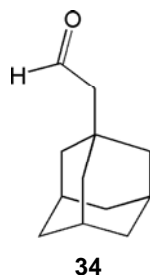
ESI-HRMS (haute résolution avec détection en mode positif):

Calculé pour C₄₈H₈₀N₂O₃₈Na [M+Na]⁺, théorique : *m/z* = 1315,42868 , trouvée : *m/z* = 1315,4285

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm) 7,69 (d, 1H, *J* 7,18 Hz, (CH)_i), 5,02 (d, 1H, *J* 6,7 Hz, H-1'), 5,01-4,97 (m, 6H, H-1), 4,41 (t, 1H, *J* 5,18 Hz, (CH)_i), 4,36 (s, 2H, (CH₂)_j), 4,32 (dd, 1H, H-5'), 3,92-3,81 (m, 6H, H-3), 3,87 (m, 1H, H-3'), 3,81-3,69 (m, 6H, H-5), 3,84-3,70 (m, 12H, H-6), 3,66 (m, 1H, H-4'), 3,63 (m, 1H, H-2'), 3,60-3,55 (m, 6H, H-2), 3,55-3,49 (m, 6H, H-4), 3,37 (s, 6H, CH₃) 3,36 (m, 2H, (CH₂)_k).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz) δ (ppm) 172,9 (1C, C=O), 151,6 (1C, (CH)_i), 103,6 (1C, (CH)_i), 103,1, 102,9, 102,5 (C-1, C-1'), 83,6 (C-4') 82,4, 82,3, 82,2, 82,1, 81,9 (C-4), 74,4, 74,3, 74,2, 74,1, 73,9 (C-3, C-3'), 73,6, 73,3, 73, 72,8 (C-5, C-2, C-2'), 73,6 (1C, (CH₂)_j), 69,7 (C-5'), 61,5, 61,3 (C-6), 56,1, 55,7 (2C, -O(CH₃)₂), 42 (1C, (CH₂)_k)

2-(1-adamantyl)aldéhyde (34) :

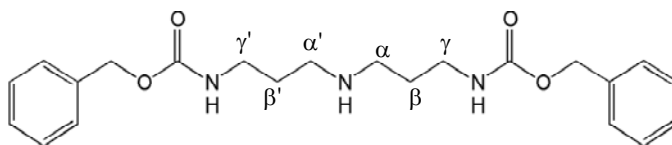


A une solution, de 2-(1-adamantyl)éthanol (1 g, 5,54 mmol) sous azote dans le dichlorométhane (40 mL) est ajouté le dichromate de pyridinium (4,17 g, 11,1 mmol) directement sous forme de poudre. Le milieu réactionnel est laissé sous vive agitation à température ambiante pendant 24 heures. Le mélange est ensuite déposé sur colonne de gel de silice avec une couche d'éther diéthylique de 10 cm sur le haut de la silice afin de précipiter les dérivés du chrome. Ces derniers sont éliminés par filtration (élution avec Et₂O) et le filtrat est concentré sous pression réduite pour donner une huile (**34**) (0,82 g, 4,6 mmol).

Formule brute: C₁₂H₁₈O

Rendement: 84 %

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 9,85 (t, CHO), 2,10, 1,97 et 1,74-1,59 (d et 2 m, H (adamantane)).

***N*¹,*N*⁹-bis(carbobenzyloxy)-norspermidine (21) :****21**

A une solution de norspermidine (2 g, 15,2 mmol), sous azote, dans le dichlorométhane anhydre (165 mL), le *N*-(benzyloxycarbonyloxy)succinimide (7 g, 30 mmol) est additionné directement sous forme de poudre. Le mélange réactionnel est laissé sous vive agitation, à température ambiante, pendant 48 heures. Le milieu est lavé 5 fois avec de l'eau distillée afin d'éliminer le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) libéré pendant la réaction. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH (7:3 v/v)) pour donner le composé **21** (3,4 g, 9 mmol) sous forme de poudre blanche.

Formule brute : C₂₂H₂₉N₃O₄

Rendement: 40 %

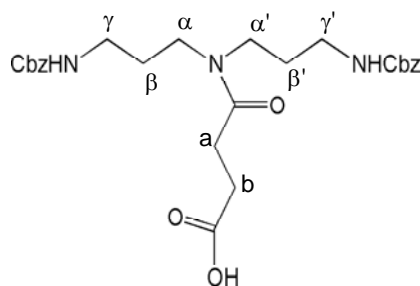
CCM: R_f = 0,2 (CH₂Cl₂/MeOH 7/3 (v/v))

ESI-HRMS (haute résolution avec détection en mode positif) :

Calculé pour C₂₂H₃₀N₃O₄ [M+H]⁺, théorique : *m/z* = 400,22363 ; trouvée : *m/z* = 400,2241

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7,3 (m, 10H, 2 Ph), 5,5 (s, 2H, Cbz-NH), 5,05 (s, 4H, 2 (Ph-CH₂)), 3,25 (m, 4H, (CH₂)_γ et γ'), 2,65 (m, 4H, (CH₂)_α et α'), 1,65 (m, 4H, (CH₂)_β et β'), 1,25 (m, 1H, NH amine)

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 156,5, (2C, C=O), 136,7, 128, 128,3, 128,5 (12 C, 2Ph), 66,5 (2 C, 2(Ph-CH₂)), 47,4 ((CH₂)_α et α'), 39,5 ((CH₂)_γ et γ'), 29,6 ((CH₂)_β et β')

***N*¹,*N*⁹-bis(carbobenzyloxy)-*N*⁵-(succinylamido)-norspermidine (23)****23**

A une solution de **(21)** (1,69 g, 4,23 mmol), sous azote, dans le dichlorométhane anhydre (60 mL), sont ajoutés successivement la pyridine (0,374 mL, 4,66 mmol) et l'anhydride succinique (0,466 g, 4,66 mmol) directement sous forme de poudre. Le milieu réactionnel est laissé sous vive agitation à température ambiante et sous azote pendant 1 heure. Le milieu, additionné de dichlorométhane, est lavé successivement avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M), avec de l'eau distillée, avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium et de nouveau avec de l'eau distillée pour atteindre un pH de 5,5. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée puis évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH 9/1 (v/v)). Le composé **(23)** est isolé (1,68 g, 3,36 mmol) sous forme d'un précipité blanc.

Formule brute: C₂₆H₃₃N₃O₇

Rendement: 80 %

CCM: R_f = 0,41 (CH₂Cl₂ / MeOH 9/1 (v/v))

ESI-HRMS (haute résolution avec détection en mode positif) :

Calculé pour C₂₆H₃₃N₃O₇Na [M+Na]⁺, théorique *m/z* = 522,22162 ; trouvée *m/z* = 522,2214

Calculé pour C₂₆H₃₃N₃O₇K [M+K]⁺, théorique *m/z* = 538,19556 ; trouvée *m/z* = 538,1930

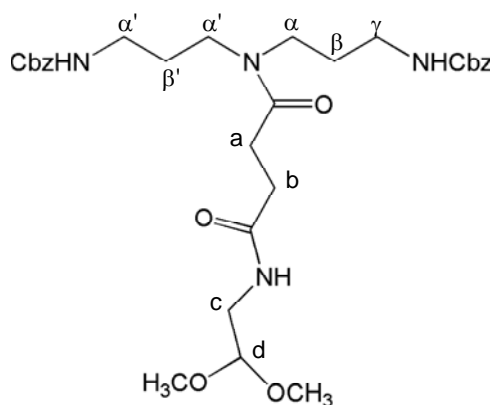
Calculé pour C₂₆H₃₂N₃O₇Na₂ [M-H+2Na]⁺, théorique *m/z* = 544,20357 ; trouvée *m/z* = 544,2033

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 7,3 (m, 10H, 2 Ph), 5,52 (s, 2H, Cbz-NH), 5,05 (m, 4H, 2 (Ph-CH₂)), 3,41 (m, 2H, (CH₂)_γ ou γ'), 3,3 (m, 2H, (CH₂)_γ ou γ'), 3,25 (m, 2H, (CH₂)_α ou α'),

3,1 (m, 2H, (CH₂)_α ou α'), 2,51 (m, 2H, (CH₂)_a ou b), 2,53 (m, 2H, (CH₂)_a ou b), 1,81 (m, 2H, (CH₂)_β ou β'), 1,68 (m, 2H, (CH₂)_β ou β')

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 177,4, 173,7, 158,1 (4 C=O), 136,7, 129,2-130 (12 C, 2 Ph), 67,8, 68,2 (2C, 2 (CH₂-Ph)), 46,9, 44,2 (2C, 2 (CH₂)_α et α'), 39,8, 39 (2C, 2 (CH₂)_γ et γ'), 30,9, 29 (2C, (CH₂)_a et b), 30,3, 29 (2C, (CH₂)_β et β')

***N*¹,*N*⁹-bis(carbobenzyloxy)-*N*⁵-(*N*'-(2,2-diméthoxyéthylamido)-succinylamido)-norspermidine (25) :**



25

A une solution de (23) (3,19 g, 6,39 mmol) sous azote, dans le DMF anhydre (100 mL), sont ajoutés successivement le *N*-hydroxybenzotriazole (0,861 g, 6,39 mmol), le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (1,58 g, 7,67 mmol), de la triéthylamine (0,88 mL, 0,645 g) et le 2,2-diméthoxyléthylamine (0,671 g, 6,39 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous vive agitation pendant 48 heures à température ambiante. Après évaporation totale du DMF, le produit est repris dans l'éther diéthylique. La dicyclohexylurée (DCU) précipite sous forme de pâte brune et est éliminée par filtration sur papier. Le filtrat est lavé successivement par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M), d'eau distillée, d'hydroxyde de sodium (0,1 M) et de nouveau avec de l'eau distillée afin d'atteindre un pH de 5,5. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée puis évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie

rapide sur colonne de gel de silice (éluant CH₂Cl₂ / MeOH 97/3 (v/v)). Le composé **(25)** (1,87 g, 3,19 mmol) est isolé sous forme d'une huile incolore.

Formule brute: C₃₀H₄₂N₄O₈

Rendement: 51 %

CCM: R_f = 0,41 (CH₂Cl₂ / MeOH 97/3 (v/v))

ESI-HRMS (haute résolution avec détection en mode positif) :

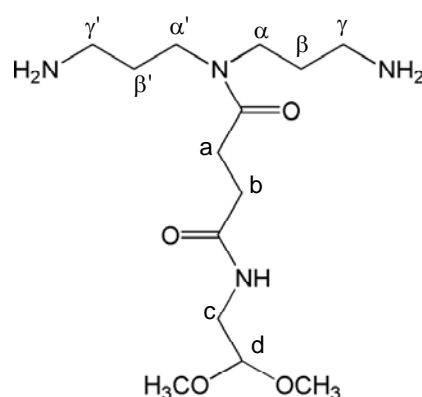
Calculé pour C₃₀H₄₂N₄O₈Na [M+Na]⁺, théorique *m/z* = 609,29003 ; trouvée *m/z* = 609,2898

Calculé pour C₃₀H₄₂N₄O₈K [M+K]⁺, théorique *m/z* = 625,26397; trouvée *m/z* = 625,2646

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 7,3 (m, 10H, 2 Ph), 6 (s, 1H, Cbz-NH), 5,7 (s, 1H, NH-Cbz), 5,1 (m, 4H, 2 (Ph-CH₂)), 4,35 (t, 1H, (CH)_d), 3,3-3,45 (m, 12 H, (-O(CH₃)₂), (CH₂)_α et α', (CH₂)_c), 3,21 (m, 2H, (CH₂)_γ ou γ'), 3,09 (m, 2H, (CH₂)_γ ou γ'), 2,61 (m, 2H, (CH₂)_a ou b), 2,51 (m, 2H, (CH₂)_a ou b), 1,81 (m, 2H, (CH₂)_β ou β'), 1,62 (m, 2H, (CH₂)_β ou β')

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 172,5, 156,5, (4C, 4 C=O), 136, 137, 129-127 (12C, 2 Ph), 102,5 (1C, (CH)_d), 67, 66,5 (2C, 2 (CH₂-Ph)), 54,2 (2C, 2 (CH₃)), 45, 42,3 (2C, 2 (CH₂)_α et α'), 41 (1C, (CH₂)_c), 38,5, 37,5 (2C, (CH₂)_γ et γ'), 31,5, 28 (2C, (CH₂)_a et b), 29, 27,5 (2C, (CH₂)_β et β')

N⁵-(N-(2,2-diméthoxyéthyl)-succinylamido)-norspermidine (26) :



26

A une solution de composé **(25)**, (1g, 1,7 mmol) dans le méthanol (100 mL), le palladium activé sur charbon (160 mg) est ajouté directement sous forme de poudre. Le mélange réactionnel, sous atmosphère d'hydrogène est laissé sous vive agitation pendant 3

heures à température ambiante Le milieu est ensuite filtré sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner le composé (**26**) (0,422 g, 1,07 mmol).

Formule brute: C₁₄H₃₀N₄O₄

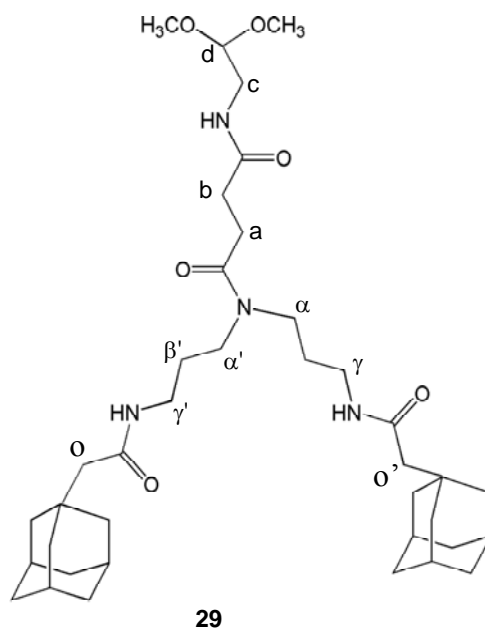
Rendement: 79 %

ESI-HRMS (haute résolution avec détection en mode positif) :

Calculé pour C₁₄H₃₁N₄O₄ [M+H]⁺, théorique *m/z* : 319,23453, trouvée *m/z* : 319,2344

Calculé pour C₁₄H₃₀N₄O₄ Na [M+Na]⁺, théorique *m/z* : 341,21648, trouvée *m/z* : 341,2163

***N*¹, *N*⁹-bis(adamantylamido)-*N*⁵-(*N*-(2,2-diméthoxyéthyl)-succinylamido)-norspermidine (**29**) :**



A une solution, sous azote, d'acide (1-adamantyl)carboxylique (0,738 g, 3,8 mmol) dans le DMF anhydre (99 mL) sont ajoutés successivement le *N*-hydroxybenzotriazole (0,514 g, 3,8 mmol), le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (0,941 g, 4,56 mmol), la triéthylamine (0,192 g, 1,9 mmol) et le composé (**26**) (0,55 g, 1,73 mmol), solubilisés dans un minimum de DMF. Le milieu réactionnel est laissé sous vive agitation à température ambiante pendant 48 heures.

Après évaporation totale du DMF, le milieu est repris dans l'éther diéthylique dans lequel la dicyclohexylurée (DCU) précipite sous forme de pâte brune. Le filtrat récupéré après filtration sur papier est lavé successivement avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,3 M), de l'eau distillée, une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M) et de nouveau de l'eau distillée pour atteindre un pH de 5,5. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH 95/5 (v/v)). Le composé (**29**) (0,498 mg, 0,0744 mmol) et isolé sous forme d'une huile.

Formule brute: C₃₈H₆₂N₄O₆

Rendement: 43 %

CCM: R_f = 0,3 (CH₂Cl₂ / MeOH : 9/1 (v/v))

ESI-HRMS (haute résolution avec détection en mode positif) :

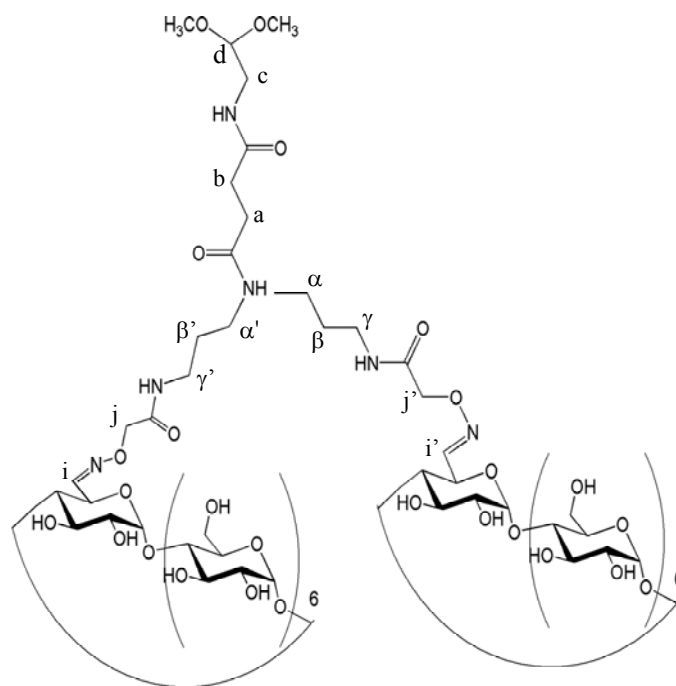
Calculé pour C₃₈H₆₂N₄O₆Na [M+Na]⁺, théorique *m/z* = 693,45671, trouvée *m/z* = 693,4553

Calculé pour C₃₈H₆₂N₄O₆K [M+K]⁺, théorique *m/z* = 709,43064, trouvée *m/z* = 709,4259

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 6,55 (t, 1H, NH), 6,28 (t, 1H, NH), 6,03 (t, 1H, NH), 4,40 (t, 1H, *J*=6,1, (CH)_d), 3,48-3,26 (12 H, 2 (CH₃), (CH₂)_α et α'), (CH₂)_γ ou γ', (CH₂)_c), 3,17 (m, 2H, (CH₂)_γ ou γ'), 2,69 (m, (CH₂)_a ou b), 2,59 (m, (CH₂)_a ou b), 2-1,94 (8H, H (adamantane), (CH₂)_β ou β'), 1,87 (m, 2H, (CH₂)_β ou β'), 1,78-1,60 (28 H, H (adamantane))

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) 173,7, 173,6, 172,8, 172,4, 137 (4C, 4 C=O), 103,4 (1C, (CH)_d), 55,4 (6C, 2(CH₃)), 46,6 (1C, (CH₂)_c), 43,6, 42,3 (2C, (CH₂)_α et α'), 38,1, 36,9 (2C, (CH₂)_γ et γ'), 32,3, 29,9 (2C, (CH₂)_a et b), 52,9, 44,4-43,1, 38,8-37,2, 28,5 (C (adamantane), (CH₂)_o et o')

“Dimère acétalique de β -CD” (27) :



27

A une solution de (**16**) (1,12 g, 0,944 mmol), sous azote, dans le DMF anhydre (90 mL), sont ajoutés successivement le *N*-hydroxybenzotriazole (0,255 g, 1,88 mmol), le *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (0,475 g, 3,77 mmol) et enfin la diamine (**26**) (0,136 g, 0,429 mmol), solubilisés dans un minimum de DMF. Le milieu réactionnel est laissé sous vive agitation à température ambiante pendant 24 heures. Le milieu est concentré jusqu'à l'obtention d'une huile (environ 10 mL). L'huile résiduelle est précipitée dans l'acétone (400 mL). Le produit brut est isolé par filtration sur creuset avec un fritté 4 et lavé 3 fois avec de l'acétone. Après filtration, il est séché sous vide à 25°C pendant 12 heures. Le précipité, solubilisé dans l'eau, est purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Biogel P6 (éluant : eau). Le produit (**27**) (0,649 g, 0,287 mmol) est isolé, après lyophilisation, sous forme d'une fine poudre blanche.

Formule brute : $C_{102}H_{168}N_6O_{76}$

Rendement: 67 %

Taux d'hydratation : 5 %

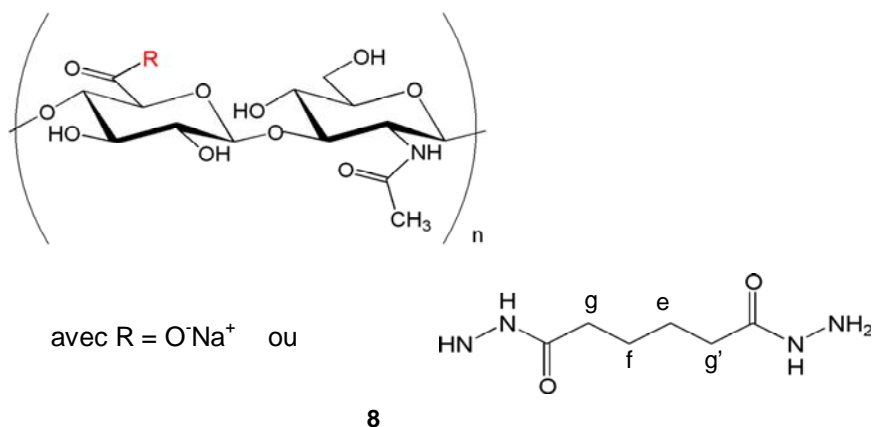
ESI-HRMS (haute résolution avec détection en mode positif):

Calculé pour $C_{102}H_{168}N_6O_{76}Na_2 [M+2Na]^{++}$, théorique $m/z = 1369,4631$, trouvée = 1369,4640

Calculé pour $C_{102}H_{168}N_6O_{76}NaK [M+Na+K]^{++}$, théorique $m/z = 1377,4500$, trouvée = 1377,4593

RMN 1H (D_2O , 400 MHz) δ 7,76 (d, 1H, $J=6,7$ Hz, $(CH)_{i \text{ ou } i'}$), 7,71 (d, 1H, $(CH)_{i' \text{ ou } i}$), 5,05-4,95 (m, 14 H, H-1' et H-1), 4,53 (m, 2H, $(CH_2)_{j \text{ ou } j'}$), 4,48 (m, 2H, $(CH_2)_{j \text{ ou } j'}$), 4,41 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, $(CH)_d$), 4,32 (m, H-5'), 3,9-3,4 (m, protons de la cyclodextrine), 3,37 (s, 6H, 2(CH₃)), 3,35 (m, 4H, $(CH_2)_{\alpha \text{ ou } \alpha'}$ et $(CH_2)_c$), 3,31 (m, 2H, $(CH_2)_{\alpha \text{ ou } \alpha'}$), 3,25 (m, 2H, $(CH_2)_{\gamma \text{ ou } \gamma'}$), 3,1 (m, 2H, $(CH_2)_{\gamma \text{ ou } \gamma'}$), 2,59 (m, 2H, $(CH_2)_{a \text{ ou } b}$), 2,44 (m, 2H, $(CH_2)_{a \text{ ou } b}$), 1,81 (m, 2H, $(CH_2)_{\beta \text{ ou } \beta'}$), 1,68 (m, 2H, $(CH_2)_{\beta \text{ ou } \beta'}$)

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz) δ (ppm) 174,9, 174,1, 171,9, 171,6 (4C, 4 C=O), 151,1, 151,2 (2C, $(CH)_{i \text{ et } i'}$), 102,7 (1C, $(CH)_d$), 102,5-101,7 (C-1, C-1'), 82,9 (C-4'), 81,5, 80,8 (C-4), 73,4, 73,1, 72,4, 72,2, 71,9 (C-3, C-3', C-5, C-2, C-2'), 72,4 (2C, $(CH_2)_{j \text{ et } j'}$), 68,9 (C-5'), 54,7 (2(CH₃)), 43,4, 41,4 (2C, $(CH_2)_{\alpha \text{ et } \alpha'}$), 45,6 (1C, $(CH_2)_c$), 36,8, 36,7 (2C, $(CH_2)_{\gamma \text{ et } \gamma'}$), 31, 28,3 ($(CH_2)_{a \text{ et } b}$), 27,9, 26,8 (2C, $(CH_2)_{\beta \text{ et } \beta'}$)

Hyaluronane porteur de groupements hydrazide HA-ADH (8) :

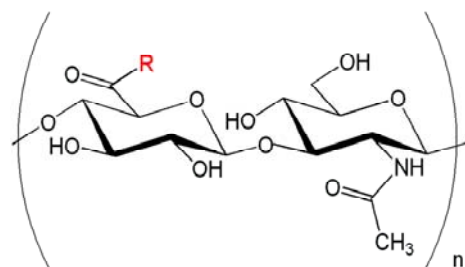
Le hyaluronane (4 g, 9,97 mmol) est solubilisé dans l'eau distillée (1000 mL). A cette solution, l'acide adipique dihydrazide (17,3 g, 99,7 mmol) est ajouté directement sous forme de poudre. Le pH du milieu réactionnel est ajusté à 4,75 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M). Une solution aqueuse de 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]-carbodiimide (0,287 g, 1,49 mmol) est ajoutée goutte à goutte au mélange. Le pH du mélange réactionnel est maintenu à 4,75 par addition d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M). La réaction est laissée sous vive agitation à température ambiante jusqu'à une stabilisation totale du pH (environ 4 heures). Le pH de la réaction est ensuite ajusté à 7,5 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,1 M). Après addition de chlorure de sodium à une concentration de 0,5 M, le HA modifié est précipité par addition d'éthanol dans les proportions : EtOH/H₂O 6/4 (v/v). Le précipité est lavé successivement avec différents mélanges EtOH/H₂O (7/3, 7,5/2,5, 8/2, 9/1). Le HA-ADH (3,48 g, 8,46 mmol) est récupéré par filtration sur creuset avec un fritté 4 et séché à l'air libre pendant 24 heures. Le dérivé HA-ADH utilisé pour la suite des synthèses a un degré de substitution de 8 % ± 1 % (calculé par RMN ¹H).

Rendement: 85 %

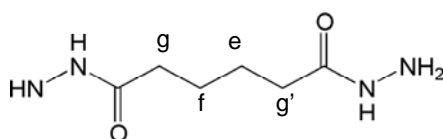
Taux d'hydratation : 16 %

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz, 353 K): 4,4 (H-1 de l'unité *N*-acétylglucosamine), 4,25 (H-1 de l'acide glucuronique), 3,85-3,1 (massif des protons des sucres du squelette polysaccharidique), 2,2 ((CH₂)_g ou g'), 2,05 ((CH₂)_g ou g'), 1,85 ((CH₃) du groupe acétamide du hyaluronane), 1,45 ((CH₂)_e et (CH₂)_f)

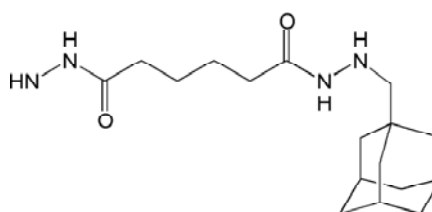
Dérivé HA(AD) (36) :



avec R= O⁻Na⁺ ou



ou



36

Après solubilisation totale du HA-ADH (**8**) (1 g, 2,43 mmol) dans l'eau (250 mL), 150 mL d'éthanol sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à 5,1 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M). Sont ajoutés successivement une solution d'adamantane oxydé (**34**) (0,108 g, 0,621 mmol) dans l'éthanol (20 mL) et une solution de cyanoborohydrure de sodium (1,15 g, 18,2 mmol) dans l'eau (2 mL). La réaction est laissée sous vive agitation pendant 24 heures. Le pH de la réaction est ensuite ajusté à 7,5 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,1 M). Après addition de chlorure de sodium de façon à obtenir une

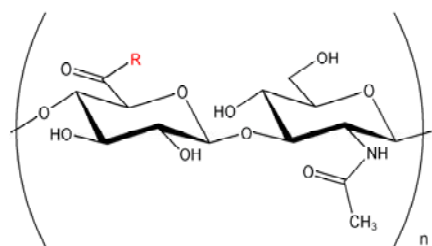
concentration en NaCl dans le mélange de 0,5 M, le HA modifié est précipité par addition d'EtOH dans les proportions : EtOH/H₂O 6/4 (v/v). Le précipité est lavé successivement avec différents mélanges EtOH/H₂O (7/3, 7,5/2,5, 8/2, 9/1). Le composé (**36**) (0,926 g, 2,19 mmol) est isolé par filtration sur fritté 4 et séché pendant 24 heures à température ambiante. Le taux de greffage des groupements adamantane est de 6 % ± 1% (calculé par RMN).

Rendement: 90 %

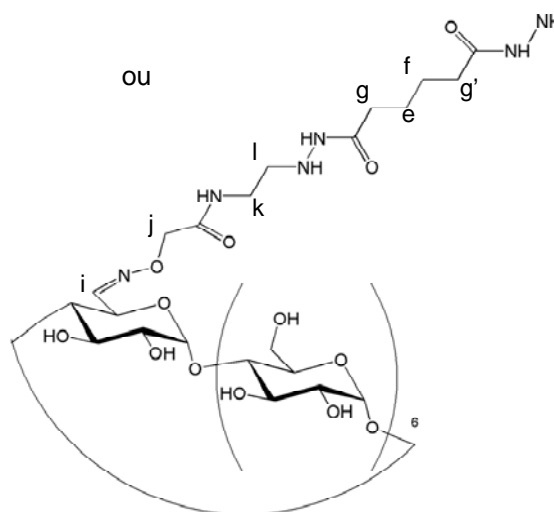
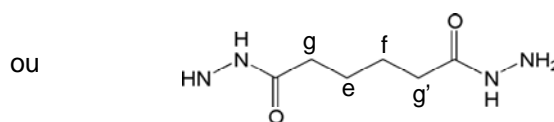
Taux d'hydratation : 15 %

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz, 353 K): 4,4 (H-1 de l'unité *N*-acétylglucosamine), 4,25 (H-1 de l'acide glucuronique), 3,85-3,1 (massif des protons des sucres du squelette polysaccharidique), 2,2 ((CH₂)_g ou g'), 2,05 ((CH₂)_g ou g'), 1,85 ((CH₃) du groupe acétamide du hyaluronane), 1,2-1,8 ((CH₂)_e, (CH₂)_f, protons de l'adamantane).

Dérivé HA(CD) (32):



avec R= O⁻Na⁺ ou



32

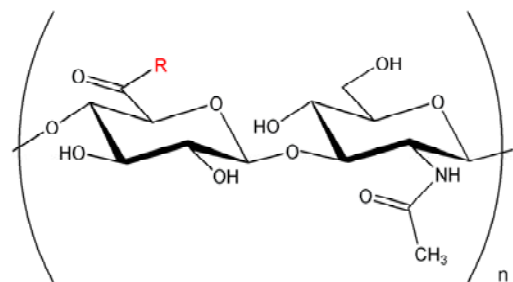
La première étape consiste à déprotéger la fonction aldéhyde de la β -cyclodextrine monoacétal (**18**). A une solution de (**18**) (0,43 g, 0,336 mmol) dans l'eau (80 mL), une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,2 M) (13,4 mL) est ajoutée. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 3 heures à 55°C puis est neutralisé à pH 7 pour donner le produit désiré. L'aldéhyde obtenu, solubilisé dans l'eau (90 mL), est ajouté à une solution de HA-ADH (**8**) (0,488 g, 1,18 mmol) dans l'eau (122 mL). Le pH est ajusté à 5,1 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M) et est maintenu à cette valeur durant toute la réaction par addition d'HCl (0,1 M). Une solution de cyanoborohydrure de sodium (0,66 g, 10,62 mmol) dans l'eau (5mL) est ajoutée et le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures. Le pH de la réaction est ensuite ajusté à 7,5 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,1 M). Le dérivé HA(CD) (**32**) (0,427 g, 0,907 mmol) est purifié par ultrafiltration sur une membrane Amicon YM 10 (seuil de coupure 10 000 g/mol) et isolé après lyophilisation. Le degré de substitution (calculé par RMN ^1H) du dérivé HA(CD) est de $5\% \pm 1\%$.

Rendement: 77 %

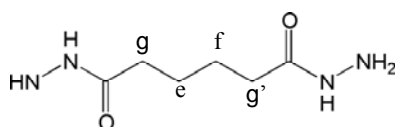
Taux d'hydratation : 9 %

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, 353 K): 5-4,8 protons anomères de la cyclodextrine, 4,55 (H-1 de l'unité *N*-acétylglucosamine), 4,25 (H-1 de l'acide glucuronique), 3,85-3,1 (large massif des protons des sucres du squelette polysaccharidique et de la cyclodextrine), 2,2 ((CH_2)_g ou g'), 2,05 ((CH_2)_g ou g'), 1,85 ((CH_3) du groupe acétamide du hyaluronane), 1,45 (4H, (CH_2)_e, (CH_2)_f).

Dérivé (HA(AD)₂) (37):

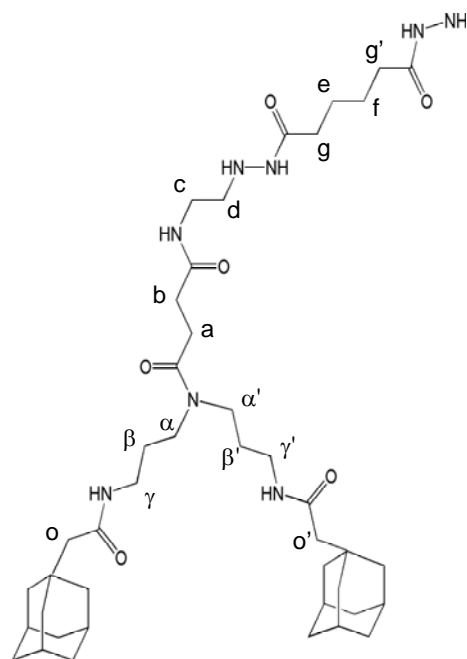


avec $R = O^-Na^+$ ou



ou

37



La première étape a consisté à déprotéger la fonction aldéhyde du dimère d'adamantane (**29**). Le composé (**29**) est solubilisé dans un mélange $CH_2Cl_2 / (TFA/H_2O)$ (8 mL) dans les proportions (4/(2/2)) : (v/(v/v)). Le milieu réactionnel est laissé sous vive agitation pendant 1 h 30 à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince avec comme éluant $CH_2Cl_2 / MeOH$ ((9/1) : (v/v)). Le mélange $CH_2Cl_2 / (TFA/H_2O)$ est évaporé et le produit est redissous plusieurs fois dans le dichlorométhane et concentré afin d'éliminer au maximum l'acide trifluoroacétique. Le résidu est repris dans l'éthanol (26 mL). L'aldéhyde obtenu (0,25 mg, 0,4 mmol) est ajouté au HA-ADH (**8**) (1,64 g, 4 mmol) préalablement solubilisé dans un mélange hydroalcoolique ($H_2O/EtOH$: (400 mL/240 mL)). Le pH est ajusté à 5,1 avec une solution d'hydroxyde de sodium (0,5 M). Une solution aqueuse (2 mL) de cyanoborohydrure de sodium (1,13 g, 18

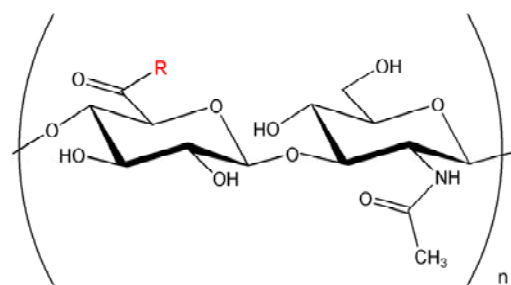
mmol) est ajoutée. Le milieu réactionnel est laissé sous vive agitation à température ambiante pendant 24 heures. Pour la suite, le mode opératoire utilisé est identique à celui décrit pour la synthèse du dérivé HA(AD) (36). Le taux de greffage des dimères (calculé par RMN ^1H) est de $3\% \pm 1\%$ soit de $6\% \pm 1\%$ pour les groupements adamantane.

Rendement: 70 %

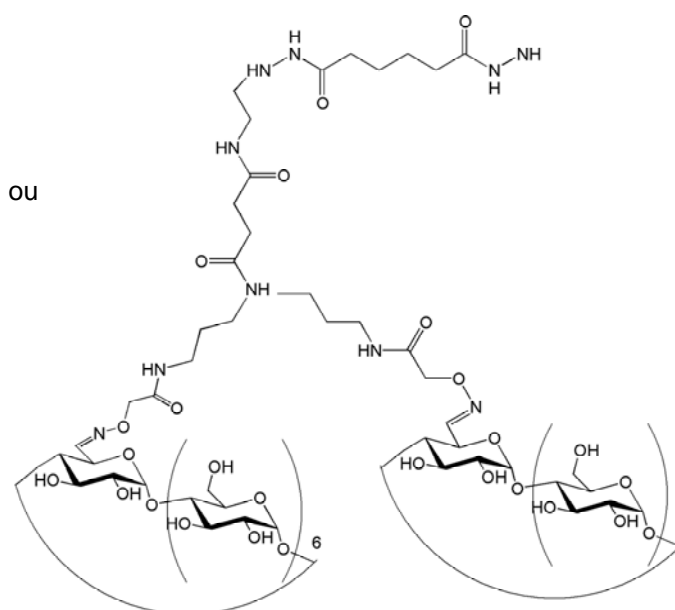
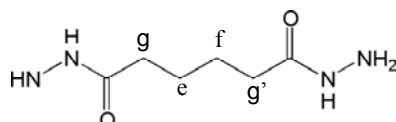
Taux d'hydratation : 25 %

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, 353 K): 4,55 (H-1 de l'unité *N*-acétylglucosamine), 4,25 (H-1 de l'acide glucuronique), 3,9-3,1 (massif des protons des sucres du squelette polysaccharidique), 2,32 ((CH_2)_a ou b), 2,48 ((CH_2)_a ou b), 2,2 ((CH_2)_g ou g'), 2,05 ((CH_2)_g ou g'), 1,85 ((CH_3) du groupe acétamide du hyaluronane), 1,3-1,55 ((CH_2)_e, (CH_2)_f, protons de l'adamantane).

Dérivé HA(CD)₂ (33)



avec $\text{R} = \text{O}^-\text{Na}^+$ ou



33

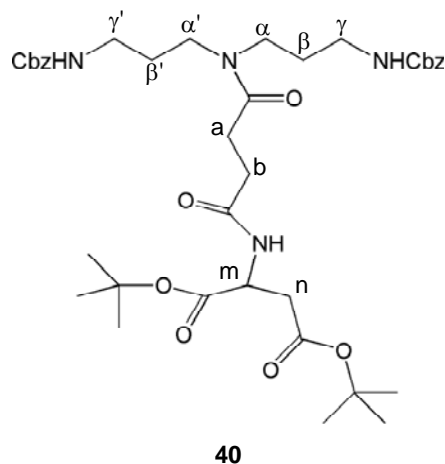
La première étape consiste à déprotéger la fonction aldéhyde du dérivé de β -cyclodextrine (**27**). A une solution de (**27**) (0,640 g, 0,240 mmol) dans l'eau (60 mL), une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,2 M) (8,9 mL) est ajoutée. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 3 heures à 55°C et est ensuite neutralisé à pH 7. L'aldéhyde obtenu solubilisé dans l'eau (90 mL), est ajouté à une solution de HA-ADH (**8**) (0,662 g, 1,61 mmol) dans l'eau (67 mL). Le pH est ajusté à 5,1 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M). Une solution de cyanoborohydrure de sodium (0,456 g, 7,24 mmol) dans l'eau (3mL) est ajoutée et le pH est maintenu à 5,1 par addition d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures. Pour la suite, le mode opératoire utilisé est identique à celui du HA(CD). Le degré de substitution (calculé par RMN ^1H) du hyaluronane en cyclodextrine est de 5 % \pm 1%.

Rendement : 88 %

Taux d'hydratation : 9 %

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, 353 K): 5-4,8 protons anomères de la cyclodextrine, 4,55 (H-1 de l'unité *N*-acétylglucosamine), 4,25 (H-1 de l'acide glucuronique), 3,9-3,1 (large massif des protons des sucres du squelette polysaccharidique et de la cyclodextrine), 2,48 ((CH_2)_a ou b), 2,32 ((CH_2)_a ou b), 2,2 ((CH_2)_g ou g'), 2,05 ((CH_2)_g ou g'), 1,85 ((CH_3) du groupe acétamide du hyaluronane), 1,5 ((CH_2)_e, (CH_2)_f).

***N*¹,*N*⁹-bis(carbobenzyloxy)-*N*⁵-(*N*-(*L*-di-*tert*-butyl-ester-aspartamido)-succinylamido)-
norspermidine (**40**)**



A une solution de (**23**) (2 g, 4 mmol), sous azote, dans le DMF anhydre (30 mL), sont ajoutés successivement le *N*-hydroxybenzotriazole (0,54 g, 4 mmol), le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (0,99 g, 4,8 mmol), solubilisés dans un minimum de DMF et le chlorhydrate de l'acide *L*-aspartique protégé sous forme d'ester di-*tert*-butylique (0,981 g, 4 mmol) préalablement dissous dans le DMF en présence d'un équivalent de triéthylamine (0,401 g, 4 mmol). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 36 heures. Après évaporation totale du DMF, le résidu est repris dans le dichlorométhane. La dicyclohexylurée (DCU) précipite et est éliminée par filtration sur papier. Le filtrat est lavé successivement avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M), avec de l'eau distillée, au bicarbonate de sodium et de nouveau avec de l'eau distillée pour atteindre un pH de 5,5. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH (98/2) (v/v)). Le composé (**40**) (2,44 g, 3,36 mmol) est isolé sous forme d'une huile.

Formule brute: C₃₈H₅₄N₄O₁₀

Rendement: 84 %

CCM: R_f = 0.42 (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5 (v/v))

ESI-HRMS (haute resolution avec detection en mode positif):

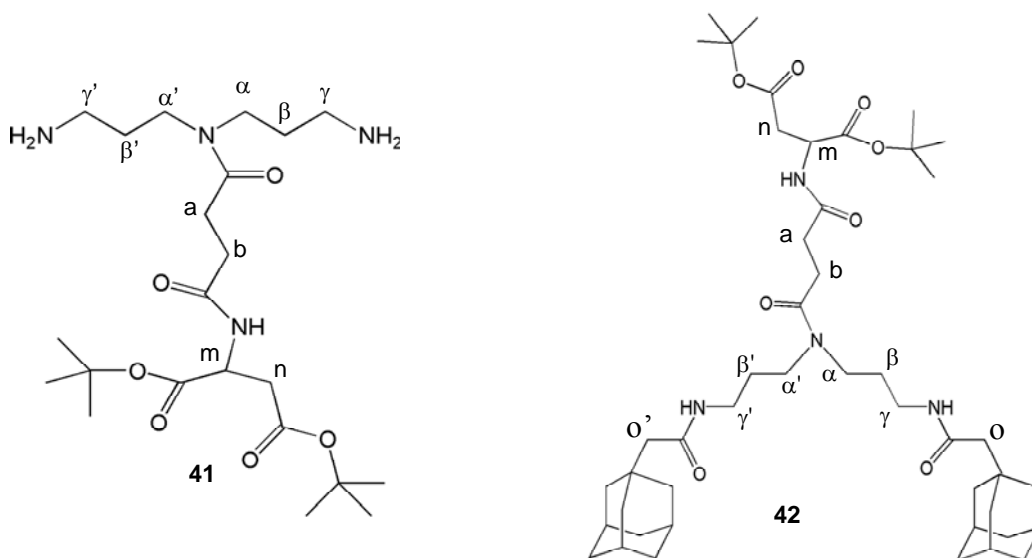
Calculé pour $C_{38}H_{54}N_4O_{10}Na$ $[M+Na]^+$, théorique $m/z = 749,37376$:, trouvée $m/z = 749,3746$

Calculé pour $C_{38}H_{54}N_4O_{10}K$ $[M+K]^+$, théorique $m/z = 765,34770$, trouvée $m/z = 765,3459$

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm) 7,45-7,3 (m, 10H, 2 Ph), 5,1 (d, 4H, 2 $\underline{CH_2}$ -Ph), 4,65 (m, 1H, (CH)_m), 4,05 (d, 1H, (CH)_n), 3,39 (m, 2H, (CH₂) _{α} ou α'), 3,31 (m, 2H, (CH₂) _{α} ou α'), 3,22 (m, 2H, (CH₂) _{γ} ou γ'), 3,11 (m, 2H, (CH₂) _{γ} ou γ'), 2,84 (dd, 2H, (CH₂)_n), 2,62 (m, 2H, (CH₂)_a ou b), 2,55 (m, 2H, (CH₂)_a ou b), 1,93 (m, 2H, (CH₂) _{β} ou β'), 1,82 (m, 2H, (CH₂) _{β} ou β'), 1,48 (18H, 6 (CH₃))

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ (ppm) δ 173,5, 173,3, 171,6, 171,1 (4C, (C=O)), 129,9-129,1 (12 C, 2 Ph), 68,05, 67,75 (2C, 2 ($\underline{CH_2}$ -Ph)), 103,6 (1C, (CH)_l), 50,4 (1C, (CH)_m), 46,2, 43,6 (2C, (CH₂) _{α} et α'), 39,8, 39 (2C, (CH₂) _{γ} et γ'), 38,7 (1C, (CH₂)_n), 32,3, 29 (2C, (CH₂)_a et b), 30,2, 28,9 (2C, (CH₂) _{β} et β'), 29,3-28,2 (6C, 6(CH₃))

**N^5 -((L-di-*tert*-butyl-ester-aspartamido)-succinylamido)-norspermidine (41)
et N^1, N^9 -bis(adamantylamido)- N^5 -((L-di-*tert*-butyl-ester-aspartamido)-succinylamido)
norspermidine (42) :**



A une solution de composé (40), (2,44 g, 3,36 mmol) dans le méthanol (244 mL), le palladium activé sur charbon (384 mg) est ajouté directement sous forme de poudre. Le

mélange réactionnel, sous atmosphère d'hydrogène, est laissé sous vive agitation pendant 3 heures à température ambiante. Le milieu est ensuite filtré sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner le composé (**41**) avec un rendement de 85 % (1,30 g, 2,83 mmol).

A une solution, sous azote, d'acide 1-adamantyl acétique (1,35 g, 6,96 mmol), dans le DMF anhydre (50 mL), sont ajoutés successivement le *N*-hydroxybenzotriazole (0,94 g, 6,96 mmol), la *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (1,72 g, 8,36 mmol), la triéthylamine (0,352 g, 3,18 mmol) et la diamine (**41**) (1,45 g, 3,16 mmol), solubilisés dans un minimum de DMF. Le mode opératoire utilisé est le même que celui utilisé pour le composé (**29**) mais dans ce cas la DCU est éliminée par précipitation dans le dichlorométhane au lieu de l'éther diéthylique. Le composé (**42**) (1,36 g, 1,68 mmol) est isolé après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant CH₂Cl₂/MeOH (97/3) (v/v)).

Formule brute: C₄₆H₇₄N₄O₈

Rendement: 53 %

CCM: R_f=0,41 (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5 (v/v))

ESI-HRMS (haute résolution avec détection en mode positif):

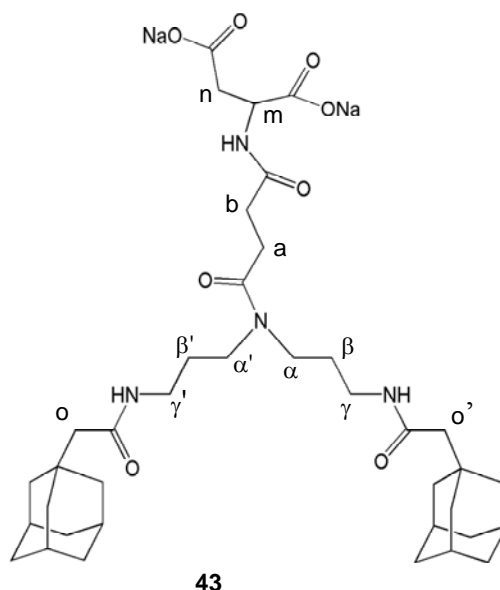
Calculé pour C₄₆H₇₄N₄O₈Na [M+Na]⁺, théorique *m/z* = 833,54044; trouvée *m/z* = 833,5399

Calculé pour C₄₆H₇₄N₄O₈K [M+K]⁺, théorique *m/z* = 849,51437; trouvée *m/z* = 849,5183

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm) 4,65 (m, 1H, (CH)_m), 3,43 (m, 2H, (CH₂)_α ou α'), 3,35 (m, 2H, (CH₂)_α ou α'), 3,27 (m, 2H, (CH₂)_γ ou γ'), 3,14 (m, 2H, (CH₂)_γ ou γ'), 2,84 (dd, 2H, (CH₂)_n), 2,62 (m, 2H, (CH₂)_a ou b), 2,55 (m, 2H, (CH₂)_a ou b), 1,99-1,91 (8H, H (adamantane), (CH₂)_β ou β'), 1,85 (m, 2H, (CH₂)_β ou β'), 1,59-1,74 (28H, H (adamantane)), 1,48 (18H, 6(CH₃))

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm) δ 173,5, 173,2, 172,8, 172,4, 171,6, 170,9 (6 C=O), 53,52,8 (2C, (CH₂)_o et o'), 46,2,43,5 (2C, (CH₂)_α et α'), 44,2-43,8 (C de l'adamantane), 38,8 (1C, (CH₂)_n), 38,1 (C de l'adamantane, (CH₂)_γ ou γ'), 36,9 (1C, (CH₂)_γ ou γ'), 33,7 (1C, (CH₂)_m), 32,2, 29,1 (2C, (CH₂)_a et b), 30-29,8 (C de l'adamantane, (CH₂)_β et β'), 29,4-29,2 (6C, 6(CH₃)), 28,7 (C de l'adamantane)

***N*¹,*N*⁹-bis(adamantylamido)-*N*⁵-((*L*-aspartamido)-succinylamido)-norspermidine de sodium (**43**)**



Le composé (**42**) (1,33, 1,64 mmol) est solubilisé dans un mélange CH₂Cl₂/TFA ((5/5) (v/v)). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 1 heure. Le mélange CH₂Cl₂/TFA est totalement évaporé. Le résidu, repris dans du dichlorométhane, est lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée et avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,1 M) afin d'atteindre un pH entre 1 et 2 pour protoner la fonction acide carboxylique. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif. Le résidu est dispersé dans un mélange EtOH/H₂O ((20/20) (v/v)). Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,3 M) est ajoutée (4,25 mL, mL par mL) pour atteindre un pH entre 8 et 9. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Après centrifugation pour éliminer les insolubles, le mélange EtOH/H₂O est totalement évaporé. Le résidu est solubilisé dans l'eau puis est lyophilisé. Le composé (**43**) est isolé sous forme d'une fine poudre blanche (480 mg).

Formule Brute: C₃₈H₅₆N₄Na₂O₈

Rendement des deux étapes: 50 %

ESI-HRMS (haute résolution avec détection en mode positif):

Calculé pour C₃₈H₅₈N₄O₈Na [M+Na]⁺, théorique *m/z* = 721,41524; trouvée *m/z* = 721,4156

Calculé pour $C_{38}H_{57}N_4O_8Na_2$ $[M-H+2Na]^+$, théorique $m/z = 743,39718$; trouvée $m/z = 743,3983$

Calculé pour $C_{38}H_{56}N_4O_8Na_3$ $[M-2H+3Na]^+$, théorique $m/z = 765,37912$; trouvée $m/z = 765,3813$

RMN 1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) 4,32 (dd, 1H, $(CH)_m$), 3,35 (m, 2H, $(CH_2)_{\alpha}$ ou α'), 3,28 (m, 2H, $(CH_2)_{\alpha}$ ou α'), 3,15 (m, 2H, $(CH_2)_{\gamma}$ ou γ'), 3,09 (m, 2H, $(CH_2)_{\gamma}$ ou γ'), 2,93 (dd, 2H, $(CH_2)_n$), 2,61 (m, 2H, $(CH_2)_a$ ou b), 2,51 (m, 2H, $(CH_2)_a$ ou b), 1,82-1,91 (8H, H (adamantane), $(CH_2)_{\beta}$ ou β'), 1,77 (m, 2H, $(CH_2)_{\beta}$ ou β'), 1,45-1,69 (28H, H (adamantane)),

RMN ^{13}C (D_2O , 100 MHz) δ (ppm) δ 180,2, 179,9, 175,4, 175,3, 175,2 (6C, C=O), 54,3 (1C, $(CH)_m$), 52,7, 51,9 (2C, $(CH_2)_o$ et o'), 47,4, 45,4 (2C, $(CH_2)_{\alpha}$ et α'), 43,9-43,6 (C de l'adamantane), 38,2, 37,9 (2C, $(CH_2)_{\gamma}$ et γ'), 37,7 (C de l'adamantane), 33,7 (1C, $(CH_2)_n$), 32,1, 29,3 (2C, $(CH_2)_a$ et b), 29,9, 29,2 (2C, $(CH_2)_{\beta}$ et β'), 29,8 (C de l'adamanatane)

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a concerné la synthèse et la caractérisation physico-chimique de nouveaux hydrogels physiques à base de hyaluronane modifié chimiquement.

Nous nous étions fixés pour objectifs essentiels d'obtenir différents réseaux tridimensionnels résultant d'interactions multivalentes spécifiques entre des molécules hôtes de β -cyclodextrine et des groupements hydrophobes d'adamantane, chacun étant greffé sur des chaînes de hyaluronane, et d'étudier en détail leur comportement en milieu aqueux.

Nous avons, en premier lieu, fait un rappel des données issues de la littérature afin de mieux situer le contexte de ce travail de thèse.

La première étape de notre travail a consisté à synthétiser les différentes macromolécules hôtes et invitées. Nous avons préparé dans un premier temps des chaînes de polymères sur lesquelles sont greffées au hasard des monomères de β -cyclodextrine (HA(CD)) et des dimères de β -CD (HA(CD)₂) avec des taux de greffage en β -CD similaires pour les deux polymères modifiés (5 %). Dans un deuxième temps, nous avons synthétisé des monomères et des dimères d'adamantane que nous avons aléatoirement greffés sur les chaînes macromoléculaires (HA(AD) et HA(AD)₂ respectivement) avec des taux de greffage identiques (6 %). Il a été nécessaire de développer une méthode de synthèse contrôlée afin d'obtenir des systèmes le mieux définis possible. La plupart des réactions utilisées s'appuient sur des méthodes de couplage chimiosélectives.

La stratégie que nous avons mis en oeuvre repose sur :

- i. l'introduction sélective, par un couplage de type peptidique en milieu aqueux, de groupements hydrazide sur la fonction carboxylate du hyaluronane afin de rendre le polymère plus réactif qu'à l'état initial,
- ii. la préparation de monomères et de dimères acétaliques d'adamantane, et de β -cyclodextrine, qui nécessite une chimie multi-étapes, en particulier la monofonctionnalisation de la β -CD par une fonction acide carboxylique effectuée *via* la formation d'une liaison oxime et des couplages de type peptidique,
- iii. le greffage en milieu aqueux des différents dérivés obtenus sur le hyaluronane qui s'appuie sur la formation d'hydrazones intermédiaires stabilisées par réduction.

L'intégrité des greffons intermédiaires et des macromolécules finales a été vérifiée par une analyse par spectroscopie RMN et par spectrométrie de masse dans le cas des petites molécules.

A l'issue de cette étape de synthèse, nous avons obtenu deux assemblages supramoléculaires originaux se différenciant par la taille et donc l'énergie des jonctions interchaînes (complexes d'inclusion) qui les stabilisent. Les hydrogels sont formés soit de complexes d'inclusion β -CD/AD, soit de paires de complexes d'inclusion β -CD/AD.

Après cette étape, nous avons effectué une analyse physico-chimique détaillée des assemblages supramoléculaires en vue d'établir le lien étroit entre leurs structures et leurs propriétés.

Les techniques physico-chimiques utilisées sont la titration microcalorimétrique qui a permis une analyse thermodynamique des propriétés de complexation et la rhéologie, avec en particulier des mesures de viscosité et des mesures en mode dynamique, permettant d'appréhender le comportement en milieu aqueux.

Les propriétés d'inclusion des monomères et des dimères de β -CD et d'AD libres et greffés sur les chaînes de HA ont été entièrement caractérisées. Il s'avère que le mélange d'un dimère de β -CD avec un dimère d'AD conduit à la formation d'interactions divalentes, ce qui a également été observé avec les polymères modifiés.

Les expériences d'ITC ont mis en évidence une constante d'association remarquablement élevée (15 fois plus importante que pour les monomères) et une enthalpie de liaison deux fois plus importante dans le cas des dimères. L'un des objectifs visant à obtenir des assemblages supramoléculaires stabilisés par des jonctions interchaînes d'énergie plus élevée a donc été atteint. Toutefois, il ressort que la restriction de mobilité due à la chaîne polymère, les répulsions électrostatiques dans le cas du HA(CD) et du HA(CD)₂ complexant les dérivés chargés d'adamantane et la formation d'interactions hydrophobes AD/AD dans le cas du HA(AD)₂, affectent les propriétés de complexation.

Les mesures de viscosité ont mis en évidence la présence d'agrégats *via* la formation d'interactions intra et/ou interchaînes entre les cavités de β -CD pendantes dans le cas du HA(CD). Quant au comportement du HA(CD)₂, il est très proche de celui du hyaluronane précurseur. Concernant les dérivés HA(AD) et HA(AD)₂, un caractère auto-associatif lié à l'établissement d'interactions hydrophobes interchaînes entre les groupements adamantane a été observé. Ces agrégats sont nettement plus importants pour le dérivé HA(AD)₂. Ces agrégats d'origine différente sont tous favorisés lorsque la concentration en sel augmente et nous avons trouvé que la concentration en NaCl optimale pour la formation des assemblages supramoléculaires homogènes recherchés dans ce travail est égale à 0,025 M.

Les mesures en rhéologie dynamique ont permis de mieux comprendre le comportement rhéologique des assemblages supramoléculaires et indiquent notamment que les mélanges HA(AD)/HA(CD) et HA(AD)₂/HA(CD)₂ ont des propriétés viscoélastiques très particulières. Ce sont des réseaux temporaires qui relaxent à basse fréquence et qui ont un comportement de type gel à fréquence élevée. Les deux mélanges ont des propriétés viscoélastiques différentes liées à la nature de la jonction interchaîne. Cependant, les différences de comportement sont moins marquées qu'escompté, ce que nous expliquons par l'effet des chaînes entropiquement défavorables, et par les associations AD/AD dans une moindre mesure, qui contrebalancent la formation des interactions multivalentes entre polymères.

Par ailleurs, les propriétés viscoélastiques de ces réseaux sont sensibles à la variation de différents paramètres externes, comme la force ionique, la concentration en polymère, la température et l'ajout d'une molécule compétitive. Il apparaît que dans la gamme de concentrations utilisées (régime semi-dilué non enchevêtré), les propriétés viscoélastiques en particulier la dynamique des deux types d'hydrogel peuvent être modélisées par le modèle de Rouse collant.

Les différentes expériences mises en œuvre, en particulier pour comprendre l'influence de la concentration en polymères, de la température et de l'ajout de la β -CD libre compétitive, nous ont permis de conclure que ces systèmes constituent de bons modèles. Il ressort deux points essentiels :

- la "force" du gel, caractérisée par le module G' est principalement liée à la concentration en "stickers" introduits sur la chaîne polymère et à la concentration en chaînes polymères,
- la dynamique, caractérisée par le temps de relaxation τ , est contrôlée d'une part, par la vitesse d'échange des complexes d'inclusion définissant leur durée de vie moyenne et par le nombre de jonctions interchaînes efficaces et par la mobilité des chaînes de HA d'autre part.

En outre, l'étude du comportement en écoulement des réseaux a mis en évidence la présence d'un seuil de contrainte apparent.

Il sera intéressant de poursuivre et de développer ce travail dans plusieurs directions.

Afin de compléter l'étude rhéologique que nous avons effectuée et d'apporter des éléments de réponse supplémentaires, il serait intéressant de synthétiser un autre assemblage

supramoléculaire HA(AD)/HA(CD) avec une teneur en β -CD et en AD deux fois moins importante afin d'obtenir un réseau dont la densité de jonctions interchaînes serait la même que celle du mélange HA(CD)₂/HA(AD)₂. La comparaison des propriétés viscoélastiques du mélange HA(AD)/HA(CD) avec celui de HA(AD)₂/HA(CD)₂ comportant la même densité de jonctions potentielles permettrait de mieux évaluer l'effet de l'énergie de jonction sur la force et la dynamique des systèmes. En outre, la comparaison des deux mélanges HA(AD)/HA(CD) possédant des DS différents permettrait de mettre clairement en évidence l'effet de la concentration en "stickers" sur les propriétés viscoélastiques des réseaux.

Par ailleurs, il serait intéressant d'analyser la formation des agrégats β -CD/ β -CD et AD/AD des polymères modifiés seuls en solution aqueuse par diffusion dynamique de la lumière. Cette étude, donnant accès au coefficient de diffusion apparent (donc au rayon hydrodynamique apparent des agrégats), permettrait d'obtenir des renseignements sur la variation du nombre des agrégats avec la concentration en polymère ainsi que sur le processus d'agrégation. De plus, il serait ainsi possible de comprendre dans quelles mesures la présence et les caractéristiques de ces agrégats sont modifiées par des paramètres physiques ou chimiques tels que la concentration en sel, l'ajout de molécules compétitives...

La RMN ¹H à l'état solide des hydrogels pourrait également permettre d'obtenir des informations sur la mobilité des chaînes, sur la dynamique d'échange des complexes et sur le nombre de complexes d'inclusion liés, c'est à dire le nombre de jonctions effectives.

Par ailleurs, la préparation de structures multicouches par immobilisation des molécules et des macromolécules hôtes sur des surfaces d'or suivie de l'interaction avec des molécules invitées est en cours.

Ces hydrogels physiques, qui combinent à la fois les propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes du hyaluronane et les propriétés spécifiques de complexation de la β -CD, offrent d'intéressantes perspectives dans les domaines biomédical et pharmaceutique. De plus, ces hydrogels, issus du simple mélange en milieu aqueux des polymères hôtes et invités, présentent des caractéristiques valorisables dans le domaine de l'ingénierie tissulaire où ils pourraient servir de matrices tridimensionnelles se formant *in situ*, permettant le développement, la prolifération des cellules vivantes et ainsi la reconstruction de tissus malades. Ils pourraient également être utilisés en tant qu'agents pour la viscosupplémentation et en tant que systèmes stimulables permettant la libération contrôlée de principes actifs. Il serait donc très intéressant et très prometteur d'envisager des essais biologiques.

PUBLICATIONS :

Charlot, A.; Auzély-Velty, R.; Rinaudo. M. (2003) **Specific interactions in model charged polysaccharide systems**, *J. Phys. Chem. B*, 107, 8248-8254.

Kriz, Z.; Koca, J.; Imberty, A.; Charlot, A.; Auzély-Velty, R. (2003) **Investigation of the complexation of (+)-catechin by beta-cyclodextrin by the combination of NMR, microcalorimetry and molecular modeling techniques**, *Org. Biomol. Chem.* 1, 2590-2595.

Aurélia Charlot, Alain Heyraud, Pierre Guenot, Marguerite Rinaudo and Rachel Auzély-Velty (2005) **Controlled synthesis and inclusion ability of a hyaluronic acid derivative bearing β -cyclodextrin molecules** (soumis)

Deux autres publications portant sur les travaux de thèse sont en préparation :

β -cyclodextrins dendrons: grafting to a polysaccharide and complexation properties

Novel hyaluronan-based supramolecular assemblies stabilized by multivalent specific interactions: synthesis and behavior in aqueous solution

ANNEXES

LISTE DES ACRONYMES ET DES ABREVIATIONS

A	AD	adamantane
	ADAc	sel de sodium d'acétate d'adamantane
	ADH	acide adipique dihydrazide
	AFM	Atomic Force Microscopy
C	CCM	Chromatographie sur Couche Mince
	CBz	benzyloxycarbonyle
	α -CD	α -cyclodextrine
	β -CD	β -cyclodextrine
	γ -CD	γ -cyclodextrine
	CGTase	Cyclodextrine GlucosylTransférase
	chit	chitosane
	CMC	Concentration micellaire critique
	Con A	Concanavaline A
	COSY	COrelated Spectroscopy
D	DCC	dicyclohexylcarbodiimide
	DCU	dicyclohexylurée
	DEPT-135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
	DIC	diisopropylcarbodiimide
	DIEA	diisopropyléthylamine
	DIU	diisopropylurée
	dimère	dérivé bifonctionnalisé
	DMF	diméthylformamide
	DMP	Dess-Martin Périodinane
	DMSO	diméthylsulfoxyde
	DP	degré de polymérisation
	DS	degré de substitution
	E	EDC
EIS		Electrochemical Impedance Spectroscopy
éq.		équivalent
ESI		Electron Spray Ionisation
ESR		Electron Spin Resonance
G	GlcA	acide glucuronique
	GlcNAc	N-acétylglucosamine
H	HA	hyaluronane
	HA(AD)	hyaluronane porteur de monomères d'adamantane
	HA(AD) ₂	hyaluronane porteur de dimères d'adamantane
	HA-ADH	hyaluronane porteur de groupements hydrazide
	HA(CD)	hyaluronane porteur de monomères de β -cyclodextrine
	HA(CD) ₂	hyaluronane porteur de dimères de β -cyclodextrine
	HEUR	Hydrophobic Ethoxylated URethane
	HMPAM	Hydrophobically Modified Polyacrylamides

	HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
	HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	ITC	Isotherm Thermodynamic Calorimetry
	IgG	immunoglobuline
L	LA	acide lactique
	LCST	Low Critical Solution Temperature
M	MBAA	<i>N,N'</i> -méthylènebisacrylamide
	Me	méthyl
	monomère	dérivé monofonctionnel
N	NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
	NHS.SO ₃	<i>N</i> -hydroxysulfosuccinimide
	NSA	<i>N</i> -succinimidyle
P	PAA	acide poly(acrylique)
	PANa	poly(acrylate) de sodium
	PCL	poly(ϵ -caprolactone)
	Ph	phényle
	PLA	acide poly(lactique)
	PLGA	acide poly(lactique- <i>co</i> -glycolique)
	PMA	acide poly(méthacrylique)
	PNIPAAm	<i>N</i> -isopropylacrylamide
	POEP	poly(oxyde d'éthylène- <i>co</i> -oxyde de propylène)
	POE	poly(oxyde d'éthylène)
	poly(HEMA)	poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate)
	POP	poly(oxyde de propylène)
	ppm	partie par million
R	réf.	référence
	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
	ROESY	Rotational nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
S	SEC	Size Exclusion Chromatography
	SPR	Surface Plasmon Resonance
	sol	solution
T	TFA	acide trifluoroacétique
	TOCSY	TOTAL Correlation Spectroscopy
	TOF	Time Of Flight
	TPA	3-(triméthylsilyl) propionique
	TPPI	Time Proportional Phase Increment
U	UV	ultraviolet
X	XPS	X Ray Photoelectron Spectroscopy

LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES

a_t	facteur de translation horizontale pour la superposition temps-température
B	facteur de fréquence
b_c	facteur de translation verticale pour la superposition temps-concentration
C	concentration en polymère
C_e	concentration à partir de laquelle les enchevêtrements sont élastiquement effectifs
C_{sel}	concentration ionique totale
C^*	concentration critique de recouvrement
C^{**}	concentration qui marque le début du régime concentré
d	doublet
dd	doublet dédoublé
E_a	énergie d'activation
G'	module de stockage (ou de conservation)
G''	module de perte
G^*	module de rigidité complexe
G_0	module au plateau
K_a	constante d'association de la complexation
k	constante de Boltzmann
k'	constante de Huggins
L	ligand
L_p	longueur de persistance intrinsèque
m	multiplet
M	masse molaire du polymère
n	stœchiométrie de la complexation
Q	chaleur totale dégagée
R	constante des gaz parfaits
R_G	rayon de giration de la chaîne
s	singulet
T	température
t	triplet

t	temps
τ_h	taux d'hydratation
ΔH°	variation d'enthalpie standard de la complexation à 298 K et à 1 bar
ΔS°	variation d'entropie standard de la complexation
ΔG°	variation d'énergie libre standard de la complexation
δ	déplacement chimique
$\dot{\gamma}$	vitesse de cisaillement
η	viscosité de la solution
η_{red}	viscosité réduite
η_{rel}	viscosité relative
η_{sp}	viscosité spécifique
η_0	viscosité du solvant
$[\eta]$	viscosité intrinsèque
$ \eta^* $	viscosité complexe
σ	contrainte
σ^*	contrainte complexe
ε	temps infiniment petit
γ	déformation
γ^*	déformation complexe
ρ	masse volumique
τ	temps de relaxation
ω	fréquence angulaire

LISTE DES FIGURES

Figure I- 1 : Représentation schématique de réseaux polymère dans lesquels les interactions interchaînes agissent de façon non coopératives (A) et coopératives (B).....	12
Figure I- 2 : Formation de jonctions physiques due à la transition pelote → hélice induite par la température d’après la revue de Bromberg et coll. [2].....	13
Figure I- 3 : Structure tridimensionnelle vue de côté (à gauche) et de haut (à droite) d’un dimère “coiled-coil” déterminée par modélisation. Les segments jaunes représentent le squelette hélicoïdal et les boules blanches représentent les chaînes secondaires dans le noyau hydrophobe, d’après Yu et coll. [5].....	14
Figure I- 4 : Mécanisme de formation de l’hydrogel. Par une variation de température et de pH, les domaines “coiled-coil” se dissocient, impliquant la dissociation des jonctions physiques d’après Xu et coll. [7].....	15
Figure I- 5 : Représentation du mélange d’un polymère hydrosoluble avec un polymère insoluble dans l’eau conduisant à la formation d’un hydrogel stabilisé par des liaisons hydrogène d’après Percec et coll. [36].....	20
Figure I- 6 : Mécanisme de gonflement suggéré après addition d’antigène libre, d’après Miyata et coll. [38].....	21
Figure I- 7 : Représentation schématique de la transition sol-gel en présence de glucose libre d’après Lee et coll. [40].....	22
Figure I- 8 : Synthèse d’hydrogels stabilisés par la formation de stéréocomplexes d’après Hennink et coll. [47].....	23
Figure I- 9 : Développement des cellules vivantes dans la matrice soit <i>in vivo</i> soit <i>in vitro</i> suivi de son introduction dans l’organisme pour la reconstruction des tissus, d’après Marler et coll. [66].....	27
Figure I- 10 : Illustration schématique des deux approches concernant la pratique de l’ingénierie tissulaire, d’après Lee et coll. [63].....	28
Figure I- 11 : Structure chimique et dimensions des cavités de l’ α , de la β et de la γ -cyclodextrine.....	29
Figure I- 12 : Représentation schématique de la complexation entre dimères de structure chimique différente.....	34
Figure I- 13 : Structure possible d’un polypseudorotaxane (A), d’après Meier et coll. [106] et d’un polyrotaxane (B), d’après Nepogodiev et coll. [105].....	35
Figure I- 14 : Représentation schématique des interactions entre les polymères de β -CDs et des POE fonctionnalisés aux deux extrémités par des groupements AD (A) et des polymères amphiphiles porteurs de groupements AD (B) d’après, Amiel et coll. [129,130].....	37

Figure I- 15 : Représentation schématique de l'assemblage supramoléculaire, d'après Ikeda et coll. [133].....	37
Figure I- 16 : Représentation schématique de l'interaction entre les bicouches de CDs et le polymère porteur de groupements hydrophobes d'après, Ravoo et coll. [134].....	39
Figure I- 17 : Architectures des monocouches de CDs adsorbées sur une surface d'or d'après de Jong et coll. [139].....	39
Figure I- 18 : Différentes architectures à base de monocouches de β -CDs adsorbées sur une surface d'or impliquant des interactions multivalentes, d'après Reinhoudt et coll. [142,143]... ..	40
Figure I- 19 : Représentation schématiques des hydrogels obtenus par interactions entre les α -CDs et les polysaccharides porteurs de POE d'après Huh et coll. [148].....	42
Figure I- 20 : Modulation des propriétés physiques des hydrogels à base de poly(ϵ -lysine) et de TPA par variation de la température ou/et du pH d'après Choi et coll. [153,154].....	43
Figure I- 21 : Unité de répétition disaccharidique du HA.....	46
Figure I- 22 : Structure secondaire du HA dans (a) du DMSO et (b) du DMSO contenant de l'eau.....	47
Figure II- 1 : Dérivé du HA porteur de groupements hydrazide.....	73
Figure II- 2 : β -CD monosubstituée par une fonction acide carboxylique ou par une fonction aldéhyde.....	73
Figure II- 3 : Dérivé carboné "biantenné" intermédiaire (a) permettant l'obtention de dimères de β -CD et d'AD possédant une fonction aldéhyde (b).....	73
Figure II- 4 : Principaux sites pour la modification chimique sélective du hyaluronane.....	76
Figure II- 5 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, 353 K, D_2O , 6 mg/mL) du dérivé HA-ADH (8)...	81
Figure II- 6 : Carte COSY (400 MHz, 353 K, D_2O , 20 mg/mL) du dérivé HA-ADH (8).....	82
Figure II- 7: Spectre de masse basse résolution ESI en mode positif du produit brut solubilisé dans $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ issu de l'oxydation de la β -CD avec les conditions décrites dans la littérature.....	85
Figure II- 8: Chromatogramme d'exclusion stérique du produit brut issu du couplage entre la β -CD oxydée par la DMP et la <i>O</i> -(carboxyméthyl)hydroxylamine ; (éluant : NaNO_3 , 0,05 M).. ..	88
Figure II- 9: Spectre RMN ^1H (400 MHz, 298 K, D_2O , 6 mg/mL) de la β -CD monoacétal (18)	90

Figure II- 10: Agrandissement de la carte TOCSY (400 MHz, 298 K, D ₂ O, 20 mg/mL, t _m =100 ms) de la β-CD monoacétal (18).....	91
Figure II- 11 : Agrandissement de la carte HMQC de la β-CD monoacétal (100 MHz, 298 K, D ₂ O, 20 mg/mL).....	91
Figure II- 12 : Spectre de masse basse résolution ESI de la β-CD monoacétal dans CH ₃ OH/H ₂ O (1/1) avec détection en mode positif.....	92
Figure II- 13: Amas isotopiques expérimentaux (a) et leur agrandissement (b), et amas isotopiques théoriques (c) de l'ion [M+Na] ⁺ de la β-CD monoacétal (18).....	93
Figure II- 14 : Représentation schématique des dimères de β- cyclodextrine (a) et d'adamantane (b) ; les fonctions aldéhyde signalées sur (a) et (b) permettront le greffage covalent sur le polymère.....	94
Figure II- 15 : Structure de la norspermidine.....	94
Figure II- 16: Inéquivalence magnétique des deux branches (a) et (a') du composé (23).....	97
Figure II- 17 : Agrandissement de la carte HMQC du composé (23) (400 MHz, 298K, CDCl ₃ , 20 mg/mL).....	97
Figure II- 18 : Agrandissement des spectres RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , 6 mg/mL) du composé (23) sur la gamme de 1,5 à 3,5 ppm à 298 K (a) et à 353 K (b).....	99
Figure II- 19: Spectre RMN ¹ H du dimère de β-CD (27) (400 MHz, 298 K, D ₂ O, 6mg/mL)....	102
Figure II- 20 : Spectre de masse basse résolution ESI en mode positif du composé (27) dans CH ₃ OH/H ₂ O (1/1).....	103
Figure II- 21 : Amas isotopique expérimentaux (a) et leur agrandissement (b), et amas isotopiques théoriques (c) de l'ion [M+2Na] ⁺⁺ du dimère de β-CD (27).....	104
Figure II- 22 : Monomère de β-CD et dimère de β-CD possédant une fonction aldéhyde obtenus après déprotection de la β-CD monoacétal (18) et du dimère de β-CD (27).....	106
Figure II- 23: Spectres RMN ¹ H (400 MHz, 353 K, D ₂ O, 6 mg/mL) du dérivé HA(CD) (spectre (A)) et du dérivé HA(CD) ₂ (spectre (B)).....	110
Figure II- 24 : Monomère d'adamantane (34) et dimère d'adamantane (35) possédant une fonction aldéhyde.....	111
Figure II- 25 : Spectres RMN ¹ H (400 MHz, 353 K, D ₂ O, 6 mg/mL) du dérivé HA(AD) (spectre (A)) et du HA(AD) ₂ (spectre (B)).....	115
Figure II- 26 : Représentation schématique de l'introduction de charges sur les molécules à base d'adamantane.....	117

Figure II- 27 : Structure chimique du sel de sodium de l'acétate d'adamantane (ADAc)....	118
Figure II- 28 : Représentation schématique des différents polymères hôtes et invités à base de hyaluronane.....	121
Figure III- 1 : Complexes de type hôte-invité formé en milieu aqueux entre les différents monomères de β -CD et l'ADAc.....	134
Figure III- 2 : Addition de l'ADAc sur les différentes molécules de β -CD.....	136
Figure III- 3 : Titration calorimétrique d'une solution de β -CD naturelle (9) (0,798 mM) par une solution d'acétate d'adamantane (38) (8,807 mM) (addition de 24 aliquots) dans l'eau à 25°C- Expériences effectuées sur le calorimètre CSC 4200 de Calorimetry (cf chapitre IV).....	136
Figure III- 4 : Contours partiels de la carte T-ROESY du dérivé β -CD monoacétal (18) (400 MHz, D ₂ O, 298 K, 20 mg/mL, $t_m = 150$ ms).....	140
Figure III- 5 : Titration calorimétrique du dimère de β -CD (27) par l'ADAc (38) (expérience A) et par le dimère d'AD (38) (expériences B-a et B-b) dans l'eau à 25°C. Expériences effectuées avec le calorimètre VP-ITC de Microcal.....	142
Figure III- 6 : Spectres RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O, 298 K, 6 mg/mL) partiels (A) du complexe dimère de β -CD/monomère d'AD, (B) du complexe dimère de β -CD/dimère d'AD, (A') de l'ADAc et (B') du dimère d'AD.....	146
Figure III- 7 : Signaux RMN (500 MHz, D ₂ O, 298 K, 6 mg/mL) des 2 protons de la double liaison (i et i') du dimère de β -CD seul (spectre (C)), en présence du monomère d'AD (spectre (B)) et en présence du dimère d'AD (spectre (A)) avec [AD] = [CD].....	147
Figure III- 8 : Structure tridimensionnelle du complexe divalent "idéal" entre le dimère de β -CD et celui d'AD.....	149
Figure III- 9 : Titration d'une solution de polymère HA(CD) par une solution d'ADAc (expérience C) et d'une solution de β -CD naturelle par une solution d'ADAc (expérience D)..	150
Figure III- 10 : Titration d'une solution de dimère de β -CD (27) par une solution de dimère d'AD (43) (expérience B), d'une solution de HA(CD) par une solution d'ADAc (expérience C), d'une solution de HA(CD) ₂ par une solution d'ADAc (expérience E) et d'une solution de HA(CD) ₂ par une solution de dimère d'AD (expérience F) à 25°C.....	152
Figure III- 11 : Titration d'une solution de polymère HA(AD) par une solution de β -CD...	154
Figure III- 12 : Titration calorimétrique d'une solution de HA(AD) ₂ (37) par une solution de β -CD libre (30 additions de 10 μ L) (38) (expérience H) et de dimère de β -CD (43) (expérience I) dans NaCl 0,025 M à 25°C.....	155

Figure III- 13 : Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour des solutions de HA initial, HA-ADH, HA(CD) ₂ et HA(CD) dans NaCl 0,1 M à 25°C.....	158
Figure III- 14: Variation de la viscosité newtonienne en fonction de la concentration d'une solution de HA dans NaCl 0,025 M et 0,1 M à 25°C.....	159
Figure III- 15 : Variation de la viscosité spécifique en fonction de la concentration du HA dans NaCl 0,025 M (A) et dans NaCl 0,1 M (B) à 25°C.....	160
Figure III- 16 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement du HA(CD) (A) et du HA(AD) (B) dans NaCl 0,025 M à 25°C.....	161
Figure III- 17 : Variation de la viscosité au plateau Newtonien en fonction de la concentration en polymère pour le HA(CD), le HA(AD) et le HA initial dans NaCl 0,025 M (A) et dans NaCl 0,1 M (B) à 25°C.....	162
Figure III- 18 : Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour une solution de HA(AD) ₂ , HA(AD), HA initial, HA(CD) ₂ et HA(CD) à 7 g/L dans NaCl 0,025 M à 25°C.....	164
Figure III- 19 : Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour une solution de HA(AD) ₂ à 7 g/L dans NaCl 0,025 M à 25°C après différents temps d'attente (<i>t</i>).....	166
Figure III- 20 : Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour une solution de HA(AD) ₂ à 7 g/L dans NaCl 0,025 M et 0,1 M à 25°C...	166
Figure III- 21: Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour une solution de HA(AD) ₂ à 7 g/L dans NaCl 0,025 M à différentes températures.....	167
Figure III- 22 : Photographies et représentation schématique des solutions de HA(CD) et de HA(AD) seuls et de l'assemblage supramoléculaire résultant du mélange de ces 2 polymères modifiés à T° ambiante.....	170
Figure III- 23 : Représentation schématique du réseau tridimensionnel HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂ ...	170
Figure III- 24 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour le HA natif à 30 g/L et pour le mélange HA(AD)/HA(CD) à 10 g/L dans NaCl 0,025 M à 25°C.....	173
Figure III- 25 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour les mélanges HA(AD)/HA(CD) et HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂ à 10 g/L dans NaCl 0,025 M à 25°C.....	175
Figure III- 26 : Variations des modules G' et G'' en fonction de la fréquence à différentes concentrations en polymère et courbes maîtresses obtenues après superposition pour les mélanges HA(AD)/HA(CD) (A et A') et HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂ (B et B') ([AD] = [CD]) dans NaCl 0,025 M à 25°C (courbe de référence 7 g/L soit 0,015 monomol/L pour les 2 mélanges).	177

Figure III- 27 : Dépendance du module G' (correspondant au point d'intersection entre G' et G'') avec la concentration en polymère pour les mélanges HA(AD)/HA(CD) et HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂ dans NaCl 0,025 M à 25°C.....	179
Figure III- 28 : Variation des modules G' et G'' avec la température pour les mélanges HA(AD)/HA(CD) (A) et HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂ (B) à une concentration totale de 10 g/L avec [AD] = [CD] dans NaCl 0,025 M à une fréquence de 1 Hz.....	180
Figure III- 29 : Variations des modules G' et G'' en fonction de la fréquence à différentes températures pour HA(AD)/HA(CD) (A) et pour HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂ (B) à 10 g/L ([AD] = [CD]) dans NaCl 0,025 M à 25°C ; courbes maîtresses obtenues (A' et B') et variations de $\ln(a_t)$ en fonction de $1/T$ (C).....	181
Figure III- 30 : Variation de l'énergie d'activation en fonction de la concentration pour des HA de masses molaires différentes, reproduction de la réf. [69].....	185
Figure III- 31 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour les systèmes HA(AD)/HA(CD) (A) et pour HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂ (B) ($C = 0,015$ monomol/L = 7 g/L, [AD] = [CD]) seuls et en présence de β -CD libre ajoutée à différentes concentrations et courbes maîtresses obtenues après superposition ((A') et (B')) ; solvant, NaCl 0,025 M à 25 °C, courbe de référence 0 éq. CD.....	187
Figure III- 32 : Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour HA(AD)/HA(CD) et HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂ avec $C = 0,015$ monomol/L soit 7 g/L dans NaCl 0,025 M à 25°C.....	190
Figure III- 33 : Effet du temps sur la variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour les systèmes HA(AD)/HA(CD) (A) et HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂ (B) à $C = 0,015$ monomol/L dans NaCl 0,025 M à 25°C.....	191
Figure III- 34 : Variation de la contrainte de cisaillement en fonction du gradient de cisaillement pour HA(AD)/HA(CD) (A) et pour HA(AD) ₂ /HA(CD) ₂ à $C = 0,015$ monomol/L ([AD] = [CD]) à différentes températures dans NaCl 0,025M.....	192
Figure IV- 1 : Influence de la concentration des polymères en solution.....	213
Figure IV- 2 : Schéma du rhéomètre LS 30.....	215
Figure IV- 3 : Schéma du rhéomètre AR 1000.....	216
Figure IV- 4 : Schéma du dispositif d'ITC.....	220

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II- 1: Pourcentages molaires de β -CD initiale, de dérivés mono-, di-, et trialdéhydiques calculés à partir des spectres de masse en fonction du rapport molaire initiale DMP/(β -CD) ; réactions effectuées dans le DMSO anhydre pendant 45 minutes à température ambiante.....	86
Tableau II- 2 : Résumé des conditions expérimentales (en équivalent molaire) utilisées pour la synthèse des dimères de β -CD (27) et d'adamantane (29).....	101
Tableau II- 3 : Récapitulatif des conditions utilisées pour la synthèse du HA(CD) et du HA(CD) ₂	108
Tableau II- 4 : Récapitulatif des conditions expérimentales utilisées pour la synthèse des dérivés HA(AD) a) et HA(AD) ₂ b).....	114
Tableau III- 1 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par des expériences d'ITC en titrant des solutions de β -CD, de β -CD monoacide (16) et de β -CD monoacétal (18) par une solution d'ADAc à 25°C dans deux concentrations en NaCl différentes, 0 M et 0,1 M.....	137
Tableau III- 2 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par les expériences d'ITC A, B-a et B-b.....	143
Tableau III- 3 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par la titration d'une solution de dimère d'AD par une solution de dimère de β -CD.....	145
Tableau III- 4 : Energie d'interaction déterminées par modélisation moléculaire pour différents types de structure (précisions estimées à 10%).....	148
Tableau III- 5 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par des expériences d'ITC en titrant des solutions de HA(CD) (C) et de β -CD (D) par l'ADAc à 25°C.....	150
Tableau III- 6 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par les expériences d'ITC B-b, C-b, E, F-a, F-b et F-c.....	152
Tableau III- 7 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par des expériences ITC en titrant une solutions de HA(AD) par une solution de β -CD à 25°C.....	154
Tableau III- 8 : Grandeurs thermodynamiques obtenues par les expériences d'ITC H et I..	155
Tableau III- 9 : Concentration critique de recouvrement du HA, HA-ADH, HA(CD) et HA(CD) ₂	159
Tableau III- 10 : Lois d'échelle prévues pour la rhéologie des polymères associatifs en régime semi-dilué non-enchevêtré et enchevêtré.....	172
Tableau III- 11 : Constantes d'association et nombre de complexes de β -CD/AD déterminés à différentes températures.....	183

Tableau III- 12 : Energies d'activation déterminées pour différents systèmes ($1 \text{ kT} = 2,5 \text{ kJ/mol}$) (la précision des mesures est estimée à 5 %)..... 184

LISTE DES SCHEMAS

Schéma II- 1 : Produits obtenus et mécanisme de la réaction entre le HA et l'EDC en présence d'une amine.....	78
Schéma II- 2 : Synthèse du dérivé HA-ADH (8).....	79
Schéma II- 3 : Réactions conduisant au dérivé monoaldéhydique de la β -CD s'appuyant sur l'intermédiaire monotosylate.....	84
Schéma II- 4 : Oxydation de la β -CD naturelle par le réactif de Dess-Martin conduisant à un dérivé monoaldéhydique de la cyclodextrine.....	85
Schéma II- 5: Synthèse de la 6 ¹ -(<i>O</i> -carboxyméthoxy-imino)-6 ¹ -désoxy-cyclomaltoheptaose ou β -CD monoacide ((16) avec n=1).....	87
Schéma II- 6 : Synthèse de 6 ¹ -[<i>O</i> -((<i>N</i> -(2,2 diméthoxyéthyl)-amidométhoxy)-imino)]-6 ¹ -désoxy-cyclomaltoheptaose ou β -CD monoacétal (18).....	89
Schéma II- 7 : Préparation du squelette carboné “ biantenné ”, conditions : a) CH ₂ Cl ₂ , TA, 48h ; b) pyridine, CH ₂ Cl ₂ , TA, 1h ; c) Et ₃ N, HOBt, DCC, DMF, TA, 48h ; d) Pd/C, H ₂ , TA, 3h. Abréviations : Cbz, benzyloxycarbonyle	95
Schéma II- 8: Formules limites de résonance.....	98
Schéma II- 9 : Synthèse des dimères de β -CD (27) et d'adamantane (29), conditions : a) DIC, HOBt, DMF, TA, 24h ; b) Et ₃ N, DCC, HOBt, DMF, TA, 48h.....	100
Schéma II- 10: Synthèse des dérivés HA(CD) (32) a) et HA(CD) ₂ (33) b).....	107
Schéma II- 11: Synthèse des dérivés HA(AD) (36) a) et HA(AD) ₂ (37) b).....	113
Schéma II- 12 : Préparation du dimère d'adamantane soluble dans l'eau, conditions : a) Et ₃ N, HOBt, DCC, DMF, TA, 36h; b) Pd/C, H ₂ , MeOH, TA, 3h ; c) Et ₃ N, HOBt, DCC, DMF, TA, 36h ; d) CH ₂ Cl ₂ /TFA puis NaOH, TA, 12h. Abréviations : Cbz, benzyloxycarbonyle.....	119
Schéma III- 1 : Représentation schématique d'une solution constituée uniquement d'interactions divalentes (à gauche) et constituée de différentes interactions concomitantes (à droite).....	142

Assemblages supramoléculaires à base de hyaluronane modifié chimiquement : synthèse et caractérisation physico-chimique

Les travaux décrits dans ce mémoire sont consacrés à la synthèse et à la caractérisation physico-chimique de nouveaux assemblages supramoléculaires à base d'un polysaccharide d'origine naturelle, le hyaluronane (HA).

Les assemblages résultent du mélange de deux polymères complémentaires et plus précisément de l'établissement d'interactions multivalentes spécifiques entre des molécules hôtes, les β -cyclodextrines (β -CD) et des molécules invitées, des groupements hydrophobes d'adamantane (AD), greffés sur les chaînes de HA.

Afin d'évaluer l'influence de l'énergie de jonction sur la stabilité des réseaux, deux systèmes de structure différente ont été préparés. Les assemblages sont stabilisés soit, par la formation de complexes d'inclusion simples β -CD/AD, soit par des paires de complexes d'inclusion.

Des expériences de titration calorimétrique ont permis une analyse détaillée des propriétés d'inclusion des molécules et des macromolécules hôtes et invitées. Le comportement en milieu aqueux des polymères modifiés seuls et les propriétés viscoélastiques des mélanges ont été étudiés par des mesures rhéologiques en écoulement et en régime dynamique.

Ces assemblages sont sensibles à la variation de paramètres externes tels que la force ionique, la concentration en polymères, la température et l'ajout de molécules hôtes compétitives. Ce sont des réseaux temporaires dont la dynamique est gouvernée principalement par le nombre et la vitesse d'échange des complexes d'inclusion efficaces et par la mobilité des chaînes de HA.

MOTS CLES : complexes d'inclusion, cyclodextrine, hyaluronane, hydrogels physiques, polysaccharides, rhéologie, RMN, titration calorimétrique

Supramolecular assemblies based on chemically modified hyaluronan : Synthesis and physical-chemistry characterization

The work described in this manuscript deals with the synthesis and the physical-chemistry characterization of new supramolecular assemblies based on a natural polysaccharide, hyaluronan (HA).

The assemblies result from the blend of complementary modified polymers and more precisely from specific multivalent interactions between host molecules, β -cyclodextrins (β -CD) and guest molecules, hydrophobic adamantanes (AD), each being grafted on HA chains.

Two different systems were prepared to estimate the influence of the junction energy. The resulting mixtures are stabilized either by single inclusion β -CD/AD complexes or by pairs of inclusion complexes.

Calorimetric titration experiments allowed to analyse the inclusion properties of host and guest molecules and macromolecules. The aqueous behaviour of modified polysaccharides and the viscoelastic properties were studied by flow and dynamic rheology.

These assemblies are sensitive to external parameters such as salt concentration, polymer concentration, temperature and addition of competitive host molecules. They are transient networks and their dynamic is mainly controlled by the number and the exchange rate of effective inclusion complexes as well as by the mobility of HA chains.

KEYWORDS : calorimetric titration, cyclodextrin, hyaluronan, inclusion complexes, NMR, physical hydrogels, polysaccharides, rheology