



HAL
open science

**SYSTEMES ASSOCIATIFS A BASE D'ACIDE
HYALURONIQUE MODIFIE : SYNTHESE ET
ETUDE DES RELATIONS
STRUCTURE/PROPRIETES RHEOLOGIQUES**

Shirin Kadi

► **To cite this version:**

Shirin Kadi. SYSTEMES ASSOCIATIFS A BASE D'ACIDE HYALURONIQUE MODIFIE :
SYNTHESE ET ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE/PROPRIETES RHEOLOGIQUES.
Polymères. Université de Grenoble, 2007. Français. NNT : . tel-00734126

HAL Id: tel-00734126

<https://theses.hal.science/tel-00734126>

Submitted on 20 Sep 2012

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

Shirin Kadi

SYSTEMES ASSOCIATIFS A BASE D'ACIDE HYALURONIQUE MODIFIE : SYNTHESE ET ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE/PROPRIETES RHEOLOGIQUES

Soutenue publiquement le 5 Décembre 2007

COMPOSITION DU JURY :

Catherine Picart	Rapporteur
Jean-François Tassin	Rapporteur
Eric Saint-Aman	Examineur
John Kavanagh	Examineur
Rachel Auzély-Velty	Directeur de Thèse
Anthony Brésin	Co-Directeur de Thèse
Marguerite Rinaudo	Membre Invité

Thèse préparée au sein du
CENTRE DE RECHERCHES SUR LES MACROMOLECULES VEGETALES,
CERMAV-CNRS, GRENOBLE

Le travail est indispensable au bonheur de l'homme ; il l'élève, il le console ; et peu importe la nature du travail, pourvu qu'il profite à quelqu'un : faire ce qu'on peut, c'est faire ce qu'on doit.

[Alexandre Dumas, fils]

À mes parents,

À mon frère,

Ces travaux sont le fruit d'une collaboration CIFRE entre le CERMAV, laboratoire propre du CNRS à l'Université Joseph Fourier à Grenoble et A-R-D l'industrie Agro-alimentaire Recherche et Développement à Pomacle. Je remercie l'ancien directeur du CERMAV, Serge Pérez, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, ainsi que l'actuel directeur, Rédouane Borsali. Je remercie aussi tout particulièrement Monsieur Yvon Le Henaff, président directeur général d'ARD.

C'est avec une grande sincérité que je remercie Anthony Bresin, co-directeur de thèse pour m'avoir confié ce projet. Merci pour votre accueil au sein de l'entreprise A-R-D, merci de m'avoir fait partager et transmis vos connaissances et votre expérience. Merci aussi à toute l'équipe du département Fermentation à A-R-D.

J'adresse tout particulièrement mes sincères remerciements et ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Rachel Auzély-Velty qui, pendant ces cinq années a su me faire profiter de ses nombreuses connaissances et qui m'a fait confiance pour mener à bien ce projet. Je la remercie particulièrement pour sa disponibilité lors de la rédaction de ce manuscrit malgré un emploi de temps chargé. C'était un réel plaisir de travailler avec toi...

Je tiens tout particulièrement à remercier Mme Rinaudo, qui a toujours répondu présente lorsque je demandais conseil, que ce soit pour des discussions concernant des résultats expérimentaux ou lors de la rédaction du manuscrit. Je tiens à lui exprimer mes plus vifs remerciements pour son implication dans ma recherche d'emploi. Merci aussi pour m'avoir guidé et enseigné les polymères et pour m'avoir soutenu constamment tout au long de ces années.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Catherine Picart et Jean-François Tassin qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'examiner et de juger ce travail. J'adresse également mes sincères remerciements à Eric Saint-Aman

d'avoir examiné ce travail de thèse et d'en avoir présidé le jury. Je remercie tout particulièrement John Kavanagh qui a accepté de se déplacer depuis l'Irlande pour me faire l'honneur d'assister à la soutenance et de juger ce travail avec une approche plus industrielle.

Je tiens à remercier Karim Mazeau pour la modélisation moléculaire et pour son soutien lors de moments difficiles. Merci de m'avoir initié au monde des polymères et de la modélisation moléculaire lors de mon stage de licence de chimie, il y a déjà sept années... Je n'oublierais pas les différentes pauses café ! ☺

Un grand merci à Eric Bayma pour son aide du point de vue technique, il a toujours fait de son mieux pour résoudre au plus vite les problèmes techniques et il a toujours été présent pour proposer son aide... merci beaucoup.

Je Remercie aussi Philippe Colin-Morel pour m'avoir formé à la GPC.

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 Martine Broué, Martine Morales, Magali Gardes, Patrick Perez ainsi que Isabelle Jeacomine pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Pendant ces années, j'ai également pu apprécier la présence de nombreuses personnes qui ont fait que je n'oublierai pas les bons moments passés au CERMAV... Je vais commencer par les jeunes docteurs... Lemonia (au sourire et à la sagesse inoubliable, je te souhaite un avenir professionnel à la hauteur de tes qualités), Marie (Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite en Australie), Jimmy (le sang chaud d'Amérique du sud coule en toi !, je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite famille et peut être à bientôt si nos chemins professionnels se croisent un jour !), Sophie (Ce n'était pas facile tout les jours

pour toi et pourtant tu y est arrivé avec succès... comme quoi tout passe... j'espère que nous resterons longtemps en contact...), Caroline (Miss So chic So glams So Fashion So Good So Great So News So Beautiful So Famous So Class So It's you Carlyne Air line ! ;)) Je ne pense pas pouvoir t'oublier un jour ... je te souhaite de trouver ton chemin qui te permettra enfin de t'épanouir. Lina, bientôt Docteur, j'attends ce moment avec impatience pour partager ce moment de bonheur et de fierté avec toi ! Courage pour ces derniers mois et comme je l'ai dit précédemment tout passe...

Maintenant je vais m'adresser aux futurs docteurs... Roberto (comme l'ont dit des gens avant moi dans leur remerciement le charme à l'italienne... J'ai beaucoup aimé cette phrase et je me permets de la retranscrire... Je n'oublierais pas tes astuces, tu as toujours réponse à tout !), Les nouvelles du bureau 110 Ozgur (à tes amours... que les tiens durent toujours... je pense qu'à chaque que je dis cette phrase je pense à toi... Tu as toujours le sourire et tu es toujours de bonne humeur... tu as apporté beaucoup de fraîcheur à ce bureau) Anna... Ahhh Anna... what to say ... Where is Anna? You're so special, something is sure: I will never and really never forget you; I hope that we will always keep in touch. When you joined our team you brought with you a new life, much light and a fresh air... My only regret is that you didn't take care of my plants ☺... I wish you all the best and a great success in your professional and life long road...

Je remercie aussi tout les autres doctorants et post doctorants... Merci aussi à Pierre Aldebert qui m'a fait découvrir la science autrement... J'ai beaucoup aimé partagé ces moments de vulgarisation scientifique pendant la fête de la science... Le contact avec des gens externe de notre domaine, les yeux

éblouissant des enfants lorsqu'ils assistent à nos tours de magie... c'était des moments inoubliables et je te remercie de m'avoir fait découvrir ce domaine...

Merci aux anciens, qui ont quitté le labo il y a déjà un moment et qui ont suivie de nouvelles directions... Aurélia (foufou) nos moments partagés au bureau sont inoubliable, c'est toi aussi qui m'a aidé pour mes premiers pas au labo, je n'oublierais pas notre petite blonde ;) ... Jutta (notre deuxième blonde du bureau) absolument unique notre petite German lady ... je te voyais très bien dans une pub de « parce que je le vauχ bien »... je te souhaite beaucoup de réussite dans ton avenir professionnel et côté personnel une vie bien paisible pleine de bonheur. Stéphane (Johnny boby pour les intimes) tes Charlie's Angel ont réussi leurs missions... ;) ... Merci à Marie Pierre, je sais qu'e je peux toujours compter sur toi et tu sais que tu peux aussi toujours compter moi aussi...

Mille mercis à mes amies qui m'ont supporté ces derniers temps et qui m'ont soutenu... Hammoudi et Hinda, Momo et Hélène, Joseph et Joëlle, Alexandra mon OM liante (avec bientôt un petit pingouin qui va rejoindre notre monde), Claraa, Bruno et Maud, Greg et Sonia (Merci pour avoir filmé ma soutenance ce qui me permettra de ne pas oublier ce moment...)

Pour terminer cette longue liste ... Je tiens à remercier infiniment toute ma famille et plus particulièrement mon frère à qui je dédie ce manuscrit, c'est grâce à lui que j'ai pu venir à Grenoble faire mes études, il m'a soutenue à tout les niveaux au cours de ces années. Un grand grand grand merci à mes parents, ils ont toujours cru en moi, ils m'ont toujours soutenue et poussé vers le haut... Merci Papou et merci Mum... je vous dédie ce travail. Merci à Dalila pour m'avoir suivie ses derniers temps et pour m'avoir remonté le moral pendant les moments difficiles.

Enfin, Merci de tout mon cœur à Ali d'être à mes côtés, merci pour m'avoir aidé pour les manips les weekends, merci d'avoir passé une nuit blanche à mes côtés pour relier les versions intermédiaires du manuscrit... merci pour ton soutien, et ton support au quotidien et merci pour tes encouragements de tous les jours.

A tous merci et à très bientôt !

Conclusion Générale

INTRODUCTION GENERALE1

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE7

INTRODUCTION	10
I HISTORIQUE	11
II PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ACIDE HYALURONIQUE	12
II.1 CONFORMATION	12
II.2 PRINCIPALES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES	14
II.3 PROPRIETES RHEOLOGIQUES	15
III ROLE DU HA DANS L'ORGANISME VIVANT	18
IV APPLICATIONS BIOMEDICALES DU HA ET DE SES DERIVES	20
IV.1 VISCO-CHIRURGIE	20
IV.2 VISCO-AUGMENTATION (COMPLEMENT VISCOELASTIQUE)	21
IV.3 VISCO-SEPARATION (ADHESION TISSULAIRE)	21
IV.4 VISCOSUPPLEMENTATION	22
V DERIVES DE L'ACIDE HYALURONIQUE POUR LA VISCOTHERAPIE	25
V.1 PRINCIPALES MODIFICATIONS CHIMIQUES DU HA	26
V.2 PRINCIPAUX HYDROGELS CHIMIQUES POUR LA VISCOTHERAPIE	28
V.3 PRINCIPAUX HYDROGELS PHYSIQUES POUR LA VISCOTHERAPIE	35
CONCLUSION	41
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	42

CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES DERIVES ALKYLES

DU HA.....53

INTRODUCTION	57
I STRATEGIE DE SYNTHÈSE DES DERIVES ALKYLES DU HYALURONANE	60
I.1 APPROCHE CHIMIQUE ENVISAGEE	60
I.2 OPTIMISATION DE LA SYNTHÈSE DU DERIVE HA-ADH.....	61
I.3 ALKYLATION DE L'ACIDE HYALURONIQUE.....	70
II ETUDE RHEOLOGIQUE DES DIFFERENTS DERIVES SYNTHETISES	75
II.1 FORMATION DU RESEAU PHYSIQUE TRIDIMENSIONNEL	75
II.2 ETUDE EN DYNAMIQUE.....	76
II.3 ETUDE EN ECOULEMENT.....	84
III ETUDE PAR FLUORESCENCE DES DIFFERENTS DERIVES ALKYLES.....	87
IV INFLUENCE DU BRAS ESPACEUR DIHYDRAZIDE.....	88
IV.1 SYNTHÈSE DES DERIVES HA-IDH ET HA-SDH.....	91
IV.2 PROPRIETES EN SOLUTION DES DIFFERENTS DERIVES HYDRAZIDE : HA-ADH, HA-IDH ET HA-SDH.....	96
IV.3 ETUDE DES DIFFERENTS DERIVES ALKYLES ISSUS DES INTERMEDIAIRES HA-SDH ET HA-IDH.....	99

V TRANSPOSITION DE LA SYNTHÈSE D'ALKYLATION A L'ECHELLE SEMI-INDUSTRIELLE.....	101
V.1 EFFET DE LA CONCENTRATION EN POLYMER.....	102
V.2 ESSAIS DE CYTOTOXICITE.....	103
V.3 ETUDE DE LA STABILITE THERMIQUE.....	105
V.4 ETUDE DE DEGRADATION ENZYMATIQUE.....	106
VI COMPARAISON AVEC LES VISCOSUPPLEMENTS INDUSTRIELS.....	109
CONCLUSION	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	116

CHAPITRE III : MODULATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES DERIVES ALKYLES DU HA.....121

INTRODUCTION	122
I MODULATION DES PROPRIETES ASSOCIATIVES PAR L'AJOUT DE CYCLODEXTRINES.	122
I.1 PRESENTATION GENERALE DES CYCLODEXTRINES.....	123
I.2 QUELQUES EXEMPLES DE LA LITTERATURE	124
I.3 ETUDE DE LA COMPLEXATION DES CHAINONS HYDROPHOBES PAR LES CDS (α ET β) PAR TITRATION MICRO-CALORIMETRIQUE ISOTHERME (ITC)	130
I.4 ETUDE DE LA COMPLEXATION DES TENSIOACTIFS PAR LES α ET β -CD PAR RMN	139
I.5 EFFET DE L'AJOUT DE CYCLODEXTRINES (α ET β) SUR LE COMPORTEMENT RHEOLOGIQUE DES DIFFERENTS LOTS DE HA-ALKYLE	151
I.6 ETUDE DE LA COMPLEXATION DE CHAINES ALKYLE EN C8, C10 ET C12 PAR LES CD (α ET β) PAR MODELISATION MOLECULAIRE	158
II MODULATION DES PROPRIETES ASSOCIATIVES PAR L'AJOUT DE TENSIOACTIFS (TA)	166
CONCLUSION	168
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	169

CHAPITRE IV : PARTIE EXPERIMENTALE.....177

I PRODUITS CHIMIQUES ET SOLVANTS	178
II MATERIELS ET METHODES GENERALES.....	178
II.1 PURIFICATION.....	178
II.2 SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE.....	181
II.3 CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE TRIPLE DETECTION (SEC)	182
II.4 RHEOLOGIE	183
II.5 CALORIMETRIE DE TITRATION ISOTHERME (ITC)	191
II.6 FLUORESCENCE.....	194
II.7 MODELISATION MOLECULAIRE.....	194
III SYNTHÈSES	197

CONCLUSION GENERALE205

ANNEXES.....211

LISTE DES ACRONYMES ET DES ABREVIATIONS211

LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES214

LISTE DES FIGURES216

LISTE DES TABLEAUX224

LITE DES SCHEMAS226

Introduction Générale

Avant-Propos

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de l'équipe structures et fonctions des polysaccharides (**SFP**) du **CERMAV** (Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales) et s'inscrivent dans le cadre d'une collaboration CIFRE avec **A.R.D** (Agro-industrie Recherche et Développement). Ces travaux ont été dirigés par le Professeur Rachel AUZELY-VELTY (CERMAV, CNRS) et font partie des thématiques du groupe SFP visant à développer des méthodes de modifications chimiques contrôlées et sélectives des polysaccharides en vue d'obtenir des systèmes épaississants ou gélifiants. Monsieur Anthony BRESIN, responsable du département fermentation d'A.R.D, a co-dirigé le présent travail.

A.R.D est une société qui a comme objectif de valoriser grâce à l'activité de recherche et de développement les productions agricoles végétales de la région Champagne-Ardenne. Elle permet ainsi le développement de nouvelles applications et l'ouverture de nouveaux marchés aux matières premières végétales issues des grandes cultures céréalières et betteravières. Aujourd'hui, A.R.D est pionnière dans son domaine et plusieurs de ses projets font partie du pôle de compétitivité de la région Champagne-Ardenne Picardie.

Soliance est une filiale d'A.R.D créée en 1994, qui a pour but la production par fermentation et la commercialisation de matière premières à vocation cosmétique, chimique. Soliance est un acteur majeur dans la fabrication d'actifs cosmétiques à partir de molécules agricoles et dans la distribution de matières premières actives, comme l'acide hyaluronique et le dihydroxyacétone, un actif auto-bronzant pour lequel elle est deuxième leader mondial.

A.R.D travaille sous contrat avec des laboratoires publics et privés dans le domaine des biotechnologies. La majorité du chiffre d'affaire est réalisée sous forme d'études et de recherches commanditées par les actionnaires. La société A.R.D.-Soliance compte près d'une centaine de salariés répartis au sein de dix équipes aux compétences complémentaires :

- Le **service fractionnement** du végétal et pilote a vocation à travailler les matières premières végétales essentiellement issues de grandes cultures (blé, betterave, luzerne, chicorée, maïs...) afin d'extraire et isoler des composés plus ou moins purifiés allant des polymères aux molécules simples de haute valeur ajoutée.
- Le **service fermentation** est spécialisé dans la production par voie fermentaire de molécules à haute valeur ajoutée à partir de substrats végétaux issus du fractionnement des plantes de grandes cultures. Ces molécules trouvent naturellement des débouchés dans les secteurs de la cosmétique, de la pharmacie et de l'agroalimentaire.

- L'**équipe formulation** est spécialisée dans l'utilisation de matières premières issues du monde végétal dans l'optique de développer des produits cosmétiques et détergents.
- Le **service chimie et évaluation** façonne des produits spécifiques comme les tensioactifs par synthèse organique et étudie la dynamique de transposition rapide de procédés à l'échelle du pilote.
- L'**équipe agro-matériaux** développe de nouveaux matériaux issus de l'association de matières premières produites par les services fermentation, fractionnement et chimie. Ainsi, l'équipe cherche à développer des applications pour les résines composites à base d'huile végétale et travaille sur la valorisation de l'amidon dans le domaine des matériaux, du papier et de la cosmétique.
- Le **service sciences analytiques** travaille en étroite collaboration avec l'ensemble des services de la société et permet de caractériser un produit à chaque étape de son développement, grâce aux équipements d'analyse (CPG, HPLC...).
- Le **pôle environnement** étudie les contraintes écologiques associées à l'activité des autres équipes en termes de nuisances, d'écotoxicité, de gestion des déchets et de biodégradabilité.
- **Soliance** assure la production et la commercialisation au niveau international. Elle produit une gamme complète d'actifs cosmétiques issus du monde végétal.
- Le **service maintenance et travaux neufs** entretient le bon fonctionnement de l'ensemble du matériel et enfin les **services administratifs** coordonnent l'ensemble des équipes et effectue la gestion de la société.

Contexte de l'étude

La société A.R.D travaille depuis plus d'une vingtaine d'année sur la production d'acide hyaluronique par voie fermentaire. Cette société a montré un vif intérêt pour les systèmes associatifs développés au CERMAV à base d'acide hyaluronique. Des travaux antérieurs effectués au laboratoire, portant sur l'élaboration d'assemblages supramoléculaire à base de hyaluronane et de chitosane, ont guidé le présent travail. Des hydrogels physiques ont été obtenus par la formation d'interactions hydrophobes entre des chaînons alkyle greffés le long de la chaîne macromoléculaire. C'est dans ce cadre que nous avons proposé de développer de nouveaux hydrogels à base d'acide hyaluronique selon une voie de synthèse transposable à

l'échelle industrielle, notre objectif étant de préparer une gamme de produits valorisables en viscosupplémentation.

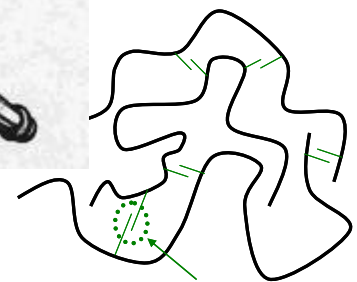
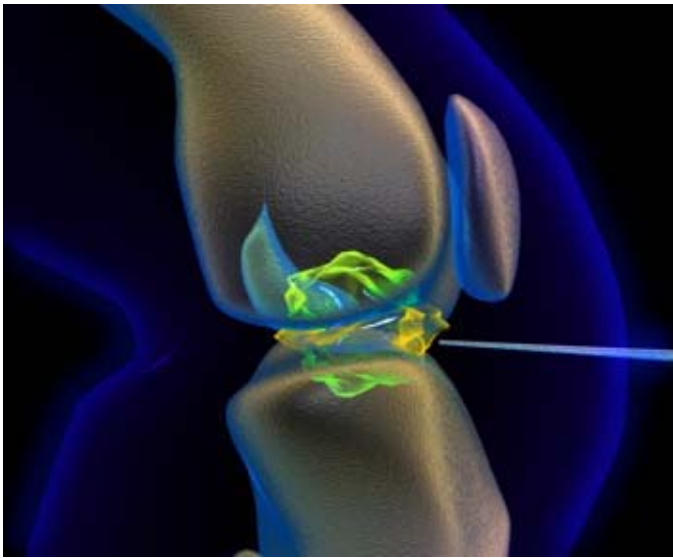
Le premier chapitre situe le travail dans son contexte bibliographique. Il porte sur l'acide hyaluronique, son origine, son rôle physiologique dans l'organisme vivant, ainsi que ses principaux domaines d'applications. Cette partie décrit par ailleurs la stratégie d'obtention de nouveaux dérivés d'acide hyaluronique pour la viscothérapie.

Le deuxième chapitre est consacré à la mise au point des conditions de synthèse de dérivés alkylés du HA permettant une transposition à l'échelle industrielle. L'étude du comportement en solution des différents composés synthétisés en relation avec leur structure est également présentée. Ces dérivés étant destinés à des applications biomédicales, leurs propriétés en termes de cytotoxicité, stabilité thermique et dégradation enzymatique sont discutées.

Le troisième chapitre concerne la modulation des propriétés épaississantes ou gélifiantes des dérivés alkylés du hyaluronane en milieu aqueux. L'effet de l'ajout de petites molécules, tel que la cyclodextrine, sur le réseau physique tridimensionnel y sera détaillé. Cette partie nous permettra d'éclaircir différents résultats contradictoires de la littérature, sur la complexation entre la cyclodextrine et les chaînes de tensioactifs. La modulation des propriétés nous permettra de contrôler la viscosité du système associatif et peut-être, viser d'autres applications.

Chapitre I

Etude bibliographique



**Interactions
hydrophobes
réversibles**

INTRODUCTION.....	10
I HISTORIQUE	11
II PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ACIDE HYALURONIQUE.....	12
II.1 CONFORMATION	12
II.2 PRINCIPALES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES	14
II.3 PROPRIETES RHEOLOGIQUES	15
III ROLE DU HA DANS L'ORGANISME VIVANT	18
IV APPLICATIONS BIOMEDICALES DU HA ET DE SES DERIVES.....	20
IV.1 VISCO-CHIRURGIE	20
IV.2 VISCO-AUGMENTATION (COMPLEMENT VISCOELASTIQUE)	21
IV.3 VISCO-SEPARATION (ADHESION TISSULAIRE)	21
IV.4 VISCOSUPPLEMENTATION.....	22
V DERIVES DE L'ACIDE HYALURONIQUE POUR LA VISCOTHERAPIE.....	25
V.1 PRINCIPALES MODIFICATIONS CHIMIQUES DU HA.....	26
V.2 PRINCIPAUX HYDROGELS CHIMIQUES POUR LA VISCOTHERAPIE.....	28
V.2.1 <i>Les hylanes</i>	28
V.2.2 <i>HA réticulé développé par la société Fidia advanced biopolymers S.R.L.</i>	30
V.2.3 <i>Hydrogels de HA obtenus par double réticulation</i>	33
V.2.4 <i>Hydrogels développés par la société Cornéal (France)</i>	34
V.3 PRINCIPAUX HYDROGELS PHYSIQUES POUR LA VISCOTHERAPIE.....	35
V.3.1 <i>Dérivés associatifs du HA reposant sur des interactions hôte/ invité</i>	35
V.3.2 <i>Dérivés amphiphiles du HA</i>	38
V.3.3 <i>Hyaluronane hydrophobiquement modifié</i>	40
CONCLUSION.....	41
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	42

Introduction

L'objectif de ce travail est d'obtenir de nouveaux dérivés de l'acide hyaluronique conduisant en milieu aqueux à des solutions de haute viscosité ou à des gels. Nous nous sommes donc proposés de développer de nouveaux types de gels physiques à base d'acide hyaluronique stabilisés par des jonctions labiles interchaînes.

La première partie de ce chapitre décrit l'acide hyaluronique, son origine, les différentes méthodes d'obtention et les propriétés physico-chimiques du HA. Enfin, le rôle physiologique du HA dans l'organisme vivant et ses principaux domaines d'application seront décrits.

La stratégie d'obtention de nouveaux dérivés d'acide hyaluronique pour la viscothérapie fera l'objet d'une seconde partie. Nous-y développerons les différentes méthodes utilisées pour l'obtention de dérivés de l'acide hyaluronique réticulés physiquement et/ou chimiquement pour obtenir des solutions de haute viscosité ou des gels. Cette partie nous permettra également de définir le contexte de l'étude et les objectifs qui ont guidé ce travail de thèse.

I Historique

L'acide hyaluronique (HA) fut isolé pour la première fois par Meyer et Palmer en 1934 à partir de l'humeur vitreuse des yeux bovins [1]. Meyer est le pionnier de la recherche sur le HA, malheureusement ses études se sont interrompues durant la deuxième guerre mondiale et l'histoire de la recherche sur l'acide hyaluronique ne reprend qu'en 1948 avec les travaux de Haddian et Pirie sur la préparation de l'acide hyaluronique [2]. Quelques années plus tard, Jeanloz a travaillé sur la détermination de la structure de ce polysaccharide [3, 4]. Trois années plus tôt, Blix a publié la première détermination de la viscosité intrinsèque de l'acide hyaluronique obtenue à partir du liquide synovial bovin [5].

Meyer [6] et Jeanloz [3] ont élucidé la structure primaire du hyaluronane, désignant à la fois l'acide hyaluronique (HA) et le hyaluronate de sodium. C'est un des polysaccharides les plus abondants appartenant à la famille des glycosaminoglycanes [7]. Le HA est décrit comme une chaîne linéaire non ramifiée dont le motif disaccharidique de répétition est composé d'une unité d'acide D-glucuronique liée en $\beta(1\rightarrow3)$ à l'unité N-acétyl-D-glucosamine (Figure I-1). Ces motifs sont reliés par des liaisons glycosidiques de type $\beta(1\rightarrow4)$. La longueur du motif de répétition du HA en solution est évaluée à 10 Å.

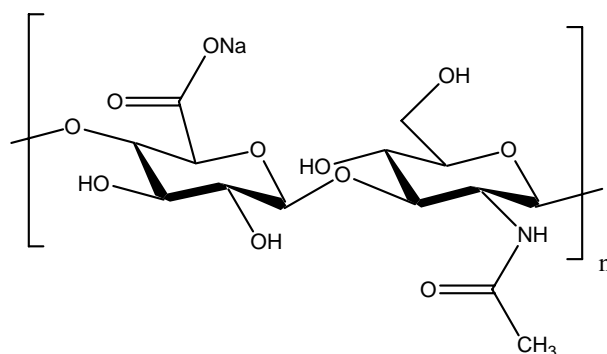


Figure I- 1 : Unité de répétition disaccharidique du hyaluronane.

Depuis plusieurs décennies, l'isolement, la purification et l'identification du HA ont connu un intérêt grandissant. La procédure développée par Balazs fut la première méthode d'extraction appliquée industriellement pour isoler et purifier du HA provenant de crêtes de coq et de cordons ombilicaux [8]. Dans cette méthode, un traitement au formaldéhyde du substrat est réalisé suivi d'une extraction en milieu basique, conduisant à un HA légèrement réticulé contenant 0,5% de protéines avec un rendement assez faible (0,9 g/kg de substrat). Par ailleurs, la production de HA par des bactéries de type *Streptococcus equi* [9, 10] et

streptococcus zooepidemicus [11] permet de meilleurs rendements (6 à 10 g/kg de moût de culture) [9]. Le hyaluronane obtenu par cette méthode est dépourvu de protéines ou d'autres glycosaminoglycanes fortement associés dans le tissu conjonctif. Le coût du HA a donc baissé conduisant au fort développement de ses applications.

II Propriétés physico-chimiques de l'acide hyaluronique

II.1 Conformation

Il n'est pas surprenant que de nombreuses études aient été effectuées pour mieux comprendre l'organisation tridimensionnelle en solution du HA qui est l'élément clé de la matrice extracellulaire. Dès 1958, les premiers clichés de diffraction des rayons X du hyaluronate de sodium, précipité et séché à l'éthanol montrent que les poudres obtenues sont de nature semi-cristalline [12]. A partir de 1972, la structure cristalline du hyaluronate de sodium est étudiée par Atkins et Sheehan [13, 14]. Winter *et al.* ont montré que ce polysaccharide possédait une conformation en hélice stabilisée par des liaisons hydrogène [15]. Une conformation de double hélice antiparallèle a été mise en évidence par diffractions de rayons-X pour des films de HA à pH 2,5 [16].

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 [17, 18] peut être liée aux 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 [19].

La résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (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 al.* ont dénombré quatre liaisons hydrogène par unité disaccharidique [20]. Suite aux travaux de Cowman *et al.* [21], 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-2 a) et b)) [22].

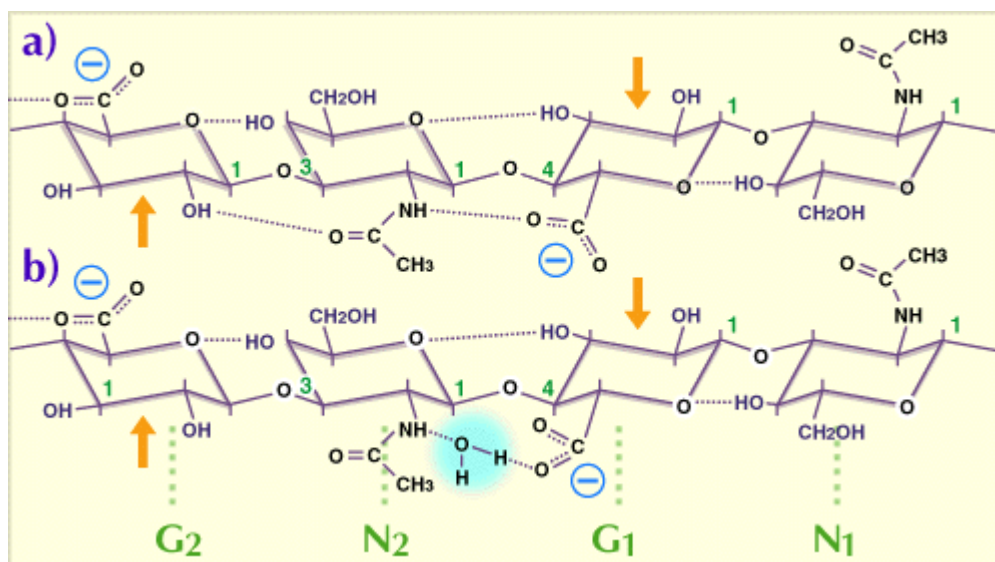


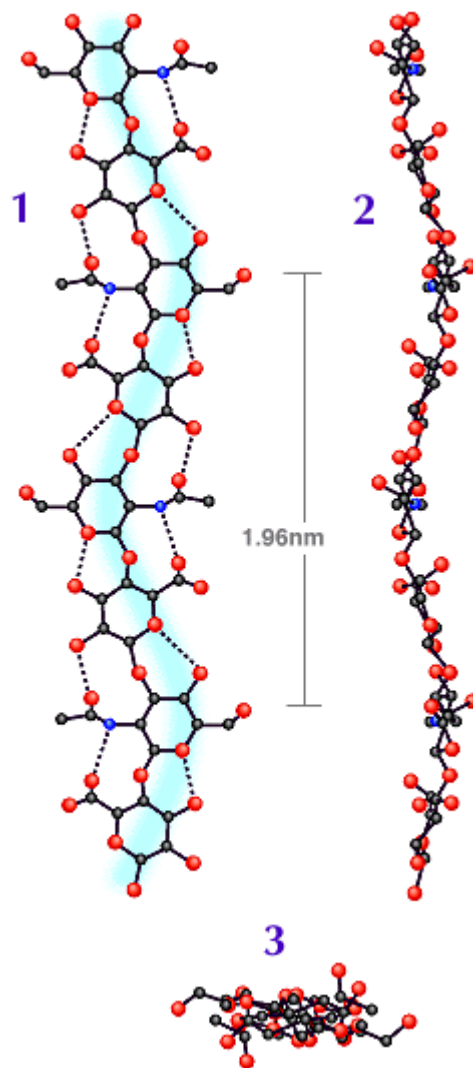
Figure I-2 : Structure secondaire du HA dans du DMSO avec et sans présence d'eau [22](A)

La structure secondaire (hélice 2_1) est stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires périodiques [23]. La première implique le NH du groupe acétamido et le groupe carboxylate à travers la liaison $\beta(1\rightarrow4)$ et la deuxième l'oxygène O_5 du cycle et l'alcool C_4-O_4H à travers la liaison $\beta(1\rightarrow3)$ (Figure I-2 (a)). D'autres travaux ont été réalisés par analyse de spectroscopie infrarouge et ont permis de localiser les ponts hydrogène intra et interchaînes ainsi que l'insertion des molécules d'eau [24-27] (Figure I-2 (b)). La spectrométrie infrarouge a également mis en évidence le mécanisme d'hydratation et les changements conformationnels induits au sein de la chaîne par l'hydratation.

Almond *et al.* 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 [28-30].

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 (figure I-3). Cette structure présente dans les simulations de dynamique moléculaire de Almond *et al.* lui confère un caractère semi-rigide.

Figure I-3 : Vue du plan de l'hélice 2_1 (1)
Vue perpendiculaire au plan de l'hélice (2)
Vue au dessus de l'axe de l'hélice (3)
Les atomes d'oxygène sont en rouges,
Les atomes d'azote sont en bleus.
Figure modifiée à partir de la référence [31].



II.2 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. L'acide hyaluronique est un polyanion, la principale caractéristique d'un polyacide est la valeur du pK intrinsèque (pK_0) qui peut être obtenue par titration potentiométrique d'une solution de HA sous forme acide. Fouissac *et al.* ont obtenu une valeur de $pK_0 = 2,9 \pm 0,1$. Un pH de 7,5 est nécessaire pour une neutralisation totale des groupements carboxylique[32]. Balazs a montré que lorsque le pH de la solution de HA diminue, en ajoutant progressivement du HCl, un gel se forme à pH 2,5. Ce qui s'expliquerait par la diminution des dissociations des carboxylates favorisant les liaisons hydrogène et conduisant à la formation du gel [33, 34].

Roure *et al.* ont évalué par chromatographie d'exclusion stérique multidétection (SEC) la longueur de persistance intrinsèque L_p de la chaîne polysaccharidique du HA à 25°C, en

l'absence de répulsions électrostatiques, à environ 75 Å [35]. Cette valeur traduit un caractère semi-rigide de la chaîne macromoléculaire et correspond aux valeurs prédites par modélisation moléculaire [36]. Dans cette étude, une diminution de la longueur de persistance intrinsèque L_p est observée lorsque la température augmente. Cette diminution serait reliée à une perte de la rigidité de la chaîne par rupture ou affaiblissement des liaisons hydrogène intramoléculaires.

La distribution des masses molaires du HA est obtenue directement par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Rinaudo *et al.* ont montré que pour des HA de masse molaire M : $4 \times 10^5 < M < 1,5 \times 10^6$ g/mol, en solution dans les conditions de la SEC (NaNO_3 0,1M, 30°C), on obtient $K = 0,0336$ et $a = 0,79$ lorsque la viscosité intrinsèque $[\eta]$ est exprimée en mL/g. Par la suite, une simple mesure de la viscosité intrinsèque dans les mêmes conditions expérimentales, par viscosimétrie capillaire, nous conduit à la masse molaire moyenne viscosimétrique M_v (si les viscosités sont déterminées au plateau newtonien) en considérant la relation de Mark-Houwink qui relie M_v à $[\eta]$ [37-39] (éq I-1).

$$[\eta] = K \times M_v^a \quad \text{éq I-1}$$

II.3 Propriétés rhéologiques

Le succès du HA tient à ses propriétés viscoélastiques. Depuis plus de 30 années, de nombreux travaux ont porté sur l'étude du comportement rhéologique du HA [37-39], 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 le comportement du HA en solution [37, 40-44].

Pour l'étude des propriétés rhéologiques du HA en solution, il est important de déterminer la viscosité de la solution polysaccharidique (η) et plus exactement l'augmentation de la viscosité du polymère par rapport à celle du solvant ($\eta - \eta_0$) et la concentration en polymère C , la masse molaire du polymère M et la viscosité intrinsèque $[\eta]$.

La figure I-4 montre le comportement en écoulement pour des HA à différentes concentration en fonction du gradient de vitesse. Toutes les courbes sont rhéofluidifiantes, ce qui signifie que la viscosité diminue quand le gradient de cisaillement augmente. La viscosité au plateau newtonien à faible gradient de cisaillement correspond à η_0 .

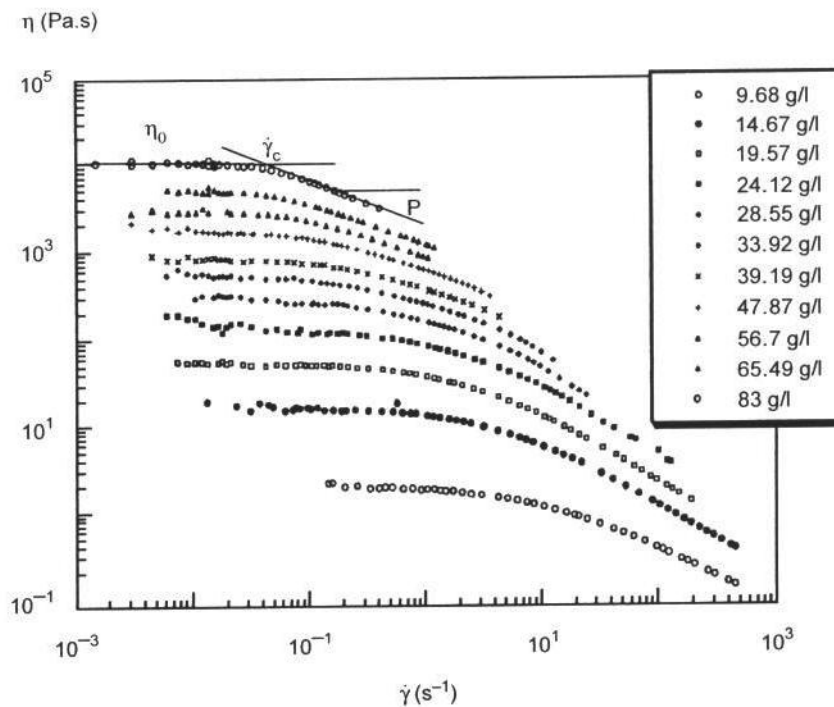


Figure I- 4 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de vitesse pour des solutions d'acide hyaluronique de masse molaire moyenne en masse ($M_w=1,3 \times 10^6$ g/mol) à différentes concentrations [45, 46].

En représentant en échelle log-log la viscosité spécifique η_{sp} au plateau newtonien en fonction de $[\eta]C$ à 0,1M NaCl, trois parties caractérisant les régimes ; dilué, semi-dilué et le régime concentré peuvent être obtenues [47] (Figure I-5).

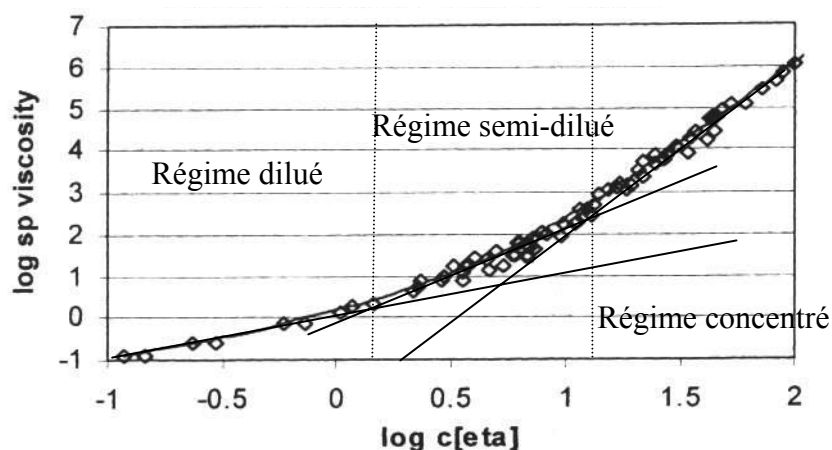


Figure I- 5 : Dépendance de la viscosité spécifique η_{sp} au plateau newtonien en fonction de $[\eta]C$ pour l'acide hyaluronique en solution dans du NaCl 0,1M à 25°C [45, 46].

La fin du régime dilué est déterminée par la valeur de concentration critique de recouvrement C^* qui correspond au début du régime semi-dilué et l'apparition progressive des enchevêtrements. La courbe représentée sur la figure I-5 correspond à une courbe maîtresse

de l'acide hyaluronique qui a été développée au sein de notre laboratoire applicable pour différentes masses molaires de polymères parfaitement solubles [46]. L'équation de la courbe maîtresse est donnée par la relation suivante :

$$(\eta_{sp})_0 = C[\eta] + k' (C[\eta])^2 + B(C[\eta])^n \quad \text{éq I- 2}$$

Les deux premiers termes de l'équation sont valables en régime dilué et connus par la relation de Huggins, avec k' la constante de Huggins ($k' \approx 0,4$ pour un polymère parfaitement soluble)[48]. k' , B et n dépendent de la force ionique mais sont peu sensibles à la masse molaire. Cette relation permet d'estimer approximativement, à gradient de vitesse nul, $(\eta_{sp})_0$ pour une solution de polymère à une concentration C , connaissant la viscosité intrinsèque $[\eta]$. Il a été démontré par la suite qu'une relation générale pouvait être proposée pour des polymères parfaitement solubles [49]:

$$(\eta_{sp})_0 = C[\eta] \times \{ 1 + k_1(C[\eta]) + k_2(C[\eta])^2 + k_3(C[\eta])^3 \} \quad \text{éq I- 3}$$

avec $k_1 = 0,4$; $k_2 = k_1^2/2$! ; $k_3 = k_1^3/3$!

Cette relation converge absolument vers les courbes tracées précédemment par Rinaudo *et al.* commentées ci-dessus.

La figure I-6 montre le comportement viscoélastique des différentes solutions d'acide hyaluronique linéaire de masse $M_w 1,3 \times 10^6$ g/mol représenté par une courbe maîtresse, avec une fréquence caractéristique ω_0 telle que $G' = G''$.

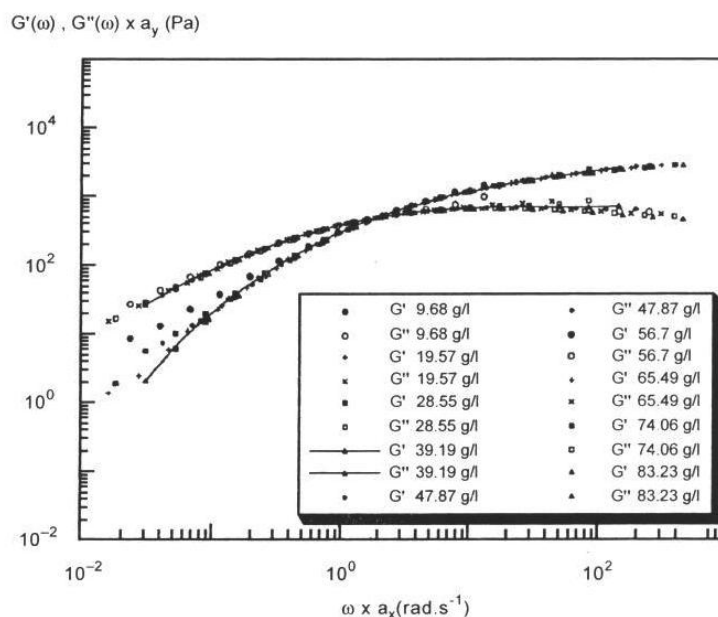


Figure I- 6 : Courbes maîtresses de G' et G'' en fonction de la fréquence obtenues par translation en utilisant comme référence les courbes $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ du HA à 39,9g/L ($M_w = 1,3 \times 10^6$; $T=25^\circ\text{C}$).

A basses fréquences, $G' < G''$, le comportement du HA est celui d'une solution visqueuse. A fréquences élevées, $G' > G''$, le comportement du HA est élastique, en relation avec les enchevêtrements. (G' module élastique et G'' correspond au module visqueux).

La majorité des applications du HA, discutées plus tard, dans le domaine biomédical notamment dans la viscothérapie, sont reliées à la viscoélasticité du HA.

III Rôle du HA dans l'organisme vivant

L'acide hyaluronique se trouve principalement dans la matrice extra-cellulaire (ECM) et dans la matrice peri-cellulaire. Evanko et Wight ont récemment montré que le HA était présent à l'intérieur des cellules [50, 51]. Dans le corps humain, les zones qui sont les plus riches en HA sont la peau, le liquide synovial, le cordon ombilical et l'humeur vitreuse de l'œil.

Dans la peau, l'acide hyaluronique immobilise les molécules d'eau dans le tissu et permet de changer le volume dermique ; il agit ainsi en tant qu'agent hydratant. Le HA peut aussi influencer la prolifération cellulaire et la réparation tissulaire. Le vieillissement et la régénération tissulaire (cicatrisation) sont souvent causés par un changement de la concentration en HA dans certaines zones, ce qui accentue son rôle important dans la peau [52].

Dans le cartilage, le HA est un élément structural important de la matrice extracellulaire, il forme un centre d'agrégation avec les protéoglycanes et les chondroïtines sulfates qui retiennent les assemblages macromoléculaires grâce aux interactions spécifiques HA-protéines [53, 54] (Figure I-7).

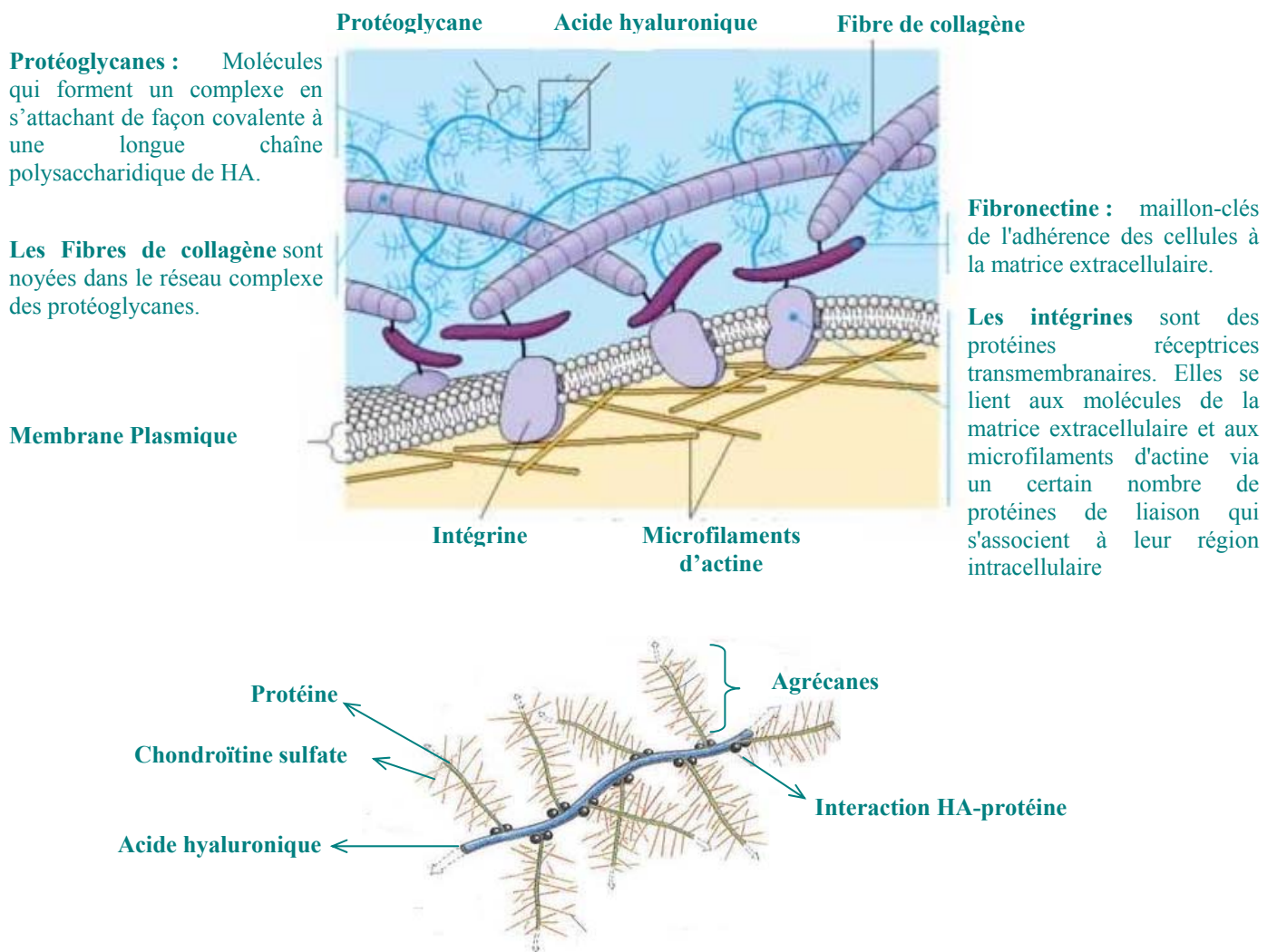


Figure I- 7 : Représentation schématique d'une partie de la matrice extracellulaire avec un agrandissement du complexe protéoglycane-HA[55].

Dans le liquide synovial (LS), la forte concentration de HA de haute masse molaire, allant jusqu'à 10×10^6 g/mol sont cités dans la littérature, permet de lubrifier l'articulation et absorber les chocs. Lors d'affections osseuses articulaires ou péri-articulaires (autour de l'articulation), d'origine inflammatoire ou mécanique, le HA de forte masse molaire se trouve dégradé par des agents réactifs oxygénés qui réduisent sa viscosité et donc ses propriétés lubrifiantes et protectrices, provoquant l'altération du cartilage accompagnée de douleurs lors des mouvements, puis l'usure des extrémités osseuses [56].

Pendant longtemps, on pensait que le HA servait essentiellement de matière de comblement de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs. Après plusieurs études sur

l'interaction HA-protéines et HA-récepteurs il a été montré que le HA avait d'autres activités fonctionnelles [57].

Le HA est aujourd'hui reconnu pour son rôle dans l'embryogenèse et dans la migration des cellules musculaires au cours du développement de l'embryon. Le HA exerce aussi de multiples fonctions dans l'induction de la prolifération, de la migration, de la formation des tubules rénaux ou encore dans le processus tumoral et métastatique [58].

De plus, le HA a la particularité d'avoir des fonctions biologiques opposées dépendantes de la masse molaire du polysaccharide. Par exemple, les acides hyaluroniques de haute masse molaire jouent un rôle de comblement d'espace dans le tissu conjonctif. De plus, ils sont anti-angiogéniques, c'est-à-dire qu'ils empêchent la fabrication des vaisseaux sanguins qui irriguent les tumeurs cancéreuses. Ainsi, les tumeurs ne sont plus alimentées en sang et elles disparaissent progressivement [59]. Les HA de haute masse molaire sont aussi immunosuppressives, ils empêchent ainsi le corps de rejeter une greffe d'organe ou un tissu étranger[60] alors que les HA de tailles intermédiaires (25 à 50 unités disaccharidiques) sont inflammatoires, immunostimulantes (stimule les défenses immunitaires) et fortement angiogéniques [61, 62]. Les petits oligosaccharides sont quant à eux anti-apoptotiques [63]. L'apoptose est le processus par lequel des cellules déclenchent leurs autodestructions en réponse à un signal. Une récente revue regroupe les différentes activités de l'acide hyaluronique en fonction de la taille du polysaccharide [64].

Le rôle très important que joue le HA dans l'organisme vivant, a permis de développer son utilisation dans de nombreux domaines du biomédical et de la cosmétique.

IV Applications biomédicales du HA et de ses dérivés

Les principaux domaines d'applications biomédicales du HA et de ses dérivés ont été classifiés par Balazs en 2004 de la façon suivante [65] :

IV.1 Visco-chirurgie

Le concept de la visco-chirurgie est apparu avec le développement dans les années 70, par Balazs, de la première solution à base de hyaluronate de sodium.

En visco-chirurgie, notamment en micro-chirurgie oculaire, la solution à base de hyaluronate de sodium est utilisée en pré-opératoire comme une aide chirurgicale afin de permettre la séparation des tissus et de créer un espace suffisant autorisant le geste chirurgical et/ou une implantation [8, 66]. Elle sert aussi à protéger les tissus, absorber les chocs et créer

un film protecteur sur les surfaces sensibles aux dommages mécaniques qui peuvent être causés par les instruments.

L'efficacité en pré-opératoire des solutions à base de hyaluronate de sodium en micro-chirurgie oculaire est liée à leurs propriétés mécaniques et, plus exactement, à leur comportement rhéologique (viscoélasticité), lui-même fonction de la longueur de la chaîne polysaccharidique et des interactions intra- et inter-chaînes. Cette longueur de chaîne est déterminée par la masse molaire du hyaluronane qui est fonction de son origine (crêtes de coq ou fermentation bactérienne) et peut être influencée par le procédé d'obtention du HA ainsi que par le procédé de fabrication et de stérilisation de la solution viscoélastique [67, 68].

IV.2 Visco-augmentation (comblement viscoélastique)

La Visco-augmentation consiste à utiliser des gels viscoélastiques injectables dans diverses applications cosmétiques, réparatrices et thérapeutiques pour augmenter les tissus et combler les rides, les dépressions et les imperfections du visage. C'est aussi l'augmentation des tissus mous des cordes vocales et le comblement de la paroi postérieure du pharynx lors d'insuffisance pharyngée.

Des produits à base d'acide hyaluronique tels que Restylane[®] (Laboratoire Inamed), Hylaform[®] (Biomatrix) ou Juvederm[®] et Surgiderme (Laboratoire Cornéal) sont utilisés par les médecins en remplacement du collagène car l'acide hyaluronique réduit les risques d'allergie (surtout pour les HA issus de fermentation bactérienne) et dure plus longtemps (6 à 18 mois pour le HA contre 3 à 6 mois pour le collagène). De plus, sa résorbabilité empêche tout accident définitif [69].

IV.3 Visco-séparation (adhésion tissulaire)

La Visco-séparation, c'est l'utilisation de gels viscoélastiques, membranes ou fluides pour séparer les tissus, prévenir l'adhésion, couvrir les plaies internes ou externes. St. Onge a démontré que le HA réduit de manière significative les problèmes d'adhérence qui sont inhérents à toute chirurgie tendineuse. L'inconvénient de l'utilisation du HA non modifié est le temps de présence insuffisant dans le tissu local [70]. Au milieu des années 80, Weiss a démontré que l'utilisation de Hylan B (HA réticulé chimiquement) avait une excellente biocompatibilité et prolonge la présence du gel dans le tissu local. L'une des principales phases incontournables dans la cicatrisation tendineuse est la prolifération des fibroblastes, il a été montré expérimentalement et cliniquement que l'action de gel de HA biodégradable

pouvait éviter ce phénomène tout en préservant la qualité de la cicatrisation du tendon et des autres structures vasculo-nerveuses [71-73].

IV.4 Viscosupplémentation

La viscosupplémentation est la deuxième plus importante application du HA après la viscochirurgie. C'est une thérapie qui a été développée pour soigner le rhumatisme inflammatoire chronique. Elle consiste à remplacer le liquide synovial déficient, en injectant dans l'articulation un gel (ou une solution de forte viscosité) possédant des qualités proches ou supérieures au liquide synovial (LS) d'un sujet jeune et sain. La viscosupplémentation peut atténuer ou enrayer la douleur, réduire la raideur et contribuer à restaurer la mobilité de l'articulation afin de retrouver des mouvements moins douloureux [74, 75].

L'arthrose est une maladie chronique dégénérative du cartilage et des os ; cette maladie est assez souvent accompagnée de la dégénération d'autres organes, tels que les poumons, le cœur et les vaisseaux sanguins. Plus de 10% de la population mondiale âgée de plus de 55 ans sont affectés d'arthrose [53]. L'arthrite est une maladie inflammatoire, d'origine infectieuse ou non, qui peut dégénérer en arthrose (Figure I-8b).

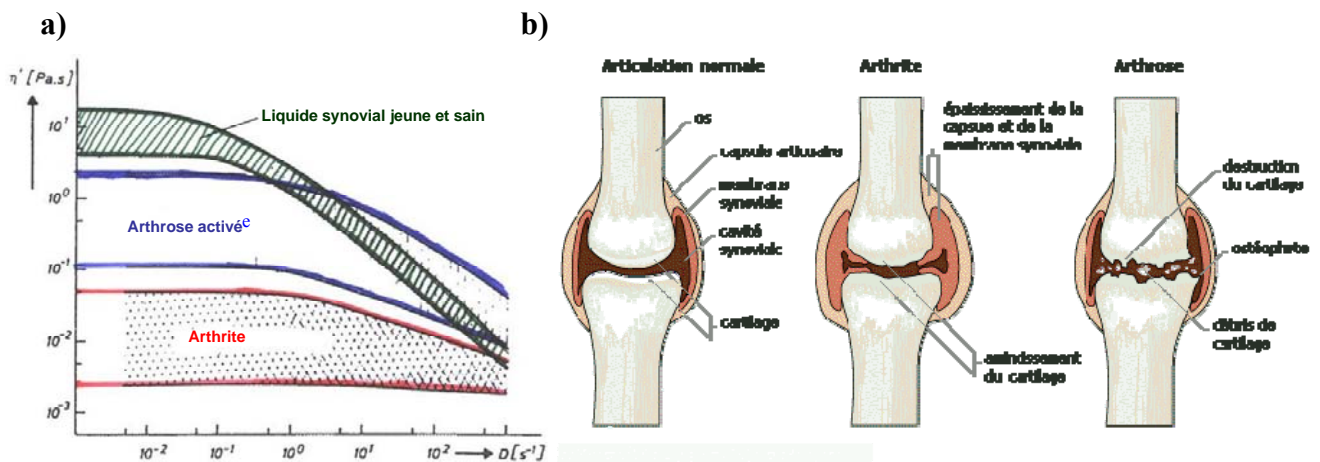


Figure I- 8: (a)Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour 3 liquides synoviaux différents [55]. (b)Comparaison de l'articulation en état normal, arthrite et arthrose.

L'arthrose du genou (Gonarthrose) apparaît suite à la réduction de l'élasticité et de la viscosité du LS qui n'absorbe plus aussi efficacement les chocs infligés à l'articulation et ne joue plus son rôle de « coussin » entre les os (figure I-8a). L'articulation est douloureuse en particulier lors des mouvements.

Le constituant principal du liquide synovial, comme cité précédemment, est un complexe moléculaire d'agrégats contenant de l'acide hyaluronique de masse molaire $\sim 10^7$ g/mol pour un sujet sain. Des études ont montré que lorsqu'un sujet est atteint d'arthrose, la viscosité du LS chute. Cette diminution de la viscosité peut être due soit à la baisse de la masse molaire du HA soit de sa concentration par dilution du HA dans l'articulation. Des études sont encore en cours sur ce sujet. Praest *et al.* ont montré que la corrélation entre la viscosité du LS et la concentration du HA est plus significative que celle entre la viscosité et la masse molaire moyenne du polymère [55, 76, 77]. Une étude récente (2007) a consisté à mesurer le volume du LS et à comparer la concentration de HA présente dans l'articulation pour, d'une part, les cas normaux, et d'autre part, des patients souffrant de gonarthrose. Cette étude montre une baisse considérable de la concentration pour les sujets malades et non de la masse molaire du HA [78].

Pendant les années 1970, Butler *et al.* ont démontré que les injections intra-articulaires de HA (issus de crête de coq) sur les chevaux de course souffrant d'arthrose permettaient une baisse significative des symptômes et douleurs de l'articulation avec un retour sur les champs de courses [79]. Ce traitement a été commercialisé pour la médecine vétérinaire comme premier viscosupplément [80]. Les premières études de viscosupplémentation pour la thérapie de l'arthrose humaine ont été effectuées de 1969 à 1973 en Suède par Rydell et Helfet [81]. Peu de temps après, les recherches ont été reprises en France par Peyron [82] qui a travaillé sur un HA, toujours issu de crête de coq, de masse molaire 2-3 million g/mol nommé Healon[®]. Les essais cliniques ont montré que ce traitement ne correspondait pas au cas avancé d'arthrose car le temps de résidence du produit dans l'articulation était trop court. Par contre, ce produit est largement utilisé en viscochirurgie. Balazs a donc essayé de développer un nouveau viscosupplément utilisant les Hylanes (les hylanes seront décrits plus en détails dans la partie dérivés du HA pour la viscothérapie). Le produit optimal doit être biocompatible et doit avoir des propriétés rhéologiques similaires à celles du liquide synovial d'un patient sain avec un temps de résidence dans l'articulation assez important [74, 83]. Le produit commercial le plus utilisé dans le domaine de la viscosupplémentation est le Hylan G-F 20, obtenu par extraction de crêtes de coqs. Le Synvisc[®] est composé de 80% de Hylan A fluide (HA pseudo-linéaire) et 20% de Hylan B gel (Hylan A réticulé chimiquement) [84].

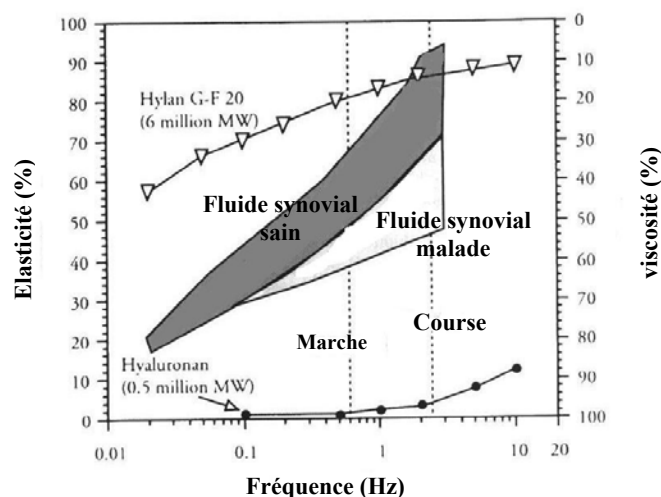


Figure I- 9 : Comparaison du comportement élastique et visqueux de liquide synovial d'un patient sain, malade par rapport au HA de faible masse molaire à 10g/L et du Hylan viscosupplément (Synvisc®) [84].

Une comparaison des propriétés viscoélastiques d'un liquide synovial d'un patient sain, souffrant d'arthrose, de Hylan G-F 20, et d'un HA de masse molaire 500 000 g/mol est représentée sur la figure I-9. Le pourcentage d'élasticité est exprimé comme la fraction de l'énergie appliquée qui est convertie en déformation élastique et en écoulement visqueux.

D'autres viscosuppléments sont aujourd'hui présents sur le marché mondial. Ces produits sont différents par leur origine, structure moléculaire (linéaire ou réticulé), masse molaire, et concentration en solution. (Tableau I-1)

Nom commercial (laboratoire)	Masse molaire apparente (g/mol)	Origine	Concentration	Structure
ADANT (Fornet, Espagne)	0,6 à 1,2 x 10 ⁶	fermentation	20mg /2mL	linéaire
ARTHURUM H (LCA, France)	2,4 x 10 ⁶	fermentation	40mg/2mL	linéaire
HYALGAN (Fidia, Italie)	5 à 7,5 x 10 ⁵	Crête de coq	20mg/2mL	linéaire
OSTENIL (Chemedica, Allemagne)	1 à 1,2 x 10 ⁶	fermentation	20 mg/2mL	linéaire
SINOVIAL (Genevrier, France)	5 à 7,5 x 10 ⁵	fermentation	16mg/2mL	linéaire

SUPLASYN (Bioniche, Irlande)	5 à 7,5 x 10 ⁵	fermentation	20mg/2mL	linéaire
SYNVISC (HYLAN GF 20) (Genzyme, USA)	6 x 10 ⁶	Crête de coq	16mg/2mL	20% réticulé et 80% pseudo-linéaire
VISCORNEAL-ORTHO (Cornéal, France)	6 x 10 ⁶	Crête de coq	20mg/2mL	réticulé

Tableau I- 1 : Récapitulatifs des différents viscosuppléments présents sur le marché.

Malgré la diversité des viscosuppléments aujourd'hui présents sur le marché, il s'avère que le Synvisc[®] est le seul viscosupplément sous forme de **gel** qui a fait preuve d'efficacité. Par contre, en observant le tableau ci-dessus, on peut remarquer que les seuls viscosuppléments à base de HA modifiés chimiquement sont d'origine animale (crête de coq).

L'utilisation désormais banalisée de la viscosupplémentation dans le traitement de l'arthrose n'a cependant pas permis de répondre de façon formelle et scientifique à de nombreuses questions, car les études méthodologiquement fiables, contrôlées, comparatives ou contre-placébo, sont de mise en place et de réalisation délicates. Elles sont d'ailleurs en règle générale sponsorisées par le laboratoire commercialisant le produit en question [85].

V Dérivés de l'acide hyaluronique pour la viscothérapie

L'application principale visée pour les nouveaux dérivés d'acide hyaluronique développés lors de ce travail étant la viscosupplémentation, ceux-ci doivent présenter des propriétés physico-chimiques et rhéologiques proches des viscosuppléments cités précédemment. L'acide hyaluronique natif que nous avons modifié dans notre étude est issu de fermentation bactérienne et nous visons à développer le premier viscosupplément de type gel physique d'origine non animale [86].

Dans la partie qui suit, nous avons effectué une étude bibliographique sur les différents dérivés synthétisés jusqu'à ce jour qui ont, ou qui pourraient avoir, pour application la viscothérapie (viscosupplémentation, visco-augmentation, visco-chirurgie et la visco-séparation).

Comme nous avons pu le constater dans les parties précédentes, l'acide hyaluronique est un biomatériau viscoélastique qui a des propriétés rhéologiques uniques, comparé aux autres polymères naturels ou synthétiques. Ces propriétés uniques le rendent attrayant pour différentes applications biomédicales. Le hyaluronane, pur, natif même de haute masse

molaire ($2,4 \times 10^6$ g/mol) et à forte concentration ($C = 20$ g/L) ne présente pas les propriétés rhéologiques souhaitées pour une utilisation efficace en viscosupplémentation, viscochirurgie et pour les implants. De façon à augmenter la viscoélasticité du HA et de prolonger son temps de séjour dans les tissus, le développement de nouveaux dérivés de HA, notamment des hydrogels a connu une forte croissance.

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 phase 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 (Figure I-10) [87].

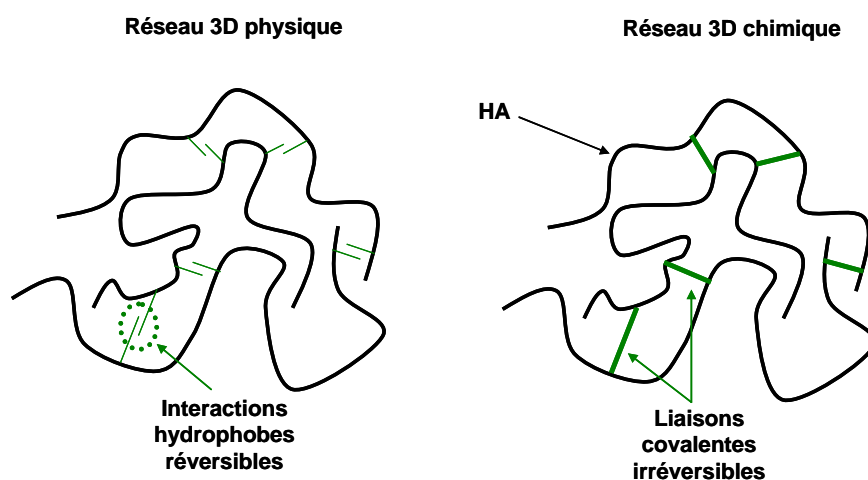


Figure I- 10 : Représentation schématique d'un exemple de réseau physique et d'un réseau chimique.

V.1 Principales modifications chimiques du HA

Le hyaluronane présente plusieurs groupements fonctionnels susceptibles d'être modifiés chimiquement de façon sélective : les fonctions alcool primaire, acétamide et carboxylates (Figure I-11).

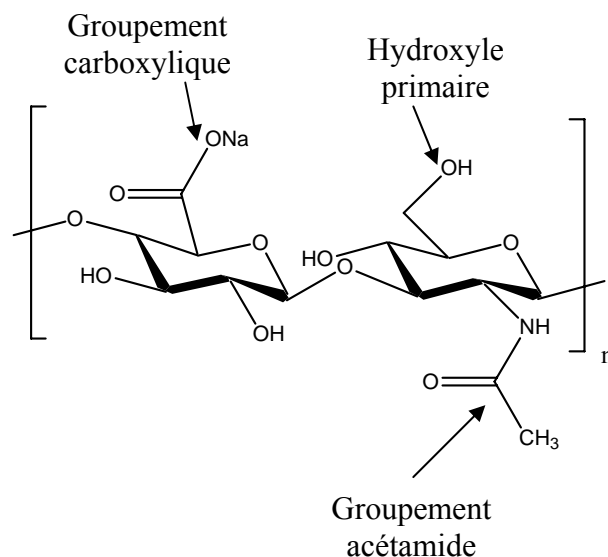


Figure I- 11 : Principaux sites pour la modification chimique sélective de l'acide hyaluronique

La fonction acétamide est difficile à modifier ; elle nécessite une hydrazinolyse pour créer quelques groupements réactifs NH₂ capables de réagir avec des aldéhydes par amination réductrice ou amidation. Mais, une importante dépolymérisation est observée pendant cette réaction. Par ailleurs, beaucoup de réactions sont effectuées sur le groupement OH primaire consistant en des sulfatations (obtention de polymères ayant un rôle anticoagulant) [88, 89], estérification (l'acide butyrique est couplé au HA pour obtenir un système de relargage de médicaments au niveau de cellules cancéreuses) [90]. Une autre réaction peut avoir lieu entre des fonctions réactives bis-aldéhyde obtenues par oxydation des OH secondaires avec du périodate de sodium.

La majorité des modifications chimiques du HA ont lieu sur la fonction acide carboxylique. Une estérification donnant des esters benzyliques qui augmente le caractère hydrophobe du HA a été développée par la société Fidia S.R.L. pour produire différents matériaux HYAFF[®] (éponges, films, films micro-perforés, sphères...) [91]. Une autre réaction importante est la modification du HA par un acide adipique dihydrazide (ADH) en utilisant des carbodiimides pour obtenir des groupements hydrazide pendants le long de la chaîne macromoléculaire, afin de pouvoir greffer par-dessus des chaînes alkyle, des principes actifs tel que le Taxol[®] ou des agents réticulants [86, 92-96].

Les premiers agents de réticulation utilisés pour produire des hydrogels sont les bis-époxydes [97], le glutaraldéhyde [98] et la divinylsulfone [99] qui sont aussi largement exploités pour produire des gels à partir d'autres polysaccharides. Dans la partie qui suit, nous avons développé les principaux hydrogels chimiques et physiques utilisés pour la viscothérapie.

V.2 Principaux hydrogels chimiques pour la viscothérapie

V.2.1 Les hylanes

a) Origine

Les hylanes, développés par la société Biomatrix Inc., font partie des premières familles de dérivés réticulés du HA, d'origine animale, pour la viscothérapie. Ils sont formés par des procédés de réticulation qui ne modifient pas les fonctions carboxylate ou acétamide de la molécule HA native et conservent donc la biocompatibilité du HA non modifié. En utilisant deux processus différents de réticulation, ils peuvent être préparés soit sous forme solubles dans l'eau soit sous forme insolubles.

Dans un des procédés (Hylane A), le formaldéhyde est utilisé à pH neutre pour former une liaison permanente entre les groupes C-OH du polysaccharide et les groupes amino ou imino d'une protéine [99]. Dans les bonnes conditions, le procédé de réticulation ne produira pas un réseau moléculaire infini mais seulement une association permanente de 2 à 8 molécules de HA. Le contenu en protéines de hylane purifié correspondra à 0,4-0,8% du contenu en HA. Les entités moléculaires résultantes peuvent avoir une masse molaire apparente de 8 à 20 millions g/mol. Les solutions de hylane ont des propriétés rhéologiques très différentes des solutions de HA de plus haute masse molaire ayant des concentrations comparables. Les solutions de hylane ont une très forte viscosité à bas cisaillement ($< 0,01 \text{ s}^{-1}$) et une forte élasticité aux hautes fréquences ($> 1\text{Hz}$), elles sont aussi plus pseudoplastiques que les solutions de HA.

Un autre procédé produit des chaînes de HA non modifiées (Hylane B), pontées par un réticulant divinyl sulfone à travers leurs groupes hydroxyle [7, 100]. Ceci conduit à un réseau permanent qui n'est plus soluble dans l'eau contrairement au précédent. Cependant, le réseau de hylane réticulé conserve son affinité pour l'eau et gonfle pour former des gels mous extrêmement hydratés. Le taux de gonflement et les propriétés rhéologiques de ces gels de hylane dépendent de la densité du réseau des chaînes de HA et du degré de réticulation. En contrôlant ces deux paramètres, les gels de hylane peuvent être conçus de façon à fournir les propriétés requises pour une application donnée.

b) Propriétés physico-chimiques :

Les propriétés physiques du hylane fluide, du gel ainsi que celles du HA non modifié, ont été comparées (tableau I-2).

	Solution 1% de NIF-NaHA *	Solution 1% de Hylane	Gel de Hylane 0,5%
Viscosité (en Pa.s) à vitesse de cisaillement 0,001s⁻¹	400	6000	8500
	<u>242</u>	<u>2190</u>	<u>Non applicable</u>
Module élastique à 0,05 Hz (en Pa)	7	60	70
	<u>4</u>	<u>22</u>	<u>69</u>
Solubilité dans l'eau	Soluble	Soluble	Insoluble

En écriture standard : Résultats obtenus par Balazs *et al.*[101] sur un NIF-NaHA de Masse molaire de 4×10^6 g/mol

En écriture soulignée : Résultats obtenus par Weiss *et al.*[102] sur un échantillon NIF-NaHA Healon pharmacia AB, avec une masse molaire comprise entre 2 et 4×10^6 g/mol.

* : NIF-NaHA Non inflammatory sodium hyaluronate

Tableau I- 2 : Comparaison des propriétés du hyaluronane et des préparations de hylane dans des conditions salines physiologiques (tableau extrait à partir de la référence [35]).

Le gel de hylane se distingue du HA par son incapacité à se disperser dans l'eau. Cette caractéristique est d'une importance fondamentale. En effet, le HA et le hylane soluble dans l'eau ont typiquement un temps de séjour court quand ils sont implantés dans les tissus [70]. Comme le gel de hylane est insoluble dans l'eau, sa migration est ralentie considérablement et en conséquence, le gel a un temps de séjour beaucoup plus long que le HA soluble introduit dans les tissus.

L'utilisation de NIF-NaHA comme viscosupplément s'est avérée efficace pour certaines arthrites. Cette technique est maintenant largement utilisée pour traiter l'arthrite traumatique chez les chevaux de course et l'arthrite aigüe chez l'homme. Cependant, les effets du NIF-NaHA ne sont pas de longue durée, du fait de son temps de séjour court dans l'articulation et de l'amélioration rhéologique limitée qu'elle génère.

c) Applications

Les hylanes ont été spécialement développés pour répondre aux exigences médicales de viscothérapie décrites précédemment. Le tableau I-3 compare les propriétés rhéologiques du liquide synovial (LS) chez l'homme « normal » de 18 à 78 ans et chez le patient atteint d'arthrose au hylane G-F 20 (Synvisc®).

	Module de conservation G' (en Pa à 2,5 Hz)	Module de perte G'' (en Pa à 2,5 Hz)	G' = G'' (Hz) Point d'intersection
LS de 20 ans	117 ± 13	45 ± 8,2	0,13 ± 0,2
LS de 27-35 ans	23 ± 0,7	7,2 ± 0,8	0,21 ± 0,004
LS de 52-78 ans	19 ± 3	10 ± 1	0,41 ± 0,12
LS arthrose	8,5 ± 0,5	4,8 ± 0,3	4,7 ± 1,9
Synvisc®	111 ± 19	25 ± 2	0,012 ± 0,008

Tableau I- 3 : Propriétés rhéologiques du liquide synovial prélevé chez des humains sains dans différents groupes d'âge et chez des patients atteints d'arthrose [35, 81].

Les modules de conservation et de perte sont réduits lors de l'arthrose. La fréquence pour laquelle les deux modules sont égaux, augmente pour le LS arthritique, indiquant une perte d'élasticité du liquide et de son caractère absorbeur de chocs. Le Synvisc® a été conçu pour offrir une viscosité et une élasticité plus élevées que le LS pathologique de façon à compenser son déficit rhéologique.

d) Avantages/inconvénients

En fournissant un environnement physique qui protège l'articulation et améliore sa mobilité, le hylane facilite la régénération des tissus et la guérison. De plus, grâce au long temps de séjour du gel de hylane dans l'articulation on observe des effets thérapeutiques à long terme [103]. Par contre, la source animale du HA pourrait être problématique du fait de la présence de protéines non éliminées dans les hylanes, et par la présence de traces de formaldéhyde utilisé pour extraire le HA de la crête de coq. Un autre inconvénient de ce produit serait le fait que le gel soit chimique.

Ce produit sera notre référence. Notre objectif sera d'atteindre (ou de dépasser) les propriétés physico-chimique du Synvisc®. De plus, nous avons l'avantage de modifier chimiquement un HA de source bactérienne et non animale et nous développons un gel physique et non chimique.

V.2.2 HA réticulé développé par la société Fidia advanced biopolymers S.R.L

La société FIDIA S.R.L. fait partie des leaders du marché des biomatériaux orthopédiques européens à cotés des deux autres sociétés Genzyme Inc et Bioniche Life sciences Inc [104]. Fidia S.R.L. travaille beaucoup sur le développement de nouveaux biomatériaux pour la viscothérapie.

Un brevet a été déposé en 1997 sur le développement de HA réticulé mélangé au HA linéaire pour la thérapie de l'arthrose [105, 106]. Dans cette formulation, le HA réticulé (ACPTM : Auto Crosslinked HA Polysaccharide) est obtenu par la formation de liaisons ester intra et inter-chaînes (Figure I-12).

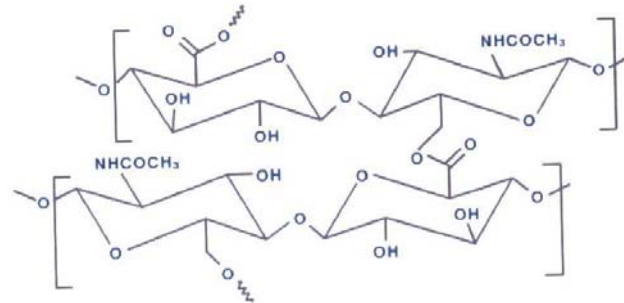


Figure I- 12 : structure chimique de l'unité disaccharidique de deux chaînes réticulées par la formation de liaisons esters.

Le HA initial utilisé a une masse molaire moyenne $M_w \sim 500-730$ Kg/mol. Il est pur, de grade pharmaceutique, avec un degré de réticulation (DR) allant de 1 à 30%. L'origine du HA dans cette invention est de source animale (crête de coq), il est noté NIF-NaHA (non Inflammatory sodium hyaluronate) comme décrit par Balaz [8].

La figure I-13 montre les propriétés rhéologiques des produits développés par Fidia Inc. pour la viscosupplémentation. Des mélanges de ACPTM (DR 5%) et de HA linéaire ($M_w \sim 500-730$ Kg/mol) ont été effectués pour obtenir une variété de produits afin de les adapter aux différents grades d'arthrose.

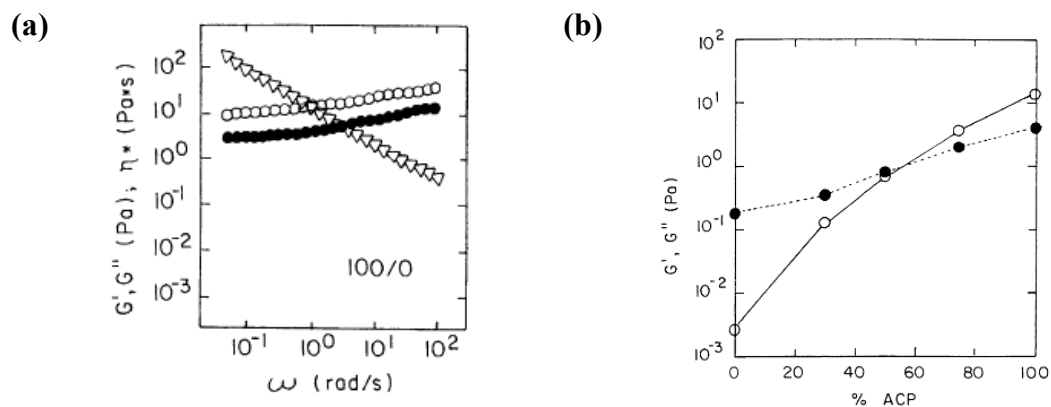


Figure I- 13 : Variation des modules élastiques G' et visqueux G'' (Pa) pour un échantillon composé de 100% d'ACPTM à 10g/L dans du PBS (a), et pour les mélanges d'ACPTM et de HA linéaire à une concentration de 10g/L en polymère (b)[105] G' (ronds vides) et G'' (ronds pleins).

La figure I-14 montre le comportement rhéologique du mélange ACPTM/HA : 50/50 avec un degré de réticulation de 20%. Nous pouvons voir que les modules élastiques et visqueux sont très proches et qu'ils se croisent à deux fréquences. Ce comportement pourrait

traduire la présence de particules de microgels dans la solution ou d'une solubilisation incomplète comme discuté pour d'autres systèmes de polymère [107].

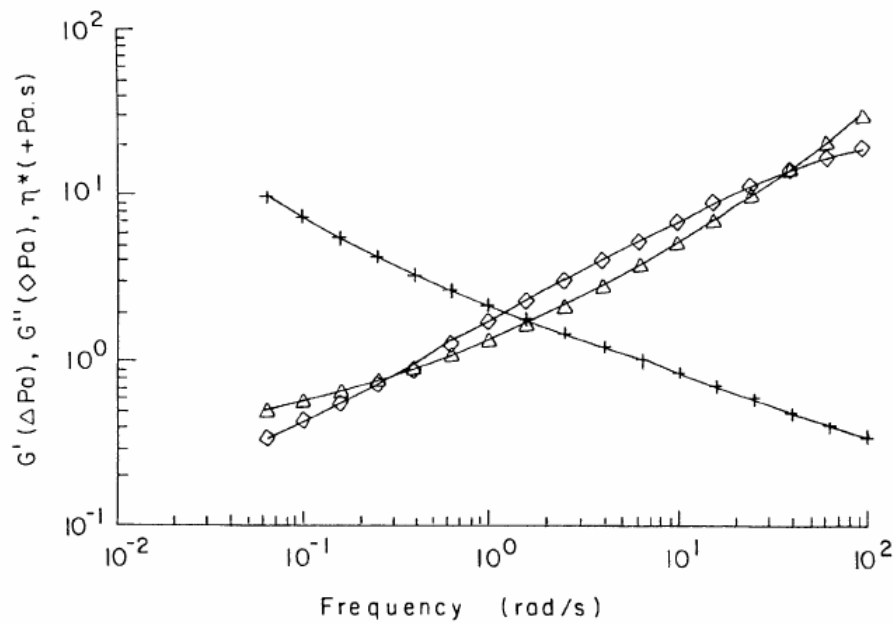


Figure I- 14 : Comportement rhéologique du mélange ACP™/HA : 50/50, sachant que le degré de réticulation est de 20%, la concentration en polymère est de 10g/L dans du PBS [105].

La figure I-15 compare la viscosité d'une solution de HA auto-réticulé avec un degré de réticulation de 20% à d'autres viscosuppléments commerciaux.

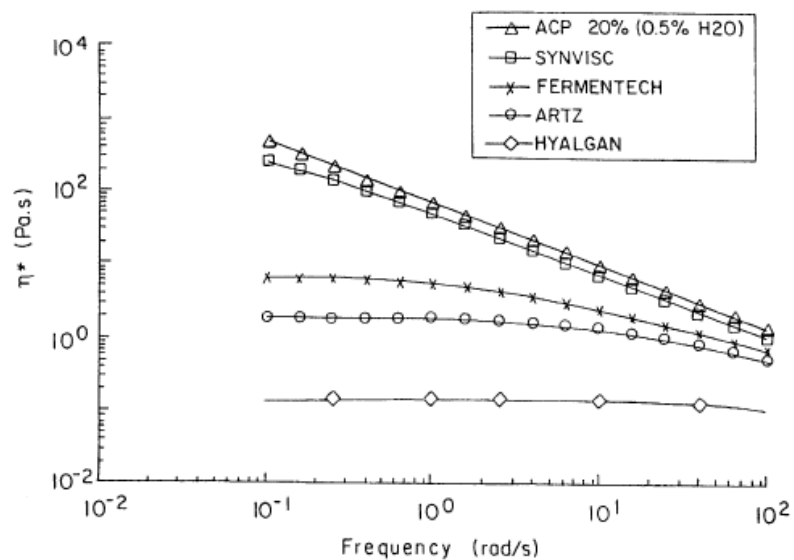


Figure I- 15 : comparaison de la viscosité complexe des composés ACP développés par Fidia et d'autres viscosuppléments commerciaux [105].

ACPTM est un polymère biocompatible et biodégradable car les ponts de réticulation sont de la même nature que dans le HA. Les propriétés viscoélastiques du HA réticulé s'alignent parfaitement avec les propriétés rhéologiques de certains viscosuppléments présents sur le marché (Synvisc[®]) et peuvent varier en faisant varier le degré de réticulation et la concentration en polymère. Les applications visées par Fidia S.R.L. pour ces dérivés de HA sont : l'orthopédie, l'ophtalmologie, la réparation tissulaire et le relargage de médicaments[108-112].

V.2.3 Hydrogels de HA obtenus par double réticulation

Zhao *et al.* ont trouvé que si le HA était réticulé à lui-même ou à un autre polymère (synthétique ou naturel), en deux étapes, un degré de réticulation élevé ainsi qu'une meilleure biostabilité pouvait être obtenus [113]. Le même agent réticulant est utilisé pour les deux étapes de réticulation mais le groupement fonctionnel réactif diffère. Les époxydes font partie des agents de réticulation les plus utilisés pour les biopolymères. La réticulation du HA a été effectuée en utilisant l'épichlorohydrine (ECH). Les groupements fonctionnels du HA qui réagissent avec l'époxyde sont la fonction carboxylique et les groupements hydroxyle. En milieu acide, l'époxyde réagit avec le groupement carboxylique pour former une liaison ester, alors qu'en milieu basique c'est le groupement hydroxyle qui réagit avec l'époxyde via une liaison éther.

La figure I- 16 montre le processus de réticulation développé par Zhao *et al* [113]. Dans cette procédure, une première étape de réticulation consiste à former une liaison éther stable via les groupements hydroxyle. La seconde étape, consiste à former les liaisons ester par réaction avec les groupements carboxyle.

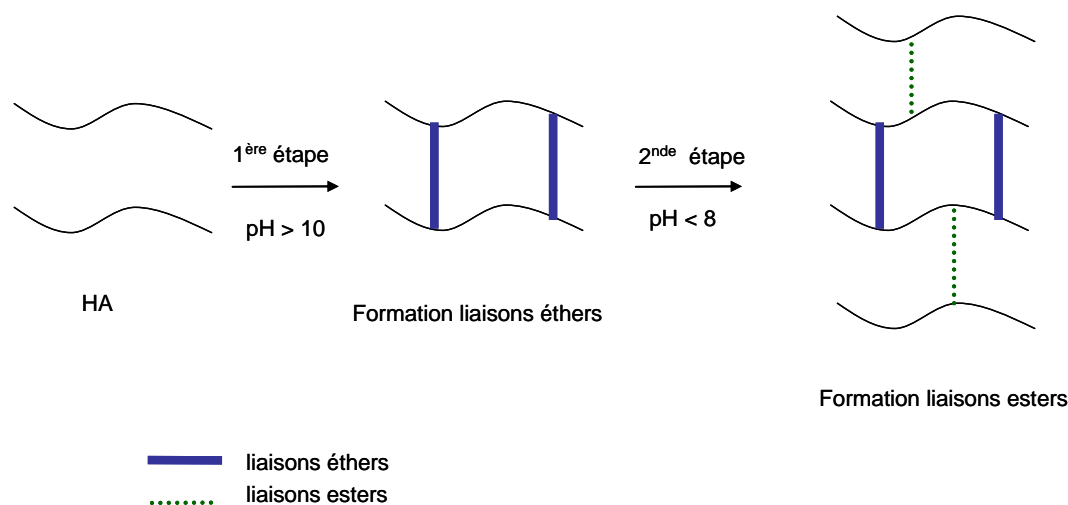


Figure I- 16 : Schéma de la procédure de synthèse du HA doublement réticulé [113].

Lors de la seconde étape de réticulation, il est possible de former les liaisons ester soit entre les chaînes de HA, soit en intégrant d'autres polymères tel que l'alcool polyvinylique (PVA) ou l'alginate. Les propriétés rhéologiques du HA initial et du HA doublement réticulé sont présentées sur la figure I-17.

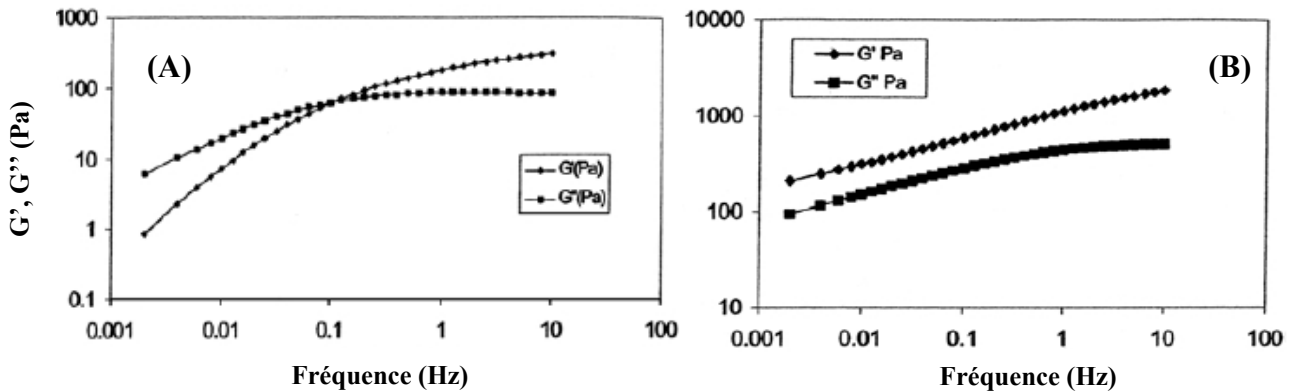


Figure I- 17 : Propriétés rhéologiques du HA linéaire non modifié à 15 g/L (A) et du HA doublement réticulé (B) à 16g/L.

Nous observons un changement de comportement rhéologique, avec le passage d'une solution viscoélastique pour le HA non modifié à un comportement de type gel pour le HA doublement réticulé. Les modules G' et G'' ont des valeurs importantes comparés aux autres viscosuppléments. Il serait difficile de faire passer une solution aussi visqueuse à travers une seringue ; son application dans la viscosupplémentation se trouve limitée. Par ailleurs, il serait envisageable d'utiliser de tels matériaux pour la visco-séparation ou l'adhésion tissulaire.

Les tests de biocompatibilité de différents biomatériaux produits par cette méthode sont en cours d'investigation.

V.2.4 Hydrogels développés par la société Cornéal (France)

Les laboratoires CORNEAL[®] (Paris, France), dans le cadre du développement de son activité en chirurgie oculaire, ont conçu et mis sur le marché depuis 1995 trois solutions viscoélastiques à base de HA (Tableau I-4).

Nom	Concentration	Origine	Masse molaire	Viscosité dynamique
VISCORNEAL [®] Plus	14 g/L	Crêtes de coq	5×10^6 g/mol	500 Pa.s à $0,1s^{-1}$
VISCORNEAL	1 g/L	Crêtes de coq	5×10^6 g/mol	180 Pa.s à $0,1s^{-1}$
BIOCORNEAL	1,35 g/L	Fermentation	$2,5 \times 10^6$ g/mol	120 Pa.s à $0,1s^{-1}$

Tableau I- 4 : Solutions viscoélastiques à base de HA développées par CORNEAL[®] pour la chirurgie oculaire.

Ces trois solutions se différencient les unes des autres soit par l'origine du HA (et donc par la masse molaire apparente) soit par leurs concentrations en solution.

Un procédé de réticulation du HA a été mis au point pour le développement de deux implants utilisés comme adjuvant dans le traitement chirurgical non perforant du glaucome chronique à angle ouvert, SKGel[®]3,5 et SKGel[®]4,5. Ces implants, en HA réticulé, visent à empêcher une colonisation trop rapide de l'espace chirurgicalement créé par un tissu cicatriciel afin de maintenir et améliorer l'écoulement de l'humeur vitreuse.

En rhumatologie et en orthopédie, les laboratoires CORNEAL[®] ont développé VISCORNEAL[®]ORTHO, une solution de HA, faiblement réticulé, issu de crête de coq ayant une masse molaire moyenne de 6×10^6 g/mol.

En dermatologie, les laboratoires CORNEAL[®] en collaboration avec LEADERM[®] ont créé une gamme complète de produits de comblement pour les rides : les produits JUVEDERM[®] 18, 24 et 30 sont adaptés à tous types de rides et ridules dont la différence réside dans la concentration et le taux de réticulation. Ces produits sont obtenus à partir de HA issus de fermentation bactérienne et réticulé chimiquement en utilisant le BDDE (1,4 butanediol diglycidyl éther) comme agent réticulant. Ce dernier permet d'obtenir une réaction similaire à celle utilisée par Zhao *et al.* [113] avec l'épichlorohydrine (ECH). L'hydrogel JUVEDERM[®] correspond à un réseau tridimensionnel formé par des liaisons éther. La concentration des solutions varie entre 22 et 26 g/L.

V.3 Principaux hydrogels physiques pour la viscothérapie

V.3.1 Dérivés associatifs du HA reposant sur des interactions hôte/ invité

Un nouveau dérivé associatif à base d'acide hyaluronique a été développé par Soltès en collaboration avec la société Fidia S.R.L. [114, 115]. Ce dérivé repose sur l'association de deux dérivés du hyaluronane de masses molaires (M_w) différentes, l'un correspond à un HA porteur de β -cyclodextrines (HA- β CD, $M_w \sim 200K$ g/mol) et l'autre à un *N*-acylurée (HA-EDC, $M_w \sim 100K$ g/mol) (Figure I-18).

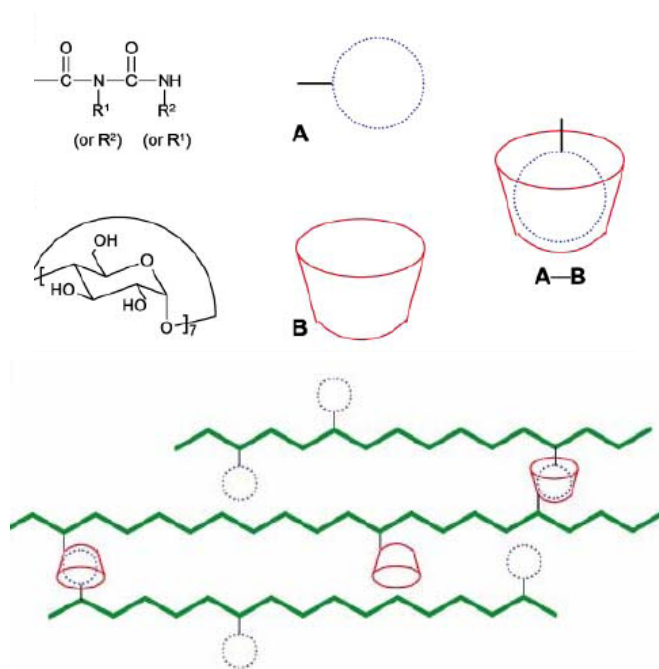


Figure I- 18 : Structure chimique du *N*-acylurée ($R^1 = Et, R^2 = Me_2N-(CH_2)_3$) A et de la β -cyclodextrine B, ainsi que le complexe d'inclusion HA-EDC et HA- β CD.

Ce nouveau dérivé a été proposé pour répondre à un problème technique rencontré lors de la viscosupplémentation, qui est la forte viscosité des produits pour l'injection à travers les seringues. Soltès *et al.* [114] ont montré qu'il est possible de contourner ce problème technique en utilisant des systèmes associatifs de HA incluant des principes actifs. En injectant un tel « cocktail », les molécules de principes actifs incluses dans le système associatif bloque le processus d'association. Ainsi, après injection, la complexation aura lieu *in situ* après que le principe actif se soit dispersé dans l'articulation.

L'inconvénient de ces travaux est le couplage du HA porteur de cavités de β -cyclodextrines. Ce dernier 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.

Des travaux similaires ont été effectués au sein de notre laboratoire, le couplage HA- β CD est dans ce cas contrôlé, sélectif et effectué dans l'eau [116-118]. Dans cette étude deux assemblages supramoléculaires de structures différentes ont été envisagés, un assemblage stabilisé par des complexes d'inclusion β -cyclodextrine et adamantane (AD) simple d'une part (monomère), et par des paires de complexes β -CD/AD d'autre part (dimère) (Figure I-19).

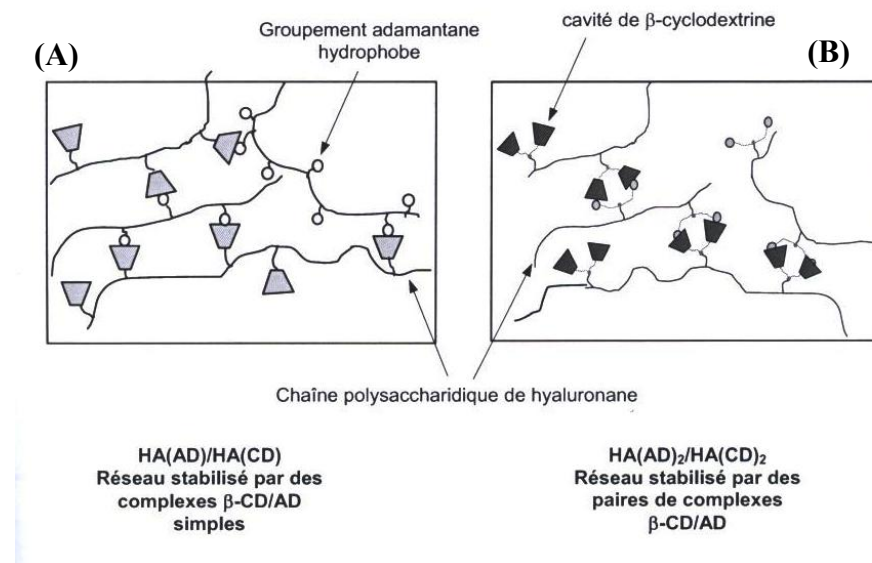


Figure I- 19 : Représentation schématique du réseau tridimensionnel (A) $HA(AD)/HA(CD)$ et du système (B) $HA(AD)_2/ HA(CD)_2$ [118].

L'étude de la complexation des dimères de CD et AD par titration calorimétrique (ITC) a permis de mettre en évidence une large augmentation de la constante d'association par rapport à la complexation des monomères. La valeur de l'enthalpie de complexation deux fois plus élevée avec les dimères suggère un processus de complexation divalent, en accord avec les données de la littérature. Néanmoins, une diminution des propriétés d'inclusion de ces dimères greffés sur le polysaccharide a été observée. Elle est liée à la restriction de mobilité due à la chaîne polymère, aux répulsions électrostatiques dans le cas du HA-CD et du HA-CD₂ complexant les dérivés chargés d'adamantane, et à la formation d'interactions hydrophobes AD/AD dans le cas du HA-AD₂.

L'étude des propriétés viscoélastiques de ces assemblages par rhéologie dynamique a permis de mettre en évidence la formation de réseaux tridimensionnels temporaires. Les deux mélanges ont des comportements viscoélastiques différents, liés à la nature de la jonction interchaîne. Cependant, les différences apparaissent moins marquées qu'escomptées, ce qui a été expliquées par un phénomène d'encombrement stérique gênant la formation des complexes divalents (figure I-20).

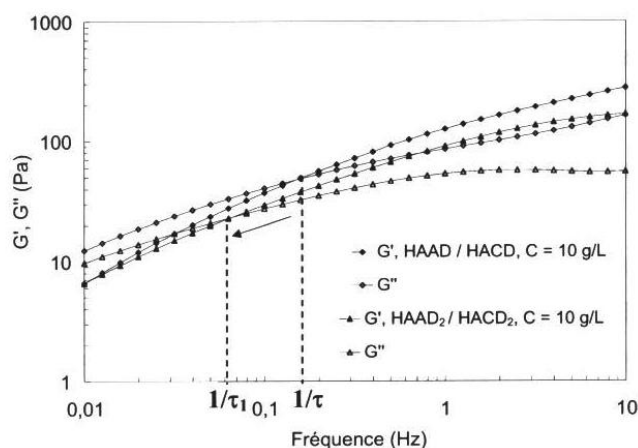


Figure I- 20 : Variation des modules élastiques et visqueux en fonction de la fréquence pour les mélanges HA(AD)₂/ HA(CD)₂ et HA(AD)/HA(CD) à 10g/L dans NaCl 0,025M à 25°C [118].

V.3.2 Dérivés amphiphiles du HA

Des dérivés amphiphiles de l'acide hyaluronique présentant des propriétés rhéologiques adéquates peuvent être implantés dans les lésions arthrosiques du cartilage articulaire, par simple injection et conduire à la production d'un néocartilage aux propriétés satisfaisantes. Ces dérivés sont obtenus par immobilisation covalente de longues chaînes aliphatiques (dodécyle C12 et octadécyle C18) sur le squelette du polysaccharide. Le greffage des longues chaînes alkyle (C12 et C18) à faible taux sur la chaîne polysaccharidique a été réalisé par l'intermédiaire de liaisons esters entre les fonctions carboxylate du HA et les chaînes alkyle en milieu organique [119]. La biocompatibilité et la biofonctionnalité de ces hydrogels ont été contrôlées à la fois *in vitro* sur des cultures de chondrocytes (cytotoxicité, prolifération cellulaire) et *in vivo* par des implantations dans des genoux de rats et par analyse du néocartilage [120-122].

Les dérivés ainsi obtenus présentent la caractéristique de donner naissance, en milieu aqueux, à des hydrogels physiques dont les propriétés rhéologiques dépendent classiquement d'une part de la longueur et du taux de greffage des chaînes alkyle et d'autre part de la concentration en polymère [122].

La formation de ces gels tient au fait qu'en milieu aqueux, les polymères s'organisent en réseaux tridimensionnels dans lesquels les groupements alkyle s'associent par interactions hydrophobes, ce qui contribue à la mise en place de micro-domaines hydrophobes pontant les chaînes polysaccharidique entre elles (Figure I-21).

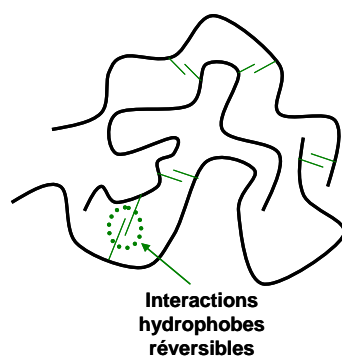


Figure I- 21 : Représentation schématique des interactions hydrophobes qui pontent les chaînes polysaccharidiques.

Les hydrogels formés ont un module élastique de l'ordre de 7 Pa à 1Hz, ils peuvent être fluidifiés sous l'effet d'un cisaillement et retrouvent leur viscosité initiale quelques minutes après l'arrêt du cisaillement. Ils sont donc faciles à mettre en place dans la lésion, avec un temps de reprise de viscosité raisonnable (Figure I-22).

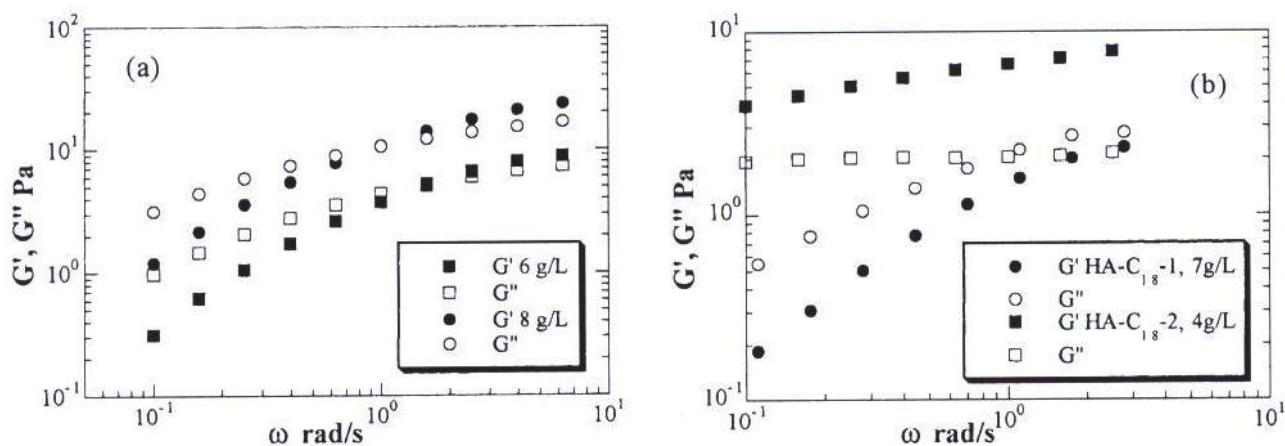


Figure I- 22 : Propriétés rhéologiques du dérivé HA porteur de chaînes en C12 avec un degré de substitution (DS) de 5% à 6 et 8g/L (a) et du HA porteur de chaînes en C18 avec deux DS de 1 et 2% à 7 et 4g/L respectivement, dans du NaCl 0,15M à 37°C [122] .

Les hydrogels purement associatifs sont réversibles et leur contact prolongé avec des fluides biologiques entraîne une dégradation progressive du biomatériau. Cette propriété ne s'est pas révélée gênante lors de l'utilisation des hydrogels sur des genoux de rats, dans la mesure où le contact avec les fluides est relativement restreint. Ceci ne serait pas le cas lors d'une utilisation chez l'homme où l'on pourrait craindre que l'hydrogel soumis à des flux de liquide biologique plus important que chez le rat, ne reste pas en place suffisamment longtemps pour assurer une bonne réparation.

Pour surmonter cette difficulté, Dellacherie *et al.* ont entrepris de nouveaux travaux visant à introduire un petit nombre de ponts covalents irréversibles entre les chaînes polymères par l'utilisation d'un agent réticulant. Le but était d'obtenir une structure de gel injectable associant des propriétés de rhéofluidification suffisantes et un temps de reprise de viscosité approprié, pour la mise en place dans la lésion et une meilleure stabilité au contact des fluides biologiques [121].

V.3.3 Hyaluronane hydrophobiquement modifié.

De nouveaux systèmes associatifs à base d'acide hyaluronique hydrophobiquement modifiés ont pu être obtenus [96]. La synthèse de ces dérivés est effectuée de façon contrôlée en milieu aqueux. La première étape consiste en la préparation d'un dérivé du HA sélectivement modifié avec l'acide adipique dihydrazide (HA-ADH) avec un degré de substitution de 8%. Par la suite, les chaînes alkyle de différentes longueurs (C8, C10, C12) sont greffées sur le polymère par amination réductrice avec un degré de substitution de 5%. Ces polymères sont solubles dans l'eau et présentent des propriétés associatives remarquables en présence de sel. La formation des domaines hydrophobes est montrée par fluorescence en présence d'une sonde polyaromatique apolaire (pyrène). Il a été montré dans cette étude que la viscosité des solutions de HA greffé avec des chaînes en C10 et C12 dans du NaCl 0,1M est non-newtonienne (significatif d'association inter-moléculaire) (figure I-23 a et b). Un comportement de type gel est observé par mesure des modules rhéologiques G' et G'' en fonction de la fréquence (figure I-24)

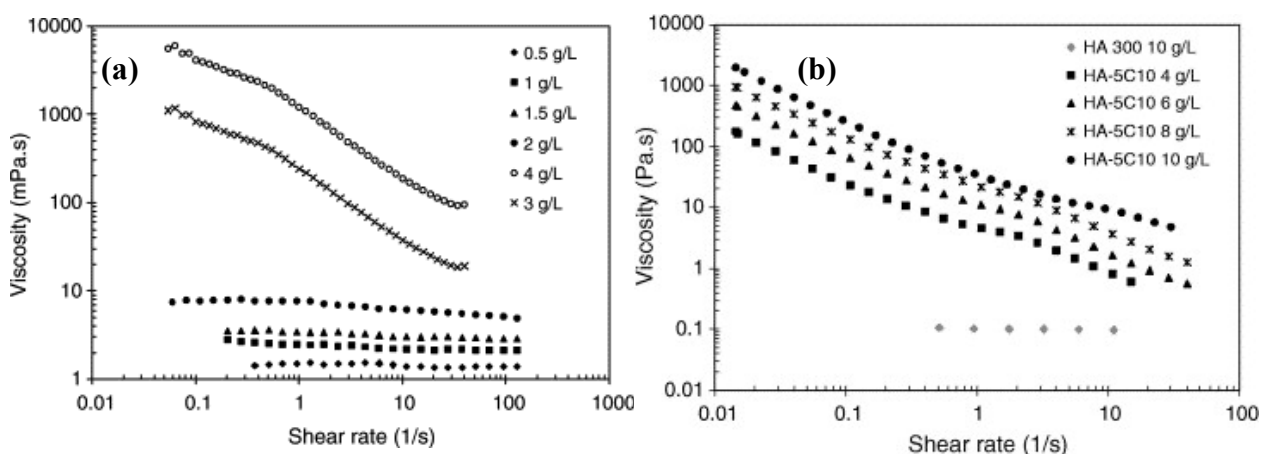


Figure I- 23 : Comportement en écoulement du (a) dérivé HA porteur de 4% de chaînes alkyle en C12 à différentes concentrations, et du (b) dérivé HA porteur de 5% de chaînes alkyle en C10 à différentes concentration.

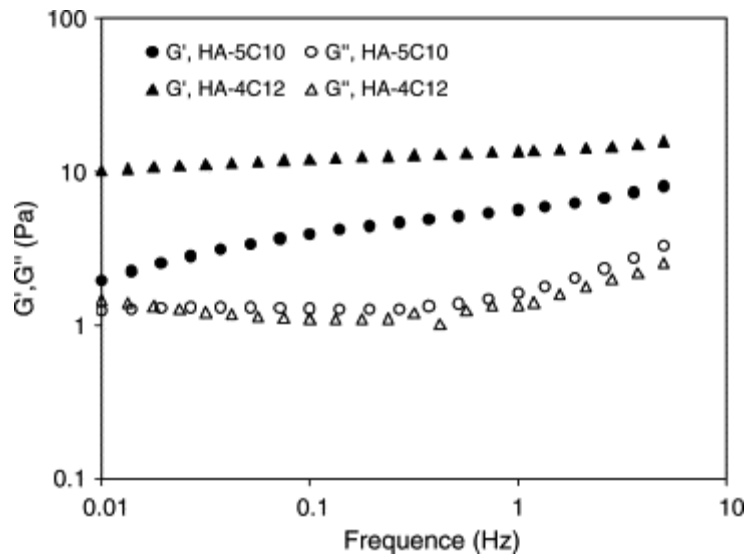


Figure I- 24 : comparaison des modules élastiques G' et visqueux G'' en fonction de la fréquence pour des solutions de HA greffés par 5% de chaînes alkyle de longueurs C10 et des solutions de HA greffé par 4% de chaînes alkyle de longueurs C12 (7g/L dans NaCl 0,1M à 25°C).

Les modules élastiques des produits ainsi obtenus sont de l'ordre de 10 Pa pour une fréquence de 1Hz avec un dérivé alkyle porteur de chaînes avec 12 atomes de carbone et un degré de substitution de 4%. Ces résultats sont très intéressants et pourraient être utilisés en viscosupplémentation.

Conclusion

Afin de mieux situer le contexte de l'étude, nous avons présenté dans ce chapitre, l'acide hyaluronique, son origine, ses propriétés biologiques, physico-chimiques, rhéologiques et les différents domaines d'applications du hyaluronane et de ses dérivés. Nous nous sommes focalisés sur la viscosupplémentation qui est l'application essentiellement visée par nos travaux. Nous avons présenté différents hydrogels chimiques et physiques qui nous paraissent les plus pertinents pour la viscothérapie.

Comme décrit précédemment, des travaux ont été élaborés au sein de notre laboratoire pour le développement de nouveaux systèmes associatifs à base d'acide hyaluronique hydrophobiquement modifié. Les premiers résultats obtenus ont été très encourageant et nous avons ainsi pu obtenir une collaboration avec l'entreprise Agro-industrie Recherche et Développements (A.R.D, Pomacle, FRANCE) pour l'optimisation de la synthèse et le développement d'une gamme de produits pour la viscosupplémentation.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux de thèse que nous présentons dans la suite du manuscrit.

Références bibliographiques

1. Meyer K, Palmer JW: **The polysaccharide of the vitreous humor.** *Journal of Biological Chemistry* 1934, **107**:629-634.
2. Hadidian Z, Pirie NW: **Preparation and some properties of hyaluronic acid from human umbilical cord.** *Biochemical Journal* 1948, **42**:260-265.
3. Jeanloz RW, Flowers HM: **Isolation and synthesis of the methyl ester-methyl glycoside of 2-acetamido-2-deoxy-3-O-b-D-glucuronosyl Dglucose (hyalobiuronic acid).** *Journal of the American Chemical Society* 1962, **84**:3030.
4. Stoffyn PJ, Jeanloz RW: **Hyaluronic acid and related substances. XII. Identification of amino sugars by paper chromatography.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1954, **52**:373-379.
5. Blix G: **Structure of hyluronic acid.** *Acta Chemica Scandinavica* 1951, **5**:981-989.
6. Weissmann B, Meyer K: **Structure of hyaluronic acid. The glucuronidic linkage.** *Journal of the American Chemical Society* 1952, **74**:4729.
7. Balazs EA, Laurent TC, Jeanloz RW: **Nomenclature of hyaluronic acid.** *Biochemical Journal* 1986, **235**(3):903.
8. Balazs EA: **Ultrapure hyaluronic acid and its use.** In. United States Patent 4782046 (Biotrics, Inc., USA). 1979: 9 pp.
9. Miyoshi T, Kitagawa H, Chiba S, Hashimoto M, Saegusa H: **Hyaluronic acid manufacture with Streptococcus equi.** In. Application: JP: (Denki Kagaku Kogyo K. K., Japan). 1988: 5 pp.
10. Hashimoto M, Saegusa H, Chiba S, Kitagawa H, Myoshi T: **fermentative manufacture of hyaluronic acid with high reproducibility.** In. Application: JPJP: (Denki Kagaku Kogyo K. K., Japan). 1988: 5 pp.
11. Akasaka H, Seto S, Yanagi M, Fukushima S, Mitsui T: **Industrial production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus.** *Journal of SCCJ* 1988, **22**(1):35-42.
12. Bettelheim FA: **Crystalline sodium hyaluronate.** *Nature* 1958, **182**(4645):1301-1302.
13. Atkins EDT, Sheehan JK: **Structure for hyaluronic acid.** *Nature (London), New Biology* 1972, **235**(60):253-254.
14. Sheehan JK, Atkins EDT, Nieduszynski IA: **X-ray diffraction studies on the connective tissue polysaccharides. Two-dimensional packing schemes for threefold hyaluronate chains.** *Journal of Molecular Biology* 1975, **91**(2):153-163.

15. Winter WT, Smith PJ, Arnott S: **Hyaluronic acid: structure of a fully extended 3-fold helical sodium salt and comparison with the less extended 4-fold helical forms.** *Journal of molecular biology* 1975, **99**(2):219-235.
16. Dea IC, Moorhouse R, Rees DA, Arnott S, Guss JM, Balazs EA: **Hyaluronic acid: a novel, double helical molecule.** *Science (New York, NY)* 1973, **179**(73):560-562.
17. Hirano S, Kondo S: **Molecular conformational transition of hyaluronic acid in solution.** *Journal of biochemistry (Tokyo)* 1973, **74**(4):861-862.
18. Hirano S, Kondo-Ikeda S: **Molecular conformation of polysaccharides in solution. Changes in the optical rotation and in the elution pattern of gel filtration.** *Biopolymers* 1974, **13**(7):1357-1366.
19. Scott JE, Tigwell MJ: **Periodate oxidation and the shapes of glycosaminoglycuronans in solution.** *The Biochemical journal* 1978, **173**(1):103-114.
20. Scott JE, Heatley F, Hull WE: **Secondary structure of hyaluronate in solution. A ¹H-n.m.r. investigation at 300 and 500 MHz in [2H₆]dimethyl sulphoxide solution.** *The Biochemical journal* 1984, **220**(1):197-205.
21. Cowman MK, Cozart D, Nakanishi K, Balazs EA: **¹H NMR of glycosaminoglycans and hyaluronic acid oligosaccharides in aqueous solution: the amide proton environment.** *Archives of biochemistry and biophysics* 1984, **230**(1):203-212.
22. Heatley F, Scott JE: **A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan.** *The Biochemical journal* 1988, **254**(2):489-493.
23. Guss JM, Hukins DWL, Smith PJC, Winter WT, Arnott S, Moorhouse R, Rees DA: **Hyaluronic acid. Molecular conformations and interactions in two sodium salts.** *Journal of Molecular Biology* 1975, **95**(3):359-384.
24. Haxaire K, Braccini I, Milas M, Rinaudo M, Perez S: **Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modeling.** *Glycobiology* 2000, **10**(6):587-594.
25. Haxaire K, Marechal Y, Milas M, Rinaudo M: **Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments.** *Biopolymers* 2003, **72**(1):10-20.
26. Haxaire K, Marechal Y, Milas M, Rinaudo M: **Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. II. Definition and quantitative analysis of elementary hydration spectra and water uptake.** *Biopolymers* 2003, **72**(3):149-161.
27. Marechal Y, Milas M, Rinaudo M: **Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. III. Structure and mechanism of hydration.** *Biopolymers* 2003, **72**(3):162-173.

28. Almond A, Brass A, Sheehan JK: **Oligosaccharides as Model Systems for Understanding Water-Biopolymer Interaction: Hydrated Dynamics of a Hyaluronan Decamer.** *Journal of Physical Chemistry B* 2000, **104**(23):5634-5640.
29. Almond A, Brass A, Sheehan JK: **Dynamic exchange between stabilized conformations predicted for hyaluronan tetrasaccharides: comparison of molecular dynamics simulations with available NMR data.** *Glycobiology* 1998, **8**(10):973-980.
30. Almond A, Sheehan JK, Brass A: **Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution.** *Glycobiology* 1997, **7**(5):597-604.
31. Atkins EDT, Meader D, Scott JE: **Model for hyaluronic acid incorporating four intramolecular hydrogen bonds.** *International Journal of Biological Macromolecules* 1980, **2**(5):318-319.
32. Fouissac E: **Contribution à l'obtention d'acide hyaluronique par voie fermentaire et étude de ses propriétés physico-chimiques.** *Thèse de doctorat de l'université Joseph Fourier, Grenoble I, France* 1992.
33. Balazs EA: **Sediment volume and viscoelastic behavior of hyaluronic acid solutions.** *Federation Proceedings* 1966, **25**(6):1817-1822.
34. Gatej I, Popa M, Rinaudo M: **Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution.** *Biomacromolecules* 2005, **6**(1):61-67.
35. Roure I: **Rhéologie et Dimensions des chaînes du hyaluronane en solution.** *Thèse de doctorat de l'université Joseph Fourier, Grenoble I, France* 1997.
36. Haxaire K, Buhler E, Milas M, Perez S, Rinaudo M: **Predictive and experimental behavior of hyaluronan in solution and solid state.** *Hyaluronan, [Proceedings of the International Cellucon Conference], 12th, Wrexham, United Kingdom, 2000* 2002, **1**:37-46.
37. Fouissac E, Milas M, Rinaudo M: **Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte.** *Macromolecules* 1993, **26**(25):6945-6951.
38. Fouissac E, Milas M, Rinaudo M, Borsali R: **Influence of the ionic strength on the dimensions of sodium hyaluronate.** *Macromolecules* 1992, **25**(21):5613-5617.
39. Milas M, Rinaudo M, Fouissac E, Launay F: **Molecular weight and rheological measurements of sodium hyaluronate.** *Cosmetics & Toiletries* 1993, **108**(12):57-58, 60, 62-53.
40. Gibbs DA, Merrill EW, Smith KA, Balazs EA: **Rheology of hyaluronic acid.** *Biopolymers* 1968, **6**(6):777-791.
41. Balazs EA, Gibbs DA: **Rheological properties and biological function of hyaluronic acid.** *Chem Mol Biol Intercell Matrix, Advan Study Inst* 1970, **3**:1241-1253.

42. Yanaki T, Yamaguchi T: **Temporary network formation of hyaluronate under a physiological condition. 1. Molecular-weight dependence.** *Biopolymers FIELD Full Journal Title:Biopolymers* 1990, **30**(3-4):415-425.
43. Kobayashi Y, Okamoto A, Nishinari K: **Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights.** *Biorheology* 1994, **31**(3):235-244.
44. Pisarcik M, Bakos D, Ceppan M: **Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution.** *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1995, **97**(3):197-202.
45. Berriaud N, Milas M, Rinaudo M: **Characterization and properties of hyaluronic acid (hyaluronan).** *Polysaccharides* 1998:313-334.
46. Berriaud N, Milas M, Rinaudo M: **Rheological study on mixtures of different molecular weight hyaluronates.** *International Journal of Biological Macromolecules* 1994, **16**(3):137-142.
47. Graessley WW: **Advances in Polymer Science, Vol. 16: The Entanglement Concept in Polymer Rheology;** 1974.
48. Milas M, Rinaudo M, Tinland B: **The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions.** *Polymer Bulletin (Berlin, Germany)* 1985, **14**(2):157-164.
49. Kwei TK, Nakazawa M, Matsuoka S, Cowman MK, Okamoto Y: **Concentration dependence of solution viscosities of rigid rod polymers.** *Macromolecules* 2000, **33**(2):235-236.
50. Evanko SP, Parks WT, Wight TN: **Intracellular hyaluronan in arterial smooth muscle cells: Association with microtubules, RHAMM, and the mitotic spindle.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2004, **52**(12):1525-1535.
51. Evanko SP, Wight TN: **The presence and processing of intracellular hyaluronan in proliferating cells.** *Hyaluronan, [Proceedings of the International Cellucon Conference], 12th, Wrexham, United Kingdom, 2000* 2002, **1**:451-456.
52. Juhlin L: **Hyaluronan in skin.** *Journal of Internal Medicine* 1997, **242**(1):61-66.
53. Prehm P: **Hyaluronan in rheumatoid arthritis: a review.** *International Congress Series* 2000, **1196**(New Frontiers in Medical Sciences: Redefining Hyaluronan):129-135.
54. Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, Arnold K: **Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: Molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies.** *Current Medicinal Chemistry* 2003, **10**(20):2123-2145.
55. Schurz J: **Rheology of synovial fluids and substitution polymers.** *Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry* 1996, **A33**(9):1249-1262.

56. Soltes L, Mendichi R, Kogan G, Schiller J, Stankovska M, Arnhold J: **Degradative Action of Reactive Oxygen Species on Hyaluronan**. *Biomacromolecules* 2006, **7**(3):659-668.
57. Tammi MI, Day AJ, Turley EA: **Hyaluronan and homeostasis: A balancing act**. *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(7):4581-4584.
58. Kogan G, Soltes L, Stern R, Schiller J, Mendichi R: **Hyaluronic acid: its function and degradation in vivo systems**, vol. 35. Amsterdam: Elsevier; 2007.
59. Fusenig NE, Stark H-J, Willhauck M, Pavesio A: **Biomaterials based on hyaluronic acid for the anti-angiogenic therapy in the treatment of tumors**. In. Application: WO: (Fidia Farmaceutici S.p.A., Italy; Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)). 2003: 16 pp.
60. Lussow AR, Buelow R: **Use of hyaluronic acid as an immunosuppressant**. In. Application: WO: (Sangstat Medical Corporation, USA; Lussow, Alexander, R.; Buelow, Roland). 1997: 23 pp.
61. Gao F, Cao M, Yang C, He Y, Liu Y: **Preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides for angiogenesis study**. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials* 2006, **78B**(2):385-392.
62. West DC, Kumar S: **Hyaluronan and angiogenesis**. *Ciba Foundation Symposium* 1989, **143**(Biol. Hyaluronan):187-207.
63. Lisignoli G, Grassi F, Zini N, Toneguzzi S, Piacentini A, Guidolin D, Bevilacqua C, Facchini A: **Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan: Evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) involvement**. *Arthritis & Rheumatism* 2001, **44**(8):1800-1807.
64. Stern R, Asari AA, Sugahara KN: **Hyaluronan fragments: an information-rich system**. *European Journal of Cell Biology* 2006, **85**(8):699-715.
65. Balazs EA: **Chemistry and biology of hyaluronan: Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use**. Editors : Garg, H.G. Hales, C.A. , Amsterdam: Elsevier; 2004.
66. Bernatchez SF, Tabatabay C, Gurny R: **Sodium hyaluronate 0.25% used as a vehicle increases the bioavailability of topically administered gentamicin**. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 1993, **231**(3):157-161.
67. Balazs EA: **Medical applications of hyaluronan and its derivatives**. *Cosmet Pharm Appl Polym* 1991:293-310.
68. Denlinger JL: **Hyaluronan and its derivatives as viscoelastics in medicine**. *Wenner-Gren International Series* 1998, **72**(Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and Its Derivatives):235-242.
69. Piacquadio DJ, Larsen NE, Denlinger JL, Balazs EA: **Hylan B gel (Hylaform) as a soft tissue augmentation material**. *Basic and Clinical Dermatology* 1998, **15**(Tissue Augmentation in Clinical Practice):269-291.

70. St Onge R, Weiss C, Denlinger JL, Balazs EA: **A preliminary assessment of Na-hyaluronate injection into "no man's land" for primary flexor tendon repair.** *Clinical orthopaedics and related research* 1980(146):269-275.
71. Weiss C: **Viscoseparation and viscoprotection as therapeutic modalities in the musculoskeletal system.** *Wenner-Gren International Series : Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and Its Derivatives* 1998, **72**:255-266.
72. Weiss C, Levy HJ, Denlinger J, Suros JM, Weiss HE: **The role of Na-hylan in reducing postsurgical tendon adhesions.** *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases Orthopaedic Institute* 1986, **46**(1):9-15.
73. Weiss C, Suros JM, Michalow A, Denlinger J, Moore M, Tejeiro W: **The role of Na-hylan in reducing postsurgical tendon adhesions: Part 2.** *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases Orthopaedic Institute* 1987, **47**(1):31-39.
74. Balazs EA, Denlinger JL: **Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis.** *The Journal of rheumatology Supplement* 1993, **39**:3-9.
75. Balazs Endre A: **Viscosupplementation for treatment of osteoarthritis: from initial discovery to current status and results.** *Surgical technology international* 2004, **12**:278-289.
76. Dahl LB, Dahl IM, Engstrom-Laurent A, Granath K: **Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies.** *Annals of the rheumatic diseases* 1985, **44**(12):817-822.
77. Praest BM, Greiling H, Kock R: **Assay of synovial fluid parameters: hyaluronan concentration as a potential marker for joint diseases.** *Clinica Chimica Acta* 1997, **266**(2):117-128.
78. Waddell David D, Marino Andrew A: **Chronic knee effusions in patients with advanced osteoarthritis: implications for functional outcome of viscosupplementation.** *The journal of knee surgery* 2007, **20**(3):181-184.
79. Butler J, Rydell NW, Balazs EA: **Hyaluronic acid in synovial fluid. VI. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of arthritis in track horses.** *Acta veterinaria Scandinavica* 1970, **11**(2):139-155.
80. Balazs EA, Briller SO, Denlinger JL: **Sodium hyaluronate molecular size variations in equine and human arthritic synovial fluids and the effect on phagocytic cells.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1981, **11**(1, Suppl. 1):141-143.
81. Balazs EA: **The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid**, 2 edn. philadelphia: JB Lippincott; 1982.
82. Peyron JG, Balazs EA: **Preliminary clinical assessment of Na-hyaluronate injection into human arthritic joints.** *Pathologie-biologie (Paris)* 1974, **22**(8):731-736.

83. Biomatrix I, Ridgefiel, NJ, USA: **Viscosupplementation: a historical perspective.** *Hyaluronan, [Proceedings of the International Cellucon Conference], 12th, Wrexham, United Kingdom, 2000 2002, 2:385-389.*
84. Weiss C: **Why viscoelasticity is important for the medical uses of hyaluronan and Hylans.** *International Congress Series 2000, 1196*(New Frontiers in Medical Sciences: Redefining Hyaluronan):89-103.
85. Felson DT: **Hyaluronate sodium for osteoarthritis: Hope, hype, and hard truths.** *Archives of Internal Medicine 2002, 162*(3):245-247.
86. Rinaudo M, Auzely R, Kadi S, Bresin A, Kubik E: **New derivatives of hyaluronic acid, their preparation process and their uses.** In. Application: WO: (Centre National de Recherche Scientifique, Fr.; Agro Industrie Recherches et Developpements A.R.D.). 2007: 80pp.
87. Hennink WE, van Nostrum CF: **Novel crosslinking methods to design hydrogels.** *Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54*(1):13-36.
88. Abatangelo G, Barbucci R, Brun P, Lamponi S: **Biocompatibility and enzymic degradation studies on sulfated hyaluronic acid derivatives.** *Biomaterials 1997, 18*(21):1411-1415.
89. Chen G, Ito Y, Imanishi Y, Magnani A, Lamponi S, Barbucci R: **Photoimmobilization of Sulfated Hyaluronic Acid for Antithrombogenicity.** *Bioconjugate Chemistry 1997, 8*(5):730-734.
90. Speranza A, Pellizzaro C, Coradini D: **Hyaluronic acid butyric esters in cancer therapy.** *Anti-Cancer Drugs 2005, 16*(4):373-379.
91. Benedetti L, Cortivo R, Berti T, Berti A, Pea F, Mazzo M, Moras M, Abatangelo G: **Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaff) implanted in rats.** *Biomaterials 1993, 14*(15):1154-1160.
92. Luo Y, Ziebell MR, Prestwich GD: **A hyaluronic acid-taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells.** *Biomacromolecules 2000, 1*(2):208-218.
93. Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruyse KP, Ziebell MR: **Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives.** *Journal of Controlled Release 1998, 53*(1-3):93-103.
94. Kurisawa M, Chung JE, Yang YY, Gao SJ, Uyama H: **Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering.** *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom) 2005*(34):4312-4314.
95. Davidson JM, Nanney LB, Broadley KN, Whitsett JS, Aquino AM, Beccaro M, Rastrelli A: **Hyaluronate derivatives and their application to wound healing: preliminary observations.** *Clinical Materials 1991, 8*(1-2):171-177.

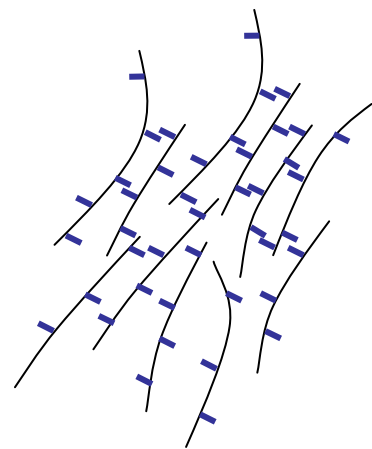
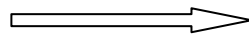
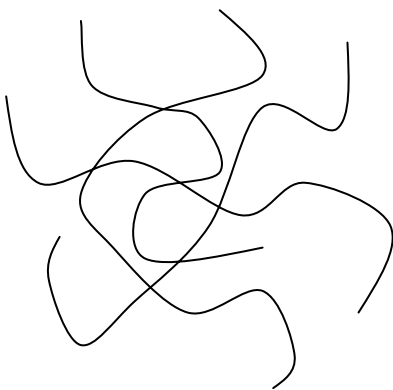
96. Creuzet C, Kadi S, Rinaudo M, Auzely-Velty R: **New associative systems based on alkylated hyaluronic acid. Synthesis and aqueous solution properties.** *Polymer* 2006, **47**(8):2706-2713.
97. Laurent TC, Hellsing K, Gelotte B: **Cross linked gels of hyaluronic acid.** *Acta Chemica Scandinavica* 1964, **18**(1):274-275.
98. Tomihata K, Ikada Y: **Crosslinking of hyaluronic acid with glutaraldehyde.** *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 1997, **35**(16):3553-3559.
99. Balazs EA, Larsen NE, Leshchiner A: **Drug delivery systems based on hyaluronan, derivatives thereof and their salts and method of producing same.** In. EP 224987: (Biomatrix, Inc., USA). 1987: 30 pp.
100. Balazs EA, Leshchiner A: **Hyaluronate-coated polymeric articles.** In. US 4500676 (Biomatrix, Inc., USA). 1985: 4 pp.
101. Balazs EA, Bland PA, Denlinger JL, Goldman AI, Larsen NE, Leshchiner EA, Leshchiner A, Morales B: **Matrix engineering.** *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 1991, **2**(1):173-178.
102. Weiss C, Band P: **Musculoskeletal applications of hyaluronan and hylan. Potential uses in the foot and ankle.** *Clinics in podiatric medicine and surgery* 1995, **12**(3):497-517.
103. Adams ME: **An analysis of clinical studies of the use of crosslinked hyaluronan, hylan, in the treatment of osteoarthritis.** *The Journal of rheumatology Supplement* 1993, **39**:16-18.
104. Krohn A: **Fidia Genzyme and Bioniche Life sciences lead the European Orthopedic Biomaterials market.** In.: Biotech Week editors 2006.
105. Belini D, Paparella A, O'Regan M, Callegaro L: **Autocrosslinked hyaluronic acid and related pharmaceutical compositions for the treatment of arthropathies.** In. WO/1997/049412: (Fidia S.P.A., Italy; Belini, Davide; Paparella, Annamaria; O'Regan, Michael; Callegaro, Lanfranco). 1997: 62 pp.
106. Mensitieri M, Ambrosio L, Nicolais L, Bellini D, O'Regan M: **Viscoelastic properties modulation of a novel autocrosslinked hyaluronic acid polymer.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1996, **7**(11):695-698.
107. Lefebvre J, Doublier J-L: **Rheological behavior of polysaccharides aqueous systems.** *Polysaccharides (2nd Edition)* 2005:357-394.
108. Alessandrini A, Di Bartolo C, Pavesio A, Pressato D: **ACP gel: a new hyaluronic acid-based injectable for facial rejuvenation. Preclinical data in a rabbit model.** *Plastic and reconstructive surgery* 2006, **118**(2):341-346.
109. Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI: **Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage.** *Journal of Orthopaedic Research* 1999, **17**(2):205-213.

110. Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI: **New Frontiers in Medical Sciences: Redefining Hyaluronan: Hyaluronic acid-based biomaterials in tissue engineered cartilage repair.** *International Congress Series* 2000, **1196**:233-246.
111. Solchaga LA, Yoo JU, Lundberg M, Dennis JE, Huibregtse BA, Goldberg VM, Caplan AI: **Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects.** *Journal of Orthopaedic Research* 2000, **18**(5):773-780.
112. Belluco C, Meggiolaro F, Pressato D, Pavesio A, Bigon E, Dona M, Forlin M, Nitti D, Lise M: **Prevention of Postsurgical Adhesions with an Autocrosslinked Hyaluronan Derivative Gel.** *Journal of Surgical Research* 2001, **100**(2):217-221.
113. Zhao XB, Fraser JE, Alexander C, Lockett C, White BJ: **Synthesis and characterization of a novel double crosslinked hyaluronan hydrogel.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002, **13**(1):11-16.
114. Soltes L, Mendichi R, Kogan G, Mach M: **Associating hyaluronan derivatives: a novel horizon in viscosupplementation of osteoarthritic joints.** *Chemistry & biodiversity* 2004, **1**(3):468-472.
115. Soltes L, Steiner B, Machova E, Kogan G, Bystricky S, Mendichi R: **Clathrate complexes formed by hyaluronic acid derivatives for pharmaceutical uses.** In. WO : 2001066601: (Fidia Farmaceutici S.p.A., Italy; Slovak Academy of Sciences Institute of Experimental Pharmacology). 2001: 23 pp.
116. Charlot A, Heyraud A, Guenot P, Rinaudo M, Auzely-Velty R: **Controlled Synthesis and Inclusion Ability of a Hyaluronic Acid Derivative Bearing b-Cyclodextrin Molecules.** *Biomacromolecules* 2006, **7**(3):907-913.
117. Charlot A, Auzely-Velty R: **Synthesis of Novel Supramolecular Assemblies Based on Hyaluronic Acid Derivatives Bearing Bivalent b-Cyclodextrin and Adamantane Moieties.** *Macromolecules* 2007, **40**(4):1147-1158.
118. Charlot A: **Assemblages supramoléculaires à base de hyaluronane modifié chimiquement : Synthèse et caractérisation physico-chimique.** *Thèse de doctorat de l'université Joseph Fourier, Grenoble I, France* 2005.
119. Pelletier S, Hubert P, Lapique F, Payan E, Dellacherie E: **Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate: synthesis and physicochemical properties of aqueous dilute solutions.** *Carbohydrate Polymers* 2000, **43**(4):343-349.
120. Galois L, Freyria AM, Grossin L, Hubert P, Mainard D, Herbage D, Stoltz JF, Netter P, Dellacherie E, Payan E: **Cartilage repair: surgical techniques and tissue engineering using polysaccharide- and collagen-based biomaterials.** *Biorheology* 2004, **41**(3,4):433-443.
121. Huin-Amargier C, Marchal P, Payan E, Netter P, Dellacherie E: **New physically and chemically crosslinked hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair.** *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* 2006, **76A**(2):416-424.

122. Pelletier S, Hubert P, Payan E, Marchal P, Choplin L, Dellacherie E: **Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: rheological properties.** *Journal of Biomedical Materials Research* 2000, **54**(1):102-108.

Chapitre II

Synthèse et caractérisation des dérivés alkylés du HA



INTRODUCTION.....	57
I STRATEGIE DE SYNTHESE DES DERIVES ALKYLES DU HYALURONANE ..	60
.....	
I.1 APPROCHE CHIMIQUE ENVISAGEE	60
I.2 OPTIMISATION DE LA SYNTHESE DU DERIVE HA-ADH	61
I.2.1 <i>Caractérisation des propriétés en solution des différents lots de HA-ADH.</i>	63
I.2.1.1 Viscosimétrie capillaire en régime dilué.....	63
I.2.1.2 Viscosimètre LowShear30 en régime semi-dilué.....	68
I.3 ALKYLATION DE L'ACIDE HYALURONIQUE.....	70
I.3.1 <i>Mise au point des conditions réactionnelles.</i>	70
I.3.2 <i>Synthèse des différents dérivés alkylés</i>	71
I.3.3 <i>Caractérisation des dérivés alkylés du HA par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN¹H).</i>	73
I.3.4 <i>Mise en solution des dérivés alkylés.</i>	74
II ETUDE RHEOLOGIQUE DES DIFFERENTS DERIVES SYNTHETISES.....	75
II.1 FORMATION DU RESEAU PHYSIQUE TRIDIMENSIONNEL	75
II.2 ETUDE EN DYNAMIQUE	76
II.2.1 <i>Propriétés rhéologiques de l'acide hyaluronique natif</i>	77
II.2.2 <i>Propriétés rhéologiques des dérivés alkylés.</i>	78
II.2.2.1 Hyaluronane modifié de masse molaire 600 000 g/mol.....	78
II.2.2.2 Hyaluronane modifié de masse molaire 200 000 g/mol.....	80
II.2.3 <i>Comparaison des différents dérivés.</i>	82
II.3 ETUDES EN ECOULEMENT.....	84
III ETUDE PAR FLUORESCENCE DES DIFFERENTS DERIVES ALKYLES.....	87
IV INFLUENCE DU BRAS ESPACEUR DIHYDRAZIDE	88
IV.1 SYNTHESE DES DERIVES HA-IDH ET HA-SDH.....	91
IV.1.1 <i>Caractérisation des dérivés HA-SDH et HA-IDH par RMN¹H.</i>	92
IV.1.2 <i>Caractérisation des dérivés HA-ADH, HA-SDH et HA-IDH par chromatographie d'exclusion stérique triple détections (SEC).</i>	95
IV.2 PROPRIETES EN SOLUTION DES DIFFERENTS DERIVES HYDRAZIDE : HA-ADH, HA-IDH ET HA-SDH.....	96

IV.2.1	<i>Viscosimétrie capillaire</i>	96
IV.2.2	<i>Viscosimètre Low Shear LS30</i>	98
IV.3	ETUDE DES DIFFERENTS DERIVES ALKYLES ISSUS DES INTERMEDIAIRES HA-SDH ET HA-IDH.....	99
V	TRANSPOSITION DE LA SYNTHÈSE D'ALKYLATION A L'ECHELLE SEMI-INDUSTRIELLE	101
V.1	EFFET DE LA CONCENTRATION EN POLYMERE.....	102
V.2	ESSAIS DE CYTOTOXICITE.....	103
V.3	ETUDE DE LA STABILITE THERMIQUE.....	105
V.4	ETUDE DE DEGRADATION ENZYMATIQUE.....	106
V.4.1	<i>Concentration optimale en HAase</i>	107
V.4.2	<i>Comparaison de la dégradation enzymatique du HA initial, HA alkylé et du Synvisc®</i>	108
VI	COMPARAISON AVEC LES VISCOSUPPLEMENTS INDUSTRIELS	109
	CONCLUSION	115
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	116

Introduction

Au cours de ce travail, nous nous sommes proposés de développer de nouveaux hydrogels à base d'acide hyaluronique selon une voie de synthèse transposable à l'échelle industrielle. En effet, comme nous l'avons introduit au début du manuscrit, le principal objectif de ce travail est le développement de nouveaux dérivés chimiquement modifiés de l'acide hyaluronique produit par fermentation bactérienne, pour la préparation de solutions visqueuses ou d'hydrogels valorisables en viscosupplémentation.

Notre stratégie a consisté à introduire des chaînes alkyle sur l'acide hyaluronique conduisant à la formation de domaines hydrophobes (Schéma II-1), jouant le rôle de pontages interchaînes (réticulation physique).

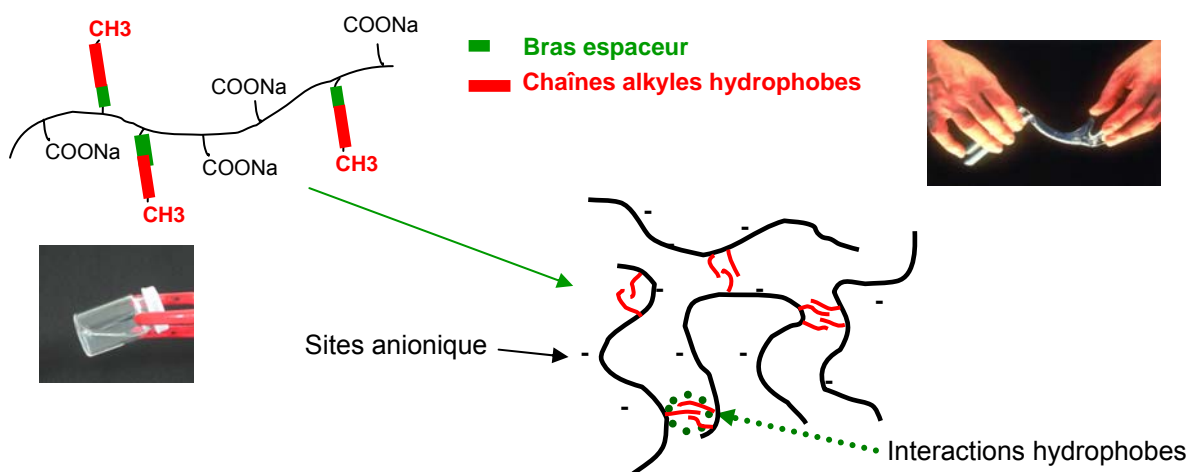


Schéma II- 1 : Formation du réseau physique tridimensionnel dû aux interactions hydrophobes entre les chaînes alkyle greffées sur le polymère.

Les réseaux tridimensionnels ainsi obtenus ont un effet viscosifiant sur les solutions. Un comportement « associatif » remarquable avait été mis en évidence lors de travaux préliminaires au laboratoire [1, 2].

La stratégie de synthèse de ces dérivés repose sur l'introduction dans une première étape de groupements hydrazide réactifs sur le HA, suivie dans une seconde étape, d'une réaction de couplage entre le « bras espaceur » hydrazide et des chaînes aldéhydiques en présence d'un agent réducteur (schéma II-2).

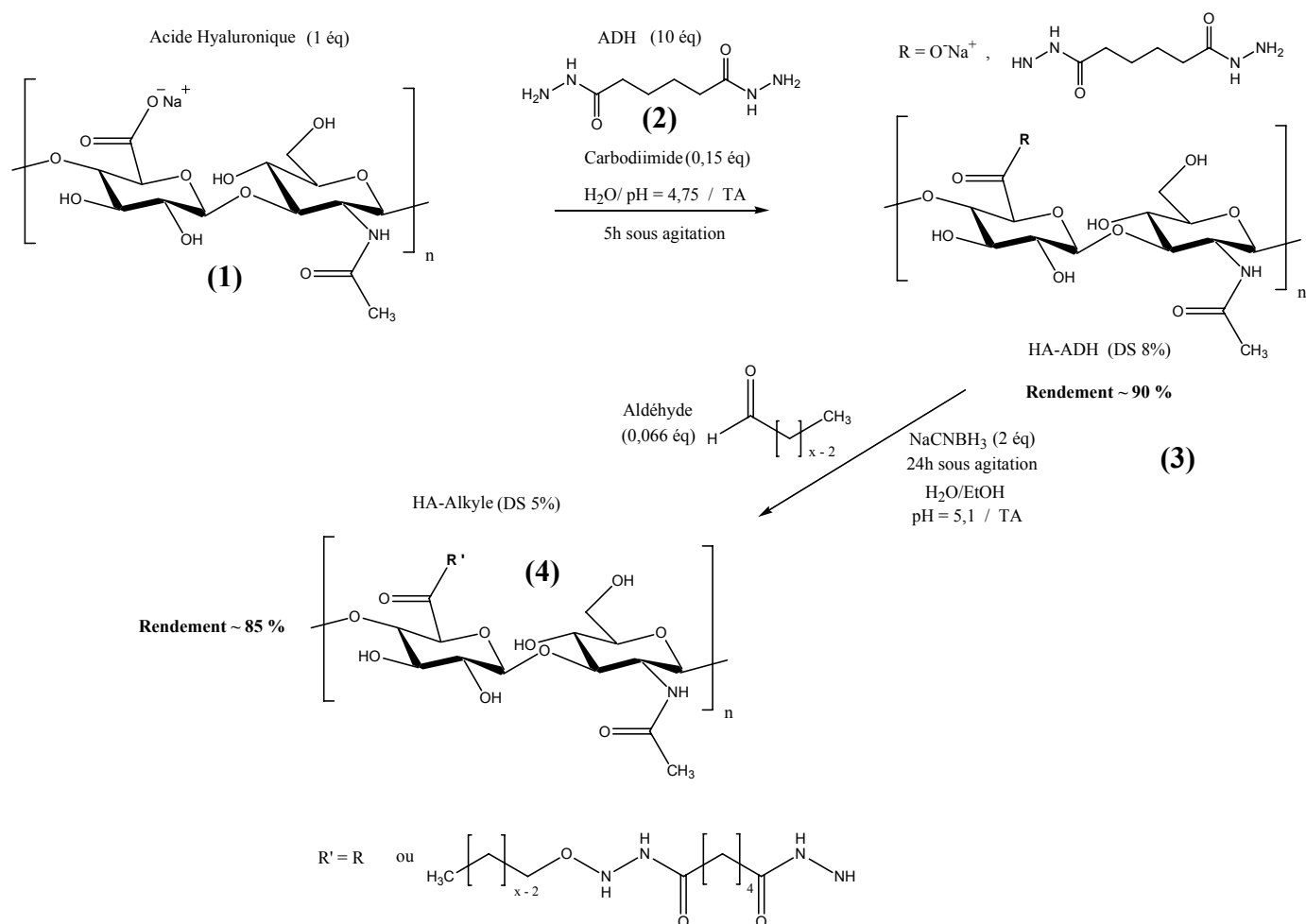


Schéma II- 2 : Stratégie de synthèse de dérivés alkylés du HA mise au point lors de travaux antérieurs au laboratoire [1].

Le dérivé intermédiaire du HA modifié par des groupements hydrazide (HA-ADH (3)) est obtenu par une réaction de couplage de type peptidique en présence d'un carbodiimide hydrosoluble (1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]-carbodiimide (EDC)) et d'un large excès d'acide adipique dihydrazide (10 éq d'ADH (2)). Dans ces conditions, l'excès d'ADH permet d'éviter toute réticulation chimique entre les chaînes de HA et le réarrangement de l'EDC en *N*-acylurée. L'EDC utilisé est le réactif limitant de la réaction de greffage du bras dihydrazide ; Il permet donc de contrôler le degré de substitution.

La réaction d'alkylation est effectuée de manière efficace en milieu aqueux homogène, permettant une répartition aléatoire des chaînes hydrophobes le long de la chaîne polymère.

Comme mentionné précédemment, l'un des objectifs de cette thèse est d'aboutir à de nouveaux dérivés d'acide hyaluronique susceptibles d'être utilisés comme viscosuppléments. Une grande partie du travail a donc été consacrée à l'optimisation des conditions de synthèse des dérivés HA-alkylés (**4**). Nous avons, en particulier, cherché à améliorer le procédé de synthèse du dérivé HA-ADH. Notre étude a visé plus particulièrement à diminuer la quantité d'ADH utilisée de façon à limiter le coût de la synthèse et faciliter l'étape de purification (élimination de l'ADH en excès). Cette dernière a dû être révisée, car des problèmes de reproductibilité de synthèse du dérivé HA-ADH étaient apparus à partir de lots de HA dont la masse molaire initiale était plus élevée. L'aptitude des hydrazides à former des liaisons hydrogène peut créer des interactions secondaires fortes, conduisant à la formation d'agrégats qui modifient les propriétés physico-chimiques en solution du HA modifié.

D'autre part, nous nous sommes intéressés à l'effet de la nature, de la longueur des chaînes alkyle et de leur taux de greffage sur les propriétés en solution du HA. Une étude préliminaire avait montré que les dérivés de HA possédant des chaînes alkyle en C10 (contenant 10 atomes de carbone), avec un degré de substitution (DS) de 5%, étaient les « meilleurs » en termes de propriétés viscoélastiques et aspect des solutions (transparence). Néanmoins, qu'en est-il lorsque le taux de greffage en chaîne alkyle augmente ? Quel est l'effet de la masse molaire du HA initial ? Dans quelles mesures le bras espaceur dihydrazide influence-t-il les propriétés des dérivés alkylés ? Pour pouvoir répondre à ces différentes questions indispensables pour le développement de produits performants, différentes séries de dérivés alkylés du HA ont été synthétisées.

La première partie de ce chapitre, décrit la mise au point des conditions de synthèse du dérivé HA-ADH de DS 8% et sa modification par des chaînes hydrophobes variées.

La seconde partie porte sur l'étude des propriétés rhéologiques des dérivés alkylés synthétisés. Nous nous sommes en particulier intéressés à l'effet de la masse molaire du HA initial sur le caractère associatif du polymère modifié. Pour cela, deux types de HA ont été testés : un HA de masse molaire moyenne en masse M_w de 600 000 g/mol fourni par la société A.R.D (celui-ci servira de lot de référence pour les essais pilotes), et un HA de M_w plus faible (200 000 g/mol), provenant de la société MEDIPOLE Distribution.

Une troisième partie sera consacrée à l'étude de l'influence des bras espaceur dihydrazide sur le réseau physique final.

La quatrième partie concerne la transposition de la synthèse à l'échelle industrielle, avec une étude des propriétés rhéologiques et de la cytotoxicité du lot industriel. La stabilité thermique et enzymatique sera également discutée dans cette partie.

Enfin, il semble nécessaire de comparer le panel des produits synthétisés au cours de ce travail avec les produits disponibles commercialement. Ceci fera l'objet de la dernière partie de ce chapitre.

I Stratégie de synthèse des dérivés alkylés du hyaluronane

I.1 Approche chimique envisagée

Comme discuté dans la partie bibliographique, l'acide hyaluronique **(1)** présente plusieurs groupements fonctionnels susceptibles d'être modifiés chimiquement de façon sélective : les fonctions alcool primaire, acétamide et carboxylate (figure II-1). Néanmoins, les modifications chimiques sont très limitées en raison de la faible réactivité de ces groupements.

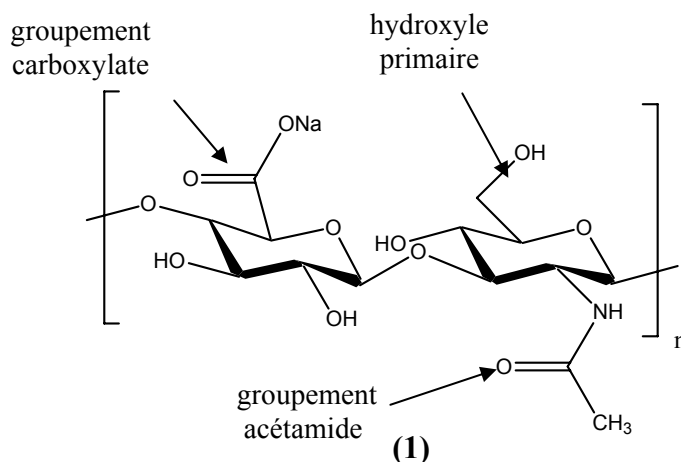


Figure II- 1. Principaux sites pour la modification chimique sélective du hyaluronate de sodium **(1)**

La fonction amine en position C2 de l'acide D-glucuronique résultant de la *N*-désacétylation de la fonction acétamide, pourrait être une cible intéressante pour une modification, mais les conditions expérimentales drastiques requises pour la *N*-désacétylation mènent à une dégradation très importante de la chaîne polymère [3, 4].

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) [5] comme agent de couplage hydrosoluble, conduisent à la formation

d'amides. Cependant, certaines études ont montré que le couplage entre des amines primaires et le groupement carboxylate du HA donne un produit majoritaire résultant du couplage covalent entre le HA et l'EDC [6-10]. Afin de pallier ce problème de réactivité, il a été montré que le HA peut réagir efficacement avec les groupements hydrazide en présence d'un excès d'hydrazide et d'un léger excès d'EDC à pH 4,75 [11, 12]. Etant donné leurs faibles valeurs de pK_a (entre 2 et 4), les hydrazides ont un caractère plus nucléophile que les amines à pH = 4,75, ce qui permet une attaque plus efficace de l'hydrazide. Il en résulte un dérivé HA porteur de groupements hydrazide HA-ADH réactifs le long de la chaîne polymère.

Comme développé ci-dessus, cette approche nous a permis d'accéder à de nouveaux dérivés amphiphiles d'acide hyaluronique présentant des propriétés associatives remarquables en milieu aqueux et supérieures à celles décrites par Dellacherie *et al.* [13, 14]. Les différences sont vraisemblablement liées au procédé de synthèse utilisé par ces auteurs, qui repose sur une réaction d'estérification du HA en milieu organique. Ces conditions non homogènes ne sont pas favorables à une répartition homogène des substituants le long de la chaîne polymère, rendant moins favorable la formation d'un réseau 3D en milieu aqueux.

L'accès aux composés amphiphiles développés dans ce travail repose donc sur une étape cruciale, qui consiste à fonctionnaliser le HA par des bras hydrazide comme discuté précédemment, nous avons donc cherché à optimiser cette synthèse.

I.2 Optimisation de la synthèse du dérivé HA-ADH

Lors des travaux antérieurs portant sur la synthèse de HA alkylés [1], le DS final visé étant inférieur à 10% pour maintenir une bonne solubilité en milieu aqueux, un dérivé de HA-ADH de DS 8% avait été préparé. 10 équivalents molaires d'ADH par rapport au HA avaient été utilisés pour la réaction de couplage (Schéma II-2 et Tableau II-1).

HA	ADH	EDC	DS
1 éq.	10 éq.	0,15 éq.	8 %

Tableau II- 1 : Rappel des conditions de synthèse du dérivé HA-ADH lors de travaux antérieurs effectués au laboratoire.

L'EDC est le réactif limitant de la réaction de greffage du bras dihydrazide sur la chaîne polymère; pour un DS de 8%, nous utilisons 0,15 équivalent molaire d'EDC par rapport au HA initial.

Comme nous l'avons décrit précédemment, notre objectif est de transposer la synthèse à l'échelle industrielle. Pourquoi utiliser un excès d'ADH si important (10éq pour un DS de 0,08) s'il faut le purifier par la suite pour en éliminer l'excès non greffé ?

De plus, nous avons remarqué que la façon d'isoler et de purifier le HA-ADH était un paramètre non négligeable contrôlant les propriétés finales du produit en solution. Nous avons donc comparé deux méthodes de purification possible pour ce dérivé :

- Une ultrafiltration suivie d'une lyophilisation
- Une précipitation à l'éthanol suivie du séchage de la poudre obtenue.

Lors de nos travaux, nous avons utilisé en premier lieu, un HA possédant une masse molaire moyenne en masse M_w de 600 000 g/mol fourni par A.R.D et obtenu par fermentation bactérienne. Ce HA correspond au polymère de référence que nous avons utilisé pour les essais pilotes.

Les différentes synthèses dans lesquelles nous avons fait varier la quantité d'ADH ajoutée, sont récapitulées dans le tableau II-2. Les produits ont été purifiés soit par ultrafiltration (notés a), soit par précipitation (notés b) :

Références	éq. d'EDC / HA	éq. d'ADH / HA	DS (%)	Rendement (%)
HA-ADH 10éq (a)	0,15	10	8	93
HA-ADH 5éq (a)	0,15	5	8	90
HA-ADH 2éq (a)	0,15	2	8	91
HA-ADH 1éq (a)	0,15	1	8	95
HA-ADH 0,1éq (a)	0,15	0,1	8	89
HA-ADH 10éq (b)	0,15	10	8	85
HA-ADH 5éq (b)	0,15	5	8	65
HA-ADH 2éq (b)	0,15	2	8	84
HA-ADH 1éq (b)	0,15	1	8	82

Tableau II- 2 : récapitulatif des différentes synthèses effectuées lors de ce travail.

Les structures des dérivés HA-ADH ont été confirmées par RMN¹H. Le spectre RMN¹H du HA-ADH 10éq (b), enregistré à 80°C est présenté sur la figure II-2.

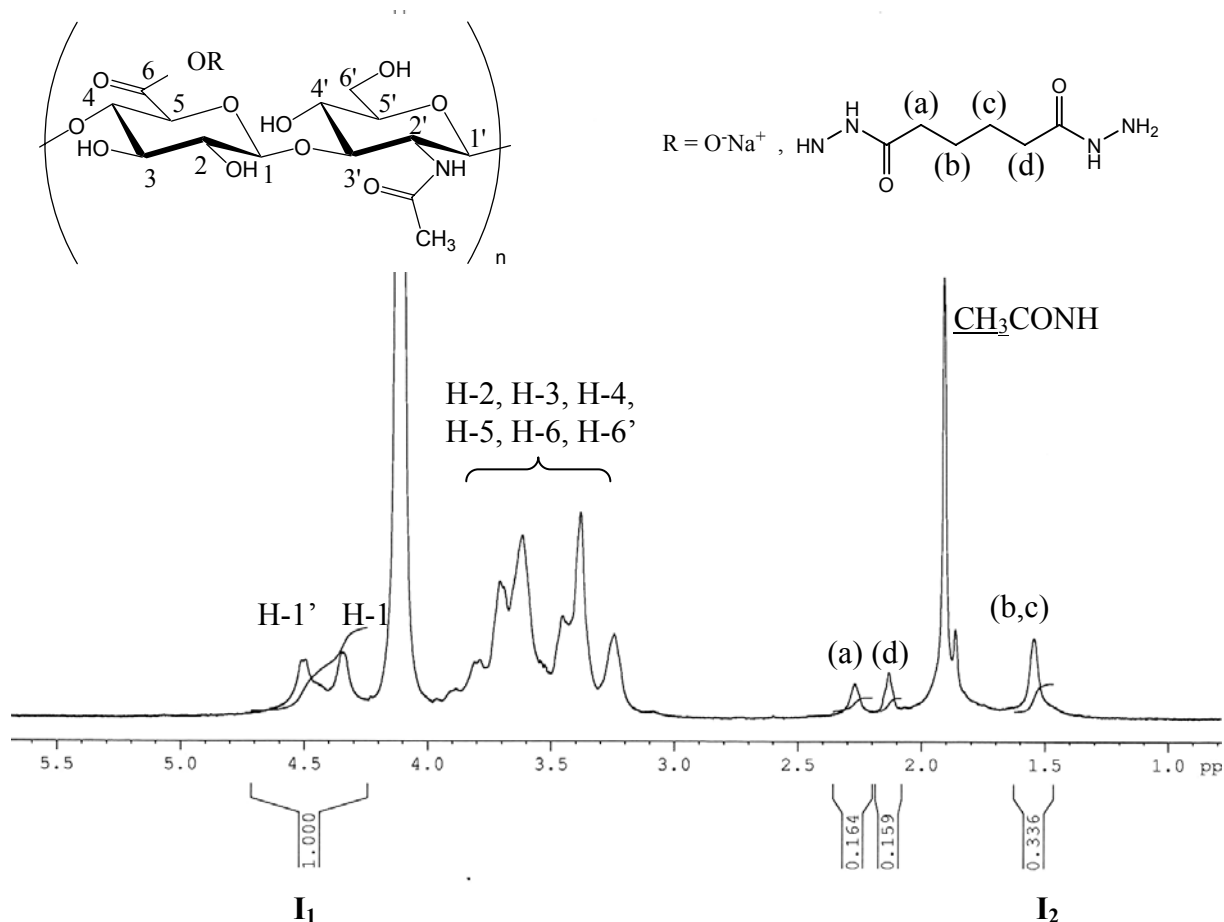


Figure II- 2. Spectre RMN ^1H (400 MHz, 80°C , D_2O , 6 mg/mL) du dérivé HA-ADH (8)

La valeur du DS a été déterminée par intégration des signaux des protons méthyléniques (b) et (c) du groupement hydrazide avec comme référence interne les protons anomères du hyaluronane :

$$DS = \left(\frac{1}{I_1} \right) \times \left(\frac{I_2}{4} \right) = 0,08 \quad \text{soit } (8 \pm 1) \% \quad \text{éq II- 1.}$$

Les valeurs des intégrales des signaux des protons a et d sont similaires, ce qui suggère qu'il n'y a pas de réticulation chimique entre les chaînes macromoléculaires.

I.2.1 Caractérisation des propriétés en solution des différents lots de HA-ADH.

I.2.1.1 Viscosimétrie capillaire en régime dilué.

Dans un premier temps, les produits obtenus par précipitation et lyophilisation ont été caractérisés par viscosimétrie capillaire en régime dilué pour des concentrations $C < C^*$. Le C^* correspond à la concentration critique de recouvrement des chaînes du HA initial. Dans ce domaine de concentration, les chaînes sont isolées et indépendantes les unes des autres.

La valeur du C^* a été évaluée à partir de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ déterminée par viscosimétrie capillaire en considérant [15] :

$$C^* [\eta] \approx 1 \quad \text{éq II- 2}$$

La viscosité intrinsèque du HA initial obtenue était de 1085 mL/g, ce qui équivaut à $C^* \approx 0,92$ g/L. Nous avons donc effectués les mesures à partir de solutions initiales à la concentration $C_0 = 0,5$ g/L.

La viscosimétrie capillaire permet d'aboutir en utilisant la relation de Huggins (éq II-2) à la viscosité intrinsèque $[\eta]$ des dérivés qui reflète le volume hydrodynamique spécifique des chaînes de HA.

$$\eta_{red} = [\eta] + k' C [\eta]^2 \quad \text{éq II- 3}$$

η_{red} est la viscosité réduite, C représente la concentration du polymère et k' la constante de Huggins. La constante k' donne une indication sur les interactions entre le polymère et le solvant. Pour des valeurs de k' comprises entre 0,3 et 0,8, on considère que le polymère est dans un bon solvant [16].

La figure II-3 montre l'évolution de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour les différents lots de HA-ADH dans une solution tampon phosphate (PBS , $[\text{NaCl}] = 0,134\text{M}$) à pH 7,4. Nous avons choisi ce solvant car il est couramment utilisé pour la préparation des solutions de HA utilisées en viscosupplémentation. Il convient de préciser que ce solvant sera essentiellement utilisé dans ce chapitre.

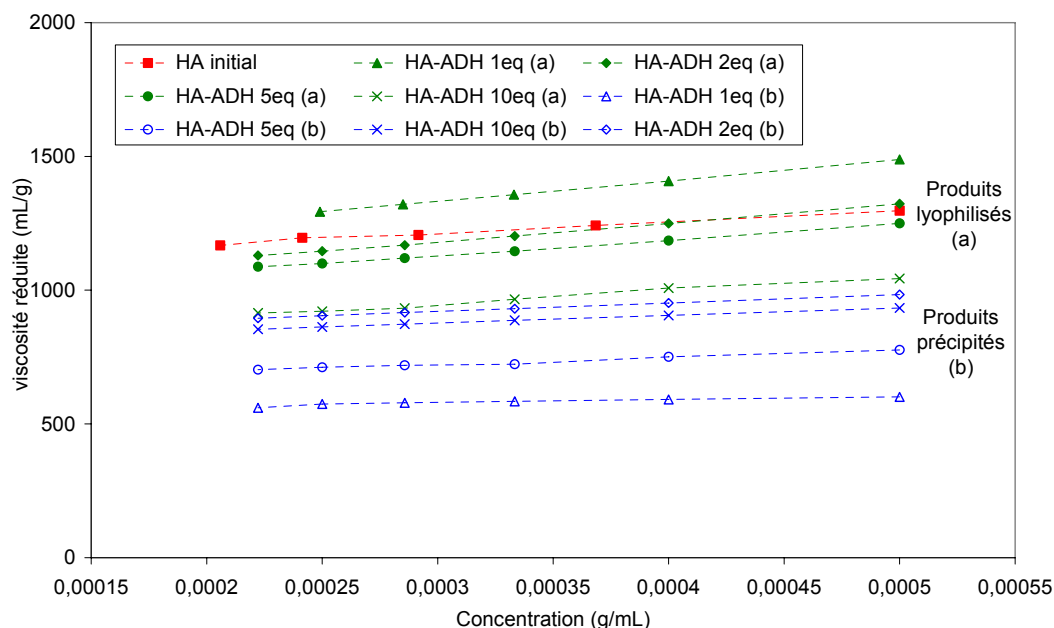


Figure II- 3 : Comparaison de la méthode de purification : (a) : ultrafiltration et lyophilisation et (b) : précipitation et séchage

D'après la figure II-3, nous pouvons distinguer deux familles de produits : ceux obtenus par précipitation et séchage, et ceux purifiés par ultrafiltration et lyophilisation. Les premiers conduisent à des valeurs de viscosités plus faibles.

Il paraît donc évident que la façon d'isoler le polymère joue un rôle primordial. La précipitation du dérivé HA-ADH semble réduire la solubilité et favoriser la formation d'agrégats compacts qui pourrait être liée à l'établissement de liaisons hydrogène inter- et/ou intrachaînes entre les fonctions amine de l'ADH.

Nous nous sommes donc focalisés sur le comportement des produits ultrafiltrés et lyophilisés. Nous avons présenté sur la figure II-4, la variation de la viscosité en fonction de la concentration pour les différents dérivés HA-ADH lyophilisés (Tableau II-2).

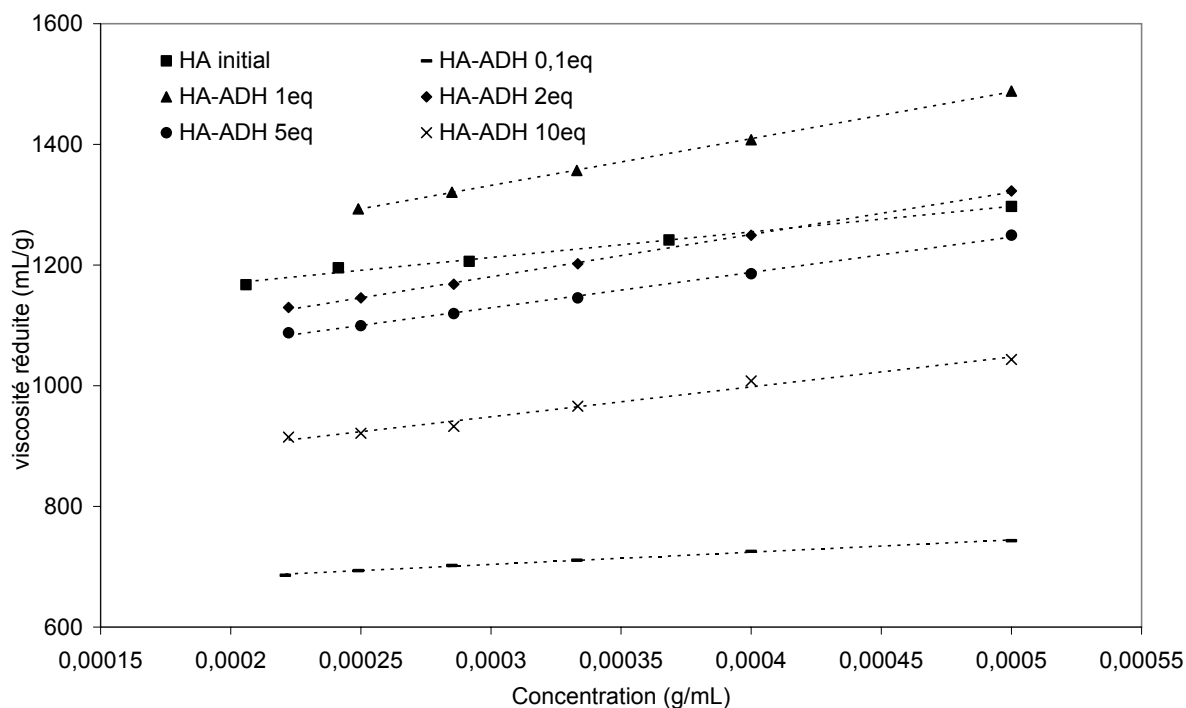


Figure II- 4 : Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour des solutions de HA-ADH avec différents équivalents dans PBS à 25°C.

Le tableau II-3 reporte les valeurs des constantes de Huggins k' et les viscosités intrinsèques calculées à partir de l'éq II-3.

	C* g/L	k'	$[\eta]$ mL/g
HA initial	0,92	0,36	1085
HA-ADH 0,1éq	1,55	0,49	642
HA-ADH 1éq	0,91	0,64	1099
HA-ADH 2éq	1,03	0,74	970
HA-ADH 5éq	1,05	0,64	953
HA-ADH 10éq	1,25	0,77	799

Tableau II- 3. Concentration critique de recouvrement et constante de Huggins calculées pour différents lots de HA-ADH lyophilisés et pour le HA initial.

On observe à partir de ce tableau que le bras hydrazide ne modifie pas de façon significative le comportement en milieu aqueux du HA-ADH synthétisé avec 1éq d'ADH/HA. En effet, le HA initial et le HA-ADH 1éq ont des viscosités intrinsèques quasi-identiques et des valeurs de constante de Huggins correctes qui indiquent que le polymère est considéré comme dans un bon solvant.

En revanche, l'utilisation de 0,1éq d'ADH conduit à un dérivé HA-ADH qui possède une viscosité intrinsèque presque 2 fois plus faible que celle du HA initial, suggérant un phénomène d'agrégation ou la présence de réticulations chimiques.

Rinaudo *et al.* ont montré que pour des HA en solution de masse molaire (M) $4 \times 10^5 < M < 1,5 \times 10^6$ g/mol, on obtient la masse molaire moyenne viscosimétrique M_v (si les viscosités sont déterminées au plateau newtonien) en considérant $K = 0,0336$ et $a = 0,79$ dans la relation de Mark-Houwink, qui relie la masse molaire et la viscosité intrinsèque [17-19] (éq II-4).

$$[\eta] = K \times M^a \quad \text{éq II- 4}$$

	M_v (g/mol)	$[\eta]$ (mL/g)
HA initial	510 164	1085
HA-ADH 0,1éq	262 564	642
HA-ADH 1éq	518 510	1099
HA-ADH 2éq	442 708	970
HA-ADH 5éq	432 909	953
HA-ADH 10éq	346 340	799

Tableau II- 4. Masses moyennes viscosimétriques calculées à partir des valeurs de viscosité intrinsèque, en utilisant la loi de Mark-Houwink, dans du PBS à 25°C

Les valeurs des masses molaires moyennes viscosimétriques ainsi calculées (Tableau II-4), montrent que la réaction de greffage des bras dihydrazide n'est pas dégradante vis-à-vis de la chaîne polymère, ce qui est important pour pouvoir contrôler l'effet de la masse molaire sur le phénomène d'association.

Conclusion : Les études effectuées en régime dilué avec un viscosimètre capillaire, ont montré que le choix de la méthode de purification joue un rôle très important sur les propriétés en solution du dérivé HA-ADH final. Pour obtenir un dérivé HA-ADH dont les propriétés en solution se rapprochent le plus de celle du HA initial, et pour que la synthèse soit reproductible, il s'avère nécessaire de **purifier le dérivé HA-ADH par ultrafiltration**. Nous verrons par la suite que le dérivé HA-ADH peut être isolé par lyophilisation ou conservé en solution pour enchaîner directement la deuxième étape de greffage de l'aldéhyde.

Cette méthode d'analyse nous a aussi permis de montrer **que l'utilisation d'1éq d'ADH par rapport à une unité dissaccharidique du HA** est suffisante pour synthétiser le dérivé HA-

ADH de DS 8%. Nous sommes donc passés de 80 fois la quantité en excès à 10 fois (10éq à 1éq pour un DS de 8%).

I.2.1.2 Viscosimètre LowShear30 en régime semi-dilué.

Etant donné que la dépendance de la viscosité avec la concentration varie selon le régime dans lequel on se trouve, nous avons cherché à définir les principales caractéristiques du comportement rhéologique du polysaccharide précurseur : le hyaluronane dans une solution tampon PBS à 25°C pour des concentrations variant de 0,25 à 10 g/L.

La figure II-5 représente la variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour le HA initial de masse molaire moyenne : M_w 600 000 g/mol.

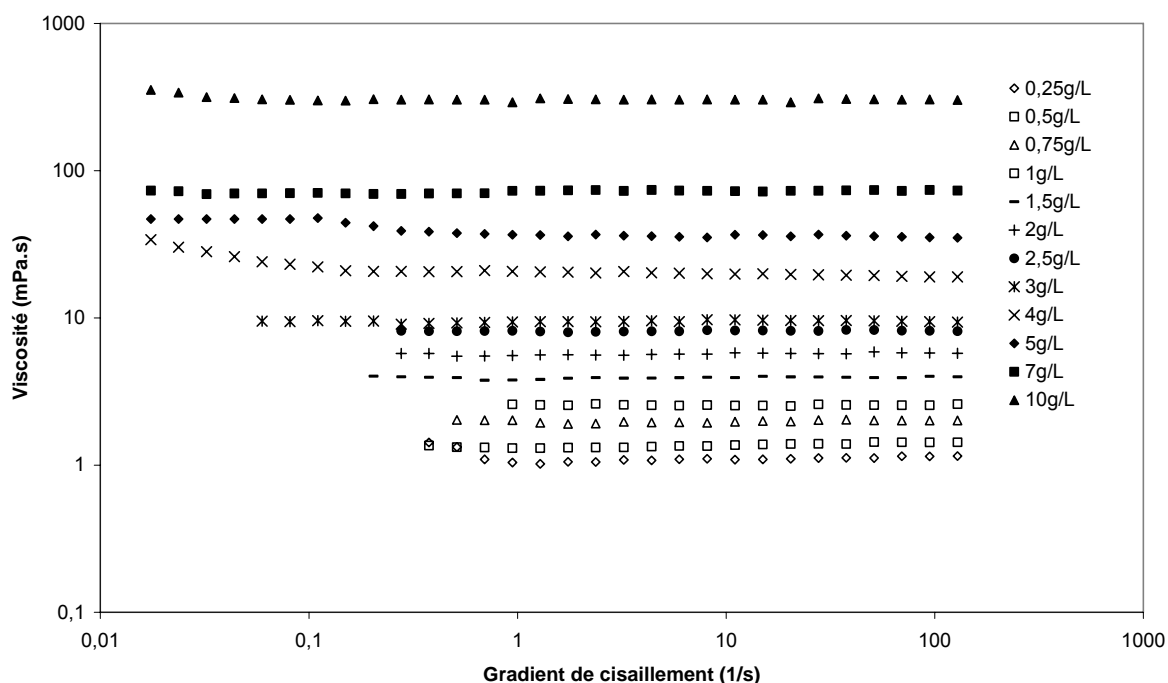


Figure II- 5. Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement du HA initial (M_w 600 000 g/mol) dans une solution de PBS à 25°C.

Cette figure montre que le comportement du HA dans le PBS est newtonien sur les gammes de gradients de cisaillement et de concentrations explorées. Cela signifie que la viscosité des solutions polymères, à une concentration donnée, ne varie pas avec la vitesse de cisaillement imposée. Le comportement newtonien observé montre que pour ces concentrations, les enchevêtrements sont peu nombreux et de ce fait, ne gouvernent pas la dynamique des chaînes.

A partir de la figure II-5, nous avons relevé les valeurs de la viscosité au plateau newtonien pour pouvoir tracer, sur la figure II-6, l'évolution de la viscosité newtonienne en fonction de

la concentration en polymère, pour les différents dérivés HA-ADH synthétisés (obtenus par ultrafiltration et lyophilisation).

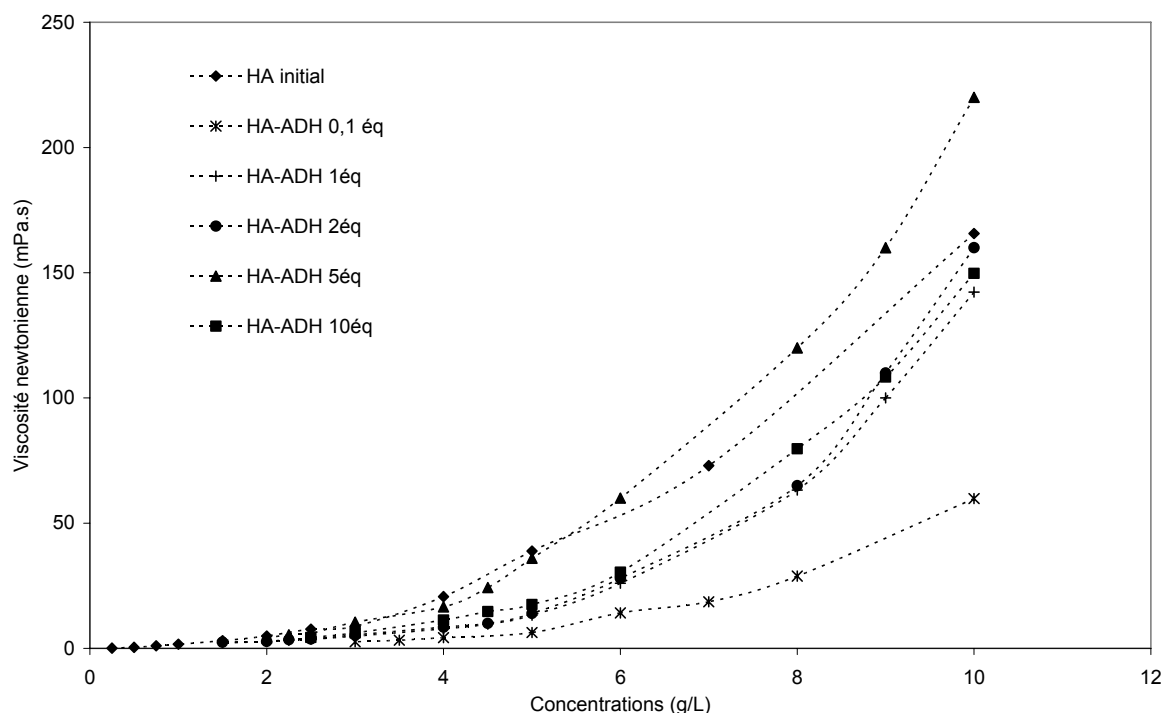


Figure II- 6. Variation de la viscosité newtonienne en fonction de la concentration en polymère pour les différents lots synthétisés.

Nous pouvons remarquer d'après la figure II-6, que tous les produits greffés ont un comportement différent du HA initial quelle que soit la quantité d'ADH en excès. Toutefois, le HA-ADH 0,1 éq a une viscosité beaucoup plus faible que les autres dérivés, ce qui définit la limite inférieure de la quantité d'ADH en excès à utiliser lors de la réaction de greffage. Il est difficile de faire un choix entre les autres dérivés, qui en régime semi-dilué, n'ont pas un comportement très différent comparé au HA non modifié.

Conclusion : Nous avons montré dans cette partie, que l'utilisation de 10 éq d'ADH pour le greffage des groupements hydrazide sur le HA n'était pas nécessaire. Il suffit d'utiliser 1 éq d'ADH, par rapport à une unité disaccharidique de HA, pour obtenir un DS de 8%, sans perturbation du comportement du polymère modifié en solution.

Pour la suite des synthèses pour lesquelles nous avons visé des DS de 5 et 10%, nous utiliserons 1 éq d'ADH et l'ultrafiltration sera la méthode de purification de l'intermédiaire HA fonctionnalisé avec les bras hydrazide.

I.3 Alkylation de l'acide hyaluronique.

I.3.1 Mise au point des conditions réactionnelles.

L'alkylation du HA-ADH consiste à faire réagir ce dernier avec la chaîne alkyle aldéhydique, en présence d'un agent réducteur. Celui-ci permet d'améliorer de manière significative le rendement de la réaction en stabilisant la liaison hydrazone formée. Néanmoins, l'agent réducteur (NaCNBH_3) utilisé lors des précédentes synthèses des dérivés HA-alkylés [1] a été remplacé par la picoline borane (PicBH_3) qui présente l'avantage d'être beaucoup moins toxique [20].

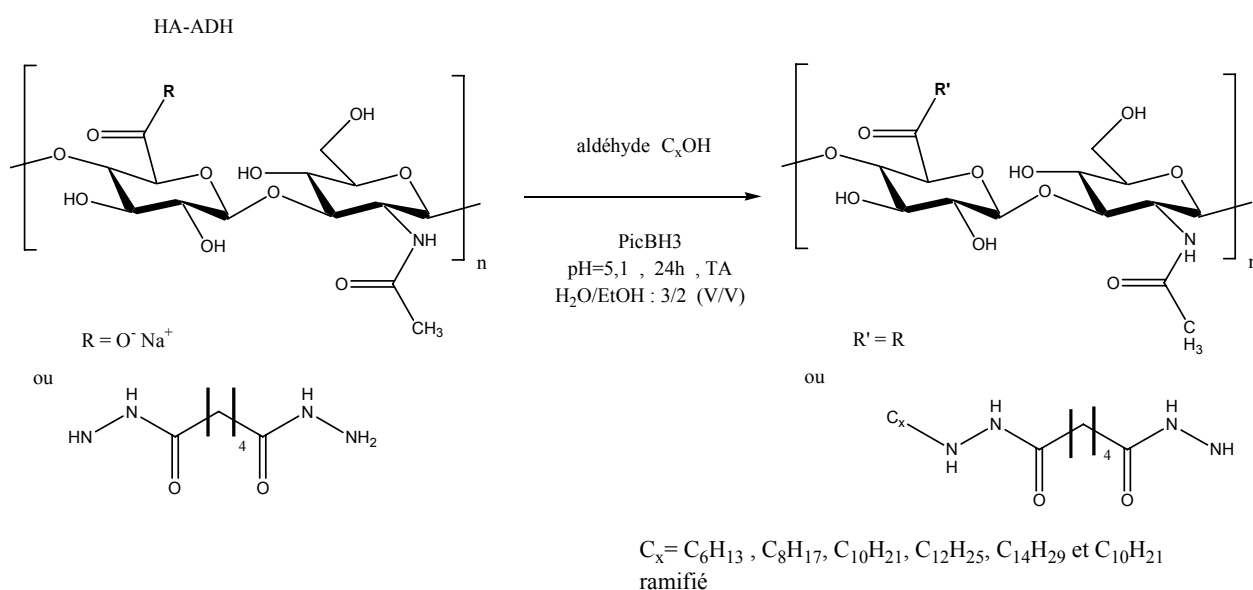


Schéma II- 3 : Réaction d'alkylation du dérivé HA-ADH

Cette réaction a l'avantage de se faire dans des conditions homogènes et douces, qui ne conduisent pas à la dégradation de la chaîne polymère. Ce critère est primordial si on veut comparer l'effet de la masse molaire du polymère sur les propriétés associatives en milieu aqueux.

Des chaînes alkyle de longueurs variables de 6 à 14 atomes de carbone linéaires ou ramifiées ont été greffées sur l'acide hyaluronique (Schéma II- 4)

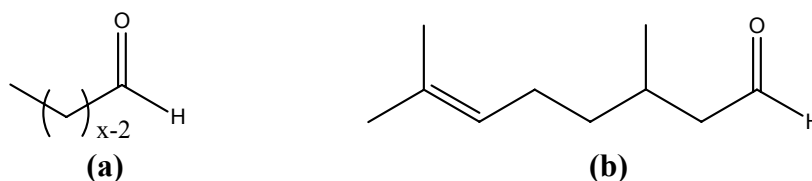


Schéma II- 4 : Chaînes aldéhydiques linéaires avec $x = 6, 8, 10, 12, 14$ (a) et la chaîne aldéhydique ramifiée (Citronellal) (b) utilisées pour la synthèse des dérivés alkylés du HA cibles.

Afin de différencier facilement les différents dérivés, nous avons utilisé la nomenclature suivante : **HAXCY-M**.

Avec : X = degré de substitution (DS) en %

Y = la longueur de la chaîne alkyle (C6 hexanal, C8 octanal, C10 décanal...Etc.)

M = masse molaire moyenne en masse (Mw) du HA. (200 000 ou 600 000 g/mol), déterminée par SEC triple détection.

La chaîne ramifiée en C8 (le citronellal) sera notée HAXC8r-M.

Par exemple : le HA5C10-200 correspond à un acide hyaluronique contenant 5% de chaînes alkyle de longueur C10 linéaire, greffées sur un HA de masse molaire moyenne 200 000 g/mol.

I.3.2 Synthèse des différents dérivés alkylés

Comme discuté précédemment, nous avons étudié l'effet de la nature et de la quantité des chaînons hydrophobes greffés sur le polymère. L'effet de la masse molaire moyenne Mw du polymère a aussi été évalué. Nous avons synthétisé des lots de HA alkylé de DS 5 et 10% à partir de lots de HA-ADH de DS 5 et 10%, respectivement. Avec des HA de Mw : 200 000 et 600 000 g/mol.

Il est important de rappeler que la synthèse est réalisée en continu après l'étape d'ultrafiltration du dérivé HA-ADH sans lyophilisation intermédiaire.

Les conditions expérimentales utilisées pour la synthèse des dérivés alkylés sont récapitulées ci-dessous :

éq. HA-ADH	éq. EDC	DS HA-ADH*	éq. Chaîne alkyle	éq. PicBH ₃	DS en chaîne alkyle obtenu
1	0,094	5%	0,066	0,5	5%
1	0,188	10%	0,132	0,5	10%

* la synthèse de ces lots est contrôlée par la quantité d'EDC.

Tableau II- 5. Récapitulatif des conditions utilisées pour la synthèse des dérivés alkylés.

A partir du tableau II-5, nous pouvons voir que ces réactions ne sont pas stœchiométriques. Il est nécessaire d'utiliser un léger excès de chaînes alkyle par rapport au taux de greffage désiré.

A la fin de la synthèse, le dérivé alkylé est isolé par précipitation, étape clé pour la récupération de l'acide hyaluronique. Si le protocole n'est pas adapté, des produits possédant des aspects en solution très différents sont obtenus. Différents paramètres sont à prendre en considération pour que la synthèse soit optimale, à savoir :

- **La concentration en sel :** l'addition de sel à une solution de HA favorise sa précipitation à l'éthanol en écrantant les répulsions électrostatiques et en diminuant la qualité du solvant. Une concentration en sel de 0,5M permet d'écranter ces répulsions pour précipiter le HA
- **La concentration en alcool :** une fois le sel complètement dissout, on précipite l'acide hyaluronique modifié chimiquement à l'aide d'une solution d'éthanol à 95°. Le rapport EtOH/H₂O doit être de 3/2 (V/V)
- **Le type d'agitation :** le module d'agitation nécessite un choix rigoureux. Il doit permettre une agitation efficace et rapide en tout point de la solution. Un émulseur centripète à mouvement axial, donne une bonne désagrégation du précipité après décantation. La poudre obtenue en fin de cycle est fine et blanche.
- **Les lavages :** nous procédons par la suite à des lavages en utilisant des mélanges EtOH/H₂O : 7/3, 4/1 et 19/1 (V/V), suivis du séchage de la poudre à l'étuve 32°C et 52 mbar.

Les rendements des différents dérivés synthétisés sont reportés dans le tableau II-6. L'étude des propriétés en solution sera détaillée par la suite.

Longueurs de chaînes	C6		C8		C8r		C10		C12		C14	
	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%
DS	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%	5%	10%
Rdts pour les 200 000 g/mol (%)	92	95	93	97	94	95	97	96	94	89	87	82
Rdts pour les 600 000 g/mol (%)	91	90	93	91	93	89	95	97	90	86	88	85

Tableau II- 6. Récapitulatif des rendements (Rdts) de la synthèse (réaction d'alkylation) des différents dérivés alkylés.

Nous obtenons de bons rendements quelque soit le dérivé synthétisé, ce qui permet d'envisager toutes les possibilités de synthèse à l'échelle industrielle.

I.3.3 Caractérisation des dérivés alkylés du HA par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN¹H)

Afin de confirmer la structure des dérivés alkylés, nous avons eu recours à des expériences de RMN du proton. Le spectre RMN¹H du dérivé HA10C8-200 enregistré à 80°C est présenté sur la figure II-7.

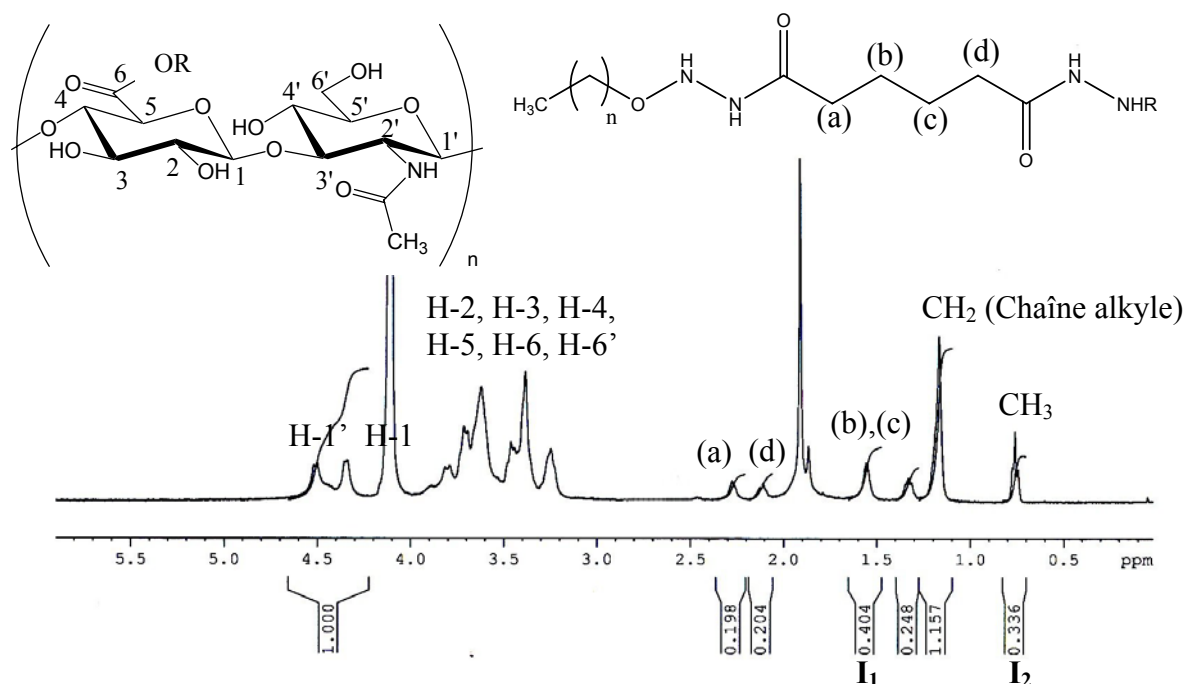


Figure II- 7. Spectre RMN ¹H (400 MHz, 80°C, D₂O, 6 mg/mL) du dérivé HA10C8-200.

La valeur du DS en chaînes alkyle a été déterminée à partir des signaux des protons des greffons, à savoir l'ADH et la chaîne. En effet, les dérivés alkylés ayant un effet viscosifiant, les signaux des protons anomères du HA pouvant être utilisés comme référence apparaissent dans certains cas larges du fait de la mobilité réduite de la chaîne polysaccharidique.

Connaissant le DS du HA-ADH utilisé pour la synthèse, on peut donc en déduire le DS du HA alkylé de la manière suivante :

$$DS = \left(\frac{4}{I_1} \right) \times \left(\frac{I_2}{3} \right) \times DS(HA - ADH) = 0,11 \quad \text{soit } (10 \pm 1) \% \quad \text{éq II- 5}$$

1.3.4 Mise en solution des dérivés alkylés.

Lors de différents essais de mise en solution des dérivés synthétisés, nous nous sommes aperçus que cette étape n'était pas à négliger. Selon le solvant, la durée et la température d'agitation, nous pouvons obtenir des produits avec des aspects en solution différents.

Deux méthodes ont été testées afin d'obtenir la meilleure homogénéisation des échantillons.

1. Chauffage des solutions : Il suffit d'ajouter le solvant (PBS) à la poudre de HA modifié puis de laisser gonfler pendant environ 4h sans agitation. Par la suite, nous chauffons la solution pendant 1h à 80°C. Ainsi, nous obtenons des solutions ou « gels » plus ou moins limpides, selon les lots synthétisés.

Une étude rhéologique, en fonction de la température, des dérivés alkylés synthétisés lors des travaux préliminaires avaient montré une variation particulière des modules de conservation (G') et de perte (G'') lors du chauffage (Figure II-8).

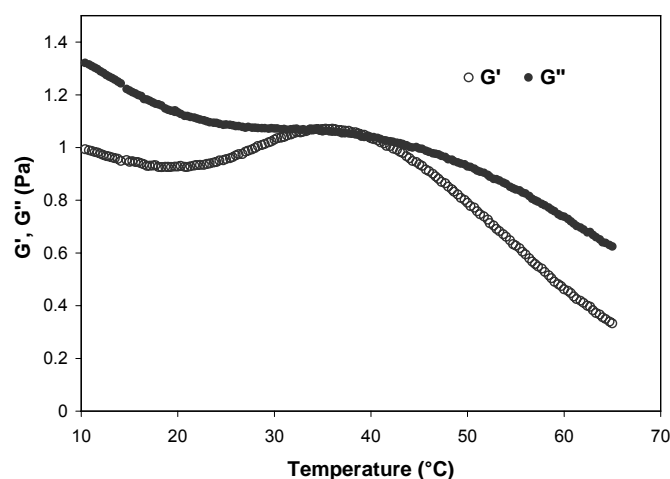


Figure II- 8 : Variation des modules de conservation (G') et de perte (G'') en fonction de la température pour le dérivé alkylé HA5C10-300 à 7 g/L dans du NaCl 0,025M (issu de la référence [1]).

Nous observons dans cette figure une augmentation de la valeur du G' jusqu'à 30-40°C, suivie d'une chute importante jusqu'à 65°C. Un tel comportement avait été attribué à un renforcement des interactions hydrophobes accompagné d'une rupture des liaisons hydrogène impliquées dans la chaîne de HA, se traduisant par le renforcement puis l'effondrement du réseau.

Ces résultats semblent indiquer qu'un traitement thermique des solutions aqueuses de HA peut être bénéfique à la formation du réseau et à la dissociation d'agrégats.

2. Mise en solution dans l'eau avant l'ajout de sel : La deuxième méthode de mise en solution consiste à dissoudre 20 mg de HA dans 1,8 mL d'eau distillée pendant 4h sans agitation. Par la suite, nous ajoutons 0,2 mL de PBS dix fois plus concentrée que le PBS standard. Le système gonfle pendant 1 nuit sans agitation et ainsi, nous obtenons des solutions ou « gels » plus ou moins limpides, selon les lots synthétisés.

Nous avons vérifié la reproductibilité de ces techniques de mise en solution et nous obtenons des résultats identiques pour les deux méthodes, excepté pour les deux lots HA10C12 et HA10C14 qui nécessitent un chauffage à 80°C après la mise en solution dans l'eau et l'ajout de sel.

II Etude rhéologique des différents dérivés synthétisés

Les polyélectrolytes hydrophobiquement modifiés sont des systèmes largement utilisés. En effet, la balance entre les interactions attractives hydrophobes inter et/ou intra-chaîne dues aux chaînes alkyle et les répulsions électrostatiques de la chaîne, permet à ce type de système associatif d'avoir des propriétés physico-chimiques intéressantes en solution.

Les interactions hydrophobes inter et/ou intra-chaînes sont favorisées selon la concentration en polymère et en fonction des caractéristiques structurales de la macromolécule, notamment, la quantité et la longueur des groupements hydrophobes. A ces effets, il faut ajouter l'effet de la force ionique qui est un facteur très important pour ces systèmes associatifs.

Lors de notre étude, nous avons étudié l'effet de la variation de la longueur de la chaîne alkyle ainsi que le degré de substitution des chaînons hydrophobes. Bien que la force ionique soit un facteur important, son influence n'a pas été évaluée. Nos systèmes étant destinés à des applications biomédicales, nous nous sommes fixés la concentration physiologique qui est d'environ 0.15M en NaCl.

II.1 Formation du réseau physique tridimensionnel

Le greffage des chaînes alkyle le long de la chaîne polysaccharidique permet d'obtenir un réseau tridimensionnel physique avec des jonctions réversibles. Comme cité dans l'introduction de ce chapitre, le gel physique obtenu par la formation du réseau 3D pourrait être utilisé en tant que viscosupplément pour la thérapie de l'arthrose.

La figure II-9 montre les propriétés physicochimiques du liquide synovial d'un patient souffrant d'arthrose comparées à celles d'un genou jeune et sain [21, 22]. Nous observons deux comportements différents. Pour le patient malade, le liquide synovial est un fluide visqueux, avec un module G'' supérieur au module G' sur toute la gamme de fréquence étudiée. Le liquide synovial du genou sain, a des propriétés viscoélastiques supérieures. Le module G' est inférieur à G'' à basse fréquence mais à partir de $\sim 0,1$ Hz le module élastique G' devient supérieur au module visqueux G'' .

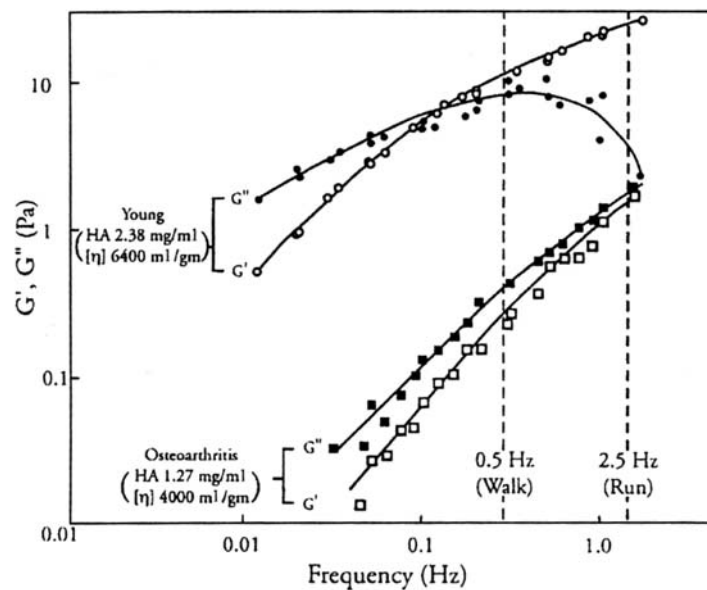


Figure II- 9 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence. Comparaison du comportement rhéologique d'un liquide synovial d'un patient sain et celui d'un sujet souffrant d'arthrose [23].

Nous avons donc choisi d'étudier nos systèmes associatifs par des expériences de rhéologie et plus particulièrement par des mesures en régime dynamique et en écoulement. Ces expériences vont permettre d'étudier la contribution des composantes élastiques (G') et visqueuses (G'') des systèmes en relation avec les interactions intermoléculaires.

II.2 Etude en dynamique

Il faut noter que pour les courbes qui seront présentées par la suite, nous avons vérifié auparavant que toutes les mesures étaient effectuées dans le domaine de viscoélasticité linéaire, afin de ne pas modifier les éléments structuraux. Il est donc nécessaire de déterminer la gamme de déformations pour laquelle les modules G' et G'' sont linéaires et indépendants de la déformation imposée (régime linéaire). L'étude a été réalisée pour chaque échantillon étudié aux fréquences de 0,5, 1 et 5 Hz. Les mesures sont effectuées sur les rhéomètres ARES-RFS et AR2000 avec des géométries cône-plan 5 cm 4° et 4 cm 4° , respectivement.

II.2.1 Propriétés rhéologiques de l'acide hyaluronique natif.

La figure II-10 montre le comportement viscoélastique des solutions de hyaluronane de masse molaire moyenne en masse M_w 600 000 et 200 000 g/mol. Les solutions sont préparées à 20g/L et 60g/L respectivement, dans une solution de PBS à 25°C.

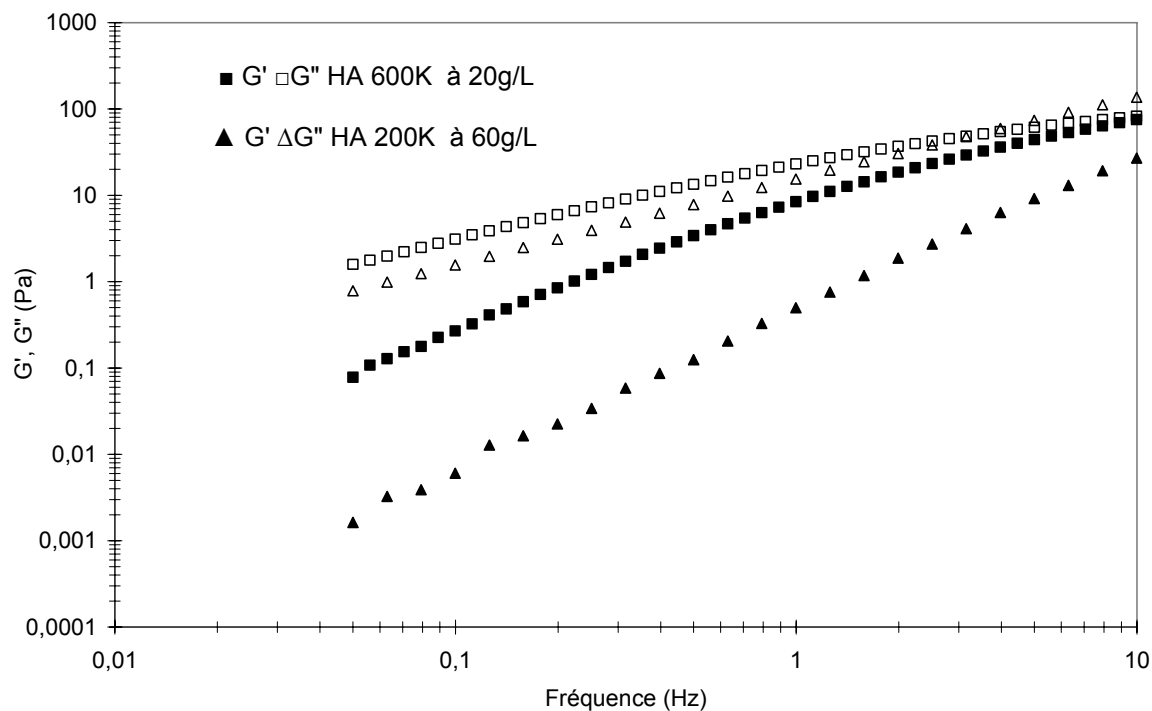


Figure II- 10 Variation des modules G' (■) et G'' (□) en fonction de la fréquence pour le HA initial 600 000 g/mol à 20 g/L et 200 000 g/mol à 60 g/L dans le PBS à 25°C.

Un comportement viscoélastique est observé pour l'acide hyaluronique de masse molaire 600 000 g/mol à 20 g/L. Par contre, le point de croisement G' , G'' se trouve à des fréquences élevées (≈ 10 Hz), ce qui signifie un comportement visqueux dans la gamme de fréquences explorées. Pour l'acide hyaluronique de masse 200 000 g/mol, nous observons que le module visqueux G'' est supérieur au module élastique G' sur toute la gamme de fréquences étudiée.

L'objectif à atteindre est d'augmenter les propriétés viscoélastiques en solution de l'acide hyaluronique tout en conservant sa solubilité afin de pouvoir le valoriser en viscosupplémentation. Dans la partie suivante, nous allons comparer les propriétés viscoélastiques des HA alkylés par rapport aux HA initiaux correspondants.

II.2.2 Propriétés rhéologiques des dérivés alkylés.

Tout d'abord, nous avons comparé les HA alkylés de même masse molaire mais avec des longueurs de chaîne différentes, pour deux degrés de substitution : DS 5 et 10%.

II.2.2.1 Hyaluronane modifié de masse molaire 600 000 g/mol

Nous avons reporté les valeurs des modules élastiques G' et visqueux G'' ainsi que la viscosité complexe $|\eta^*|$ pour deux fréquences : 0,1 Hz et 1 Hz. La zone de fréquences aux environs de 0,1 Hz reflète les mouvements des articulations au repos, alors que les fréquences de la zone 1 Hz correspondent à des mouvements rapides (Figure II-9). La turbidité a été indiquée pour pouvoir comparer l'aspect des échantillons.

Turbidité	Référence	Fréquence 1 Hz			Fréquence 0,1 Hz		
		G' (Pa)	G'' (Pa)	$ \eta^* $ (Pa.s)	G' (Pa)	G'' (Pa)	$ \eta^* $ (Pa.s)
Limpide	HAinitial-600^a	8,44	23	3,92	0,269	3,11	4,98
Limpide	HA5C6-600 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA5C8-600 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA5C8r-600 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA5C10-600	2,88	2,09	0,568	0,865	1,02	2,13
Trouble	HA5C12-600	26	7,31	4,34	16	5,84	27
Trouble	HA5C14-600	108	14	17	76	23	127
Limpide	HA10C6-600 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA10C8-600 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA10C8r-600 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA10C10-600	38	7,20	6,25	57	8,06	44,45
Trouble	HA10C12-600	127	22	20	102	16	164
Trouble	HA10C14-600	23	1,651	3,75	21	2,032	33

Tableau II- 7 : Valeurs des modules élastiques G' (Pa) et visqueux G'' (Pa) ainsi que la viscosité complexe $|\eta^*|$ (Pa.s).

(a) HAinitial-600 à une concentration de 20 g/L dans du PBS alors que les HA alkylés sont à 10 g/L dans du PBS.

(b) Les valeurs sont trop faibles pour être mesurées en dynamique. Ces produits seront analysés en écoulement dans la partie suivante.

Le tableau II-7 montre que l'aspect associatif commence à apparaître pour des longueurs de chaînes alkyle avec 10 atomes de carbone.

Nous avons présenté sur la figure II-11 la variation des modules élastiques (G') et visqueux (G'') en fonction de la fréquence pour les dérivés de DS 5% ayant un comportement associatif.

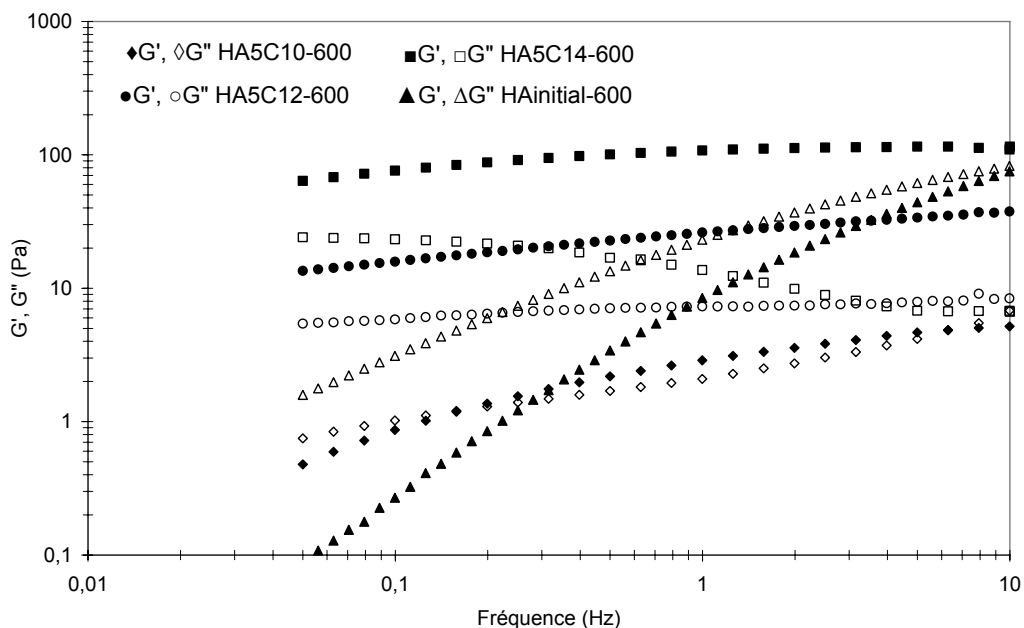


Figure II- 11 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour le HA initial à 20 g/L dans le PBS et les HA5C10-600, HA5C12-600 et HA5C14-600 à 10 g/L dans le PBS à 25°C.

La figure II-12 montre la variation des modules élastiques G' et visqueux G'' en fonction de la fréquence pour les dérivés de DS 10% ayant un comportement associatif.

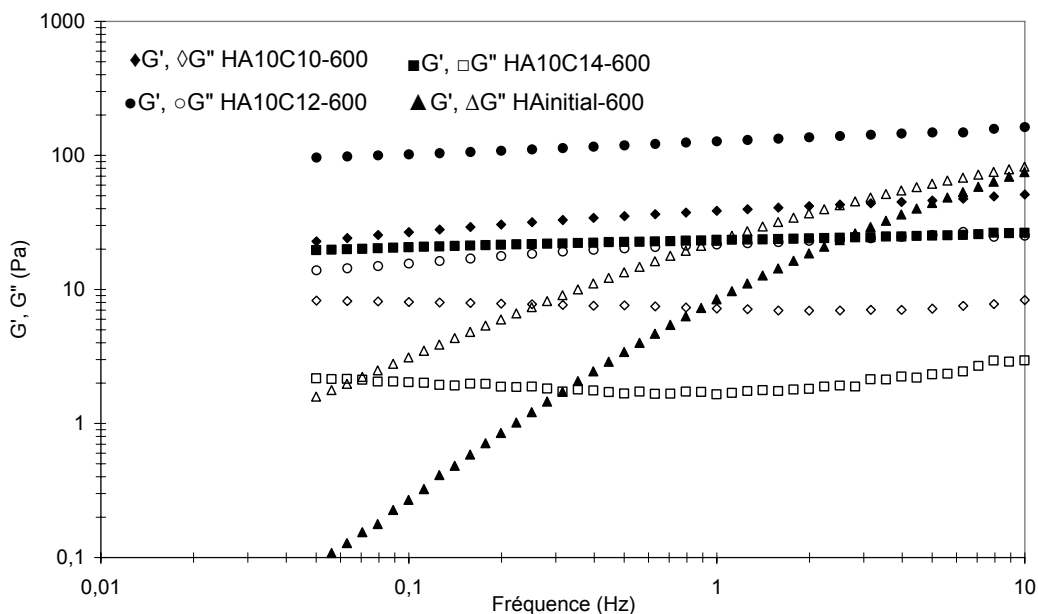


Figure II- 12 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour le HA initial-600 à 20 g/L dans le PBS et les HA10C10-600, HA10C12-600 et HA10C14-600 à 10 g/L dans le PBS à 25°C.

Nous observons que pour les dérivés de DS 5%, la valeur des modules augmente en fonction de la longueur de la chaîne alkyle. Les propriétés élastiques du HA5C14-600 sont supérieures à celles du HA5C12-600, qui sont elles-mêmes largement supérieures à celles du HA5C10-600.

Le dérivé HA10C10-600 a un comportement de type gel, avec G' supérieur à G'' sur toute la gamme de fréquences étudiée contrairement à son homologue de DS de 5%. Par contre, on observe une anomalie concernant le HA10C14-600. Ses modules sont inférieurs à ceux du HA10C12-600 et ceux du HA10C10-600. Ceci s'explique probablement par un problème de solubilité dû au DS élevé et à la longueur de la chaîne alkyle importante.

II.2.2.2 Hyaluronane modifié de masse molaire 200 000 g/mol

Comme pour le HA de masse molaire 600 000 g/mol, nous avons reporté les valeurs des modules élastiques, G' , et visqueux, G'' , ainsi que la viscosité complexe, $|\eta^*|$, pour les deux fréquences caractéristiques 0,1 Hz et 1 Hz.

Turbidité	Référence	Fréquence 1 Hz			Fréquence 0,1 Hz		
		G' (Pa)	G'' (Pa)	$ \eta^* $ (Pa.s)	G' (Pa)	G'' (Pa)	$ \eta^* $ (Pa.s)
Limpide	HAinitial-200^a	0,499	15,27	0,012	0,006	0,156	2,491
Limpide	HA5C6-200 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA5C8-200 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA5C8r-200 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA5C10-200 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA5C12-200	59,14	13,27	9,64	40,04	11,2	66,15
Trouble	HA5C14-200	1,141	0,847	0,226	1,141	0,738	2,169
Limpide	HA10C6-200 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA10C8-200 ^b	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA10C8r-200	28,51	15,39	5,156	8,525	9,992	20,9

Limpide	HA10C10-200	67,02	10,72	10,80	49,85	12,68	81,85
Insoluble	HA10C12-200	0,824	0,381	0,144	0,523	0,157	0,872
Insoluble	HA10C14-200	6,159	0,619	0,987	5,873	0,884	9,476

Tableau II- 8 : Valeurs des modules élastiques G' (Pa) et visqueux G'' (Pa) ainsi que la viscosité complexe $|\eta^*|$ (Pa.s).

(a) L'échantillon HAinitial-200 à une concentration de 60 g/L dans du PBS alors que les HA alkylés correspondants sont à 10 g/L dans du PBS.

(b) Les valeurs sont trop faibles pour être mesurées en dynamique. Ces produits seront analysés en écoulement dans la partie suivante.

Pour les HA alkylés préparés à partir d'un lot de masse molaire moyenne en masse M_w de 200 000 g/mol, nous avons un comportement différent de ceux issus de l'échantillon de HA de masse 600 000 g/mol. Le tableau II-8 suggère que pour un DS de 5%, seul le HA porteur de chaînes en C12 montre un comportement de type gel. (Figure II-13).

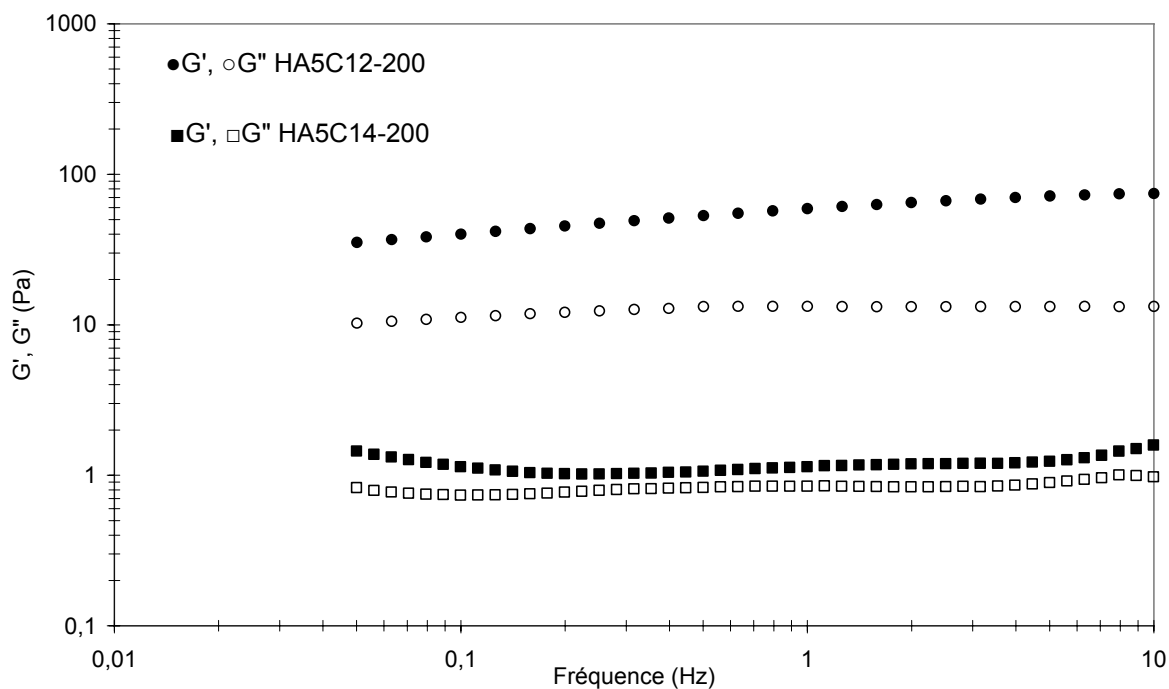


Figure II- 13 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour HA5C12-200, HA5C14-200 à 10g/L dans le PBS à 25°C.

Le HA porteur des chaînes en C14 avec un DS de 5% possède un module élastique G' supérieur au module visqueux G'' sur toute la gamme de fréquences, mais l'écart entre G' et G'' est assez faible. L'aspect trouble du « gel » suggère d'ailleurs un problème de solubilité

du produit, expliqué par l'hydrophobie élevée de ce composé et la possibilité de former des agrégats.

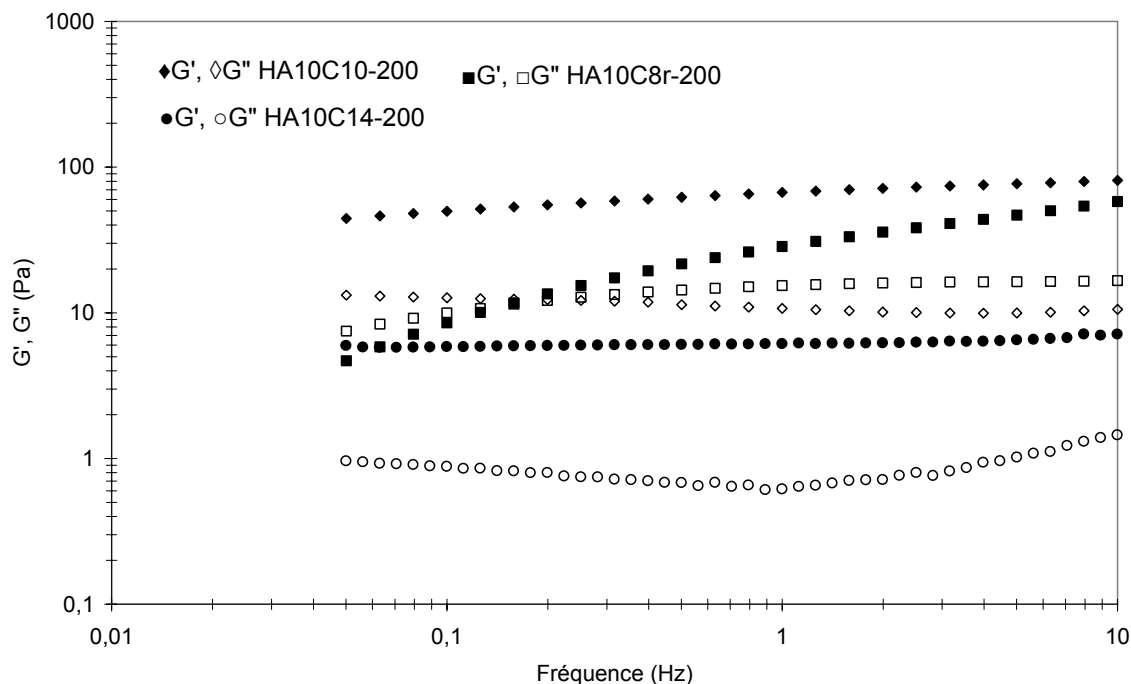


Figure II- 14 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour HA10C10-200, HA10C14-200 et HA10C8r-200 à 10g/L dans le PBS

La figure II-14 montre que pour des degrés de substitution deux fois plus élevés, soit un DS égal à 10%, nous observons un comportement de type gel pour le lot HA10C10-200 avec un aspect limpide. Le HA10C14-200 présente aussi un comportement de type gel, avec $G' > G''$ mais l'échantillon est à la limite de la solubilité (aspect trouble).

Le produit qui a montré des propriétés originales est le HA10C8r-200. Il a un comportement viscoélastique avec $G' < G''$ aux faibles fréquences et $G' > G''$ aux fréquences élevées. Ce type de comportement concorde bien avec l'application que nous visons qui est la viscosupplémentation. En effet, à faibles fréquences, c'est-à-dire à des temps longs, nous avons un comportement visqueux qui lubrifie l'articulation et permet de ne pas ressentir de douleur pendant les mouvements lents. A fréquences élevées, nous observons un module élastique prédominant permettant d'absorber les chocs pendant les mouvements rapides du patient.

II.2.3 Comparaison des différents dérivés.

Afin de mieux comparer l'effet de la masse molaire et du degré de substitution, nous avons reporté ci-après les différentes courbes présentées précédemment en fixant la longueur de la

chaîne alkyle pour les systèmes ayant des chaînons hydrophobes pendant de longueur C10 et C12 (les dérivés C14 ont des problèmes de solubilité).

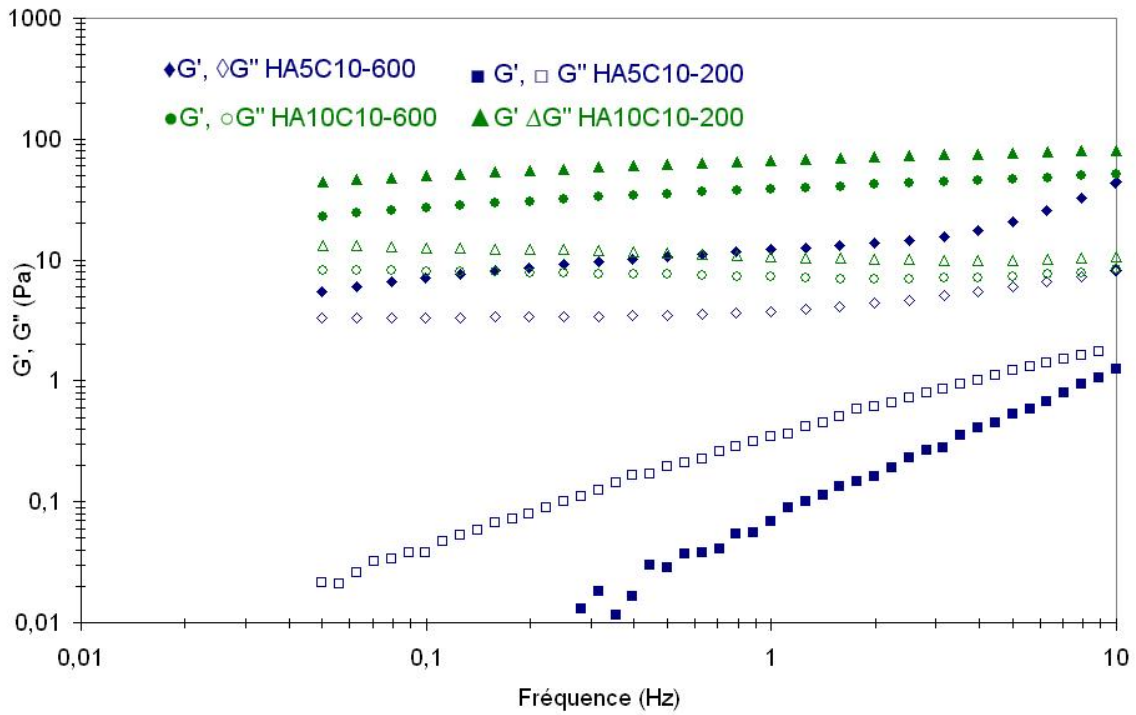


Figure II- 15 : Comparaison des modules élastiques et visqueux pour des longueurs de chaînes alkyle en C10 à 10 g/L dans du PBS à 25°C.

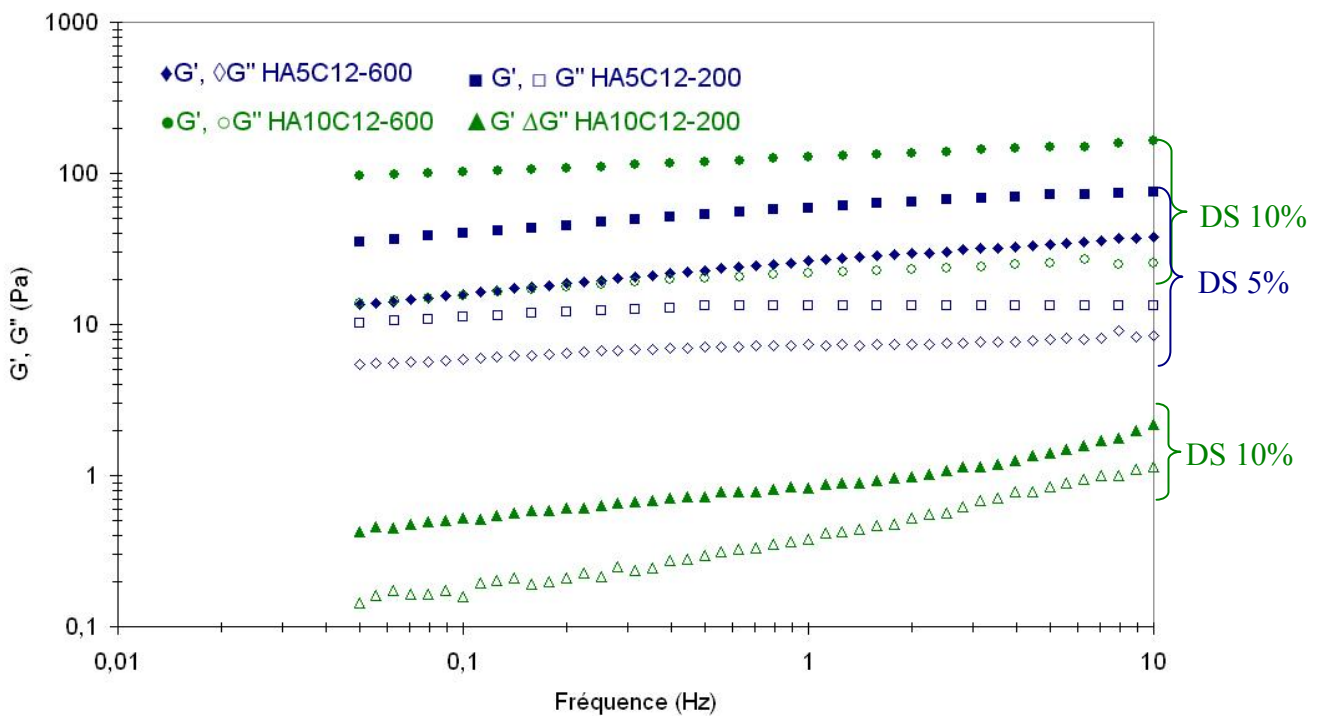


Figure II- 16 : Comparaison des modules élastiques et visqueux pour des longueurs de chaînes alkyle en C12 à 10 g/L dans du PBS à 25°C.

D'après la figure II-15, nous remarquons que pour un DS de 10% et pour une chaîne alkyle en C10, les modules rhéologiques obtenus avec du HA de masse molaire initial M_w : 200 000 sont plus élevés que ceux obtenus avec du 600 000 g/mol. Le même effet est obtenu sur la figure II-16 pour des longueurs de chaînes alkyle en C12 avec un DS de 5%. Ces observations ne sont pas vérifiées pour le DS 10% probablement à cause de l'insolubilité de l'échantillon.

Ceci pourrait s'expliquer par l'expansion de la chaîne dans le solvant et par la formation d'enchevêtrements qui sont plus importants pour les masses molaires élevées. Les chaînes courtes (M_w 200 000) conduisent ainsi à un réseau plus homogène que celui établi avec des chaînes de masses molaires plus élevées (600 000) où les enchevêtrements, plus nombreux, peuvent gêner la formation des domaines hydrophobes entre les chaînes polymères (schéma II-5).

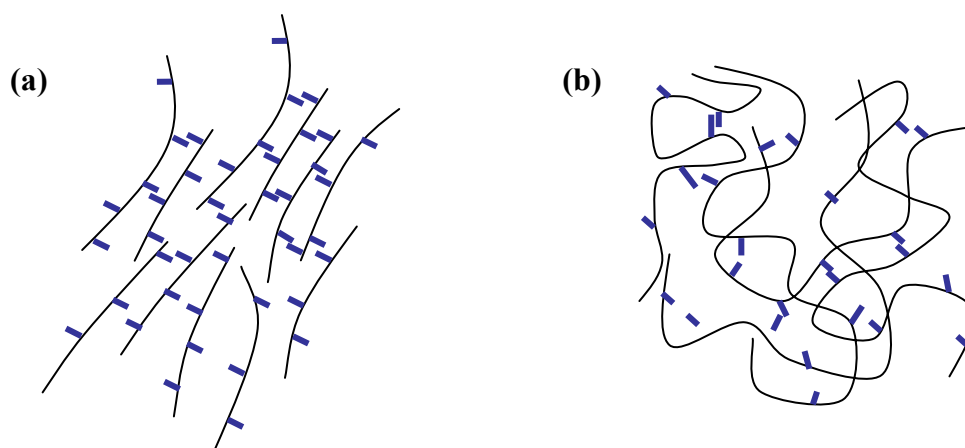


Schéma II- 5 : Représentation schématique de l'expansion de la chaîne polysaccharidique dans le solvant : (a) pour des masses de 200 000 et (b) des masses 600 000g/mol.

Conclusion : Cette étude nous a permis de montrer que le choix de la masse molaire initial du polymère est très important pour l'homogénéité du réseau physique final. Une masse molaire élevée du polysaccharide ne semble pas être optimale pour la formation du réseau. La longueur idéale du chaînon hydrophobe pendant semble être de 10 atomes de carbone pour un DS de 10%. Des études d'écoulement sont nécessaires afin de pouvoir étudier les propriétés des échantillons les moins visqueux.

II.3 Etudes en écoulement

Dans la partie précédente, nous avons mis en évidence par des mesures en régime dynamique, les associations hydrophobes qui se produisent dans les solutions de HA alkylés

pour des longueurs de chaînes alkyle supérieures à C10, ceci pour des DS de 5 et 10%. Dans cette partie, nous allons examiner par des expériences de rhéologie en écoulement, l'influence du degré de substitution des chaînes et de leur longueur pour les deux masses molaires.

Les mesures sont effectuées sur le rhéomètre AR2000, avec une géométrie de type cône-plan 4 cm 4° pour les solutions donc la viscosité est supérieure à 0,1 Pa.s. Pour les viscosités inférieures à 0,1 Pa.s, un viscosimètre de type Couette (LowShear 30) a été utilisé.

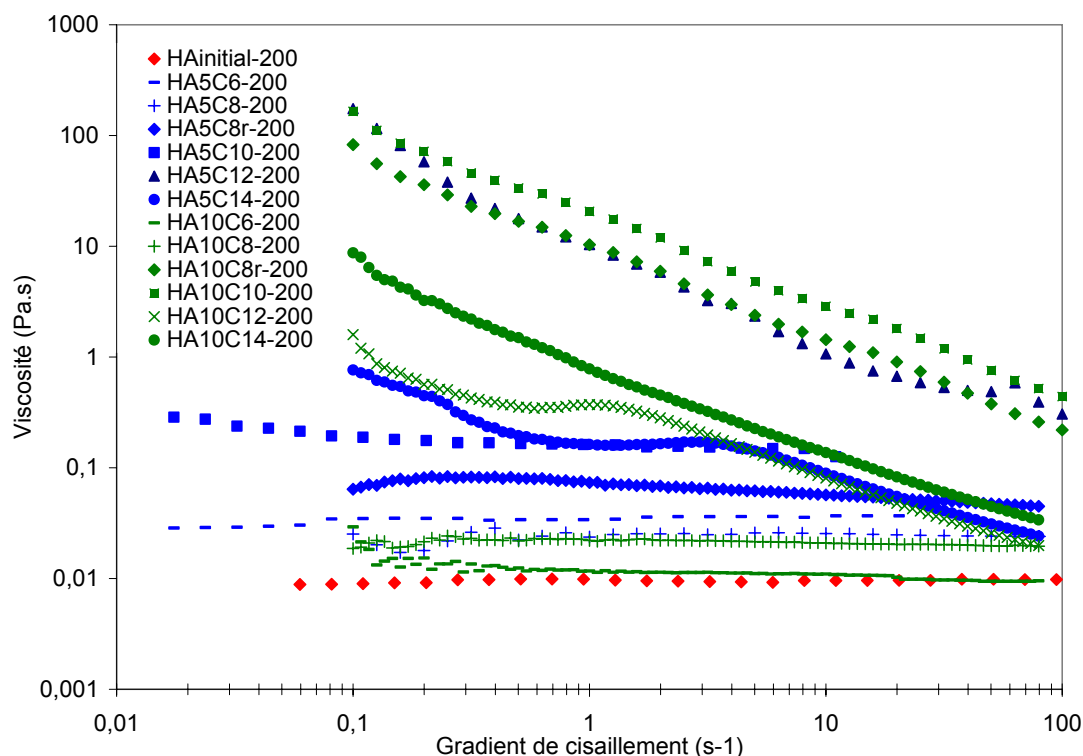


Figure II- 17 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour les différents HA alkylés à 10 g/L de masse molaire 200 000 g/mol et le HA initial à 10 g/L. Les solutions sont étudiées à 25°C dans du PBS.

La figure II-17 montre que nous avons un comportement newtonien pour les longueurs de chaînes inférieures à 10 atomes de carbone. Les viscosités sont supérieures à celles du HA initial 200 000 ce qui indique qu'il existe une légère association, provoquant une légère augmentation de la viscosité. Les chaînons pendants C6 et C8 semblent néanmoins être trop courts pour former un réseau tridimensionnel.

Nous pouvons noter que pour les dérivés ayant des greffons de longueurs inférieures à C10 et des degrés de substitution de 10%, ont des viscosités inférieures à ceux qui ont des DS de 5% ; ceci pourrait s'expliquer par la formation d'interaction intra-chaînes pour les DS

supérieures conduisant au recroquevillement des chaînes ce qui fait baisser la viscosité des solutions.

Un comportement différent est observé pour les longueurs de chaînes supérieures ou égales à C10 ; un effet rhéofluidifiant est observé pour les échantillons qui ont montré un effet associatif lors des mesures en dynamique. Ceci montre la présence d'associations hydrophobes qui se dissocient sous l'effet du cisaillement.

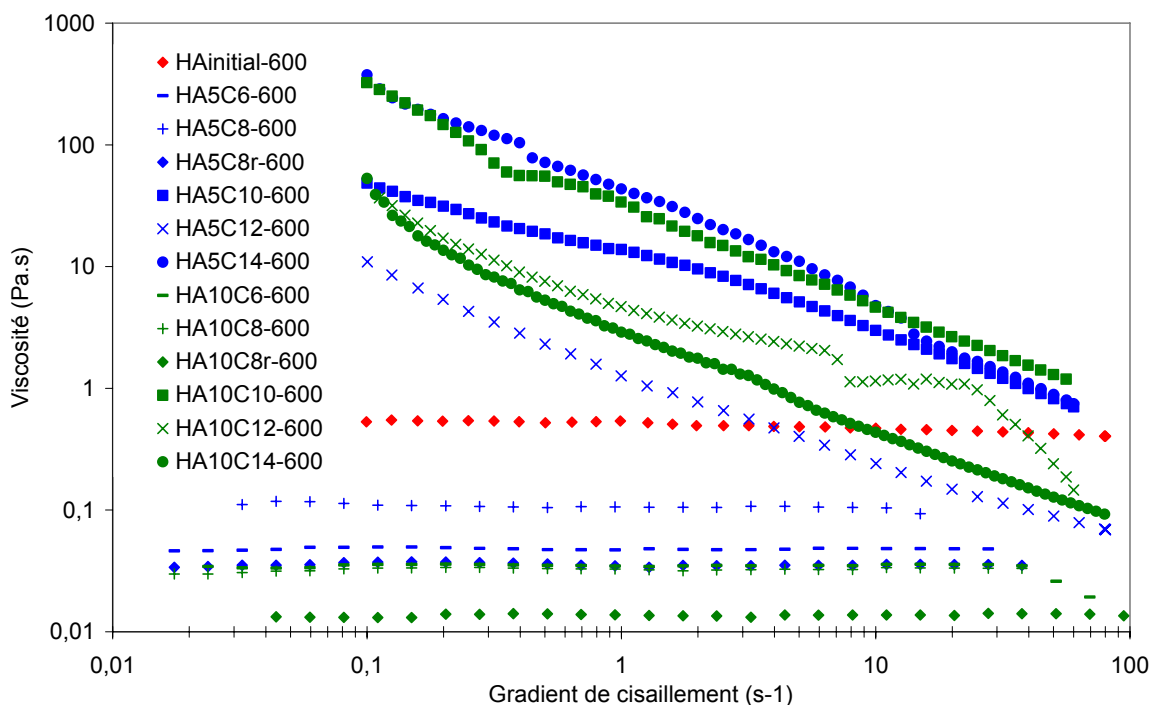


Figure II- 18 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour les différents HA alkylés à 10g/L de masse molaire 600 000 g/mol et le HA initial à 10g/L. Les solutions sont étudiées à 25°C dans du PBS.

Comme pour le HA de masse molaire 200 000 g/mol, la figure II-18 montre un comportement rhéofluidifiant caractéristique de la présence d'associations hydrophobes pour des longueurs de chaînes égales et supérieures à C10. Pour des longueurs inférieures, les chaînes semblent être trop courtes pour conduire à la formation d'un réseau tridimensionnel.

Nous pouvons observer aussi que les dérivés avec des longueurs de chaînes inférieures à C10 ont des viscosités plus faibles que celle du HA initial non modifié. Sachant que la réaction est non dégradante, cette baisse de viscosité est probablement due à la formation d'agrégats et/ou à l'enchevêtrement des longues chaînes de HA, tel que décrit précédemment dans le schéma II-5. Dans le cas du HA de masse molaire 200 000g/mol, la longueur du

polymère conduit à un réseau 3D homogène sans formation d'enchevêtrements qui conduisent à la diminution de la viscosité.

Afin de mieux comprendre la formation des domaines hydrophobes entre les différentes chaînes alkyle greffées, nous avons analysé les échantillons par fluorescence.

III Etude par fluorescence des différents dérivés alkylés

Afin d'estimer la variation des domaines hydrophobes pour les différents dérivés alkylés synthétisés, nous avons réalisé une étude par fluorescence en utilisant le pyrène comme sonde. Le spectre de fluorescence du pyrène est sensible à la polarité du solvant. Ainsi les rapports I_1/I_3 des bandes de la première et la troisième bande de vibration du spectre d'émission de fluorescence tend à diminuer quand la polarité diminue. Cette caractéristique peut être exploitée pour mesurer la concentration d'agrégations critique des polymères hydrophobiquement modifiés. (figure II-19)

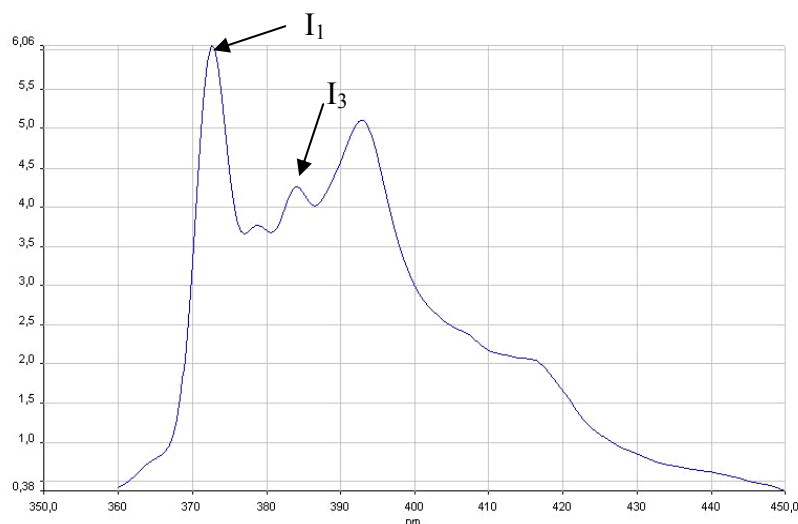


Figure II- 19 : Spectre d'émission du pyrène pour une solution de HA5C10-600 à 1 g/L contenant du pyrène à une concentration de 6×10^{-7} M.

Afin de comparer l'effet de la longueur des greffons hydrophobes et leurs degrés de substitution sur la chaîne polymère, nous avons préparé différents échantillons allant des dérivés HA5C6-600 à HA5C12-600 et de HA10C6-600 à HA10C12-600 pour des concentrations de 0,01 à 2 g/L en polymère. La figure II-20 permet de comparer le rapport des intensités I_1/I_3 en fonction de la concentration pour les différents dérivés.

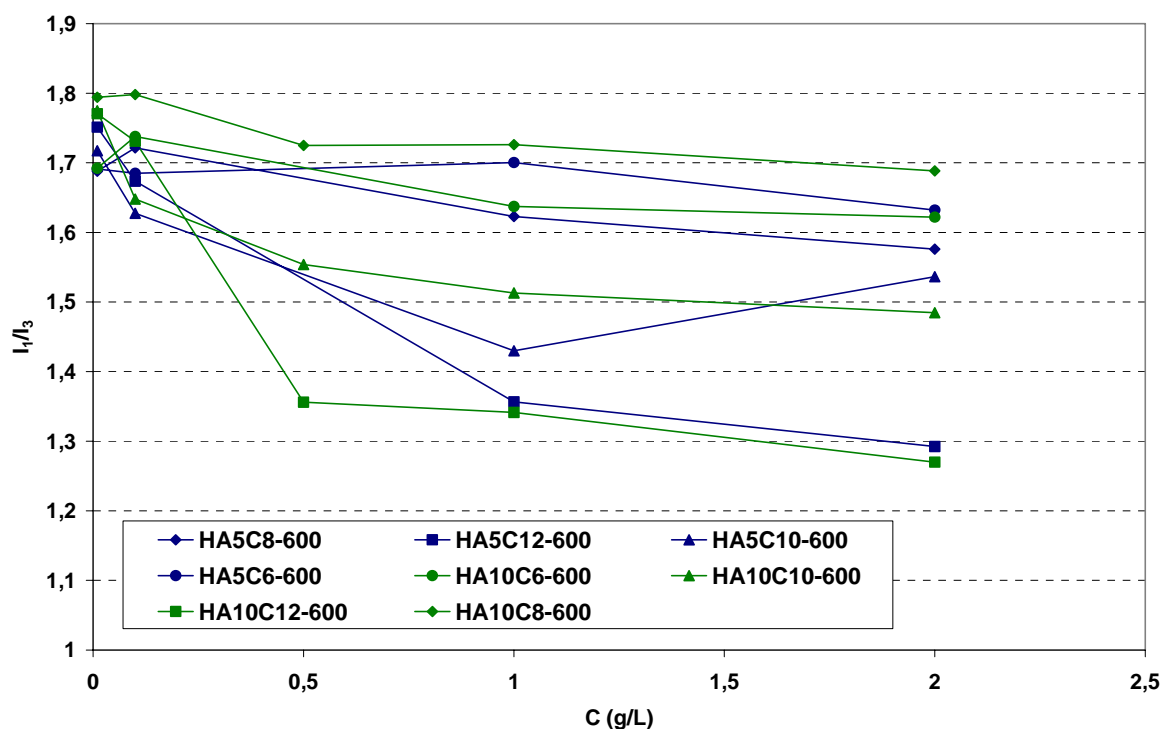


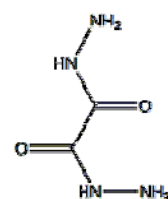
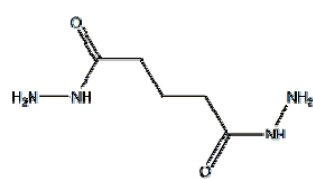
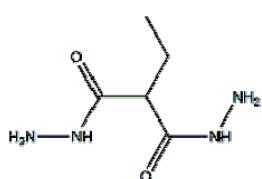
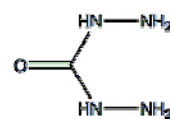
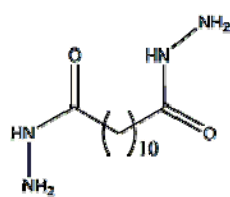
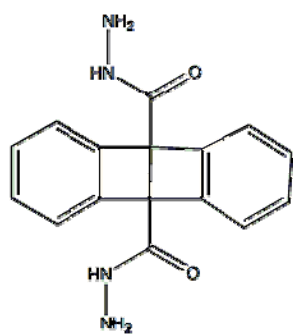
Figure II- 20 : Rapport des intensités I_1/I_3 du spectre d'émission du pyrène pour les différents dérivés alkylés de HA de masse molaire 600 000 g/mol.

Nous pouvons voir que les domaines hydrophobes sont plus importants pour des longueurs de chaînes en C12 (DS 5 et 10%), suivis par les chaînes en C10 (DS 5 et 10%). Il est difficile de faire une distinction entre les chaînes en C6 et C8 ce qui montre que les associations hydrophobes sont faibles et que cette longueur de chaîne est insuffisante pour établir de fortes interactions interchaînes.

IV Influence du bras espaceur dihydrazide

Comme nous avons pu le voir dans la première partie de ce chapitre, l'acide hyaluronique a été fonctionnalisé par un bras espaceur dihydrazide «l'acide adipique dihydrazide ADH» en milieu aqueux. A partir du HA-ADH, nous avons pu greffer des chaînes alkyle permettant d'obtenir des comportements de type gel. Afin de compléter notre étude comparative et afin d'obtenir un panel de produits ayant des propriétés originales, nous sommes proposés de faire varier la nature du bras espaceur dihydrazide.

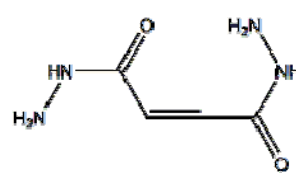
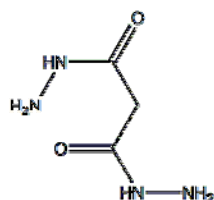
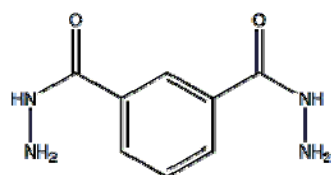
Un large choix de produits dihydrazide sont disponibles commercialement :



(8)

(9)

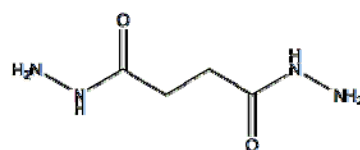
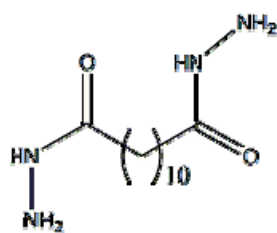
(10)



(11)

(12)

(13)



(14)

(15)

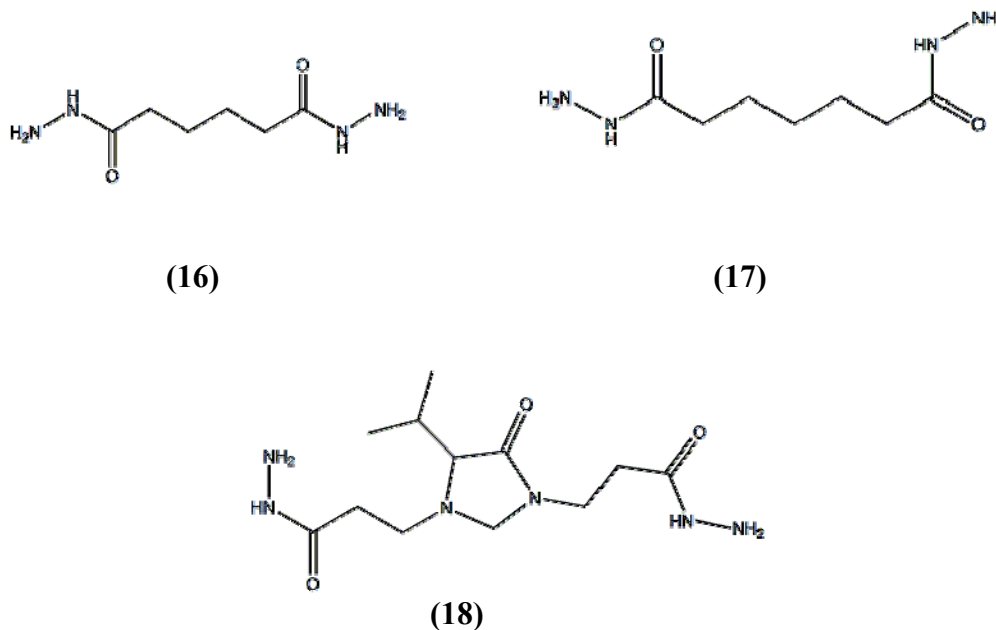


Schéma II- 6 : (5) Acide 9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracène-11,12-dicarboxylique dihydrazide
(6) Acide 1,12-dodécanedioïque dihydrazide
(7) Acide carbodihydrazide (CDH)
(8) Acide éthylmalonique dihydrazide
(9) Acide glutarique dihydrazide
(10) Acide oxalique dihydrazide (ODH)
(11) Acide isophthalique dihydrazide (IDH)
(12) Acide malonique dihydrazide
(13) Acide maléique dihydrazide
(14) Acide icosanedioïque dihydrazide (LDH)
(15) Acide succinique dihydrazide (SDH)
(16) Acide adipique dihydrazide (ADH)
(17) Acide pimélique dihydrazide (PDH)
(18) Acide valine dihydrazide (VDH)

Evidemment, nous nous sommes focalisés sur les composés solubles dans l'eau car la réaction de greffage du dihydrazide que nous avons optimisée est réalisée en milieu aqueux. Notre choix s'est orienté vers deux dihydrazides différents : l'acide succinique dihydrazide SDH (15), qui contient 2 carbones entre les fonctions dihydrazide et l'acide isophthalique dihydrazide IDH (11), qui contient un cycle aromatique. Ce choix devrait permettre de voir l'influence d'un bras espaceur plus court ou plus rigide sur le comportement en solution des HA modifiés.

	ADH (16)	SDH (15)	IDH (11)
Coût * 1g de produit	1,68 €	4,80 €	404 €

Tableau II- 9 : coût des différents dihydrazides sélectionnés pour l'étude de l'effet du bras dihydrazide.

* tarification sigma-aldrich Septembre 2007

La stratégie de synthèse pour l'activation du hyaluronane par ces groupements dihydrazide est tout à fait identique à celle utilisée pour fixer l'ADH. Nous avons synthétisé des HA porteurs de bras dihydrazide ADH, SDH et IDH avec deux degrés de substitution différents : 5 et 10%. Ces produits ont été caractérisés par RMN¹H et par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) triple détection. Les propriétés en solution ont été étudiées par viscosimétrie capillaire et par rhéologie en écoulement. Les HA fonctionnalisés ont ensuite servi à greffer les chaînes alkyle de différentes longueurs avec les deux degrés de substitution de 5 et 10%.

IV.1 Synthèse des dérivés HA-IDH et HA-SDH

Le tableau ci-après résume les conditions de synthèse utilisées pour préparer les dérivés HA-SDH et HA-IDH de DS 5 et 10%.

HA	SDH ou IDH	EDC	DS	Rendement
1 éq.	1 éq.	0,093 éq.	5 %	89 %
1 éq.	1 éq.	0,187 éq.	10 %	86 %

Tableau II- 10 : Récapitulatif des conditions de la synthèse des dérivés HA-SDH et HA-IDH.

Nous rappelons que pour cette synthèse, un excès de dihydrazide est nécessaire. Nous utilisons 1 éq de dihydrazide par rapport au HA. Le carbodiimide utilisé, l'EDC, est le réactif limitant. Pour obtenir un DS de 5%, nous utilisons 0,093 éq d'EDC et pour un DS de 10%, nous utilisons 0,187 éq d'EDC par rapport à 1 éq de HA.

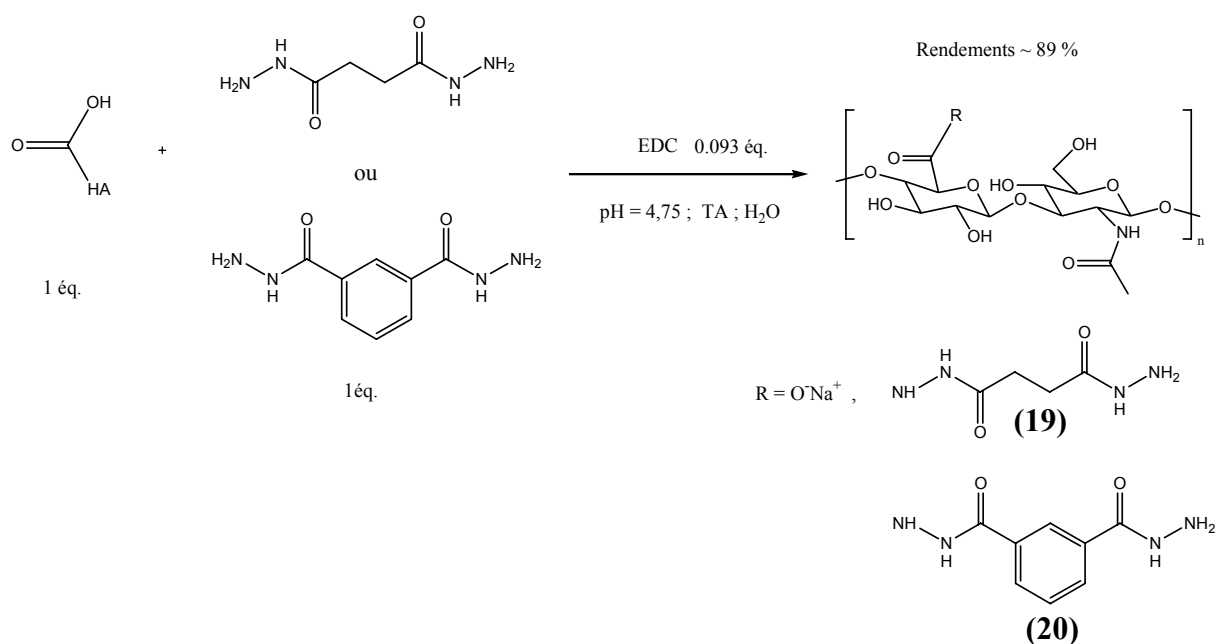


Schéma II- 7 : Schéma réactionnel des dérivés HA-SDH (19) et HA-IDH (20) avec des DS de 5%.

Les HA fonctionnalisés sont purifiés par ultrafiltration et isolés par lyophilisation. Comme décrit précédemment, la précipitation du produit final favorise la formation d'interactions secondaires irréversibles entre les chaînes de HA, conduisant à des problèmes de solubilisation en milieu aqueux des dérivés obtenus.

IV.1.1 Caractérisation des dérivés HA-SDH et HA-IDH par RMN¹H.

La structure des dérivés HA-SDH (19) et HA-IDH (20) a été confirmée par RMN¹H. Les spectres RMN proton, enregistrés à 80°C sont présentés sur les figures II-21 et II-22.

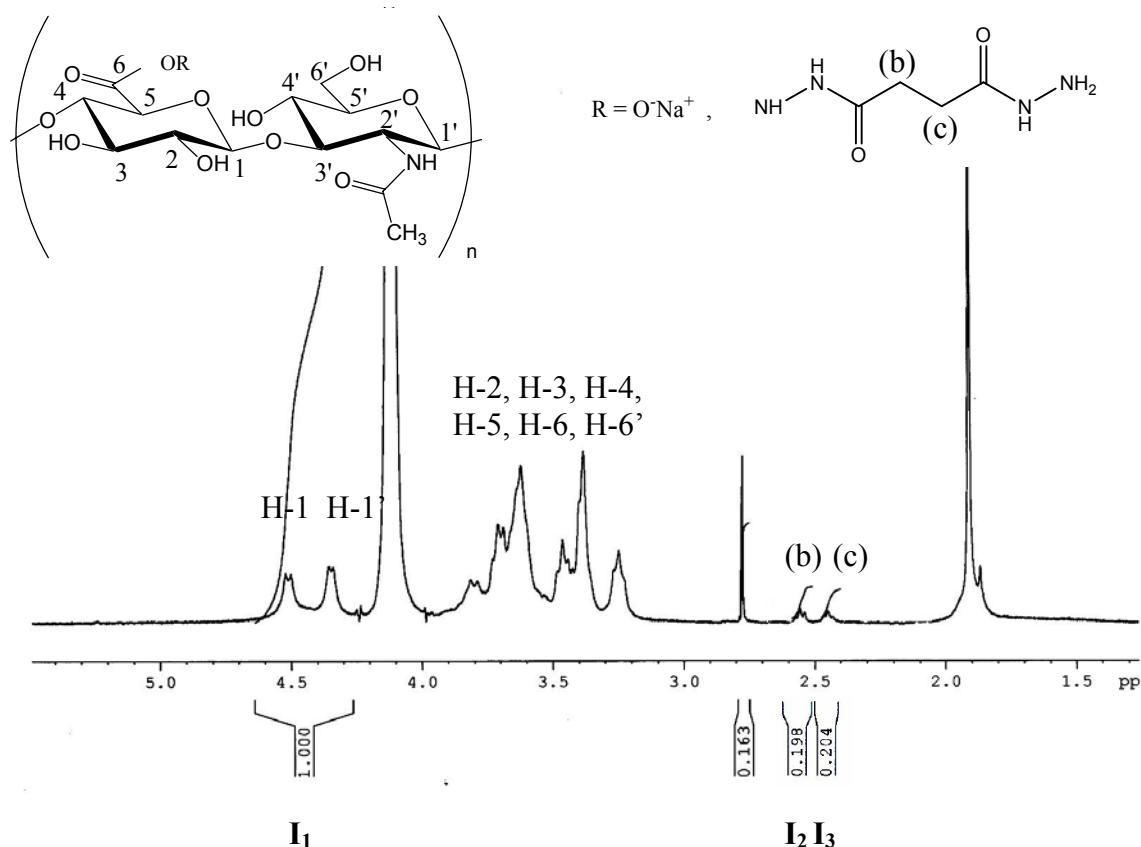


Figure II- 21 : Spectre RMN¹H (400MHz, 80°C, D₂O, 6mg/mL) du dérivé HA-SDH (20) DS 10%.

Pour le HA-SDH, la valeur du DS a été déterminée par intégration des signaux des protons méthyléniques (b, c) du groupement hydrazide avec comme référence interne les protons anomères du hyaluronane (a) :

$$DS = \left(\frac{1}{I_1} \right) \times \frac{I_2}{2} = \left(\frac{1}{I_1} \right) \times \frac{I_3}{2} \approx 0,10 \quad \text{soit } (10 \pm 1) \% \quad \text{éq II- 6.}$$

Les valeurs identiques des intégrales des signaux des protons b et c semblent indiquer l'absence de réticulation chimique. Toutefois, il est important de tenir compte de la précision relative de la RMN évaluée approximativement à 10 %.

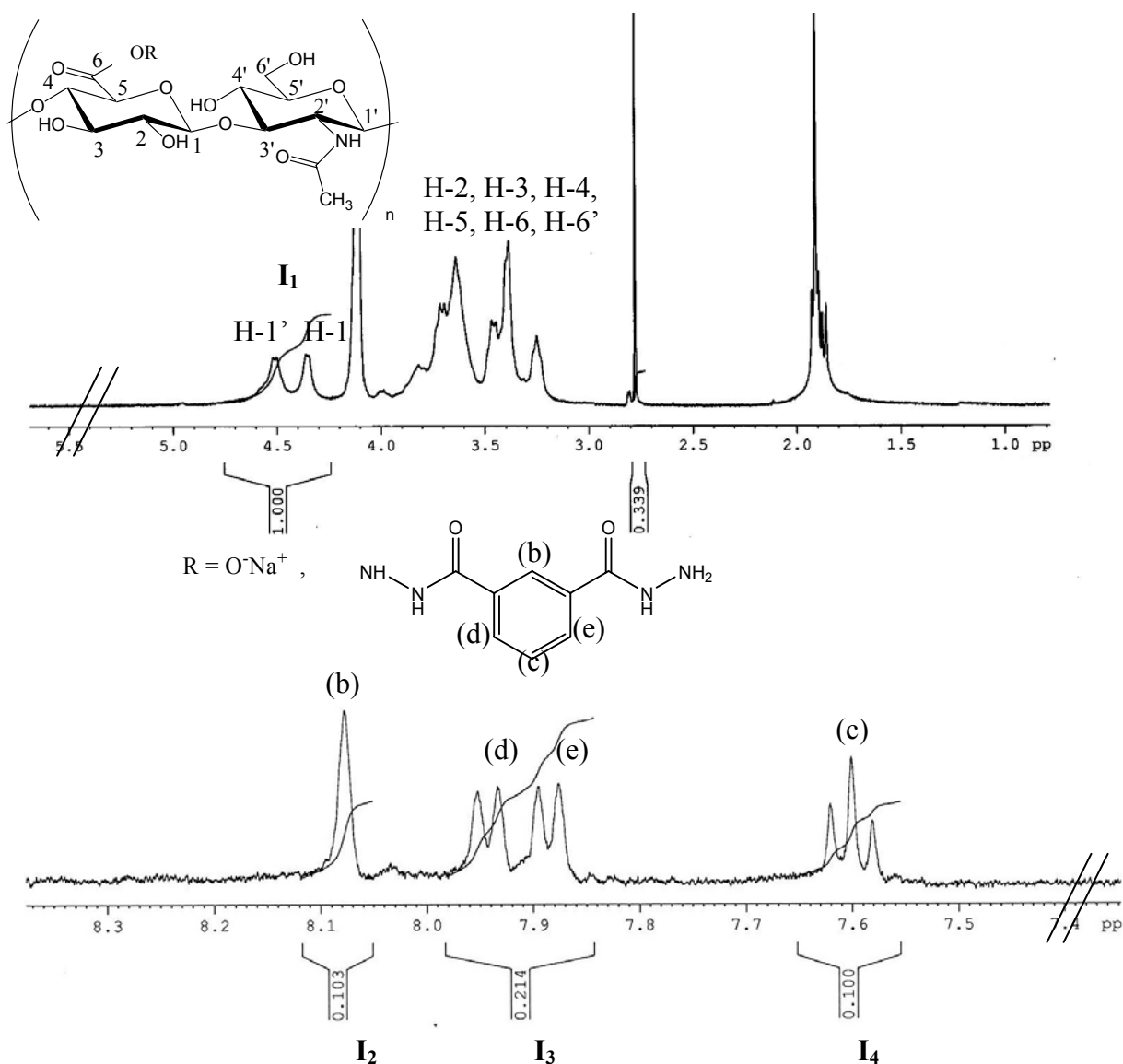


Figure II- 22 : Spectre RMN^1H (400MHz, 80°C , D_2O , 6mg/mL) du dérivé HA-IDH (20) de DS 10%.

Pour le HA-IDH, la valeur du DS a été déterminée par intégration des signaux des protons (b, c, d) du cycle du groupement hydrazide avec comme référence interne les protons anomères du hyaluronane (a) :

$$DS = \left(\frac{1}{I_1}\right) \times I_2 = \left(\frac{1}{I_1}\right) \times \frac{I_3}{2} = \left(\frac{1}{I_1}\right) \times I_4 \approx 0,10 \quad \text{soit } (10 \pm 1) \% \quad \text{éq II- 7}$$

IV.1.2 Caractérisation des dérivés HA-ADH, HA-SDH et HA-IDH par chromatographie d'exclusion stérique triple détections (SEC).

Cette technique donne accès à des grandeurs physiques telles que les masses molaires moyennes en masse (M_w), le rayon de giration (R_g) ou encore la viscosité intrinsèque des échantillons $[\eta]$. L'échantillon à étudier est fractionné selon le volume hydrodynamique des polymères, puis analysé à l'aide de trois détecteurs : un refractomètre différentiel, un viscosimètre capillaire et un détecteur multi-angles à diffusion de lumière.

Les dérivés HA-ADH, HA-SDH et HA-IDH ultrafiltrés et lyophilisés sont solubilisés dans du PBS à une concentration de 0,5 à 1 g/L puis filtrés sur des membranes en acétate de cellulose de porosité 0,22 μ m. Les chromatogrammes correspondant seront comparés à ceux du HA initial.

La figure II-23 montre des courbes de distribution en masse (ou volume d'élution) des différents produits. Le début, le maximum et la fin des pics de distribution doivent se situer théoriquement aux mêmes valeurs de masse molaire pour les différents échantillons étudiés (trait pointillé sur la figure II-23). On remarque que ce n'est pas le cas pour les échantillons de DS 10%.

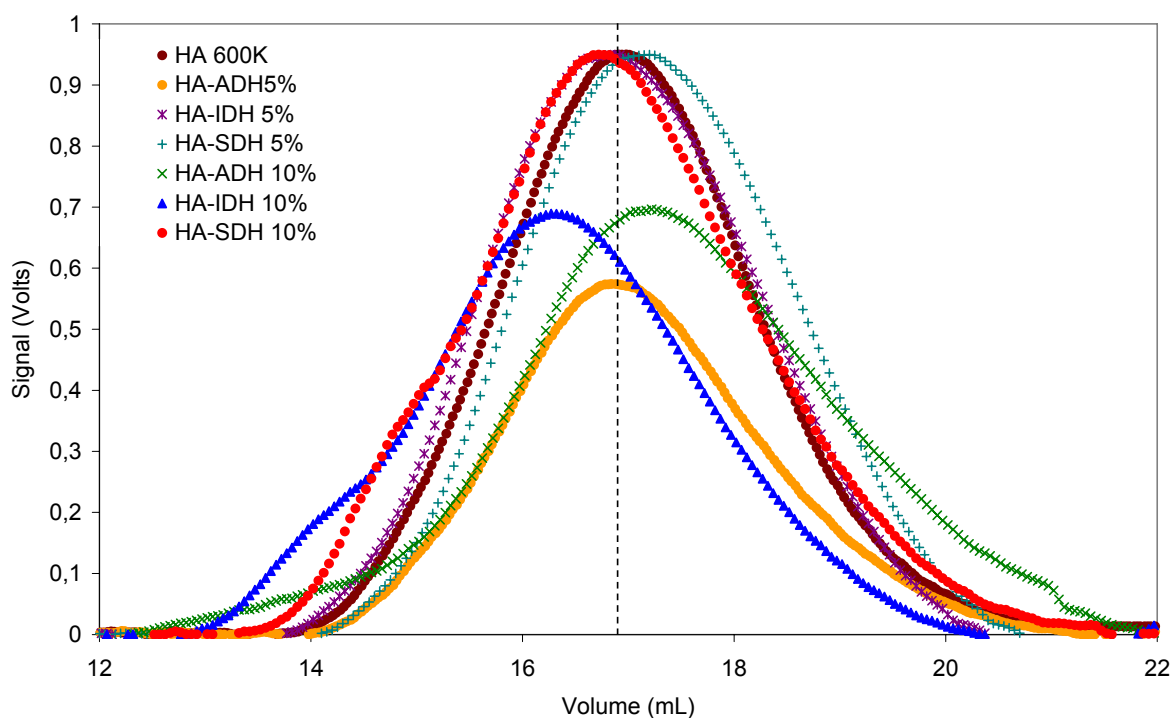


Figure II- 23 : Courbes de distribution en volume d'élution obtenues pour les dérivés HA-ADH, HA-SDH et HA-IDH pour des DS de 5% et 10% ainsi que le HAinitial-600.

Seul les dérivés de DS 5% ont des distributions similaires à celles du HA initial.

	M _w HA-ADH (g/mol)	M _w HA-SDH (g/mol)	M _w HA-IDH (g/mol)
DS 5%	695 600	650 000	505 100
DS 10%	299 800	713 500	946 100

Tableau II- 11 : Valeurs des masses molaires moyennes obtenues par SEC triple détection pour les HA modifiés comparé au HA initial de masse M_w 600 000 g/mol.

Nous pouvons conclure de cette caractérisation que le greffage d'un taux élevé ($\geq 10\%$) de bras dihydrazide semble conduire à la formation d'agrégats dus aux interactions inter-chaînes (Figure II-23 : présence d'épaulement aux faibles volumes d'élution). Par contre le greffage de 5% de bras dihydrazide semble être l'idéal, car nous n'observons pas (ou peu) de modifications des propriétés en solution par rapport au HA initial.

IV.2 Propriétés en solution des différents dérivés hydrazide : HA-ADH, HA-IDH et HA-SDH

D'après les résultats obtenus en chromatographie d'exclusion stérique triple détections (SEC), le DS semble jouer un rôle important sur les propriétés en solution du HA-hydrazide. 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 l'influence de la nature du bras espaceur sur le polymère.

IV.2.1 Viscosimétrie capillaire

Cette étude a été effectuée en régime dilué, c'est à dire à une concentration en polymère de 0,5 g/L dans du PBS qui contient du NaCl à 0,134M. (0,5 g/L est inférieur à la concentration C* du HA initial de masse 600 000 g/mol, C* \approx 0,9 g/L)

La figure II-24 représente l'évolution de la viscosité réduite (η_{red}) des solutions des dérivés de HA-ADH, HA-IDH et HA-SDH de DS 5 et 10% ainsi que le HA initial de masse 600 000 g/mol.

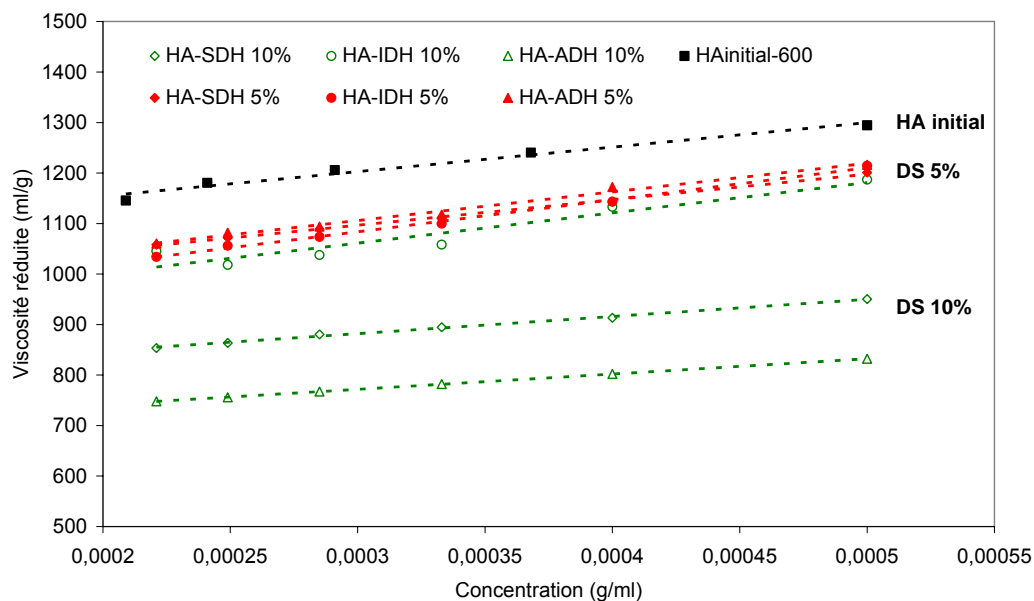


Figure II- 24 : Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour des solutions de HA initial-600, HA-ADH, HA-SDH et HA-IDH possédant deux DS différents 5 et 10% à 25°C dans du PBS.

En extrapolant les droites de la figure II-25 à $C \rightarrow 0$, nous pouvons déduire les valeurs de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ et de la constante de Huggins k' . Les valeurs des masses molaires viscosimétriques sont obtenues par application de la loi de Mark-Houwink citée précédemment (éq II-4).

	C^* (g/L)	k'	$[\eta]$ (mL/g)	M_v (g/mol) apparente
HAinitial-600	0,92	0,36	1085	510 164
HA-ADH 5%	1,06	0,64	935	423 100
HA-SDH 5%	1,05	0,56	944	428 200
HA-IDH 5%	1,07	0,79	893	398 900
HA-ADH 10%	1,46	0,65	681	282 900
HA-SDH 10%	1,28	0,55	779	335 900
HA-IDH 10%	1,13	0,79	881	392 100

Tableau II- 12 : Concentration critique de recouvrement C^* , Constante de Huggins, viscosité intrinsèque et les masses molaires moyennes viscosimétriques pour les différents dérivés hydrazides.

Le tableau II-12 confirme les résultats observés lors de la caractérisation par SEC. Les dérivés de DS 5% ont des valeurs qui se rapprochent le plus de celles du HA initial. Pour les DS de 10% nous avons des valeurs différentes, la viscosité et les masses molaires M_v sont inférieures au HA initial.

Comme discuté précédemment, les valeurs obtenues pour les dérivés de DS 10% suggèrent la présence d'interactions intra et/ou inter-chaînes résultant de la formation de liaisons hydrogène. Il faut noter que les dérivés HA-IDH 5 et 10% ont la même viscosité intrinsèque, ce qui signifie un comportement analogue dû à une bonne solubilité de ces dérivés.

IV.2.2 Viscosimètre Low Shear LS30

La figure II-25 représente la valeur de la viscosité newtonienne en fonction de la concentration pour les différents dérivés HA-ADH, HA-SDH, HA-IDH. On observe deux familles de courbes bien distinctes : celles des dérivés ayant un DS de 5% et celles correspondant aux polymères de DS deux fois plus élevés. Les mesures ont été effectuées en régime dilué et semi-dilué ($C > C^*$) dans le PBS à 25°C.

Quelle que soit la technique d'analyse, nous observons que pour des DS de 10%, des interactions inter et/ ou intra-chaînes se forment, conduisant à une baisse de la viscosité des solutions. L'écart entre les valeurs de la viscosité devient de plus en plus prononcé lorsque la concentration en polymère augmente.

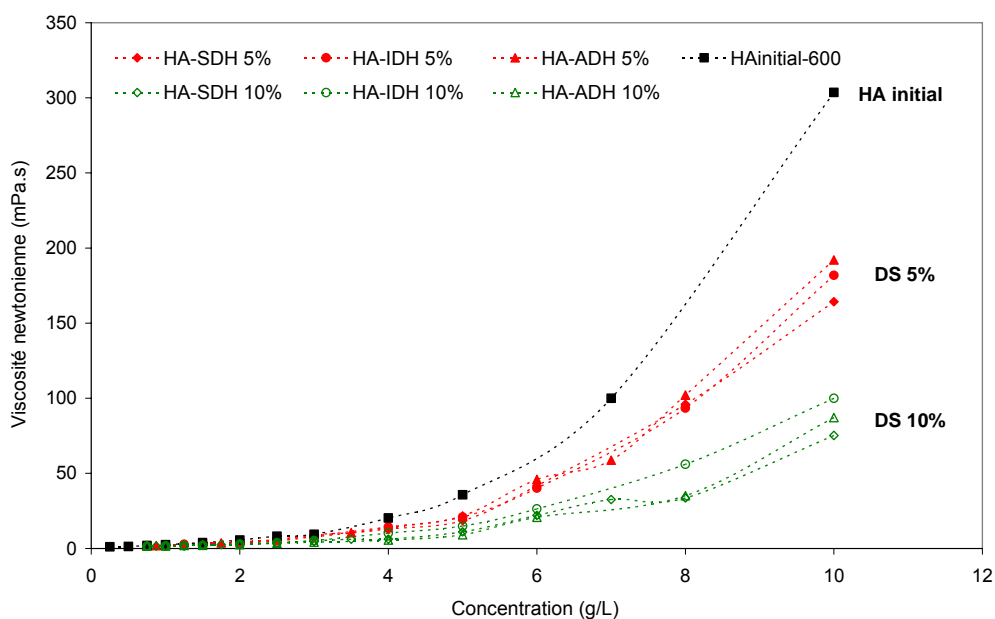


Figure II- 25 : Variation de la viscosité newtonienne en fonction de la concentration pour le HA initial HAinitial-600 (noir) et les dérivés du HA de DS 5% (rouge) et de DS 10% (vert).

En revanche, nous ne pouvons pas conclure sur l'influence de la nature du bras espaceur. Afin de pouvoir observer leurs effets, nous avons greffé des chaînes alkyle sur ces intermédiaires et comparé les propriétés physico-chimiques des réseaux physiques amphiphiles obtenus avec ceux préparés à partir de l'intermédiaire HA-ADH.

IV.3 Etude des différents dérivés alkylés issus des intermédiaires HA-SDH et HA-IDH.

Nous avons reporté les valeurs des modules élastiques, G' , et visqueux, G'' , ainsi que la viscosité complexe, $|\eta^*|$, pour deux fréquences de 0,1 Hz et 1 Hz. La turbidité a été indiquée pour pouvoir comparer l'aspect des échantillons. Les résultats présentés dans le tableau II-13 correspondent aux HA alkylés obtenus via le HA-SDH de DS 5 et 10%.

Turbidité	Référence	Fréquence 1 Hz			Fréquence 0,1 Hz		
		G' (Pa)	G'' (Pa)	$ \eta^* $ (Pa.s)	G' (Pa)	G'' (Pa)	$ \eta^* $ (Pa.s)
Limpide	HAinitial-600	8,44	23	3,92	0,269	3,11	4,98
Limpide	HA5C6-SDH	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA5C8-SDH	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA5C8r-SDH	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA5C10- SDH	1,82	10,39	1,68	0,12	1,22	1,95
Limpide	HA5C12- SDH	2,66	11,43	1,87	0,08	1,37	2,19
Trouble	HA5C14- SDH	2,12	10,27	1,67	0,08	1,22	1,95
Limpide	HA10C6- SDH	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA10C8- SDH	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA10C8r- SDH	-	-	-	-	-	-
Limpide	HA10C10- SDH	3,33	13,56	2,31	0,11	1,47	3,46
Trouble	HA10C12- SDH	258	104	44	136	62	239
Trouble	HA10C14- SDH	359	37	57	250	90	224

Tableau II- 13. Valeurs des modules élastiques G' (Pa) et visqueux G'' (Pa) ainsi que la viscosité complexe $|\eta^*|$ (Pa.s). Tous les échantillons ont une concentration de 20 g/L dans du PBS.

Le tableau II-13 montre que pour les DS de 5% aucun aspect associatif n'est observé quelque soit la longueur de la chaîne alkyle de 6 à 14 atomes de carbone avec le SDH. Le caractère associatif commence à apparaître pour les DS de 10% et des longueurs de chaîne de 12 et 14 atomes de carbone.

En ce qui concerne les dérivés alkylés obtenus à partir des lots HA-IDH de DS 5 et 10% nous obtenons des résultats remarquables. Nous nous sommes limités au greffage de chaînes en C10 et en C8r, l'IDH étant couteux (tableau II-14).

Turbidité	Référence	Fréquence 1 Hz			Fréquence 0,1 Hz		
		G' (Pa)	G'' (Pa)	$ \eta^* $ (Pa.s)	G' (Pa)	G'' (Pa)	$ \eta^* $ (Pa.s)
Limpide	HA5C8r-IDH	17,33	13,08	3,505	3,92	5,85	11,24
Limpide	HA5C10-IDH	94	9,42	15	79	11	128
Insoluble	HA10C8r-IDH	-	-	-	-	-	-
Insoluble	HA10C10-IDH	-	-	-	-	-	-

Tableau II- 14. Valeurs des modules élastiques, G' (Pa), et visqueux, G'' (Pa), ainsi que de la viscosité complexe $|\eta^*|$ (Pa.s). Tout les échantillons ont une concentration de 10g/L dans du PBS.

Les courbes sur la figure II-26 montrent un comportement viscoélastique pour le HA5C8r et un comportement de gel pour les chaînes en C10. Ces produits se distinguent clairement des dérivés HA5C10-ADH et HA5C10-SDH, comme illustré par la figure II-28.

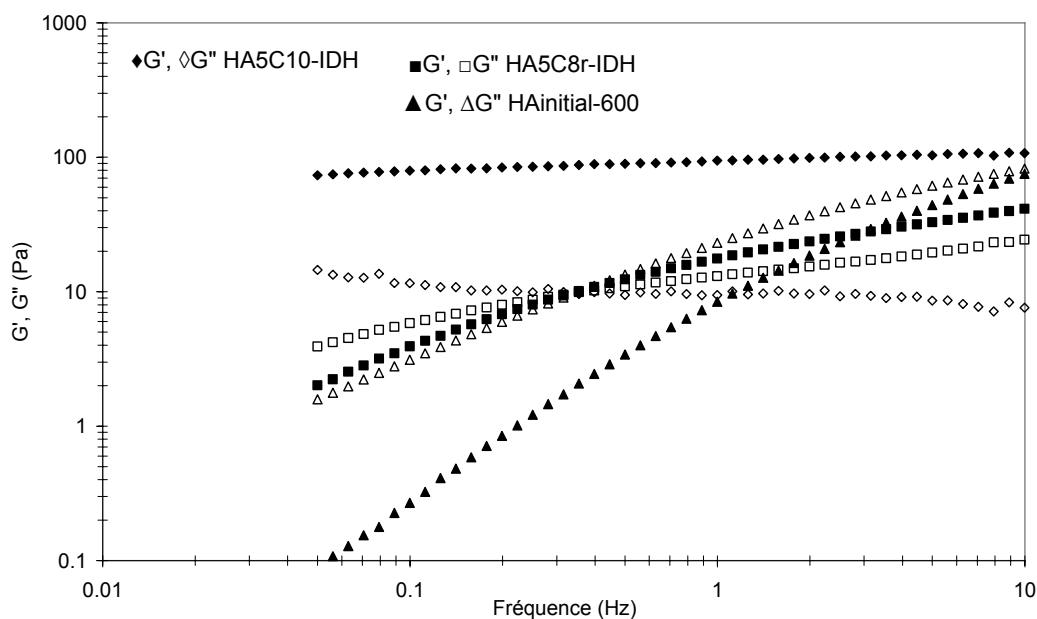


Figure II- 26 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour les dérivés HA5C10-IDH et HA5C8r-IDH à une concentration de 10g/L et le HAinitial-600 à 20g/L dans le PBS.

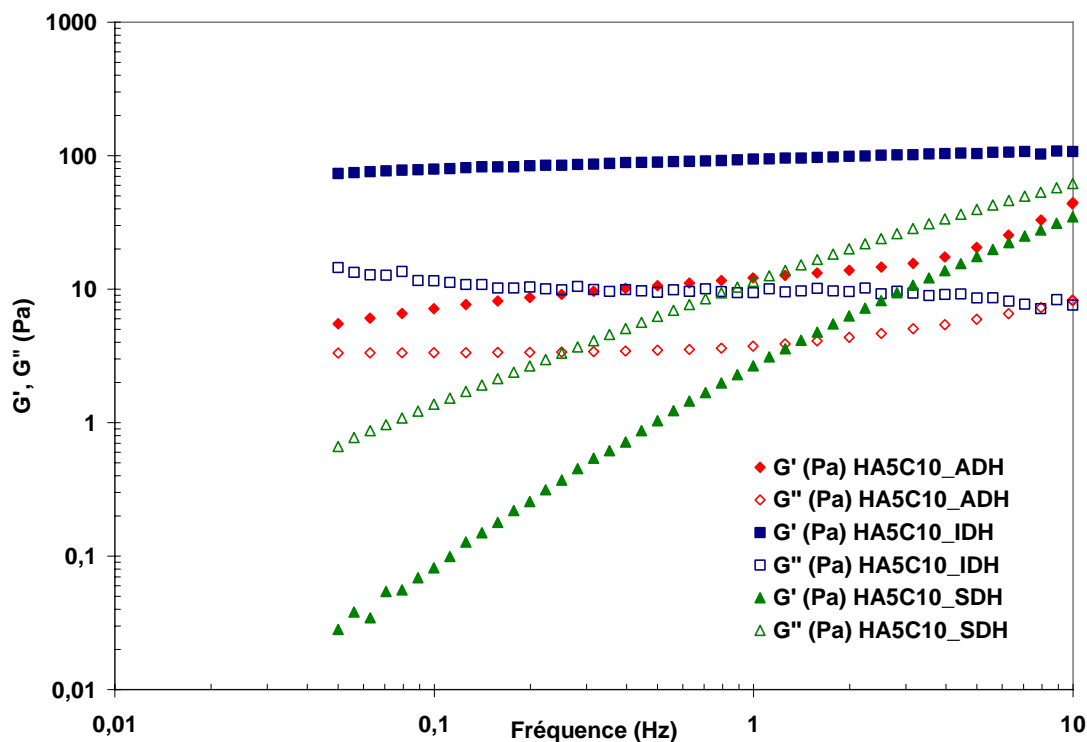


Figure II- 27 : Effet du bras espaceur sur les propriétés rhéologiques du réseau physique de DS 5% avec des chaînes alkyle en C10.

La figure II-27 montre clairement que le bras espaceur a un effet notable sur les propriétés associatives des dérivés alkylés du HA. L'IDH du fait de sa rigidité et de son caractère hydrophobe apporte une certaine stabilité au réseau tridimensionnel physique.

Pour la transposition de la synthèse à l'échelle industrielle, des raisons de faisabilité et de coût font que notre choix s'est porté sur le dérivé avec un bras espaceur ADH. La longueur de chaîne idéale est de 10 atomes de carbone et le DS proche de 10%.

V Transposition de la synthèse d'alkylation à l'échelle semi-industrielle.

Après avoir mis au point toutes les étapes de la synthèse des dérivés alkylés du hyaluronane, nous avons décidé de passer à l'étape de transposition de cette synthèse à l'échelle industrielle en réalisant des lots pilotes.

La réalisation des protocoles et les rapports de validation des nouveaux produits ainsi qu'une analyse des étapes critiques du procédé ont été nécessaires. Les différents lots pilotes ont été effectués sur le site d'A-R-D.

La synthèse à l'échelle pilote a été effectuée sur le HA de masse molaire moyenne 600 000 g/mol. La fonctionnalisation du HA par le bras dihydrazide ADH est effectuée en visant un DS de 8% afin d'obtenir un HA alkylé de DS 8%. Compte tenu des résultats précédents, des chaînes en C10 ont été greffées.

La synthèse du dérivé alkylé comporte 7 étapes à transposer à l'échelle industrielle :

- 1) Solubilisation du HA initial.
- 2) Filtration sous pression à 0,22 μ m.
- 3) Synthèse du HA-ADH.
- 4) Ultrafiltration tangentielle de la solution du HA-ADH.
- 5) Synthèse du dérivé alkylé.
- 6) Précipitation du produit final.
- 7) Lavage et séchage du produit final.

Les conditions expérimentales sont récapitulées dans le tableau suivant :

éq. HA-ADH	DS HA-ADH	éq. Chaîne alkyle	éq. PicBH ₃	DS en chaîne C10
1	8%	0,105	0,5	8%

Tableau II- 15 : Tableau récapitulatif des conditions expérimentales de la synthèse pilote.

V.1 Effet de la concentration en polymère.

Nous avons étudié le comportement rhéologique du lot synthétisé à l'échelle industrielle à différentes concentrations afin de déterminer la concentration limite à partir de laquelle nous observons la formation d'un gel (Figure II-28). La majorité des produits commerciaux utilisés pour la viscosupplémentation sont utilisés à des concentrations de 10 g/L voir 20 g/L. Il serait intéressant de développer un produit ayant des propriétés semblables aux produits commerciaux tout en baissant la concentration en polymère.

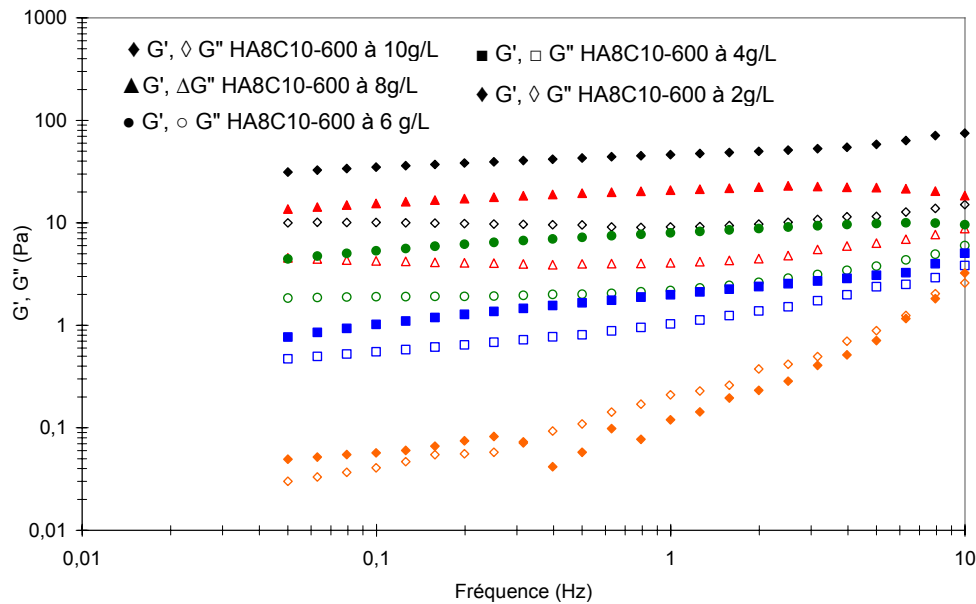


Figure II- 28 : influence de la concentration du HA8C10-600 sur les propriétés physico-chimiques du réseau physique final.

Il est intéressant de noter que le comportement de type gel est conservé jusqu'à une concentration de 4 g/L en polymère. À une concentration de 2 g/L, nous observons la formation de microgels qui rend difficile la mesure rhéologique [24].

V.2 Essais de cytotoxicité.

Dans le cadre d'une collaboration avec Bareille R. du laboratoire INSERM « Biomatériaux et Réparation Tissulaire » à Bordeaux, une étude de la cytotoxicité du HA initial de masse molaire moyenne en masse M_w : 600 000 g/mol et du HA synthétisé à l'échelle industrielle (HA8C10-600) a été réalisée sur des cultures de cellules ostéoprogénitrices humaines (HOP) issues du stroma médullaire [25]. Dans ce but, les lots de HA ont été préalablement stérilisés à 120°C pendant une heure à une pression de 1,2 bar.

Une extraction du matériau en présence de milieu seul supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) avant la mise en contact avec les cellules a été effectuée selon la méthode ISO [26, 27]:

- Extrait E1 = 1^{ère} extraction de 24 h à 37°C, testé pur (100%)
- Extrait E2 = 2^{ème} extraction de 24 h à 37°C, testé pur (100%)
- Extrait E3 = dernière extraction de 3 jours, testé pur : 100% puis diluée au 1/2, au 1/10 et 1/100^{ème} dans du milieu de culture complet

Chaque extrait a été testé en plaque de 96 puits pendant 24 heures.

La cytotoxicité a été évaluée par 2 tests [28, 29]:

- **Le test au MTT** représente l'activité métabolique de la cellule. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide). L'anneau de tétrazolium contenu dans le réactif est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu-violet [30]. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique.
- **Le test du Rouge neutre**, est le témoin de la viabilité cellulaire. Les cellules normales en culture absorbent et retiennent facilement un colorant rouge neutre. Lorsque la membrane cellulaire ou les lysosomes à l'intérieur de la cellule sont endommagés par une substance chimique irritante, le colorant diffuse par les membranes perméables et il en reste moins dans la cellule. Un spectrophotomètre permet de mesurer précisément la quantité de colorant diffus.

Les résultats présentés sur les figures II-29 et II-30 sont exprimés en % d'activité ou de viabilité par rapport au témoin plastique. Un matériau est considéré comme cytotoxique si les valeurs obtenues sont en dessous de 75% du témoin (trait noir sur les figures II-29 et 30).

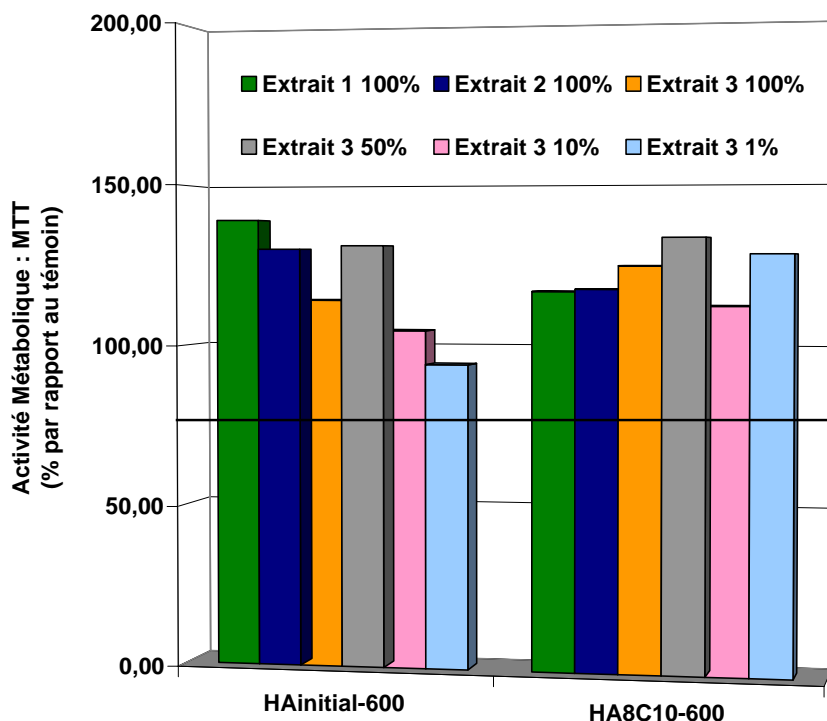


Figure II- 29 : Résultat du test au MTT pour deux échantillons de HA natif non modifié et HA alkyle issu de la synthèse à l'échelle industrielle.

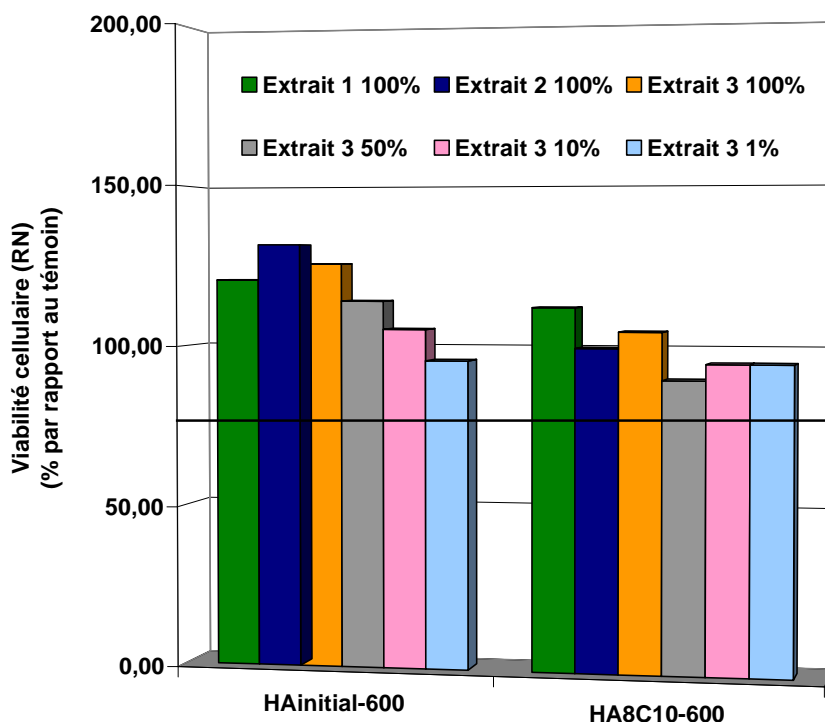


Figure II- 30 : Résultat du test du rouge neutre pour les deux échantillons de HA natif non modifié et HA alkyle issu de la synthèse à l'échelle industrielle.

Nous observons que pour les différents extraits nous obtenons des valeurs supérieures à 75% pour la viabilité cellulaire et pour l'activité métabolique.

Conclusion : Cette étude nous a permis de montrer qu'il n'existe pas de cytotoxicité avec les différents extraits sur la viabilité cellulaire (RN) et sur l'activité métabolique (MTT) des cellules. Il semblerait que ces substances aient un effet positif sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules ostéoprogénitrices.

V.3 Etude de la stabilité thermique.

Une étude de stabilité thermique a été réalisée sur le lot industriel HA8C10 et le lot initial de HA non modifié de masse molaire moyenne en masse 600 000 g/mol. Les résultats de la stabilité thermique du lot industriel ont été comparés à ceux du Synvisc®. L'objectif de cette analyse est de mettre au point une méthode de conservation du produit en solution dans une seringue, par exemple.

Pour effectuer cette étude, nous avons conservé des solutions à 10 g/L de HAinitial-600 et de HA8C10-600 (lot industriel) à 4°C, 25°C et 40°C. Les mesures ont été effectuées en utilisant le rhéomètre AR2000 avec un cône de 4 cm⁴, pour les solutions les plus visqueuses, et le LS30 pour les solutions les moins visqueuses. La variation de la viscosité a été mesurée

pour une durée allant de 15J à 2 mois. Nous avons représenté sur la figure II-31 les valeurs de la viscosité à un gradient de vitesse fixé à $1s^{-1}$ pour ces différents échantillons.

A partir des résultats obtenus, nous pouvons voir que l'acide hyaluronique initial et modifié sont fortement dégradés à $40^{\circ}C$. Par ailleurs, la conservation à 4 et $25^{\circ}C$ semble être identique et ne semble pas provoquer de dégradation du HA.

Nous pouvons noter que le Synvisc[®] reste stable à $40^{\circ}C$ contrairement au dérivé alkylé que nous avons synthétisé. L'analyse du HA initial à cette température montre aussi une dégradation dans ce lot fournit par A.R.D. Il semblerait donc qu'il existe un problème de stabilité thermique sur le lot initial.

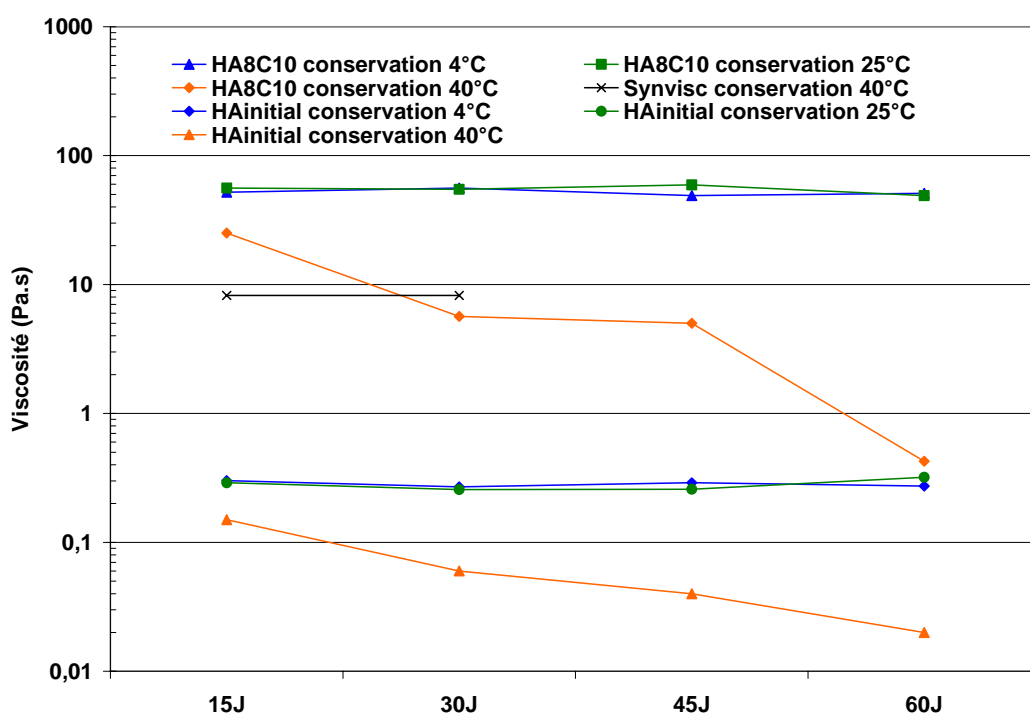


Figure II- 31 : Etude de la stabilité thermique des différents lots HA8C10-600 (à 10g/L dans du PBS), HA initial (à 10 g/L dans du PBS) et du Synvisc[®] (à 5 g/L) à $4^{\circ}C$, $25^{\circ}C$ et $40^{\circ}C$. (Gradient de cisaillement $1s^{-1}$)

V.4 Etude de dégradation enzymatique.

Il a été montré que le hyaluronane et la hyaluronidase (HAase) sont présents à fortes concentrations dans la matrice extracellulaire des tumeurs cancéreuses [31, 32]. Comme décrit dans la partie bibliographie, les HA de hautes masses molaires (h-HA) sont anti-angiogéniques contrairement aux HA de faibles masses molaires (b-HA). La HAase joue alors un rôle important pour la régulation de la balance h-HA et b-HA [33].

Lorsque l'on ajoute l'enzyme à l'acide hyaluronique en solution, on obtient la vitesse de réaction maximale qui caractérise le complexe enzyme-substrat. La vitesse de réaction atteint

rapidement une valeur constante et s'y maintient pendant un certain temps, allant de quelques minutes à plusieurs heures, suivant les cas.

Afin d'effectuer une étude de dégradation enzymatique dans les meilleures conditions, nous devons prendre en considération différents paramètres :

- Concentration de l'enzyme : La vitesse de réaction est en général proportionnelle à la concentration de l'enzyme. Des mesures seront effectuées sur le HA initial en faisant varier la concentration en HAase afin de pouvoir déterminer la concentration idéale en enzyme nécessaire pour suivre la dégradation.
- Concentration en ions H^+ (pH) : Pour la plupart des enzymes, il existe un pH optimum; leur activité ne s'exerce de façon appréciable que dans un intervalle de 2 à 3 unités de pH. En ce qui concerne la HAase, le pH optimum est de 5,3 mais l'activité de l'enzyme est conservée jusqu'à un pH de 8 [34]. Sa solubilisation se fera donc dans une solution de PBS à pH 7,4.
- Température : Dans des conditions optimales, la température doit avoisiner les 37/38°C. Ces valeurs sont indicatives d'enzymes d'animaux à sang chaud, soit presque la température du corps. À l'inverse, si la température dépasse les 60°C, l'enzyme est dénaturée. Si la température est inférieure à 5°C, l'enzyme est inactivée. Les mesures que nous allons effectuer pour étudier la dégradation enzymatique se feront donc à 37°C.

V.4.1 Concentration optimale en HAase.

Afin de déterminer la concentration optimale en HAase à utiliser pour l'étude de la dégradation enzymatique du HA, nous avons mesuré la variation de la viscosité d'une solution de HA non modifié en fonction du temps pour 5 concentrations en HAase différentes. La concentration en enzyme se mesure en unité enzymatique (UE) par mg de substrat (HAinitial-600). Les mesures de viscosité ont été effectuées sur le rhéomètre AR2000 en utilisant un cône en acier de 4 cm⁴, à une température de 37°C et en fixant le gradient de cisaillement à 36,5 s⁻¹.

Sur la figure II-32 nous avons représenté la baisse de la viscosité en fonction du temps de dégradation enzymatique qui est reliée au nombre de coupure de chaîne. Le temps entre l'ajout de l'enzyme et le début de la mesure de viscosité est inférieur à 2 minutes. La concentration initiale en HA est de 10 g/L.

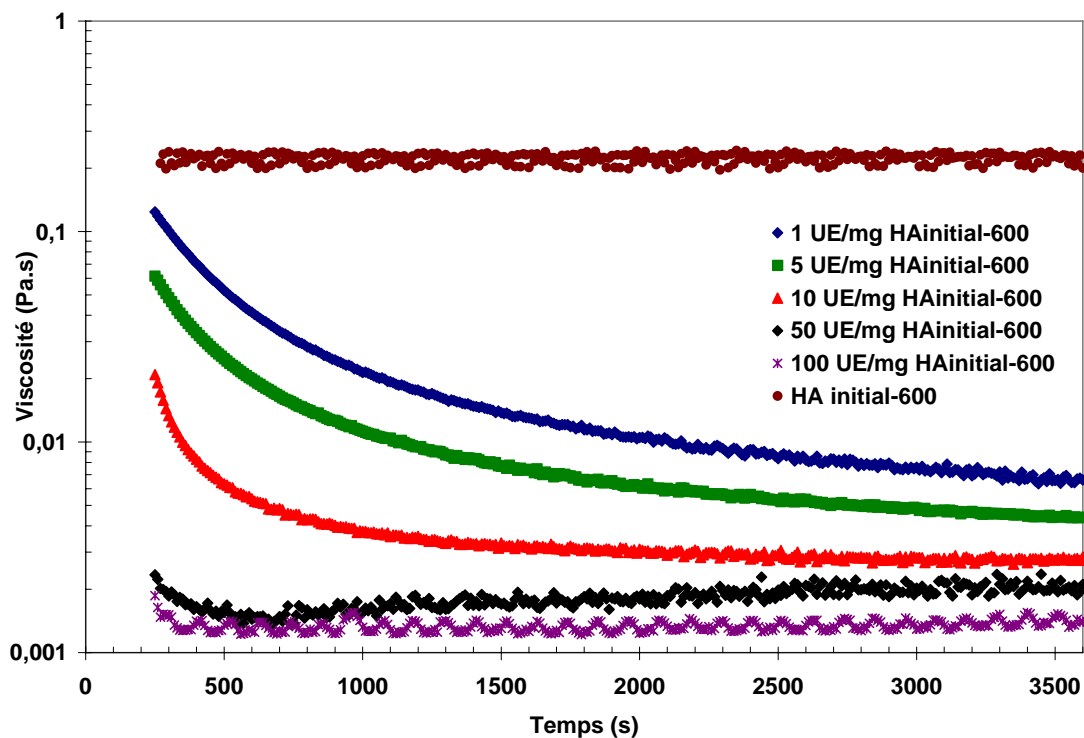


Figure II- 32 : Variation de la viscosité en fonction de la durée de la dégradation enzymatique du HA initial-600 pour 5 concentrations croissantes en HAase.

Pour des quantités supérieures ou égales à 50 UE/mg de HA, la dégradation est totale et rapide. Ce qui nous empêche de contrôler la baisse de la viscosité en fonction du temps. Nous avons choisi 10 UE/mg de HA pour comparer la dégradation du HA-alkylé avec celle du Synvisc®.

V.4.2 Comparaison de la dégradation enzymatique du HA initial, HA alkylé et du Synvisc®.

Afin de comparer la dégradation enzymatique du HA initial, du HA8C10-600 et du Synvisc®, nous avons ajouté 10 UE/mg de HA à chacun des échantillons préalablement mis en solution (le Synvisc® a été directement utilisé en sortie de seringue commerciale). Les mesures des viscosités ont été effectuées sur le rhéomètre AR2000 en utilisant un cône en acier de 4 cm 4°, à une température de 37°C et un gradient de cisaillement à 36,5 s⁻¹.

La figure II-33 représente la chute de la viscosité en fonction du temps après avoir ajouté la quantité d'enzyme nécessaire. Le temps entre l'ajout de l'enzyme et le début de la mesure est inférieur à 2 minutes. La concentration des échantillons est de 10 g/L.

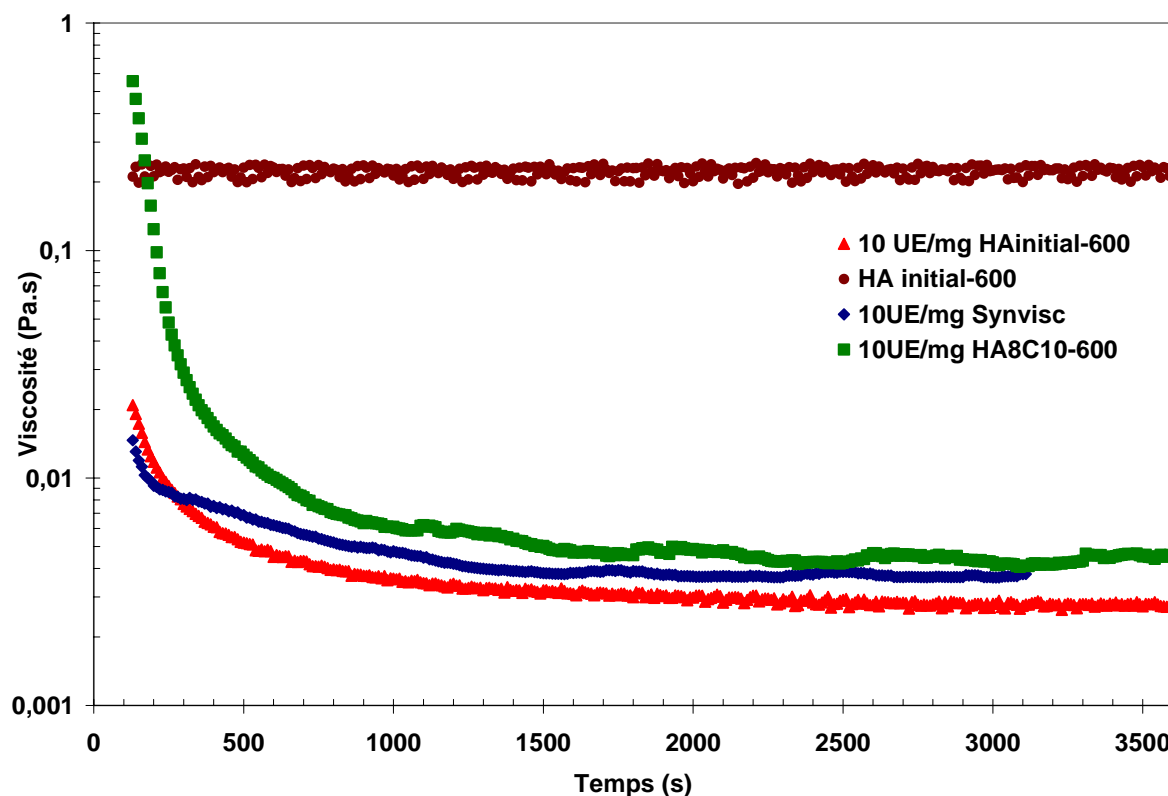


Figure II- 33 : Comparaison de la dégradation enzymatique entre le HA-initial-600, le HA8C10-600 et le Synvisc®.

A partir de cette figure, il est clair que le dérivé alkylé a une meilleure stabilité que le HA linéaire et que la référence commerciale (le synvisc®). En effet, pour les 500 premières secondes, la viscosité du HA8C10-600 reste supérieure à celle du HA linéaire et à celle du Synvisc®. Cet effet est lié au mécanisme d'association non covalent qui est induit par le polymère amphiphile qui montre un effet d'auto-réparation. In vivo, d'autres facteurs peuvent intervenir mais la tendance de la dégradation restera la même. Comparé au synvisc®, le dérivé alkylé pourrait maintenir ses propriétés rhéologiques plus longtemps, ainsi, le patient pourra espacer les injections ce qui apporte un confort au patient.

VI Comparaison avec les viscosuppléments industriels

L'injection intra-articulaire de solutions aqueuses d'acide hyaluronique pour le traitement de l'arthrose est déjà ancienne, puisque ce concept date de 1960 [35-37], et que les premières publications remontent à une quinzaine d'années. Ce traitement a pris ces dernières années, un essor important, une prise en charge du traitement de la gonarthrose (arthrose du genou) étant accordée par la Sécurité Sociale. Cette prise en charge a favorisé l'apparition sur le marché de nombreux produits, d'origines et de propriétés différentes.

L'utilisation désormais banalisée de la **viscosupplémentation** dans le traitement de l'arthrose n'a cependant pas permis de répondre de façon formelle et scientifique à de nombreuses questions, car les études méthodologiquement fiables, contrôlées, comparatives ou contre-placébo, sont de mises en place et de réalisations délicates. Elles sont d'ailleurs en règle générale sponsorisées par le laboratoire commercialisant le produit en question [15].

A l'heure actuelle, un certain nombre de controverses persiste donc quant à l'intérêt et au mode d'action de ce traitement qui n'a par ailleurs pas été étudié de façon spécifique sur une population sportive.

Au sein de l'articulation, l'acide hyaluronique est présent dans le liquide synovial, la membrane synoviale, et le cartilage. Il y est synthétisé aussi bien par les chondrocytes que par les synoviocytes de type A. Dans une articulation normale, sa concentration (2 à 4mg/ml) et sa masse molaire ($4 \text{ à } 5 \times 10^6 \text{ g/mol}$) sont élevées. Elles sont responsables de ses propriétés viscoélastiques qui en font un lubrifiant visqueux pendant les mouvements lents de l'articulation (marche lente), et un absorbeur élastique de chocs durant les mouvements rapides de l'articulation (marche rapide et course).

Dans le cas de l'arthrose, les fonctions biologiques de l'acide hyaluronique sont altérées, sa concentration étant nettement diminuée dans le liquide synovial de l'articulation arthrosique. A partir de ces constatations, le concept de viscosupplémentation a été proposé, l'injection d'acide hyaluronique dans l'articulation ayant pour but de restaurer l'homéostasie du liquide synovial en améliorant ses propriétés rhéologiques et en favorisant une production endogène d'acide hyaluronique.

Le tableau II- 16 présente différents viscosuppléments à base de HA actuellement disponibles sur le marché français. Le HA utilisé dans ces préparations est soit issu de fermentation bactérienne, soit purifié à partir de crêtes de coq. Afin d'accroître la viscosité et la demi-vie intra-articulaire du HA, certaines préparations sont réticulées chimiquement : elles appartiennent alors à la classe des Hylanes.

Nom commercial (laboratoire)	Masse molaire (g/mol)	Origine	Concentration	Structure
ADANT (Fornet, Espagne)	0,6 à 1,2 x 10 ⁶	fermentation	20mg /2mL	linéaire
ARTHRUM H (LCA, France)	2,4 x 10 ⁶	fermentation	40mg/2mL	linéaire
HYALGAN (Fidia, Italie)	5 à 7,5 x 10 ⁵	Crêtes de coq	20mg/2mL	linéaire
OSTENIL (Chemedica, Allemagne)	1 à 1,2 x 10 ⁶	fermentation	20 mg/2mL	linéaire
SINOVIAL (Genevrier, France)	5 à 7,5 x 10 ⁵	fermentation	16mg/2mL	linéaire
SUPLASYN (Bioniche, Irlande)	5 à 7,5 x 10 ⁵	fermentation	20mg/2mL	linéaire
SYNVISC (HYLAN GF 20) (Genzyme, USA)	6 x 10 ⁶	Crêtes de coq	16mg/2mL	20% réticulé et 80% pseudo linéaire
VISCORNEAL-ORTHO (Cornéal, France)	6 x 10 ⁶	Crêtes de coq	20mg/2mL	réticulé
DUROLANE (Q-Med, France)	90 x 10 ⁶ *	Fermentation	60mg/3mL	Fortement réticulé

* Masse apparente

Tableau II- 16. Quelques préparations de HA destinées à la viscosupplémentation articulaire en France.

Cette dernière partie du Chapitre II, consiste à comparer les propriétés physicochimiques de certains produits de la liste précédente avec les dérivés alkylés que nous avons développés au cours de ce travail.

Nous allons tout d'abord présenter sur les figures II-34 et II-35 les propriétés physicochimiques en dynamique des 8 produits commerciaux sélectionnés qui ont été étudiés dans notre laboratoire[38].

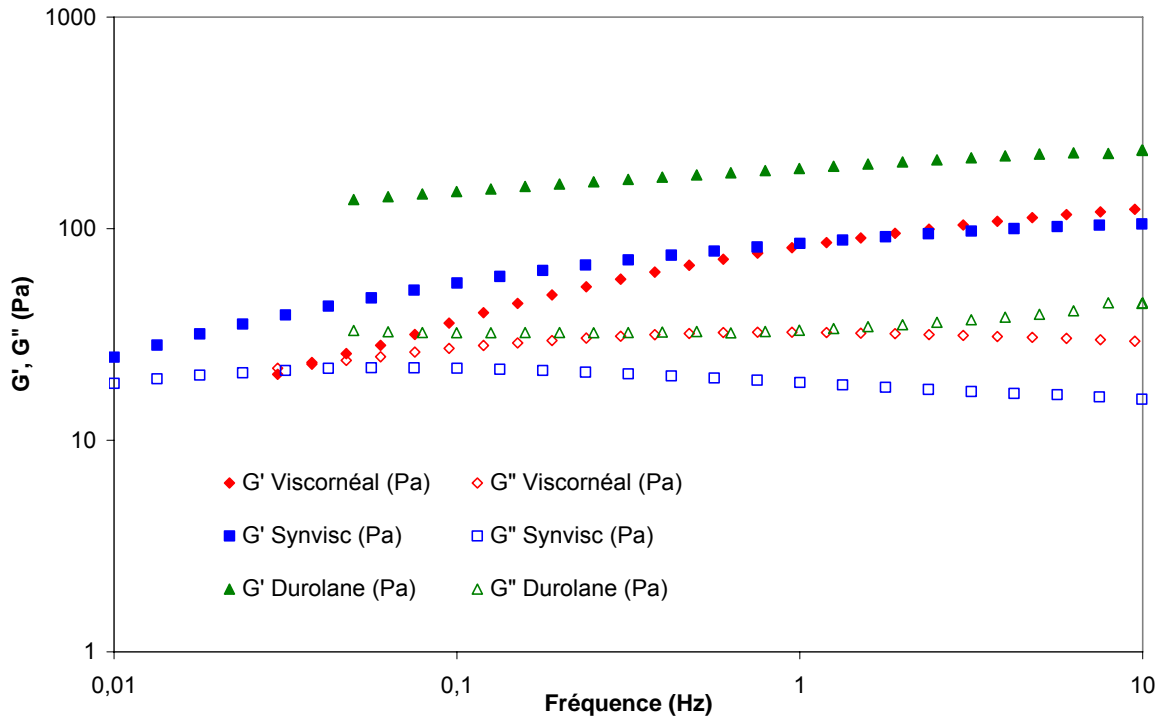


Figure II- 34. Propriétés viscoélastiques des produits commerciaux réticulés chimiquement.

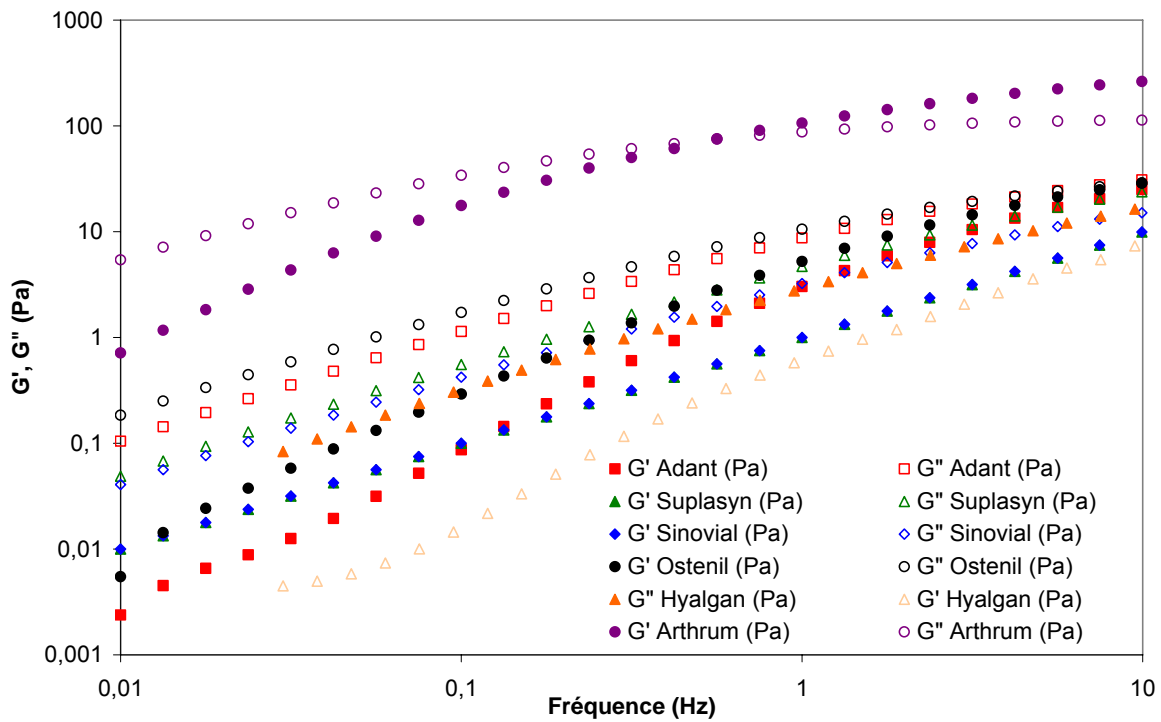


Figure II- 35. Propriétés viscoélastiques des produits commerciaux linéaires.

En considérant les propriétés rhéologiques de ces préparations, nous pouvons classer ses dernières en deux familles de produits :

- Une famille de produits réticulés chimiquement de type gel (Durolane[®] et Synvisc[®]), ou viscoélastique (Viscornéal[®]) (Figure II-36).
- Une autre famille de produits linéaires avec un comportement de type solution visqueuse avec $G'' > G'$ sur toute la gamme de fréquence observée (Figure II-37) sauf pour Arthrum[®], qui a un comportement viscoélastique.

La figure II-36 montre le comportement en écoulement des différents produits commerciaux. La viscosité est représentée en fonction du gradient de cisaillement.

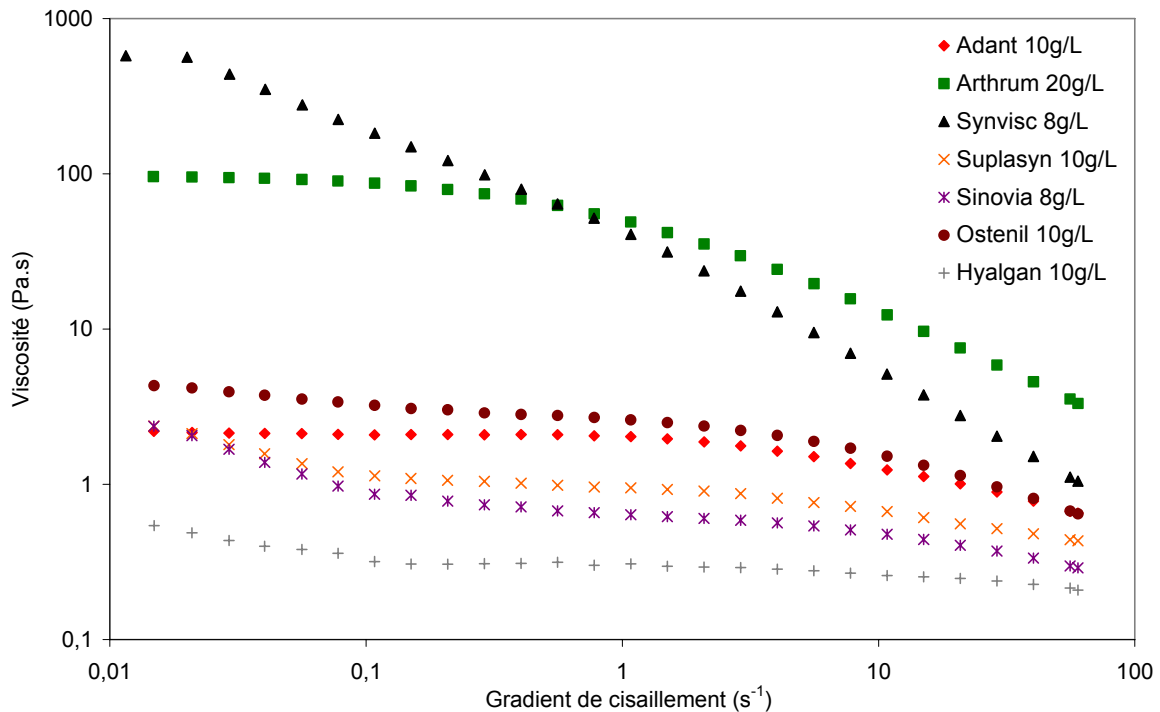


Figure II- 36. Comportement en écoulement des différents produits commerciaux [38].

On remarque un comportement newtonien pour la majorité des produits à faible gradient de cisaillement mis à part le Synvisc[®]. Celui-ci à un comportement rhéofluidifiant, qui se traduit par la déformation du réseau avec le cisaillement. Le Synvisc[®] est composé de 20% d'Hylan B et 80% d'Hylan A. Pendant le cisaillement, le réseau 3D des Hylanes se trouve déformé et la viscosité du système 3D diminue en fonction du gradient de cisaillement à partir de ses plus faibles valeurs.

La figure II-37 représente une comparaison du Synvisc[®], qui est le viscosupplément le plus utilisé et le plus efficace pour le traitement de l'arthrose, avec nos produits qui présentent des propriétés remarquables.

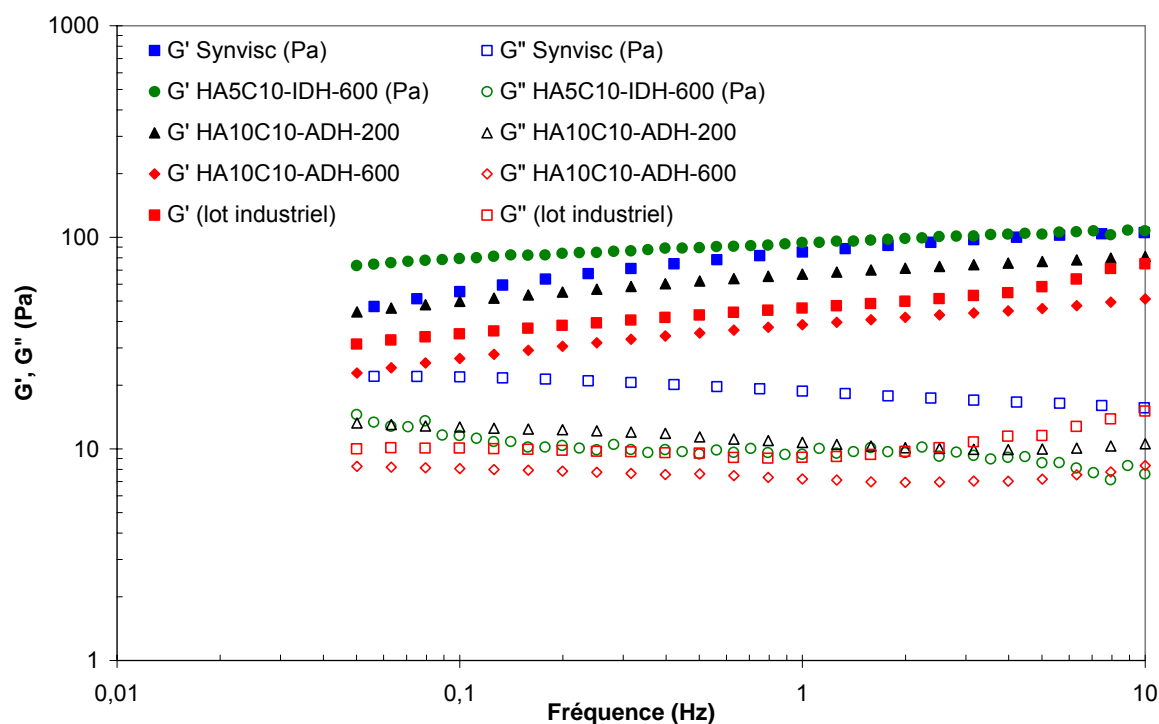


Figure II- 37 : Comparaison des propriétés du Synvisc avec les produits issus des différentes synthèses au laboratoire à 10g/L dans du PBS à 25°C.

Le réseau tridimensionnel le plus stable que nous avons pu obtenir est celui qui contient l'IDH en tant que bras espaceur avec une chaîne alkyle contenant 10 atomes de carbone. Ce lot a des propriétés rhéologiques supérieures au Synvisc[®]. Par ailleurs, les modules rhéologiques des dérivés avec des masses molaires 200 000 et 600 000 g/mol et des longueurs de chaînes alkyle de 10 atomes de carbone sont proches de ceux du Synvisc[®]. Nous avons pu montrer courant cette étude que le greffage de chaînes alkyle de longueurs inférieures à C10 était insuffisante pour conduire à un réseau associatif, quelque soit le DS utilisé. Nous avons pu montrer aussi que le greffage de chaînes alkyle de longueurs supérieures à C12 conduisait à des dérivés insolubles.

Conclusion

Dans cette étude nous avons synthétisé et développé de nouveaux dérivés chimiquement modifiés de l'acide hyaluronique pour la préparation de solutions visqueuses et des hydrogels valorisables en viscosupplémentation. Les propriétés rhéologiques des dérivés en solution sont comparables à celles de certains dérivés utilisés dans domaine médical pour la viscosupplémentation. Les essais de cytotoxicité effectués sur le dérivé issu du lot industriel nous permettent de montrer que ces nouveaux dérivés sont cytocompatibles et qu'ils ont un effet positif sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules ostéoprogénitrices. L'étude de la stabilité thermique nous a permis de montrer que nous pouvons conserver ces produits en solution à 4 ou 25°C sans dégradation éventuelle de l'échantillon pendant une période minimale de 2 mois. De plus, une comparaison de la dégradation enzymatique du dérivé HA8C10-600 (lot industriel) et du Synvisc® (référence commercial), montre que l'hydrogel physique résiste plus efficacement à la hyaluronidase que l'hydrogel chimique. Ainsi, le gel physique montre un comportement d'autoréparation.

Cette étude a permis aussi de mettre au point les conditions de synthèse de greffage du bras dihydrazide et des chaînes alkyle. La méthode de purification du polysaccharide a aussi été étudiée dans ce travail et nous avons pu montrer que l'ultrafiltration et la lyophilisation du dérivé dihydrazide était plus efficace que la précipitation.

Ces différentes études ont permis le dépôt d'un brevet international portant sur la procédure de préparation de ces dérivés et de leurs utilisations en viscosupplémentation [39].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

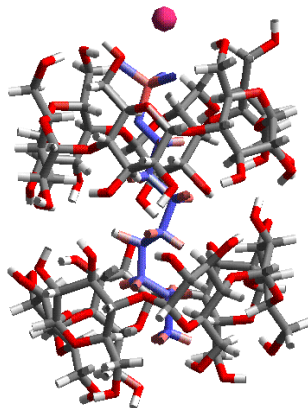
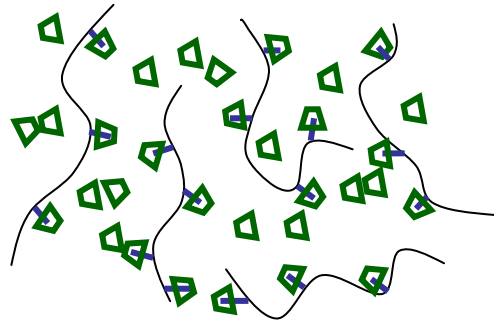
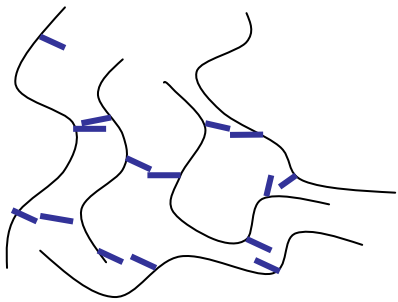
1. Creuzet C, Kadi S, Rinaudo M, Auzely-Velty R: **New associative systems based on alkylated hyaluronic acid. Synthesis and aqueous solution properties.** *Polymer* 2006, **47**(8):2706-2713.
2. Desbrieres J: **Autoassociative natural polymer derivatives: the alkylchitosans. Rheological behaviour and temperature stability.** *Polymer* 2004, **45**(10):3285-3295.
3. Dahl LB, Laurent TC, Smedsrod B: **Preparation of biologically intact radioiodinated hyaluronan of high specific radioactivity: coupling of 125I-tyramine-cellobiose to amino groups after partial N-deacetylation.** *Analytical biochemistry* 1988, **175**(2):397-407.
4. Curvall M, Lindberg B, Lonngren J: **Structural studies of the capsular polysaccharide of Klebsiella type 28.** *Carbohydrate research* 1975, **42**(1):95-105.
5. Sheehan JC, Hlavka JJ: **The use of water-soluble and basic carbodiimides in peptide synthesis.** *Journal of Organic Chemistry* 1956, **21**:439-441.
6. Kuo JW, Swann DA, Prestwich GD: **Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides.** *Bioconjugate Chemistry* 1991, **2**(4):232-241.
7. Tengblad A: **Affinity chromatography on immobilized hyaluronate and its application to the isolation of hyaluronate binding proteins from cartilage.** *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure* 1979, **578**(2):281-289.
8. Ogamo A, Matsuzaki K, Uchiyama H, Nagasawa K: **Preparation and properties of fluorescent glycosaminoglycuronans labeled with 5-aminofluorescein.** *Carbohydrate Research* 1982, **105**(1):69-85.
9. Inoue Y, Nagasawa K: **On the reaction of N-acetylchondrosine, N-acetylchondrosine 6-sulfate, chondroitin 6-sulfate, and heparin with 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide.** *Carbohydrate Research* 1982, **111**(1):113-125.
10. Pouyani T, Kuo JW, Harbison GS, Prestwich GD: **Solid-state NMR of N-acylureas derived from the reaction of hyaluronic acid with isotopically-labeled carbodiimides.** *Journal of the American Chemical Society* 1992, **114**(15):5972-5976.
11. Pouyani T, Harbison GS, Prestwich GD: **Novel Hydrogels of Hyaluronic Acid: Synthesis, Surface Morphology, and Solid-State NMR.** *Journal of the American Chemical Society* 1994, **116**(17):7515-7522.
12. Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruyse KP, Ziebell MR: **Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives.** *Journal of Controlled Release* 1998, **53**(1-3):93-103.

13. Huin-Amargier C, Marchal P, Payan E, Netter P, Dellacherie E: **New physically and chemically crosslinked hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair.** *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* 2006, **76A**(2):416-424.
14. Pelletier S, Hubert P, Payan E, Marchal P, Choplin L, Dellacherie E: **Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: rheological properties.** *Journal of Biomedical Materials Research* 2000, **54**(1):102-108.
15. Krieger IM: **Rheology Principles, Measurements, and Applications.** *Journal of Colloid and Interface Science* 1996, **178**(1):382.
16. Muthukumar M, Freed KF: **Huggins coefficient for polymer solutions with excluded volume.** *Macromolecules* 1977, **10**(5):899-906.
17. Fouissac E, Milas M, Rinaudo M: **Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte.** *Macromolecules* 1993, **26**(25):6945-6951.
18. Fouissac E, Milas M, Rinaudo M, Borsali R: **Influence of the ionic strength on the dimensions of sodium hyaluronate.** *Macromolecules* 1992, **25**(21):5613-5617.
19. Milas M, Rinaudo M, Fouissac E, Launay F: **Molecular weight and rheological measurements of sodium hyaluronate.** *Cosmetics & Toiletries* 1993, **108**(12):57-58, 60, 62-53.
20. Sato S, Sakamoto T, Miyazawa E, Kikugawa Y: **One-pot reductive amination of aldehydes and ketones with a-picoline-borane in methanol, in water, and in neat conditions.** *Tetrahedron* 2004, **60**(36):7899-7906.
21. Gibbs DA, Merrill EW, Smith KA, Balazs EA: **Rheology of hyaluronic acid.** *Biopolymers* 1968, **6**(6):777-791.
22. Balazs EA: **Viscoelastic properties of hyaluronic acid and biological lubrication.** *University of Michigan Medical Center journal* 1968:255-259.
23. Weiss C: **Why viscoelasticity is important for the medical uses of hyaluronan and Hylans.** *International Congress Series* 2000, **1196**(New Frontiers in Medical Sciences: Redefining Hyaluronan):89-103.
24. Lefebvre J, Doublier J-L: **Rheological behavior of polysaccharides aqueous systems.** *Polysaccharides (2nd Edition)* 2005:357-394.
25. Vilamitjana-Amedee J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand MF: **Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture.** *In vitro cellular & developmental biology Animal* 1993, **29A**(9):699-707.
26. AFNOR6NF-EN-30993-5: **Evaluation biologique des dispositifs médicaux. Partie 5 : essais concernant la cytotoxicité : méthodes in vitro.** 1994.
27. ISO10993-5: **Biological evaluation of medical devices. Test for cytotoxicity: in vitro methods.** 1992.

28. Parish CR, Mullbacher A: **Automated colorimetric assay for T cell cytotoxicity.** *Journal of immunological methods* 1983, **58**(1-2):225-237.
29. Mosmann T: **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of immunological methods* 1983, **65**(1-2):55-63.
30. Denizot F, Lang R: **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.** *Journal of immunological methods* 1986, **89**(2):271-277.
31. Toole BP: **Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue.** *Nature Reviews Cancer* 2004, **4**(7):528-539.
32. Laurent TC, Fraser JRE: **Hyaluronan.** *FASEB Journal* 1992, **6**(7):2397-2404.
33. West DC: **The role of hyaluronan and its degradation products in tumor angiogenesis and metastasis.** *Cancer Metastasis--Biology and Treatment* 2000, **1**(Cancer Metastasis, Molecular and Cellular Mechanisms and Clinical Intervention):55-71.
34. Asteriou T, Vincent J-C, Tranchepain F, Deschrevel B: **Inhibition of hyaluronan hydrolysis catalyzed by hyaluronidase at high substrate concentration and low ionic strength.** *Matrix Biology* 2006, **25**(3):166-174.
35. Balazs EA: **Physical chemistry of hyaluronic acid.** *Federation Proceedings* 1958, **17**:1086-1093.
36. Butler J, Rydell NW, Balazs EA: **Hyaluronic acid in synovial fluid. VI. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of arthritis in track horses.** *Acta veterinaria Scandinavica* 1970, **11**(2):139-155.
37. Balazs Endre A: **Viscosupplementation for treatment of osteoarthritis: from initial discovery to current status and results.** *Surgical technology international* 2004, **12**:278-289.
38. Rinaudo M: **Communications personnelles.** 2007.
39. Rinaudo M, Auzely R, Kadi S, Bresin A, Kubik E: **New derivatives of hyaluronic acid, their preparation process and their uses.** In. WO/2007/059890: (Centre National de Recherche Scientifique, Fr.; Agro Industrie Recherches et Developpements A.R.D.). 2007: 80pp.

Chapitre III

Modulation des propriétés physico-chimiques des dérivés alkylés du HA



INTRODUCTION.....	122
I MODULATION DES PROPRIETES ASSOCIATIVES PAR L'AJOUT DE CYCLODEXTRINES.....	122
I.1 PRESENTATION GENERALE DES CYCLODEXTRINES	123
I.2 QUELQUES EXEMPLES DE LA LITTERATURE	124
I.3 ETUDE DE LA COMPLEXATION DES CHAINONS HYDROPHOBES PAR LES CDS (α ET β) PAR TITRATION MICRO-CALORIMETRIQUE ISOTHERME (ITC).....	130
I.3.1 Complexes d' α - et β -CD avec le polymère.....	131
I.3.2 Complexes d' α - et de β -CD avec les tensioactifs.....	133
I.4 ETUDE DE LA COMPLEXATION DES TENSIOACTIFS PAR LES α ET β -CD PAR RMN.	139
I.4.1 Inclusion des chaînes de tensioactif SOS (C8) dans la cavité des α -CD.	142
I.4.2 Inclusion des chaînes de tensioactif SDES (C10) dans la cavité des α -CD.....	146
I.4.3 Inclusion des chaînes de tensioactif SDOS (C12) dans la cavité des α -CD.	148
I.5 EFFET DE L' AJOUT DE CYCLODEXTRINES (α ET β) SUR LE COMPORTEMENT RHEOLOGIQUE DES DIFFERENTS LOTS DE HA-ALKYLE.....	151
I.5.1 Ajout des α -cyclodextrines sur les dérivés alkylés HA5C8-600, HA5C10-600 et HA5C12-600.....	152
I.5.2 Ajout des β -cyclodextrines sur les dérivés alkylés HA5C8-600, HA5C10-600 et HA5C12-600.....	155
I.6 ETUDE DE LA COMPLEXATION DE CHAINES ALKYLE EN C8, C10 ET C12 PAR LES CD (α ET β) PAR MODELISATION MOLECULAIRE.	158
II MODULATION DES PROPRIETES ASSOCIATIVES PAR L'AJOUT DE TENSIOACTIFS (TA).....	166
CONCLUSION.....	168
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	169

Introduction

Les interactions le long d'une chaîne polymère permettent de contrôler la rhéologie de la solution [1]. Les polymères hydrosolubles modifiés hydrophobiquement sont largement utilisés en peinture, cosmétique, pharmaceutique, alimentaire et aussi dans le relargage de matériaux bioactifs [2-4]. Comme nous avons pu le constater dans le chapitre précédent, les interactions hydrophobes peuvent être contrôlées par le type et la densité des groupements hydrophobes [5-8], voir même par l'addition de sels ou de tensioactifs [9-11]. Il est avantageux d'avoir des jonctions d'énergie de taille élevées dans le réseau physique d'un polymère hydrophobiquement modifié, mais une réduction de ces interactions peut apporter de nouvelles applications. Une modulation des associations hydrophobes pourrait servir pour le relargage de substances actives, par exemple.

Dans ce chapitre, nous décrivons différentes approches que nous avons utilisées pour moduler les propriétés associatives du réseau tridimensionnel formé via les interactions hydrophobes. Une des méthodes les plus rencontrées pour moduler la force des interactions hydrophobes est d'ajouter des tensioactifs (TA). A faible concentration en TA le réseau tridimensionnel est renforcé, alors qu'à forte concentration, les TA découplent les interactions hydrophobes polymère-polymère en formant des micelles autour des groupements hydrophobes greffés le long de la chaîne polysaccharidique [12, 13]. Cependant, les tensioactifs sont souvent des substances toxiques, ce qui limite leur utilisation dans le domaine biomédical. Une autre approche permettant de moduler les associations hydrophobes, consiste à additionner des cyclodextrines (CDs) [14]. Dans ce cas, les CDs vont s'enfiler dans les groupements hydrophobes greffés sur le polymère, formant ainsi des complexes d'inclusion et perturber la formation du gel physique. L'un des avantages de cette méthode est la biocompatibilité de la cyclodextrine, donc une ouverture pour de nouvelles applications dans le domaine biomédical.

I Modulation des propriétés associatives par l'ajout de cyclodextrines.

Au cours de ces 10 dernières années, l'aptitude des cyclodextrines à complexer sélectivement des molécules hydrophobes a été avantageusement mise à profit pour contrôler les associations dans divers systèmes polymères [15-31]. Les CDs sont des oligosaccharides cycliques hydrosolubles capables d'inclure, dans leur cavité hydrophobe, une grande variété de molécules « invitées » via des interactions non covalentes [16, 30]. L'importance des

systèmes complexes de type « hôte-invité » en biologie explique le fort intérêt pour ces complexes supramoléculaires [31].

1.1 Présentation générale des cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques constitués de 6, 7 ou 8 sous-unités D-glucopyranose, reliées par des liaisons glycosidiques α -(1 \rightarrow 4), nommées respectivement α -, β - et γ -CD. La dimension du diamètre interne de la CD dépend du nombre d'unités glucose constituant l'oligosaccharide, la hauteur restant constante (7,9 Å) (Figure III-1) [32].

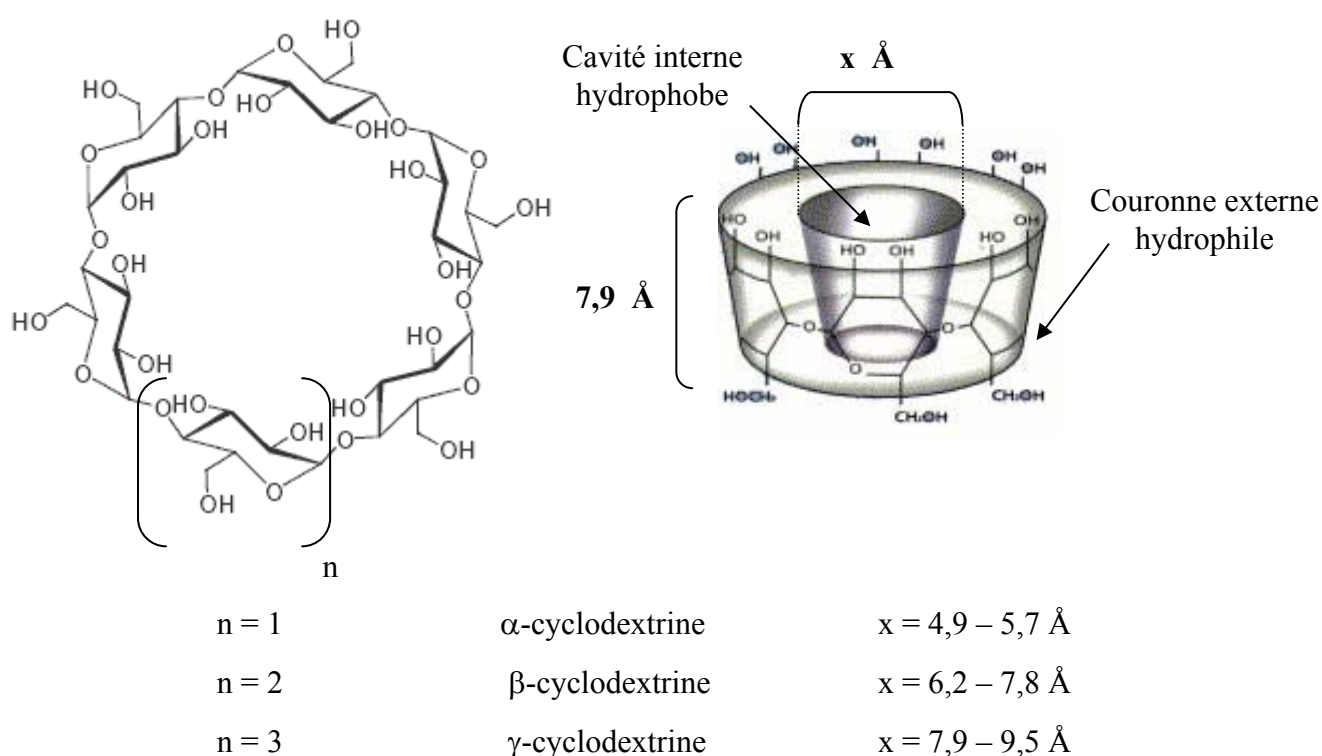


Figure III- 1 : Structure chimique et dimensions des cavités de l' α -, de la β - et de la γ -cyclodextrine.

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) et de l'oxygène inter-glycosidique est hydrophobe (surface en contact avec la molécule invitée) [29].

La nature apolaire de la cavité des cyclodextrines lui permet de jouer le rôle de molécule hôte pour des invités polaires ou non, que ce soit des petites molécules ou des polymères pour former des complexes d'inclusion « hôte-invités » [16, 33].

La structure cristalline des complexes d'inclusion des CDs peut être classifiée sous trois catégories : structures « multicouche », « cage » et « chaîne » (Schéma III-1) [34].

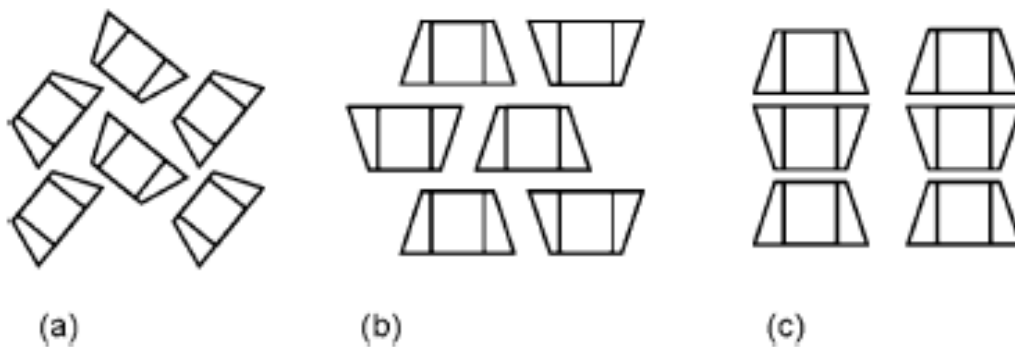


Schéma III- 1 : Représentation schématique des structures cristallines de type :(a) cages, (b) multicouches et (c) chaînes [35].

La structure cristalline de type « cage » est souvent obtenue lors de l'inclusion de petites molécules dans la cavité des cyclodextrines, alors que l'arrangement de type « chaîne » est plutôt obtenu avec des invités ioniques. Dans ce cas, les molécules d' α -CD se plaquent pour former des colonnes infinies avec un arrangement linéaire. Deux possibilités d'arrangement sont proposées pour les cyclodextrines : un arrangement de type « tête-tête » ou de type « tête-queue ». Dans la structure de type « tête-tête » les hydroxyles secondaires (OH-2 et OH-3) sont liés par des interactions hydrogène. Alors que dans la structure de type « tête-queue » ce sont les hydroxyles primaires d'une molécule de CD qui sont liés aux hydroxyles secondaires d'une autre molécule de CD via des interactions hydrogène.

1.2 Quelques exemples de la littérature

Prud'homme et son équipe ont développé un système associatif à base d'acide polyacrylique hydrophobiquement modifié (HMPAA) [36, 37]. Afin de moduler les propriétés rhéologiques de ce système de façon contrôlée, ils ont eu recours aux cyclodextrines. D'une part, des cyclodextrines libres ont été ajoutées au HMPAA pour dissocier les interactions hydrophobes et baisser la viscosité du réseau physique. D'autre part, des cyclodextrines ont été greffées sur une chaîne macromoléculaire d'acide polyacrylique (CDMPAA) afin de les mélanger aux HMPAA, formant ainsi un système associatif de type hôte-invité ayant des viscosités plus élevées que celles du réseau HMPAA seul (figure III-2).

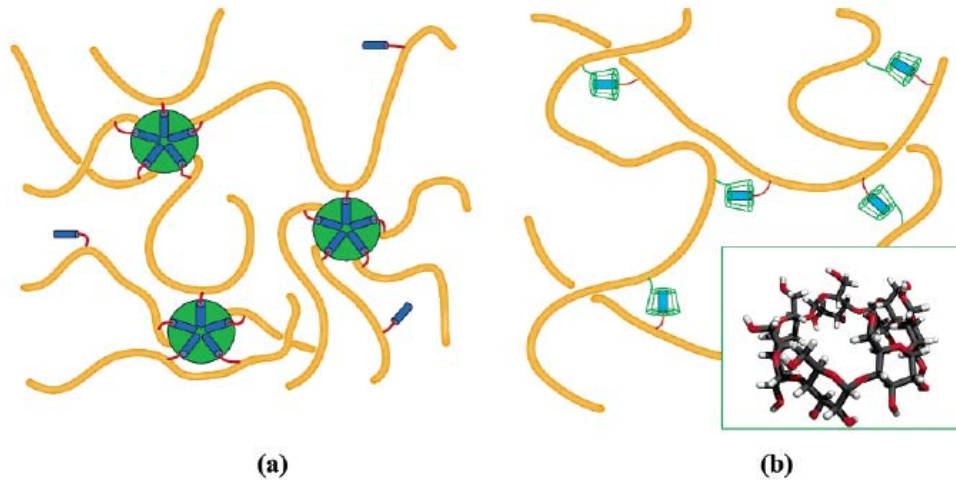


Figure III- 2: Représentation schématique de l'association entre les HMPAA seuls (a) et les mélanges HMPAA/CDMPAA (b) [36, 37].

L'étude de l'ajout des cyclodextrines libres sur le réseau physique HMPAA a été réalisée avec des α -CDs et des β -CDs. Dans les deux cas, α -CD et β -CD, une baisse importante de la viscosité et des modules dynamiques a été observée. La variation de la viscosité en fonction des différents équivalents de cyclodextrine ajoutés par rapport au HMPAA est représentée sur la figure III-3.

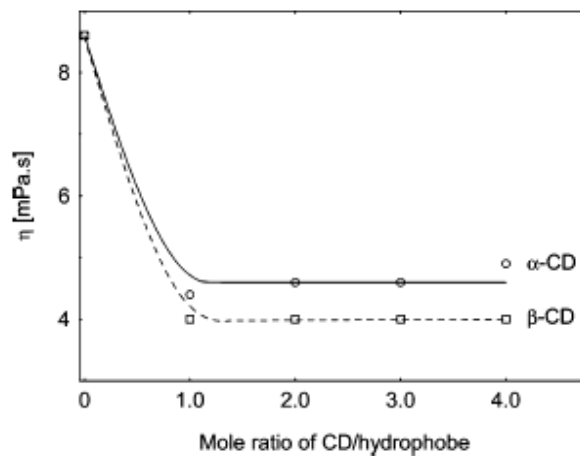


Figure III- 3 : Variation de la viscosité en fonction de la quantité de α -CD et β -CD ajoutée à un système de HMPAA hydrophobiquement modifié par 0,5 % (molaire) de chaînes en C18. (Gradient de vitesse fixé à 20 s^{-1}) [37].

La viscosité atteint un plateau pour l'ajout de 1 équivalent de cyclodextrine, ce qui indique que les interactions hydrophobes ont été totalement dissociées, sachant que la viscosité du PAA non modifié hydrophobiquement a une viscosité de 3,9mPa.s. Par contre, la différence entre l' α -CD et la β -CD n'a pas été développée dans ce travail.

A notre connaissance, il n'existe pas d'autres études décrites dans la littérature mettant en évidence une différence de comportement entre les α -CDs et les β -CDs vis-à-vis des polymères hydrophobiquement modifiés.

Une étude d'ajout de cyclodextrines libres sur un système associatif à base de polysaccharides ayant des applications potentielles dans le domaine biomédical a été réalisée par l'équipe de Bo Nyström [14]. Cette étude montre que l'ajout de β -CD à un réseau d'alginate hydrophobiquement modifié par des chaînes alkyle en C8 (HM-alginate), peut moduler les propriétés physico-chimiques, conduisant à une baisse de la viscosité et des modules dynamiques (Figure III-4). L'alginate est un copolymère anionique composé de résidus d'acide β -D-mannuronique et d'acide α -L-gulonique.

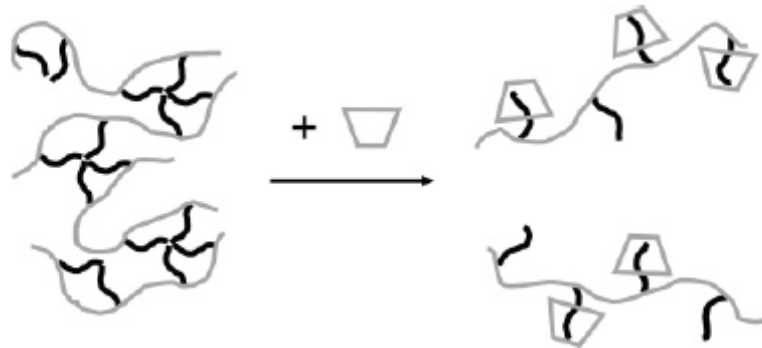


Figure III- 4 : Représentation schématique du système associatif avant et après introduction des cyclodextrines libres.

L'effet de l'ajout des β -CDs sur l'alginate modifié (HM-alginate) a été étudié par turbidité, rhéologie et diffusion des neutrons aux petits angles. La figure III-5 montre la variation des modules élastiques et visqueux en fonction de la concentration en β -CD pour une solution d'HM-alginate et pour une solution d'alginate natif. On n'observe aucun effet de l'ajout de la β -CD sur les modules élastiques et visqueux de l'alginate natif. En revanche, le comportement élastique du système hydrophobiquement modifié varie en fonction de la concentration en β -CD. La diminution du comportement élastique s'explique par la baisse des jonctions entre les chaînes de l'HM-alginate, ce qui montre la désactivation des groupements hydrophobes du polymère via la formation des complexes d'inclusion entre ces groupements et la cavité de la β -cyclodextrine.

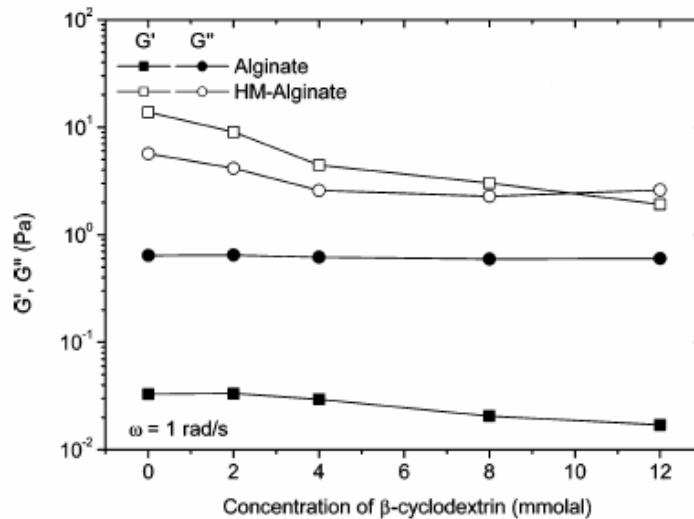


Figure III- 5 : Variation des modules élastiques, G' , et visqueux, G'' , en fonction de la concentration en β -CD pour une solution d'alginate hydrophobiquement modifié à 20g/L[14].

L'analyse par diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) a montré dans cette étude que l'augmentation de la concentration en β -CD libre conduit à l'augmentation de la longueur de persistance (L_p , Å) et à la baisse de la longueur de corrélation (ξ , Å) du réseau (figure III-6).

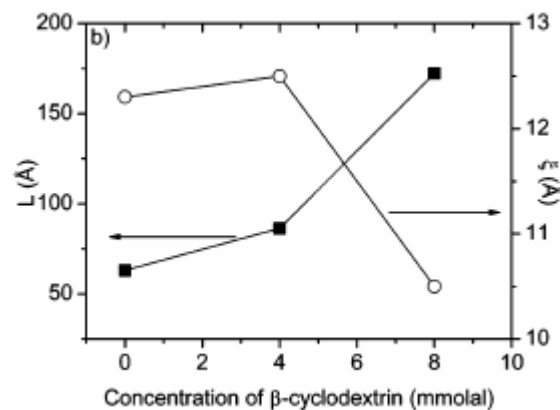


Figure III- 6 : Influence de la concentration en β -CD sur la longueur de persistance L_p et sur la longueur de corrélation ξ [14].

Lorsque l'HM-alginate est dissout dans l'eau, il existe une compétition entre les répulsions électrostatiques et les interactions attractives hydrophobes qui gouvernent les propriétés physiques de ce type de système. L'addition de cyclodextrines libres favorise l'augmentation des forces répulsives et conduit à l'extension de la chaîne macromoléculaire (augmentation de L_p). La baisse de la longueur de corrélation reflète une baisse des associations hydrophobes permettant la réorganisation du système en un réseau 3D plus homogène et plus dense (figure III-3).

Une autre étude d'interaction entre la cyclodextrine et un mélange de polymère (hydroxyéthylcellulose JR400) et de tensioactif (dodecyl sulfate de sodium SDS) a été réalisée par Alexandridis et son équipe [38]. Le mélange JR400-SDS en solution aqueuse montre des viscosités dépendant de la concentration en SDS (figure III-7a). Lors de l'addition de cyclodextrines libres, α -CD et β -CD, la viscosité du mélange se trouve modifiée (figure III-7b).

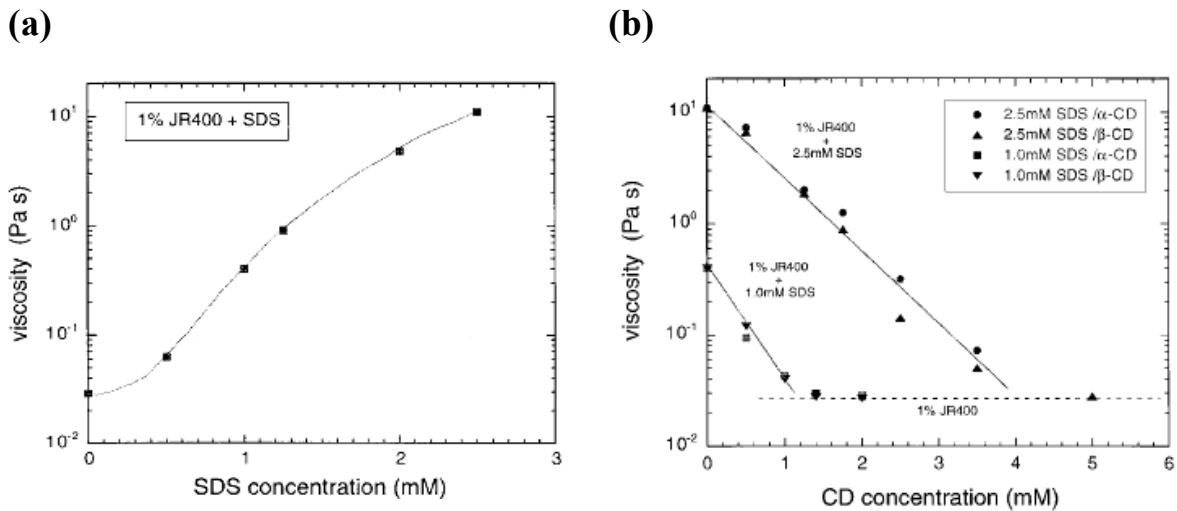


Figure III- 7 : Variation de la viscosité d'une solution de JR400 à 10g/L en fonction de la concentration en SDS (a). Variation de la viscosité d'un mélange JR400 + 1mM SDS et JR400 + 2,5mM SDS en fonction de la concentration en α - et β - CD (b).

L'addition de tensioactifs SDS a été effectuée à des concentrations de SDS inférieures à la CMC (≈ 8 mM). A ces concentrations, un réseau tridimensionnel est formé via des interactions électrostatiques (JR400 cationique et SDS anionique) et hydrophobes entre les molécules de tensioactif (TA). C'est la formation de ce réseau tridimensionnel qui conduit à l'augmentation de viscosité conduisant à un gel physique (figure III-7 (a)).

L'addition d' α - ou de β cyclodextrines à un mélange JR400-SDS conduit à une baisse de la viscosité due à la désactivation des interactions hydrophobes. Le réseau tridimensionnel formé par l'introduction de SDS est détruit au fur et à mesure que la concentration en CDs augmente. A partir de la figure III-7 (b), on observe que la viscosité atteint un plateau dont la valeur correspond à la viscosité du JR400 à 10g/L en absence de SDS.

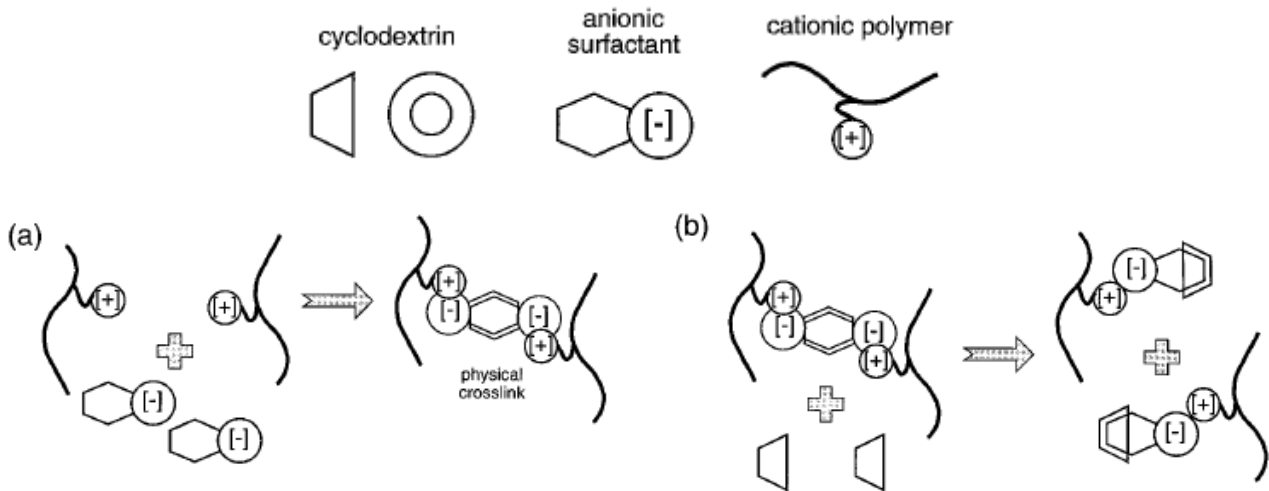
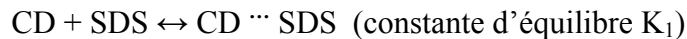


Schéma III- 2 : Représentation schématique des interactions entre les polymères cationiques, les tensioactifs anioniques et la cyclodextrine conduisant à la modulation des propriétés rhéologiques observées : (a) association des tensioactifs avec le polymère conduisant à un réseau 3D ; (b) Formation du complexe d'inclusion entre la CD et la partie hydrophobe du tensioactif conduisant à la dissociation de l'hydrogel physique et à la baisse de la viscosité [38].

Aucune différence significative n'a été observée entre le comportement de l' α -CD et celui de la β -CD en présence de 1mM de SDS. Par contre, pour 2,5mM de SDS, la β -CD semble être plus efficace que l' α -CD (figure III-7 (b)). Tsianou et Alexandridis ont discuté la formation du complexe TA:CD dans cette étude. Ils reportent que les TA peuvent être inclus dans la cavité des cyclodextrines selon deux schémas :



Dans le cas du SDS, les valeurs des constantes d'équilibre données par la littérature sont les suivantes [39] :

$$\text{Pour } \alpha\text{-CD } K_1 = 21000 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3 \text{ et } K_2 = 18000 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3$$

$$\text{Pour } \beta\text{-CD } K_1 = 21000 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3 \text{ et } K_2 = 210 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3$$

Ces valeurs indiquent que dans le cas du complexe SDS- β -CD, la constante K_1 est largement supérieur à la constante K_2 , ce qui indique que la stœchiométrie prédominante du complexe est de l'ordre de 1:1. Dans le cas du complexe SDS- α -CD, la constante K_1 est proche de la constante K_2 , ce qui suggère la présence des deux stœchiométries 1:1 et 2:1.

Dans la figure III-7 (b), Tsianou et Alexandridis trouvent que la stœchiométrie apparente pour les β -CD est de $\approx 1:1,3$ pour 1mM de SDS et $\approx 1:1,7$ pour 2,5mM de SDS. Ces résultats montrent que 70% des SDS forment un complexe 1:1 avec la CD et 30% forment un complexe 2:1 dans le cas de 1mM. Pour 2,5mM de SDS, 70% des SDS forment un complexe

2:1 et 30% forment un complexe 1:1. Par contre, les mesures effectuées par rhéologie ne permettent pas de différencier entre l'efficacité de l' α -CD et la β -CD.

Dans notre étude, l'introduction des cyclodextrines libres dans le réseau physique formé par les interactions hydrophobes entre les greffons alkyle de la chaîne macromoléculaire pourrait apporter des modifications des propriétés physico-chimiques du système associatif. Comme montré sur la figure III-4, les CDs libres vont complexer les chaînons hydrophobes greffés sur le HA et détruire le réseau tridimensionnel. Nous avons donc comparé, l'effet de l' α -CD et de la β -CD sur les propriétés rhéologiques du système associatif HA-alkylé. Nous avons par ailleurs cherché à relier les propriétés observées aux différents processus de complexation impliquant les cyclodextrines et les greffons hydrophobes grâce à des expériences de titration micro-calorimétrique isotherme (ITC) et de modélisation moléculaire. Ces expériences nous permettront, d'expliquer en partie la formation des complexes 1 :1 ou 2 :1 tel que l'avait proposé Alexandridis dans son étude décrite précédemment.

1.3 Etude de la complexation des chaînons hydrophobes par les CDs (α et β) par titration micro-calorimétrique isotherme (ITC).

L'ITC permet d'accéder aux paramètres thermodynamiques de l'interaction entre un ligand (L) et un récepteur (R). Cette technique consiste donc à ajouter des quantités progressives de ligand à la solution de macromolécule et à mesurer l'énergie libérée ou absorbée. Le tracé de la chaleur mise en jeu en fonction de la proportion de ligand ajouté donne des courbes de titration, qui permettent d'en déduire la constante d'association, K_a , (comprise entre 10^2 et 10^8 M^{-1}), la stœchiométrie de l'interaction, n , (nombre de sites impliqués dans l'interaction) et l'enthalpie de complexation, ΔH .

Dans le cas où un ligand (L) interagit avec un récepteur (R) pour donner un complexe [RL] de stœchiométrie 1 :1, on a la constante d'association, K_a , qui est reliée aux concentrations des espèces à l'équilibre :

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

Avec : [L] la concentration en ligand, [R] la concentration en récepteur et [RL] la concentration en complexe.

Dans les processus de reconnaissance moléculaire, particulièrement dans les systèmes supramoléculaires biologiques, le phénomène de coopérativité joue un rôle central. Dans le

cas des CD sous forme de monomères, les interactions faibles stabilisant les complexes d'inclusion ne sont pas toujours coopératives par nature et peuvent agir de façon indépendantes.

La formation d'un complexe d'inclusion à base de cyclodextrine en milieu aqueux implique [40]:

- La pénétration de la partie hydrophobe de la molécule invitée dans la cavité de la CD et donc la déshydratation de la molécule organique invitée.
- La libération de molécules d'eau présentes naturellement dans la cavité de CD [41].
- Le changement de conformation de la molécule de CD dû à la complexation [32].

Des expériences d'ITC ont été effectuées à partir des solutions d'acide hyaluronique hydrophobiquement modifié HA8C10-600 par les cyclodextrines α -CD et β -CD. Par la suite, nous avons étudié de plus près la complexation entre les CDs et les groupements alkyle. Pour cela, nous avons choisi d'étudier les groupements octyle, décyle et dodécyle sulfate de sodium pour mimer les chaînons hydrophobes avec 8, 10 et 12 atomes de carbone.

I.3.1 Complexes d' α - et β -CD avec le polymère.

Nous avons représenté sur la figure III-8 la titration des solutions d'acide hyaluronique hydrophobiquement modifié HA8C10-600 par les cyclodextrines α -CD et β -CD.

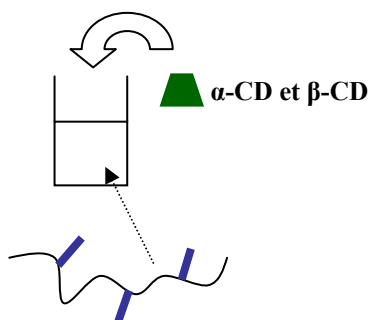


Figure III- 8 : Représentation schématique d'une titration d'une solution de polymère HA8C10-600 par une solution d' α -CD et β -CD.

La figure III-9 montre les thermogrammes obtenus lors de la titration d'une solution de HA8C10-600 pour une solution d' α - ou β -CD.

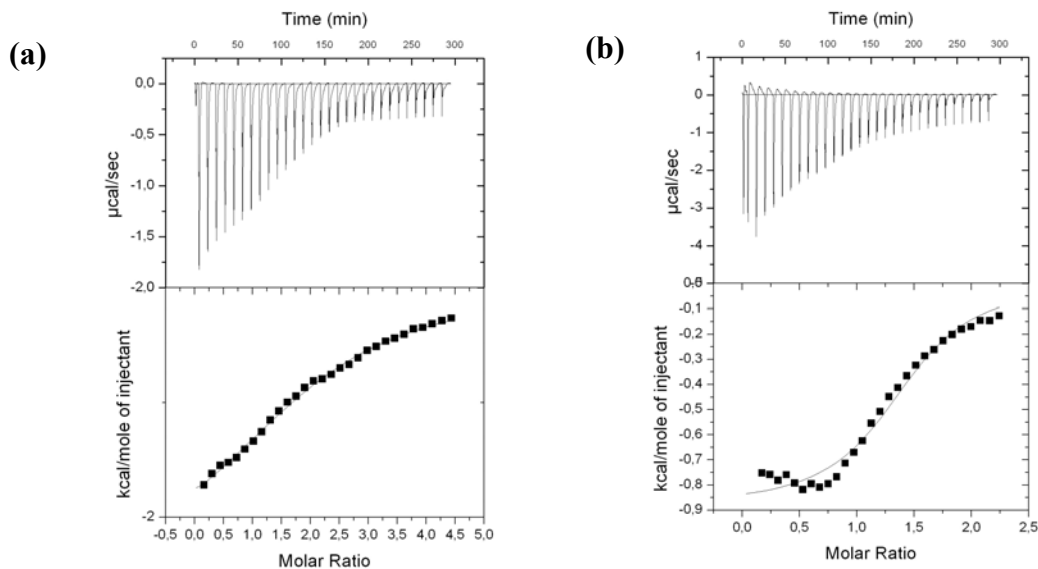


Figure III- 9 : Titration calorimétrique d'une solution polymère HA8C10 par (a) l' α -CD avec $[\alpha\text{-CD}]=(8\text{mM})$ et $[\text{HA8C10}]=(5\text{g/L})$ et par (b) la β -CD avec $[\beta\text{-CD}] = (20\text{mM})$ et $[\text{HA8C10}]=(10\text{g/L})$ dans l'eau à 25°C. Expériences avec le calorimètre VP-ITC de Microcal.

L'aire de chacun des signaux correspond à la quantité d'énergie libérée (exothermique) lors d'une addition de solution de cyclodextrine à une solution de polymère. Cette énergie est reliée au nombre de complexes β -CD/chaîne C10 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. En effet, les chaînons hydrophobes greffés sur le polymère se lient à la cyclodextrine en large excès à ce stade de la titration. A la fin de la titration, tous les chaînons hydrophobes disponibles sont complexés par la cyclodextrine et les pics observés correspondent alors à l'effet de dilution du ligand. Néanmoins, l'absence claire de point d'inflexion sur ces deux thermogrammes, ne permet pas de faire un ajustement fiable des courbes par les différents modèles proposés pour obtenir les paramètres thermodynamiques.

Afin d'obtenir des courbes plus représentatives de la complexation, il aurait été intéressant d'augmenter la concentration du polymère et des cyclodextrines. Malheureusement, pour des problèmes de viscosité élevée des solutions de polymère et pour des raisons de limitation au niveau de l'appareillage, cela n'a pas été réalisable (cf chapitre IV).

Afin de pouvoir mieux comprendre les propriétés de complexation des chaînes alkyle, nous avons donc décidé d'utiliser des tensioactifs avec 8, 10 et 12 atomes de carbone. Ainsi, nous pensons mimer la complexation avec les cyclodextrines et les chaînons hydrophobes greffés sur le polymère.

I.3.2 Complexes d' α - et de β -CD avec les tensioactifs.

Plusieurs travaux décrits dans la littérature ont été consacrés à l'étude de la complexation entre des tensioactifs et des cyclodextrines. Il existe une grande divergence entre les résultats selon la méthode d'analyse utilisée. Nous avons regroupé dans le tableau III-1 ces différents résultats.

Tensioactifs	Cyclodextrines	Techniques d'analyse	K_1 (M^{-1})	K_2 (M^{-1})
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)	β -CD	Conductimétrie [42]	356	-
	α -CD		111	-
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)	β -CD	Conductimétrie [43]	210	-
SOS ($C_8H_{17}SO_4Na$)	β -CD	Conductimétrie[44]	565	-
SDES ($C_{10}H_{21}SO_4Na$)			2310	-
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)			7230	-
SOS ($C_8H_{17}SO_4Na$)	β -CD	Conductimétrie [45]	1610	-
SDES ($C_{10}H_{21}SO_4Na$)			5400	-
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)			6600	-
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)	β -CD	Tension de surface [46]	3200-18000	-
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)	β -CD	Tension de surface [47]	3630	-
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)	β -CD	Electrodes spécifiques au tensioactif [39]	21000	210
	α -CD		21000	18000
SOS ($C_8H_{17}SO_4Na$)	β -CD	Fluorescence [48]	2560	13
SDES ($C_{10}H_{21}SO_4Na$)			8750	58
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)			25600	200
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)	β -CD	UV visible [49]	18500	-
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)	β -CD	Fluorescence [50]	26800	440
	α -CD		43000	-
SOS ($C_8H_{17}SO_4Na$)	β -CD	RMN [51]	780	-
SDES ($C_{10}H_{21}SO_4Na$)			7000	41
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$)			49000	100
SOS ($C_8H_{17}SO_4Na$)	β -CD	RMN [52]	343	-
SDES ($C_{10}H_{21}SO_4Na$)			2240	-

SOS (C ₈ H ₁₇ SO ₄ Na)	β-CD	Titration micro-calorimétrique [53]	1210	-
SDES (C ₁₀ H ₂₁ SO ₄ Na)			3446	-
SDOS (C ₁₂ H ₂₅ SO ₄ Na)			8150	-

Tableau III- 1 : Données de la littérature concernant la complexation des chaînes d'alkyle sulfate et les cyclodextrines α et β.

Le tableau récapitulatif des données de la littérature, concernant la complexation des cyclodextrines avec les tensioactifs d'alkyle sulfate de longueur C8, C10 et C12, montre la divergence des résultats même pour une même technique d'analyse. Une seule étude a été effectuée par titration micro-calorimétrique isotherme pour la β-CD mais aucune étude n'a été effectuée sur l'α-CD par ITC à notre connaissance.

Nous avons donc réalisé des expériences d'ITC en titrant des solutions d'α-CD et de β-CD par des tensioactifs modèles de longueurs de chaîne C8 (SOS), C10 (SDES) et C12 (SDOS). Les concentrations en ligand et en récepteur utilisées ont été ajustées en fonction de la constante d'association et de la concentration micellaire critique (CMC) des tensioactifs (Tableau III-2) [54]. Cette concentration correspond à la valeur à partir de laquelle les tensioactifs se regroupent pour former des agrégats micellaires.

	C8 (SOS)	C10 (SDES)	C12 (SDOS)
CMC mM	134	33	8,3

Tableau III- 2 : Concentrations micellaires critiques CMC pour les tensioactifs utilisés dans l'eau à 20°C [54].

La figure III-10 montre les thermogrammes de titration des solutions de cyclodextrines par les tensioactifs d'alkyle sulfate.

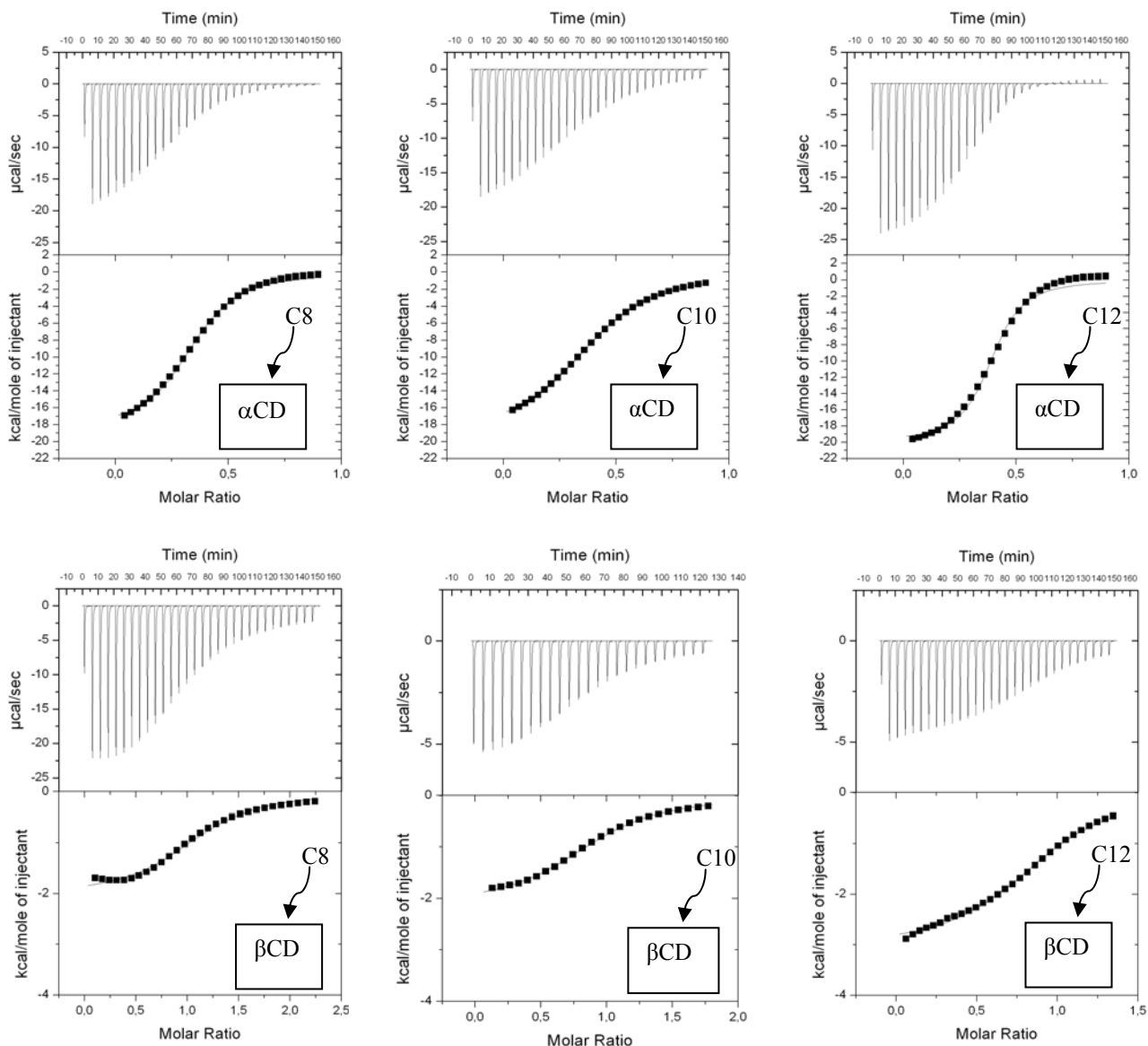


Figure III- 10 : Titration calorimétrique de solutions d' α et de β -CD par des tensioactifs alkyle sulfate ayant des chaînes en C8, C10 et C12 dans l'eau à 25°C. Expériences effectuées avec le calorimètre VP-ITC de Microcal.

A partir de ces figures, nous pouvons observer que l'énergie libérée lors de la complexation est beaucoup plus importante dans le cas des α -CDs que dans le cas des β -CDs utilisées à des concentrations molaires lors des titrations. Afin de comparer ces différents cas de complexation, les grandeurs thermodynamiques caractéristiques des complexations entre les différents tensioactifs et les cyclodextrines α et β (tableau III-3), ont été calculées à partir des thermogrammes en utilisant un modèle simple à un site.

Ligand	Récepteur	n	$K_a \cdot 10^{-4}$ (M^{-1})	ΔH (kJ/mol)	T ΔS (kJ/mol)
SOS (C ₈ H ₁₇ SO ₄ Na) (4mM)	α CD (1mM)	0,41± 0,02	1,57 ± 0,02	-79,75 ± 0,25	-55,55
SDES (C ₁₀ H ₂₁ SO ₄ Na) (4mM)	α CD (1mM)	0,35± 0,02	3,07 ± 0,16	-77,24 ± 0,83	-51,56
SDOS (C ₁₂ H ₂₅ SO ₄ Na) (4mM)	α CD (1mM)	0,39± 0,02	7,71 ± 0,90	-83,22 ± 1,25	-54,81
SOS (C ₈ H ₁₇ SO ₄ Na) (40mM)	β CD (4mM)	1,12± 0,02	0,21 ± 0,02	-8,50 ± 0,19	+10,51
SDES (C ₁₀ H ₂₁ SO ₄ Na) (10mM)	β CD (1mM)	0,91± 0,02	0,80 ± 0,03	-8,93 ± 0,09	+13,32
SDOS (C ₁₂ H ₂₅ SO ₄ Na) (10mM)	β CD (1mM)	0,91± 0,02	1,22 ± 0,06	-12,72 ± 0,12	+10,58

Tableau III- 3 : Grandeurs thermodynamiques obtenues à partir d'expériences d'ITC en titrant des solutions d' α et de β -CD par des tensioactifs SOS, SDES et SDOS à 25°C dans l'eau.

Si l'on compare l' α - et la β -CD, on constate une contribution enthalpique défavorable dans le premier cas et favorable dans le second. On peut aussi voir que la contribution entropique est plutôt défavorable dans le cas de la complexation par l' α -CD, alors que celle-ci est plutôt favorable dans le cas de la β -CD. Comme nous allons le développer, ces différences reflètent des processus de complexation différents pour l' α -CD et la β -CD.

Complexation par la β -CD : Les valeurs de n sont proches de 1, ce qui suggère la formation de complexes 1:1, c'est-à-dire qu'une cavité de β -CD interagit avec une molécule de tensioactif. 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, du fait d'une légère agrégation des β -CDs en milieu aqueux à ces concentrations. Celle-ci résulte vraisemblablement de l'établissement de liaisons hydrogène entre les couronnes externes hydrophiles des β -CDs.

Les valeurs des constantes d'association K_a permettent de montrer que la complexation est plus stable pour les longueurs des chaînes les plus élevées (SOS < SDES < SDOS).

Complexation par l' α -CD : Les valeurs de n sont voisines de 0,5, ce qui indique qu'il se forme des complexes 2:1 (CD : TA), c'est-à-dire que deux cavités d' α -CD interagissent avec une molécule de tensioactif. Les valeurs des constantes d'association, K_a , permettent de montrer que la complexation est plus stable pour les longueurs des chaînes les plus élevées

(SOS < SDES < SDOS). De plus, ces valeurs sont plus importantes que dans le cas des β -CD, ce qui indique une association « plus stable » entre les tensioactifs alkyle sulfate et les α -CDs, du fait notamment, de la présence de deux cyclodextrines sur la chaîne alkyle.

Dans ce cas, la formation des complexes est de nature enthalpique. La contribution entropique défavorable pourrait être liée à la présence de 2CDs sur la chaîne alkyle, limitant leur mobilité.

Des mesures inverses consistant à titrer des solution de tensioactif par les cyclodextrines, ont été réalisées afin de confirmer ces résultats (Schéma III-3) :

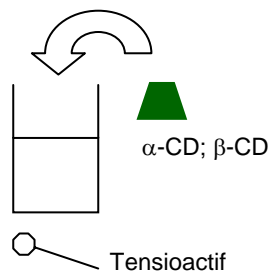
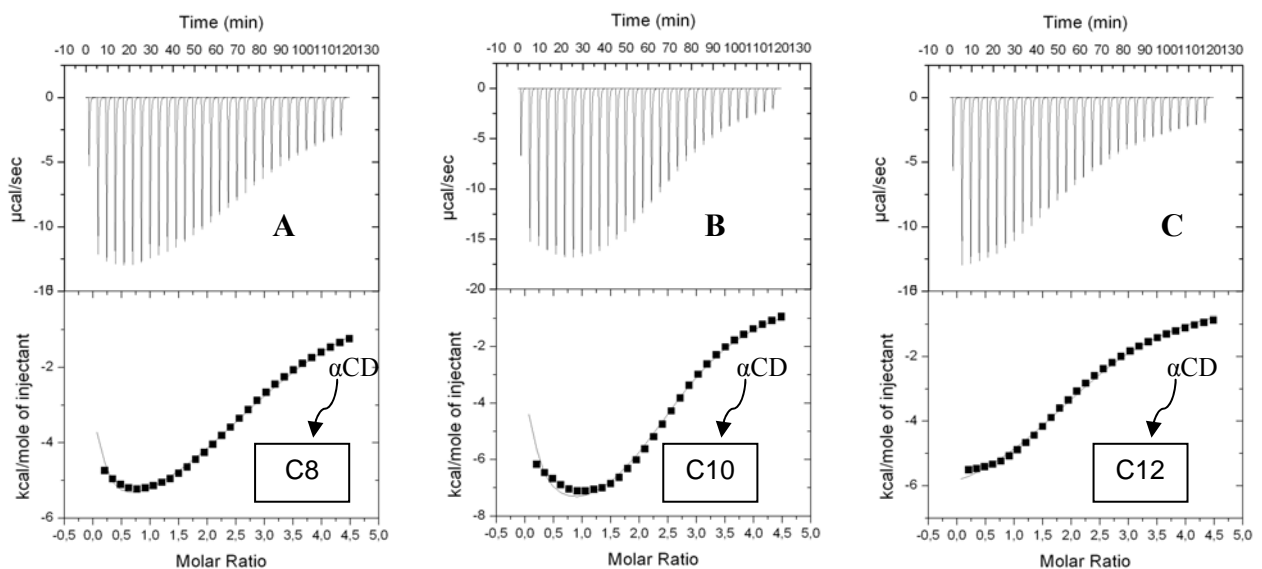


Schéma III- 3 : Représentation schématique de l'addition d' α - et de β -CD sur les différents tensioactifs SOS, SDES et SDOS.

Les thermogrammes correspondants sont donnés dans la figure III-11.



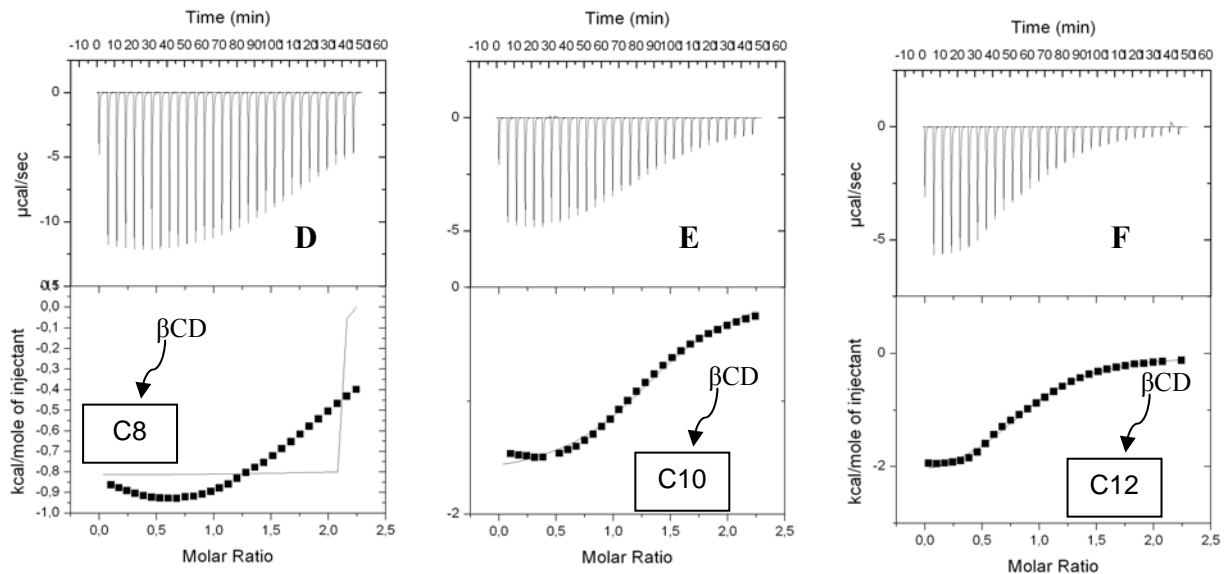


Figure III- 11 : Titration calorimétrique des solutions d'alkyle sulfate de longueurs C8, C10 et C12 par les α et β -CD dans l'eau à 25°C. Expériences avec le calorimètre VP-ITC de Microcal.

La plupart des courbes de titration (A,B,D) présentent un profil inhabituel avec une intensité des pics plus faible lors des premières titrations. Ce phénomène n'est pas un artéfact et est reproductible. Différents modèles ont été testés pour ajuster les données expérimentales mais les résultats obtenus ne sont pas concluants. Seules les données des titrations E et F ont pu être exploitées en utilisant un modèle simple à un site (tableau III-4). Les valeurs trouvées sont assez cohérentes par rapport à la titration inverse.

Récepteur	Ligand	n	$K_a \cdot 10^{-4}$ (M^{-1})	ΔH (kJ/mol)	TAS (kJ/mol)
SOS ($C_8H_{17}SO_4Na$) (4mM)	α CD (1mM)	-	-	-	-
SDES ($C_{10}H_{21}SO_4Na$) (4mM)	α CD (1mM)	-	-	-	-
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) (4mM)	α CD (1mM)	-	-	-	-
SOS ($C_8H_{17}SO_4Na$) (40mM)	β CD (4mM)	-	-	-	-
SDES ($C_{10}H_{21}SO_4Na$) (10mM)	β CD (1mM)	$1,43 \pm 0,01$	$0,845 \pm 0,071$	$-6,86 \pm 0,10$	$+15,57$
SDOS ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) (10mM)	β CD (1mM)	$0,92 \pm 0,01$	$0,803 \pm 0,058$	$-9,66 \pm 0,13$	$+12,58$

Tableau III- 4: Grandeurs thermodynamiques obtenues par des expériences d'ITC en titrant des tensioactifs SOS, SDES et SDOS par des solutions d' α et β -CD par à 25°C dans l'eau.

Ces résultats, même s'ils n'ont pas permis d'aboutir à des données thermodynamiques pour la série α , semblent indiquer que le phénomène de complexation des chaînes alkyle par les CDs, en particulier pour l' α -CD, est assez complexe du fait de la présence des complexes 2 :1. En effet, la double inclusion implique une certaine cinétique de complexation. De plus, celle-ci peut avoir lieu selon plusieurs processus de complexation. Comme schématisé ci-dessous, une première cyclodextrine peut venir s'enfiler sur la chaîne et celle-ci entraîne l'enfilement de la seconde (Schéma III-4).

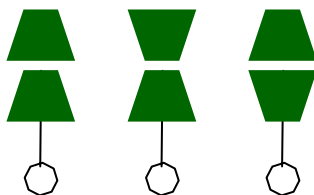


Schéma III- 4 : Différentes possibilités d'enfilement de la chaîne tensioactive dans la cyclodextrine.

Afin de pouvoir répondre au choix d'enfilement nous avons simulé ces différentes possibilités d'enfilement par modélisation moléculaire et nous avons réalisé des expériences de RMN mono- et bi-dimensionnelles. Une recherche bibliographique sur des études déjà réalisées a aussi été effectuée et seront présentées en introduction de la partie « modélisation moléculaire ».

1.4 Etude de la complexation des tensioactifs par les α et β -CD par RMN.

Le principe de base de l'étude par RMN des complexes d'inclusion CDs-invités repose sur l'étude des variations des valeurs de déplacements chimiques (δ , ppm) des signaux de la molécule invitée et de la molécule hôte. Lorsque l'on est en présence d'un complexe, les modifications de la densité électronique locale à l'intérieur de la cavité sont créées par la molécule invitée, entraînant des variations des déplacements chimiques de certains protons des CDs. Les protons H3 et H5 situés à l'intérieur de la cavité sont les principaux signes de ces modifications d'environnement électronique (figure III-13).

L'étude des variations de déplacements chimiques en RMN ^1H monodimensionnelle est un premier indice de la complexation, mais pour pouvoir étudier plus précisément l'inclusion et éviter les erreurs d'interprétations, il est nécessaire de recourir à des expériences de RMN bidimensionnelles fondées sur les corrélations par couplage dipolaire homonucléaire (ROESY).

La séquence ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY) permet de mettre en évidence les noyaux de même nature proches spatialement sans être couplés scalairement. Ainsi, l'utilisation de cette séquence pour l'étude des complexes de CDs permet de lever les ambiguïtés quant aux noyaux mis en jeu dans le processus d'inclusion. L'observation de pics de corrélations ROE entre les protons de la molécule hôte et ceux de la molécule invitée permettra de montrer les proximités spatiales intermoléculaires, et donc, de mettre en évidence la formation du complexe. Un effet secondaire du ROESY étant le transfert du relais, des expériences T-ROESY ont été utilisées.

Comme nous avons pu le voir dans le tableau récapitulatif des données de la littérature concernant l'association des complexes CD-TA, il existe de nombreuses études qui ont été réalisées mais souvent les résultats sont divergents [46, 55, 56]. Il a fallu attendre des techniques plus récentes telles que les mesures de conductivités, tensions de surfaces, fluorescence et la RMN pour obtenir des données cohérentes [39, 46, 55]. La RMN a souvent été utilisée pour la détermination de la constante d'association des tensioactifs et CDs [57-59].

Les données RMN obtenues par des expériences telles que les expériences NOE, les constantes de couplage des spins voisins et les déplacements chimiques fournissent des informations sur la structure du complexe en solution. Néanmoins, les spectres ROESY sont ceux qui contiennent le plus d'informations concernant la structure du complexe [60].

Funasaki *et al.* ont publié plusieurs travaux sur l'étude de l'inclusion de tensioactifs de type bromure de triméthylammonium (C6, C8, C10 et C12) dans les cavités de cyclodextrine par des expériences RMN bidimensionnelles [60, 61]. Ils ont ainsi pu montrer que pour des tensioactifs en C12, deux cyclodextrines pouvaient s'enfiler. Selon leurs résultats, les tensioactifs sont incorporés dans une première phase par le plus large côté de la cyclodextrine.

Dans la mesure où la tête polaire peut avoir une influence sur le phénomène de complexation et de façon à avoir une vision globale des différents complexes étudiés par ITC, nous avons examiné le processus de complexation à l'aide d'expériences de RMN¹H monodimensionnelles classiques et bidimensionnelles de type T-ROESY.

Les spectres RMN proton monodimensionnels de l' α -CD et de la β -CD sont représentés sur la figure III-12.

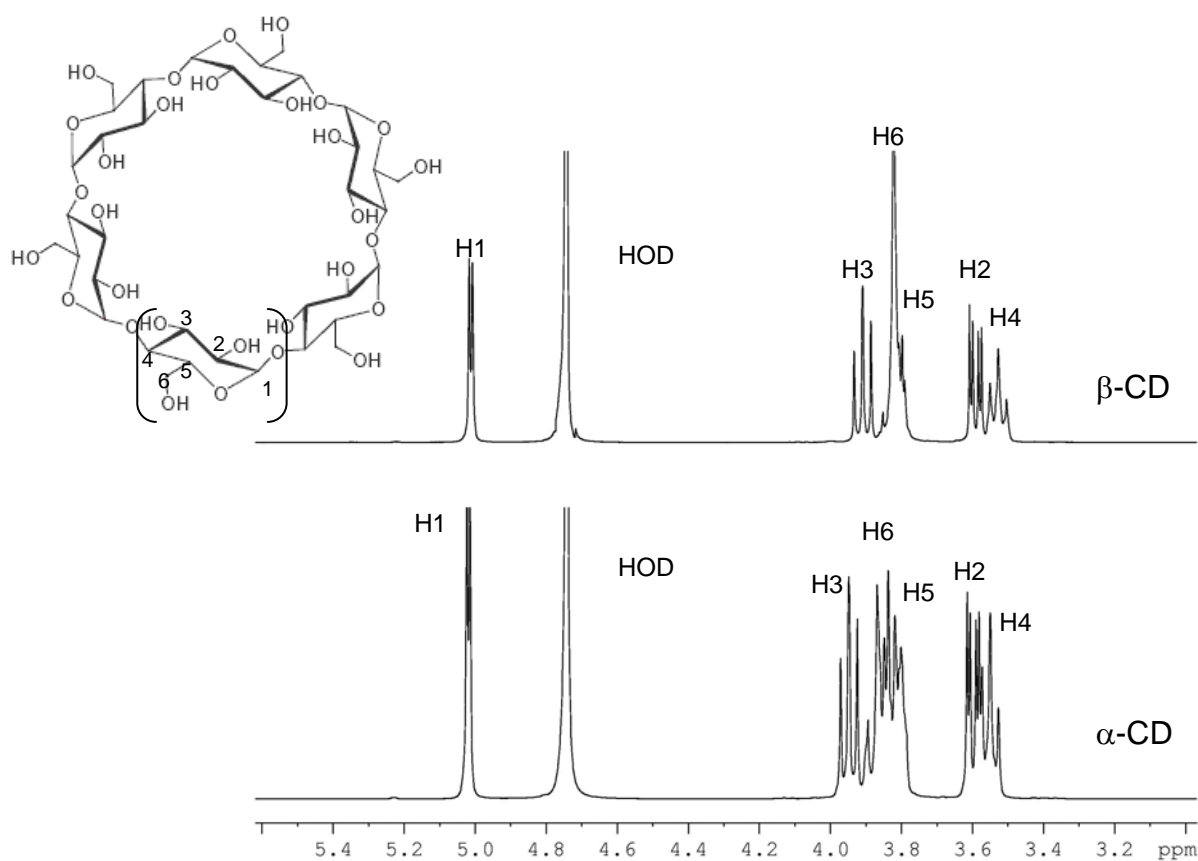


Figure III- 12 : Spectres RMN ¹H de l'α-CD et de la β-CD (400MHz, 25°C, 3mM, D₂O).

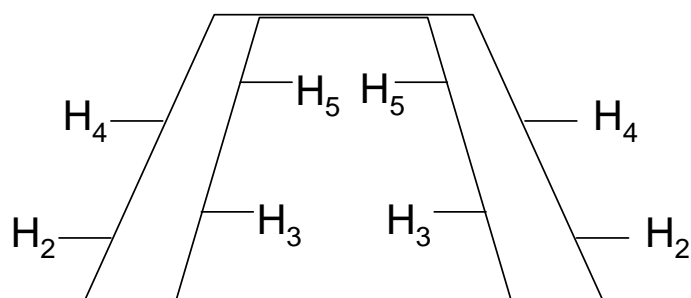


Figure III- 13 : Représentation des protons internes et externes de la cyclodextrine.

Les spectres RMN¹H 1D des tensioactifs SOS, SDES et SDOS sont représentés sur la figure III-14.

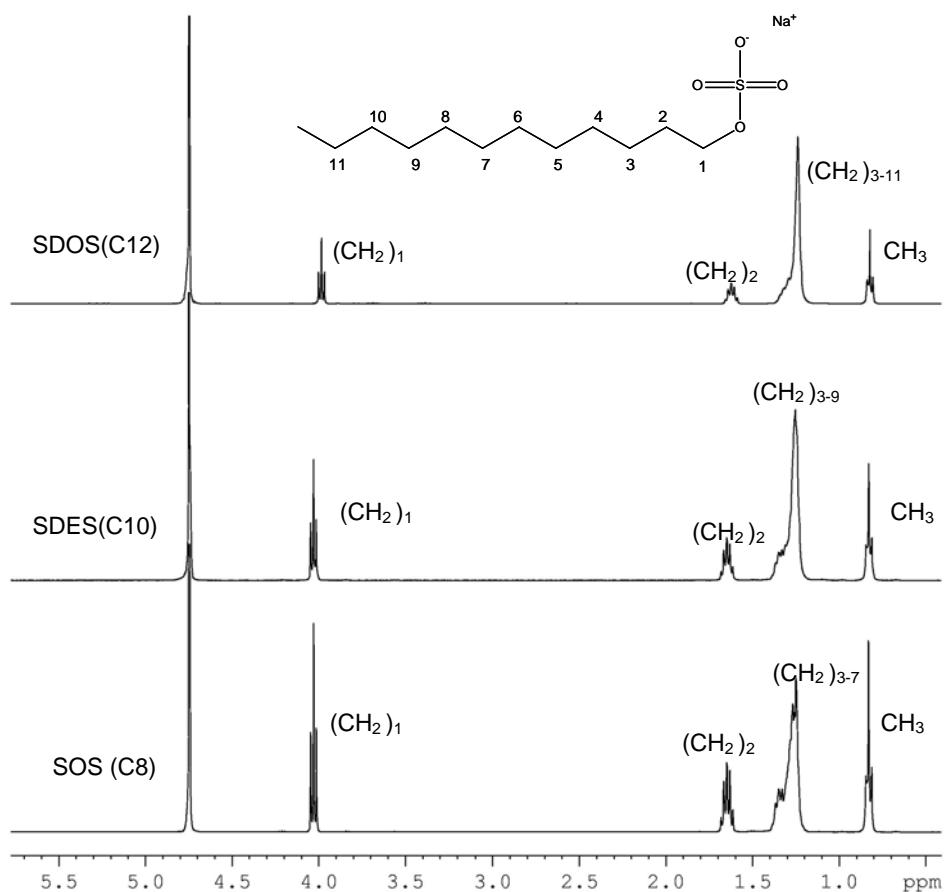


Figure III- 14 : Spectres RMN ^1H des différents tensioactifs alkyle sulfate (400MHz, 25°C, 6mg/mL, D_2O).

I.4.1 Inclusion des chaînes de tensioactif SOS (C8) dans la cavité des α -CD.

La figure III-15 montre les spectres RMN ^1H 1D du tensioactif et de la cyclodextrine libres en solution, ainsi que les mélanges α -CD : C8 avec des rapports 1 :1 et 4 :1.

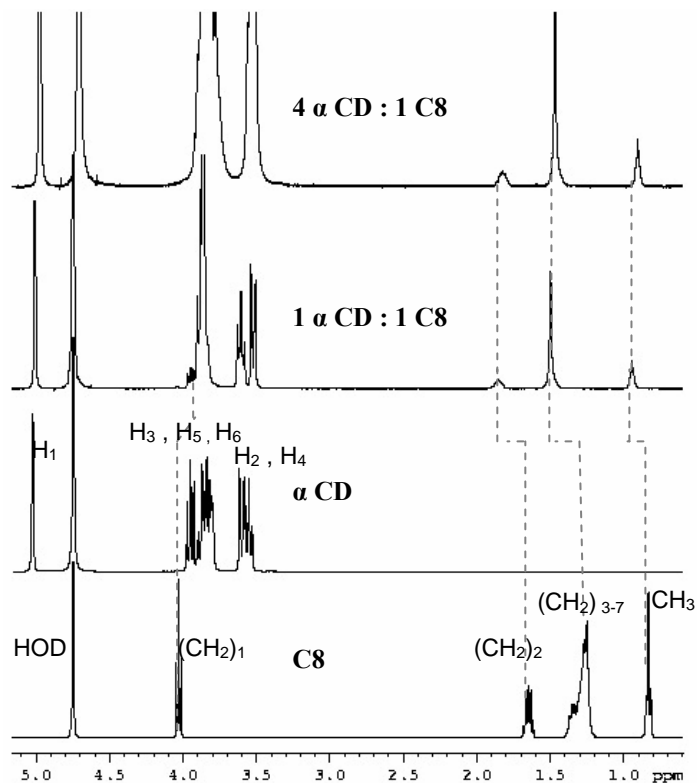


Figure III- 15 : Spectres RMN ^1H (400MHz, 25°C, D_2O) du (a) tensioactif SOS (C8) à 6mg/mL ; (b) l' α -CD à 3mM ; (c) mélange α -CD-C8 avec un rapport 1:1 (3mM : 3mM) ; (d) mélange α -CD :C8 avec un rapport 4:1 (12mM : 3mM).

Les spectres obtenus pour un rapport 1:1 (CD:C8) montrent des variations des déplacements chimiques du CH_3 terminal du tensioactif ainsi que des CH_2 de la chaîne. Le CH_2 proche de la tête polaire (4,05ppm) subit également une variation de déplacement chimique. Ces variations sont le premier indice de la complexation. On peut par ailleurs, noter des variations similaires pour les protons de la chaîne pour les deux rapports CD/Chaîne. Ceci semble indiquer une simple inclusion de la chaîne du tensioactif dans la cavité de cyclodextrine. En effet, si une deuxième cyclodextrine était enfilée sur la chaîne, on devrait observer une différence plus significative entre les deux rapports (comme nous le verrons plus tard pour le cas des C10 et C12).

Ces conclusions préliminaires semblent être confirmées par les expériences T-ROESY et suggèrent qu'il y aurait une seule cyclodextrine enfilée sur la chaîne de tensioactif en C8 (figure III-16 et 17).

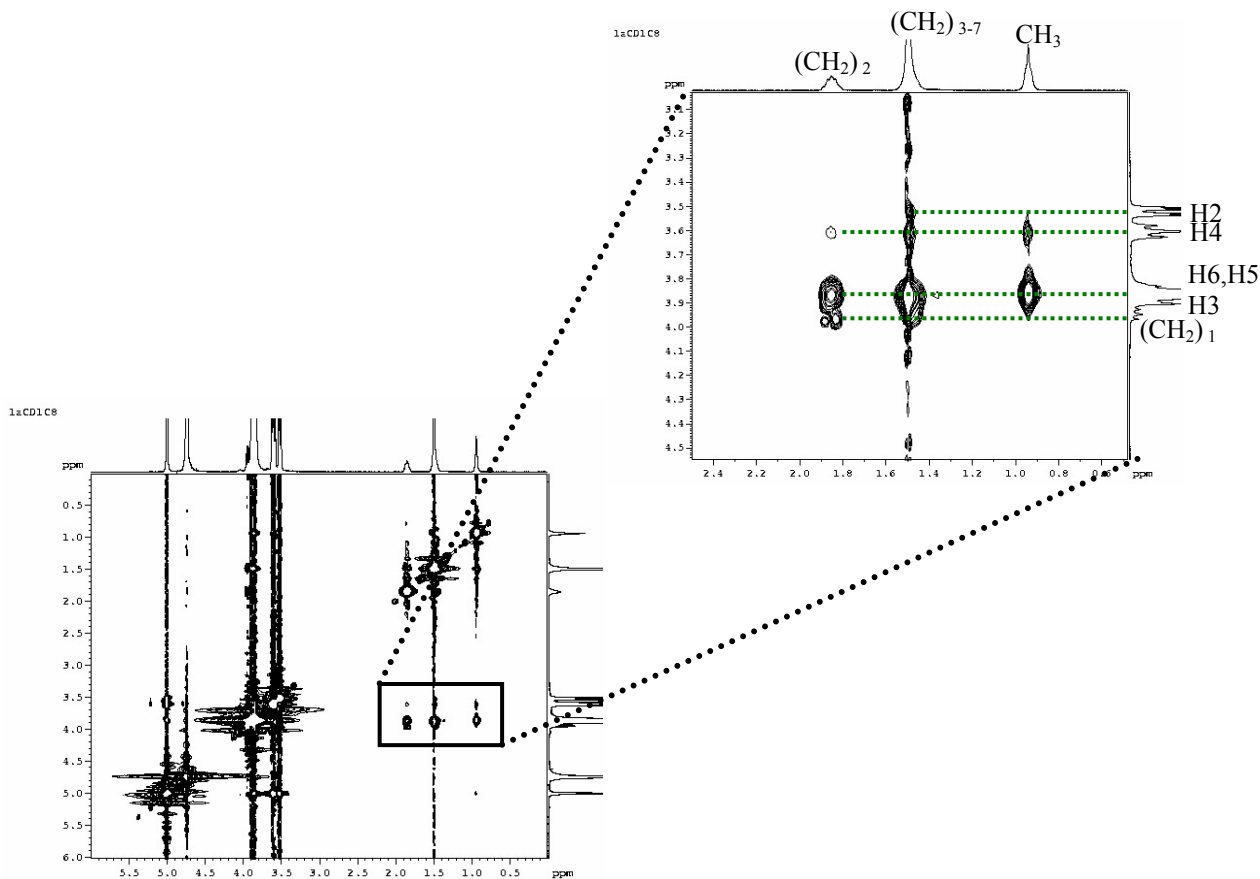
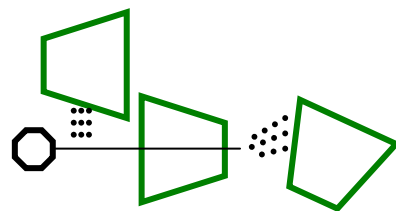


Figure III- 16 : Carte T-ROESY (400 MHz, 25°C, D₂O, 3mM en C8 et 3mM en α -CD) du mélange α -CD : C8 avec le rapport 1:1.

A partir de la carte T-ROESY, nous pouvons voir que les CH₂ centraux de la chaîne C8 interagissent avec les H2 et H4 de la cyclodextrine. Dans la mesure où les H2 et H4 sont situés à l'extérieur de la cavité de la CD, on peut penser que l'interaction a lieu avec une CD voisine, comme illustré dans le (schéma III-5) Par ailleurs, nous ne pouvons pas distinguer si le CH₃ est corrélé avec les H3 ou les H6 de la cyclodextrine, ne permettant pas de connaître le sens d'inclusion de la cyclodextrine.



..... Interactions H2, H4 de la CD avec les CH₂ de la chaîne du tensioactif

Schéma III- 5 : Représentation schématique de l'interaction des H2 et H4 de la cyclodextrine avec les CH₂ et les CH₃ de la chaîne du tensioactif.

Ces résultats nous laissent penser que nous avons une simple inclusion, ou une double inclusion mais pas très prononcée.

La carte T-ROESY ci-dessous représente le mélange 4:1 (α CD:C8).

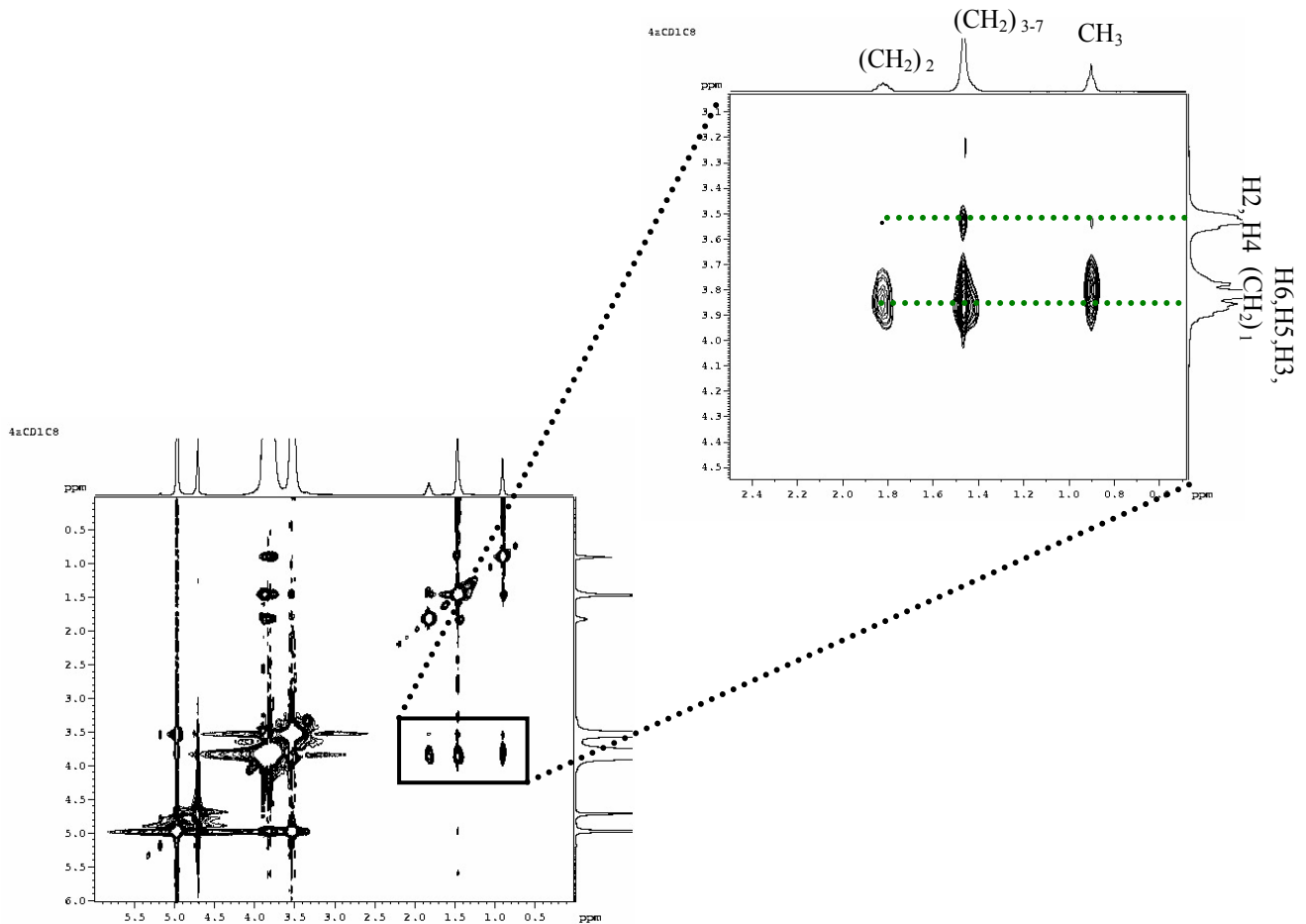


Figure III- 17 : Carte T-ROESY (400 MHz, 25°C, D₂O, 3mM en C8 et 12mM en α -CD) du mélange α -CD : C8 avec le rapport 4:1.

A partir de cette carte T-ROESY, nous pouvons voir que les H2 et H4 de la CD interagissent avec les CH₂ du milieu de la chaîne C8 de manière négligeable avec les CH₃ terminaux de la chaîne et les CH₂ en β de la tête polaire. La faible interaction entre le CH₃ et les H4 de la CD semble indiquer que dans ce cas une 2^{ème} CD est proche de la chaîne sans être totalement incluse, compte tenu de la faible longueur de la chaîne.

Conclusion : Dans le cas de la complexation des chaînes de tensioactif en C8 par l' α -CD, il semblerait que la double inclusion des cyclodextrines soit difficile à obtenir de manière stable du fait de la faible longueur de la chaîne. Ceci rejoint les résultats de la calorimétrie qui indiquent une double inclusion mais avec une constante d'association faible.

I.4.2 Inclusion des chaînes de tensioactif SDES (C10) dans la cavité des α -CD.

La figure III-18 montre les spectres RMN¹H du tensioactif et de l' α -cyclodextrine libres en solution, ainsi que les mélanges α -CD : C10 avec des rapports 1 :1 et 4 :1.

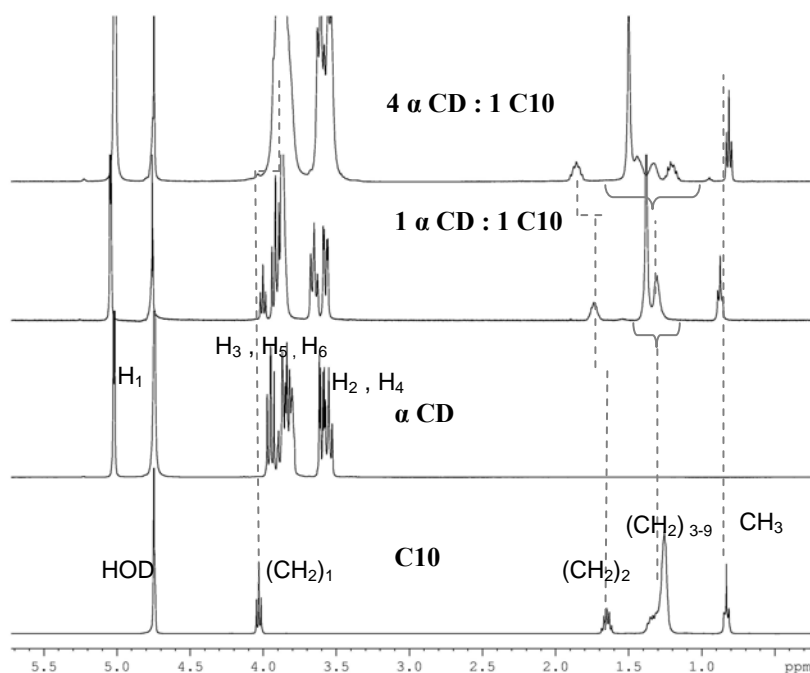


Figure III- 18 : Spectres RMN ¹H (400MHz, 25°C, D₂O) du (a) tensioactif SDES (C10) à 6mg/mL ; (b) l' α -CD à 3mM ; (c) mélange α -CD-C10 avec un rapport 1:1 (3mM : 3mM) ; (d) mélange α -CD:C10 avec un rapport 4:1 (12mM : 3mM).

Pour le rapport 1:1, nous pouvons observer une légère variation du déplacement chimique du CH₂ en α de la tête polaire mais du CH₃ de la chaîne du tensioactif. On observe une dispersion des signaux des CH₂ dès l'ajout de 1 équivalent d' α -CD mais celle-ci est beaucoup plus prononcée pour 4équivalents. Ceci qui indique la présence d'environnements différents pour chaque CH₂ et est vraisemblablement lié à la double inclusion de la cyclodextrine. Les CH₂ en α et β de la tête polaire ont subit également une variation de leurs déplacements chimiques ce qui semble confirmer la double inclusion pour un rapport 2:1.

Cette double inclusion semble être confirmée par les cartes T-ROESY pour les deux rapports 1:1 et 4:1 (α -CD:C10) représentées sur les figures III-19 et III-20.

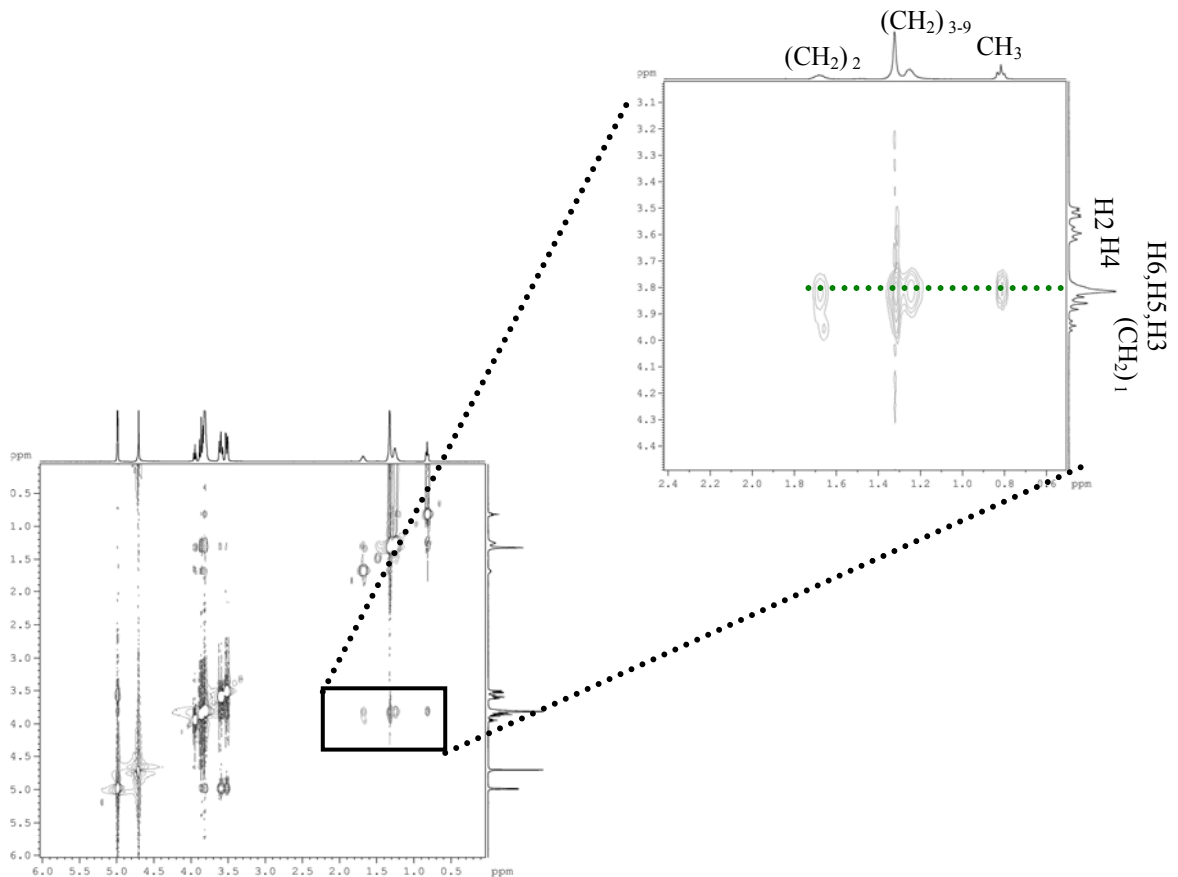


Figure III- 19 : Carte T-ROESY (400 MHz, 25°C, D₂O, 3mM en C10 et 3mM en α -CD) du mélange α -CD : C10 avec le rapport 1:1.

Nous pouvons voir d'après la carte T-ROESY pour le rapport 1:1, l'existence d'une tache de corrélation entre les H2, H4 de la cyclodextrine et les CH₂ centraux de la chaîne C10. Ce qui suggère une simple inclusion. Les CH₂ centraux et en α de la tête polaire semble interagir plus fortement avec les H6 que les H3, suggérant que le sens d'inclusion de la cyclodextrine se ferait plutôt du côté des H6.

En ce qui concerne la carte T-ROESY du mélange 4 :1 (CD : C10) (figure III-20), nous pouvons voir une dispersion des signaux des CH₂ centraux de la chaîne en C10. Par ailleurs, on observe des proximités spatiales entre les CH₂ centraux et les H2, H4 des cyclodextrines indiquant une interaction de la chaîne avec d'autres cyclodextrines. Celle-ci pourrait être liée à la présence de quelques espèces avec le rapport stœchiométrique 1 :1.

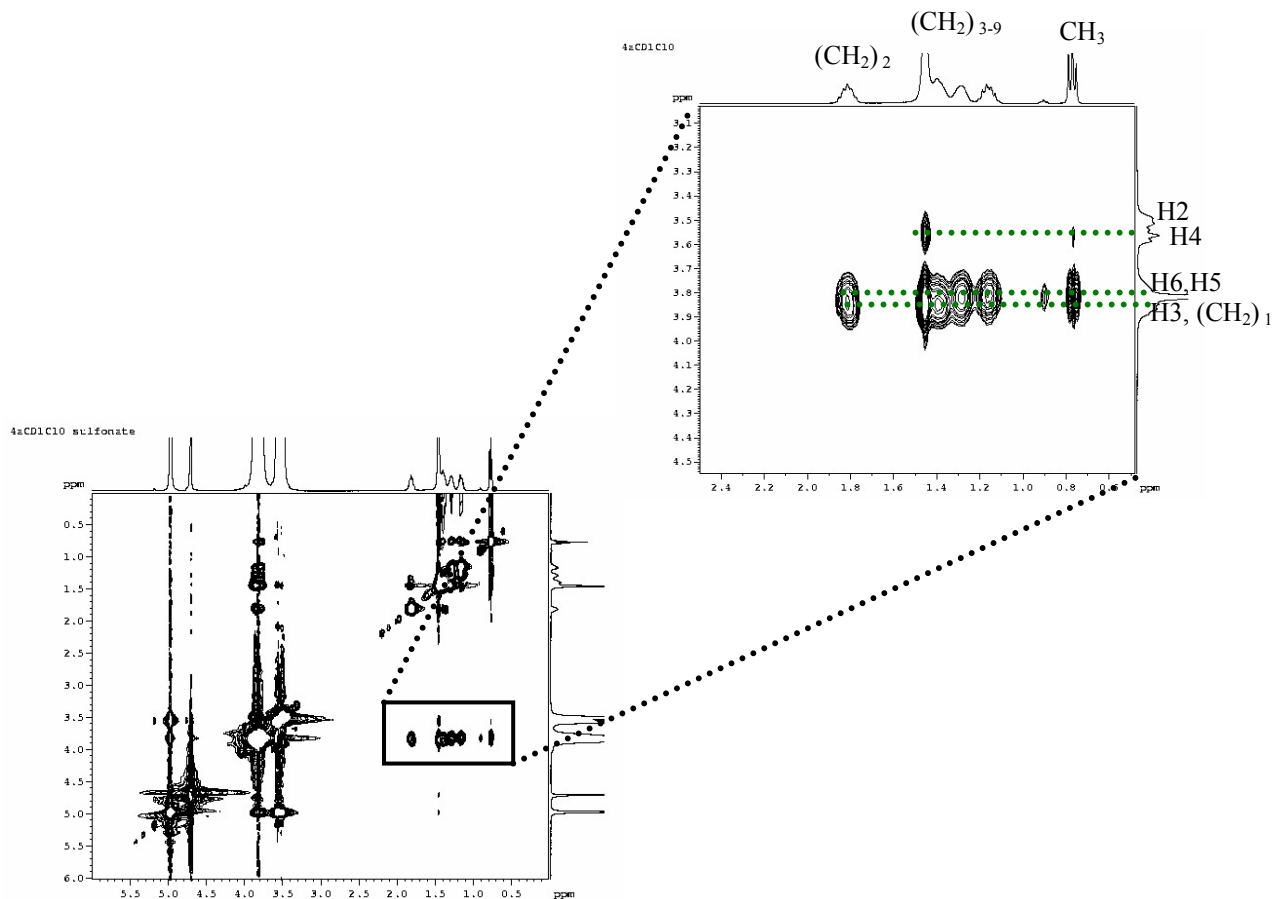


Figure III- 20 : Carte ROESY (400 MHz, 25°C, D₂O, 3mM en C10 et 12mM en α-CD) du mélange α-CD : C10 avec le rapport 4:1.

Conclusion : Dans le cas de l'inclusion des chaînes de tensioactif en C10 et l'α-CD il semblerait qu'il y a peu de double inclusion de cyclodextrine pour un rapport 1:1 mais pour un rapport 4:1 il semble évident qu'il y a deux cyclodextrines pour une chaîne C10. Ce résultat rejoint ce que nous avons observé lors des expériences d'ITC.

1.4.3 Inclusion des chaînes de tensioactif SDOS (C12) dans la cavité des α-CD.

La figure III-21 montre les spectres RMN ¹H du tensioactif et de la cyclodextrine libre en solution, ainsi que les mélanges α-CD : C12 avec des rapports 1 :1 et 4 :1.

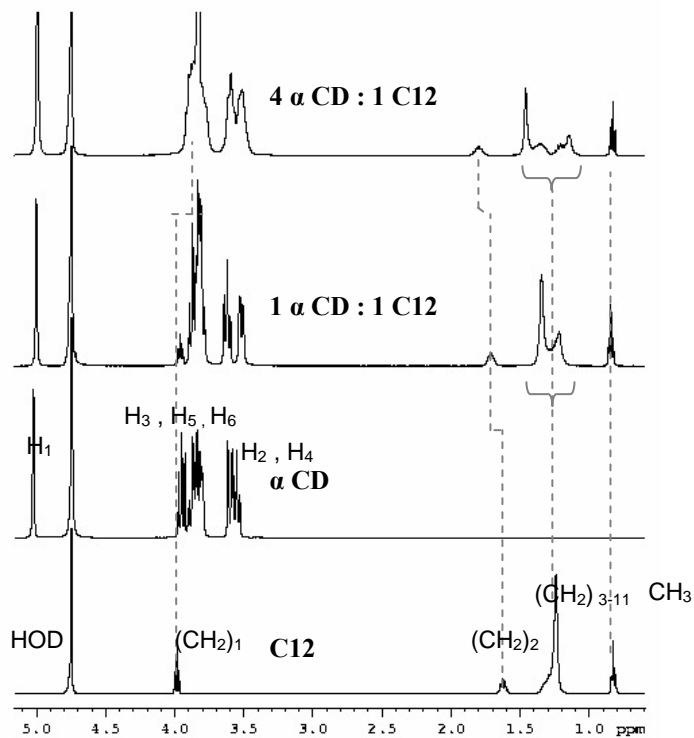


Figure III- 21 : Spectres RMN ^1H (400MHz, 25°C, D_2O) du (a) tensioactif SDOS (C12) à 6mg/mL ; (b) l' α -CD à 3mM ; (c) mélange α -CD-C12 avec un rapport 1:1 (3mM : 3mM) ; (d) mélange α -CD :C12 avec un rapport 4:1 (12mM : 3mM).

Nous pouvons observer qu'il y a une légère variation des déplacements chimiques des CH_2 en α et β de la tête polaire pour le rapport 1 :1. La dispersion des signaux des CH_2 est observée dès l'ajout de 1 équivalent d' α -CD mais celle-ci est beaucoup plus prononcée pour 4 équivalents. Il semblerait donc que nous avons une double inclusion de la cyclodextrine dans la chaîne C12 même en présence de 1 équivalent. De plus, pour un rapport 4:1, le CH_2 en α de la tête polaire subit un effet de déblindage important, ce qui suggère la double inclusion.

La carte ROESY nous permet aussi de montrer cette double inclusion de la dans une chaîne de tensioactif en C12 (figure III-22 et 23).

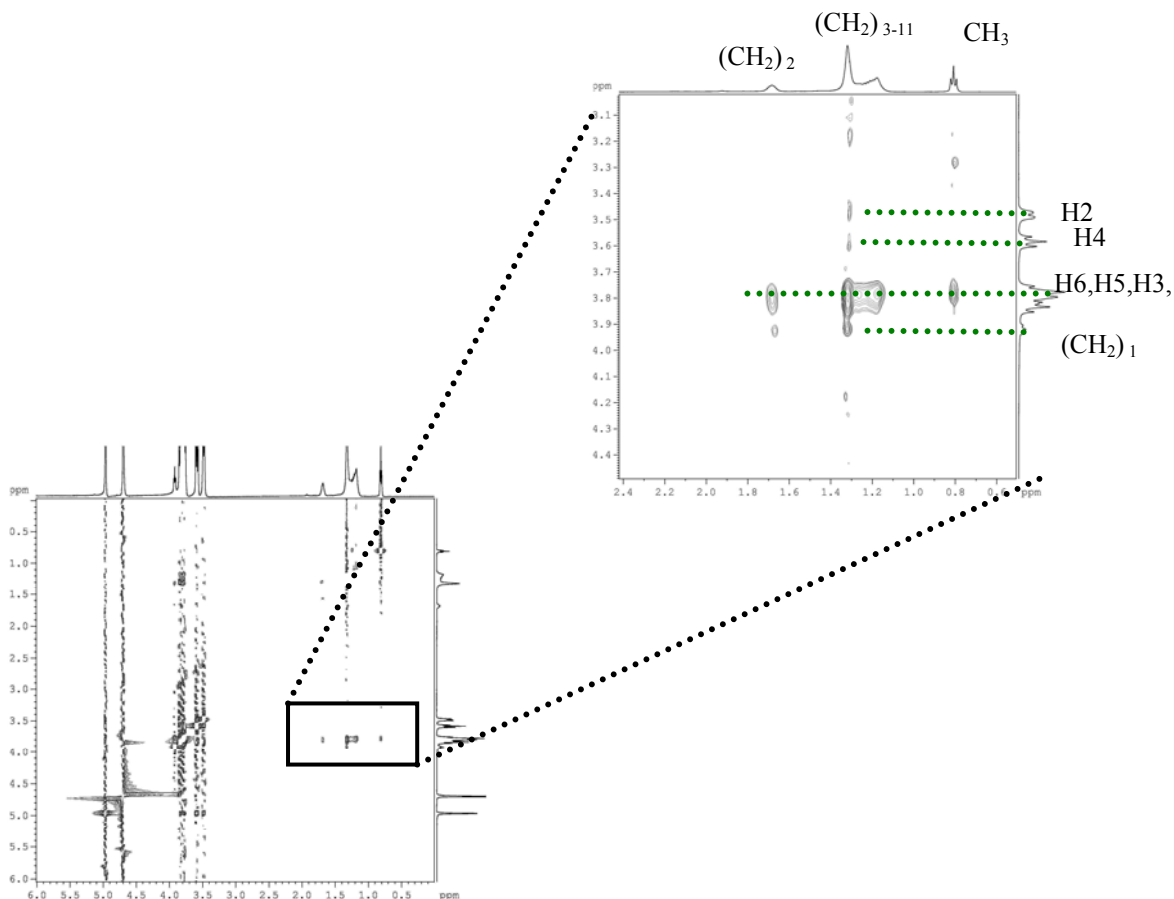


Figure III- 22 : Carte T-ROESY (400 MHz, 25°C, D₂O, 3mM en C10 et 3mM en α -CD) du mélange α -CD : C12 avec le rapport 1:1

Nous pouvons voir d'après la carte T-ROESY pour le rapport 1:1, l'existence d'une très légère tache de corrélation entre les H₂, H₄ de la cyclodextrine et les CH₂ centraux de la chaîne C12. Les CH₂ centraux et en α de la tête polaire semble interagir plus fortement avec les H₆ que les H₃, suggérant que le sens d'inclusion de la cyclodextrine se ferait plutôt du côté des H₆.

En ce qui concerne la carte T-ROESY du mélange 4 :1 (CD : C12) (figure III-23), nous pouvons voir une dispersion des signaux des CH₂ centraux de la chaîne en C12 ce qui indique une double inclusion.

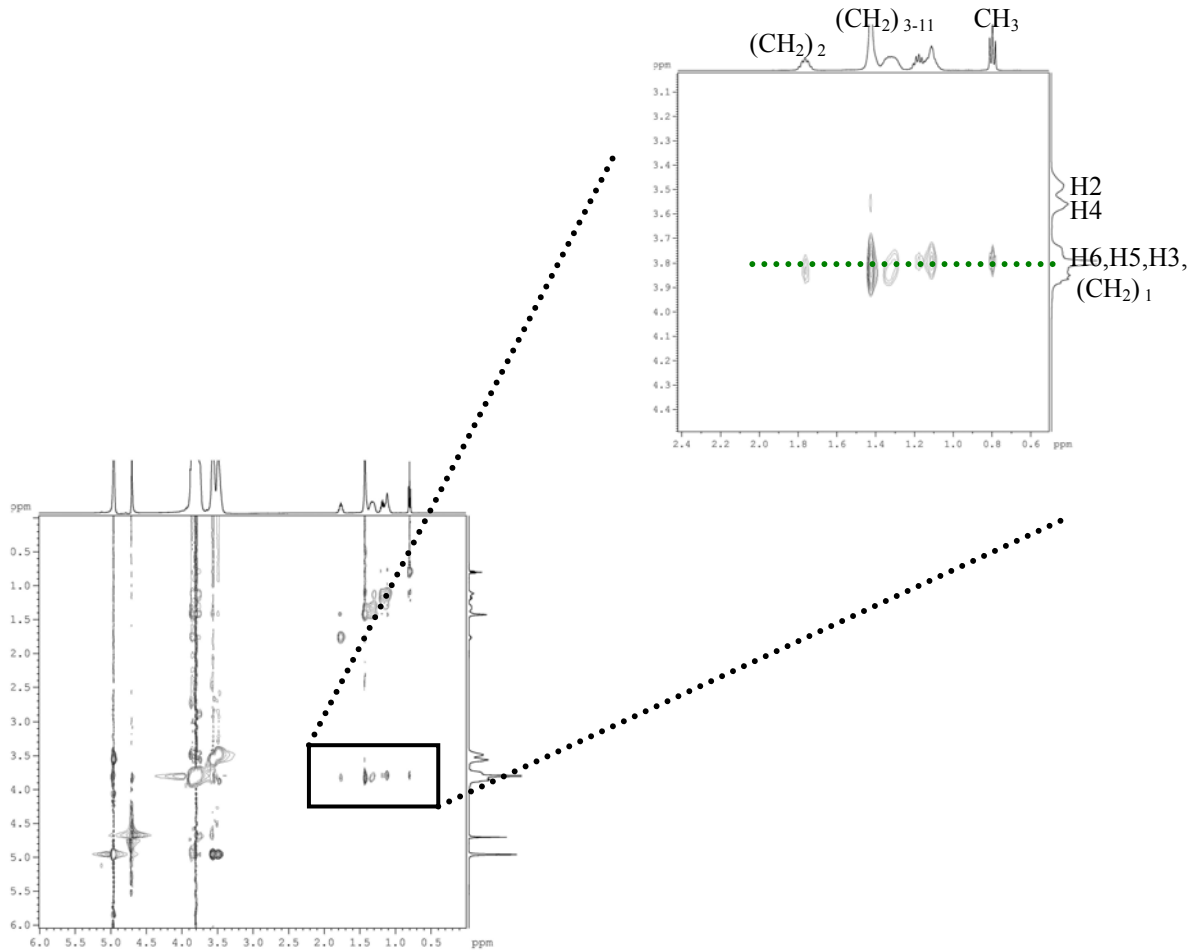


Figure III- 23 : Carte T-ROESY (400 MHz, 25°C, D₂O, 3mM en C10 et 3mM en α -CD) du mélange α -CD : C12 avec le rapport 4:1

Conclusion : Dans le cas de l'inclusion des chaînes de tensioactif en C12 et l' α -CD il semblerait qu'il y a des doubles inclusion de cyclodextrines pour un rapport 1:1 et un rapport 4:1. Ce résultat rejoint ce que nous avons observé lors des expériences d'ITC.

1.5 Effet de l'ajout de cyclodextrines (α et β) sur le comportement rhéologique des différents lots de HA-alkylé.

Dans cette partie, nous allons montrer comment le comportement rhéologique de l'acide hyaluronique hydrophobiquement modifié peut être contrôlé par l'addition de cyclodextrines (α et β) libres.

Les mesures ont été effectuées sur les différents lots HA5C8-600, HA5C10-600 et HA5C12-600 à une concentration de 10g/L dans du PBS à 25°C. Cette étude nous permettra de vérifier l'effet de l'addition des cyclodextrines en fonction de la longueur de la chaîne

alkyle. Nous avons ajouté des quantités croissantes de cyclodextrines α et β , allant de 0,5 à 4 équivalents molaires de CDs par rapport aux chaînes alkyle greffées sur le polysaccharide.

I.5.1 Ajout des α -cyclodextrines sur les dérivés alkylés HA5C8-600, HA5C10-600 et HA5C12-600.

La figure III-24 montre l'effet de l'ajout de quantités croissantes d' α -CD sur le dérivé alkylé HA5C8-600.

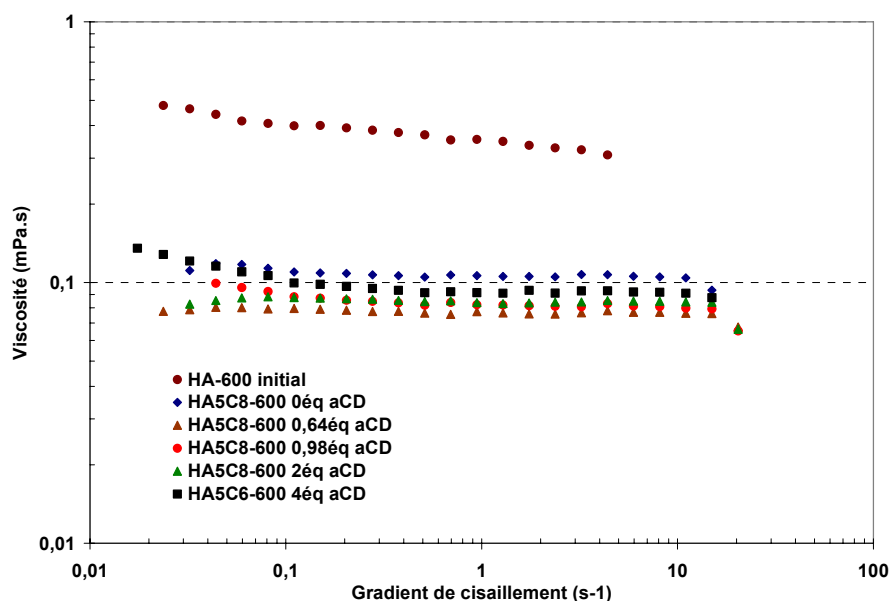


Figure III- 24 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour le dérivé HA5C8-600 en présence de quantités croissantes en α -CD. La concentration en polymère est de 10g/L dans du PBS à 25°C.

Comme décrit dans le chapitre précédent, le dérivé HA5C8-600 donne une solution de viscosité inférieure à celle du HA initial. La formation d'agrégats et le repliement de la chaîne polymère dus à la présence de chaînes alkyle hydrophobes seraient responsables de cette baisse de viscosité. La chaîne C8 semble être trop courte pour permettre la formation prédominante de jonctions inter-chaînes observée avec les chaînes C10 et C12. L'ajout de 0,5 équivalent de cyclodextrines dissocie partiellement les agrégats, conduisant à la formation de petit amas d'agrégats. Une baisse de la viscosité par rapport au HA5C8-600 0éqCD est alors observée (schéma III-6). En ajoutant 1 équivalent de cyclodextrines, les agrégats se dissocient, de manière plus efficace, permettant une réorganisation des chaînes qui se traduit par une légère augmentation de la viscosité. Aucune différence significative n'est observable entre 1, 2 et 4 équivalents de cyclodextrines.

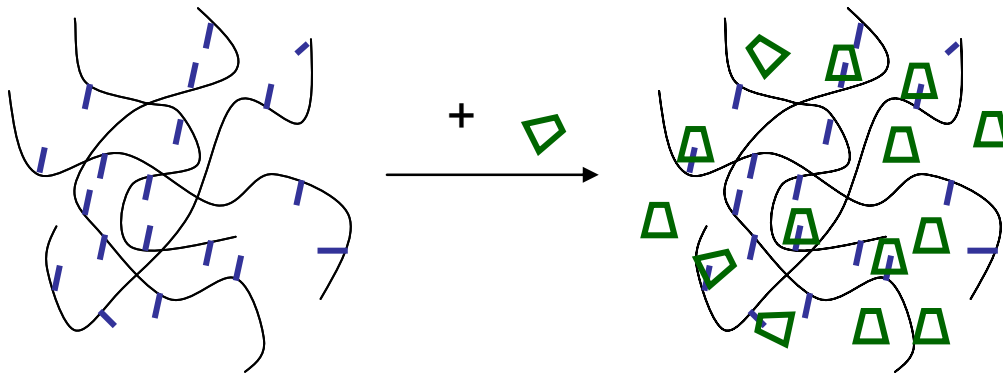


Schéma III- 6 : Représentation schématique du système HA5C8-600 avant et après ajout de CDs.

La figure III-25 montre l'effet de l'ajout de quantités croissantes d' α -CD sur le dérivé alkylé HA5C10-600.

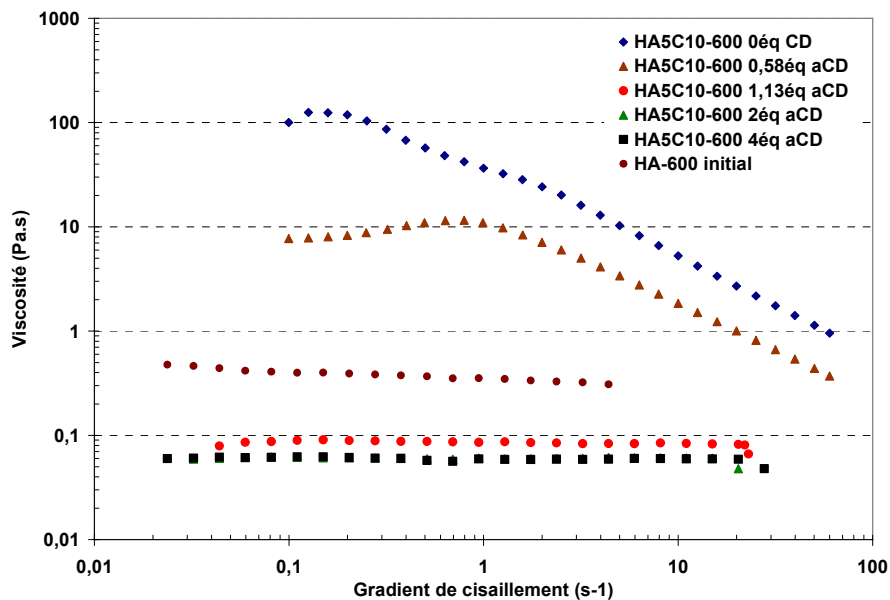


Figure III- 25 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour le dérivé HA5C10-600 avec des concentrations croissantes en α -CD. La concentration en polymère est de 10g/L dans du PBS à 25°C.

Comme décrit dans le chapitre précédent, le dérivé HA5C10-600 a un comportement associatif marqué. Les chaînons hydrophobes de longueur C10 s'associent, formant un réseau tridimensionnel qui se dissocie en augmentant le gradient de cisaillement. L'ajout de 0,5 équivalent de cyclodextrines dissocie légèrement ce réseau, conduisant à une baisse de la viscosité, par rapport au HA5C10-600 0éqCD, tout en conservant un comportement associatif (schéma III-7). En ajoutant 1 équivalent de cyclodextrines, le réseau tridimensionnel semble se dissocier conduisant à une viscosité inférieure à celle du HA initial, probablement à cause

de la formation de « paquets » d'agrégats. Par ailleurs, aucune différence significative n'est observable entre l'ajout de 2 et 4 équivalents de cyclodextrines.

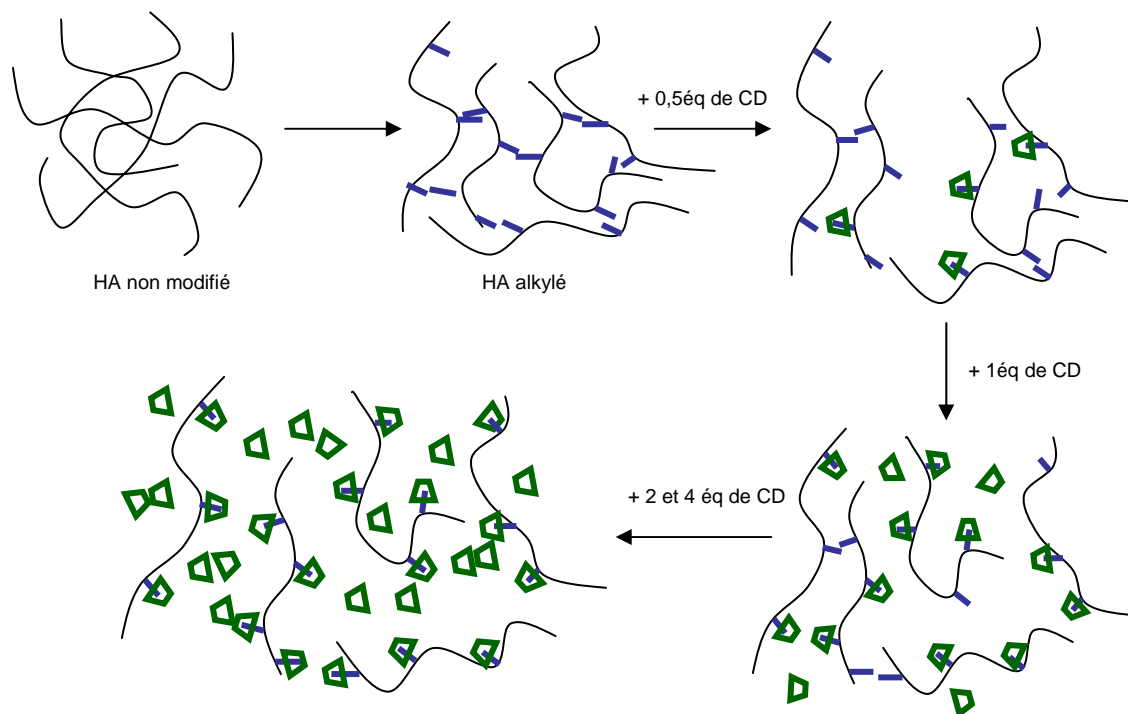


Schéma III- 7 : Représentation schématique du système HA5C10-600 avant et après ajout de CDs.

La figure III-26 montre l'effet de l'ajout de quantités croissantes d' α -CD sur le dérivé alkylé HA5C12-600.

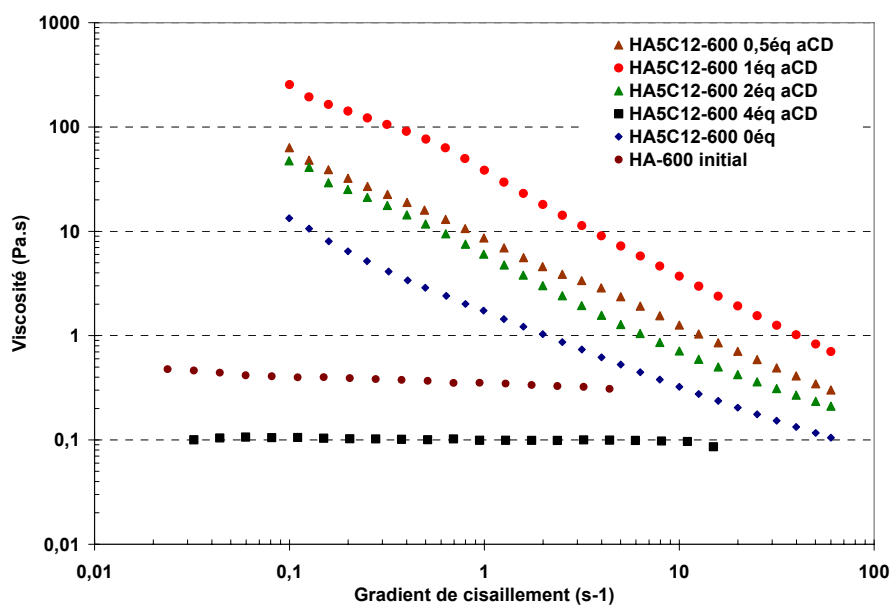


Figure III- 26 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour le dérivé HA5C12-600 avec des concentrations croissantes en α -CD. La concentration en polymère est de 10g/L dans du PBS à 25°C.

Des résultats remarquables ont été obtenus avec le dérivé alkylé possédant des chaînes hydrophobes en C12. Ces dérivés décrits dans le chapitre II présentaient des problèmes de solubilisation et de formation d'agrégats. L'ajout de cyclodextrines nous a permis de mettre en évidence ces agrégats.

En effet, l'ajout de 0,5 équivalent d' α -CD a pour effet d'augmenter la viscosité du dérivé HA5C12-600, atteignant une viscosité similaire à celle du réseau tridimensionnel du dérivé HA5C10-600. Cette augmentation pourrait s'expliquer par la dissociation d'agrégats du HA5C12-600 conduisant à la réorganisation du réseau tridimensionnel qui favorise la formation de nouvelles jonctions interchaînes.

L'ajout de 1 et 2 équivalents de cyclodextrines fait baisser la viscosité sans provoquer un effondrement du réseau tridimensionnel. Ceci serait dû au caractère trop hydrophobe de ce système. Par ailleurs, l'ajout de 4 équivalents de cyclodextrines fait chuter fortement la viscosité conduisant à la dissociation totale du réseau physique associatif (schéma III-8).

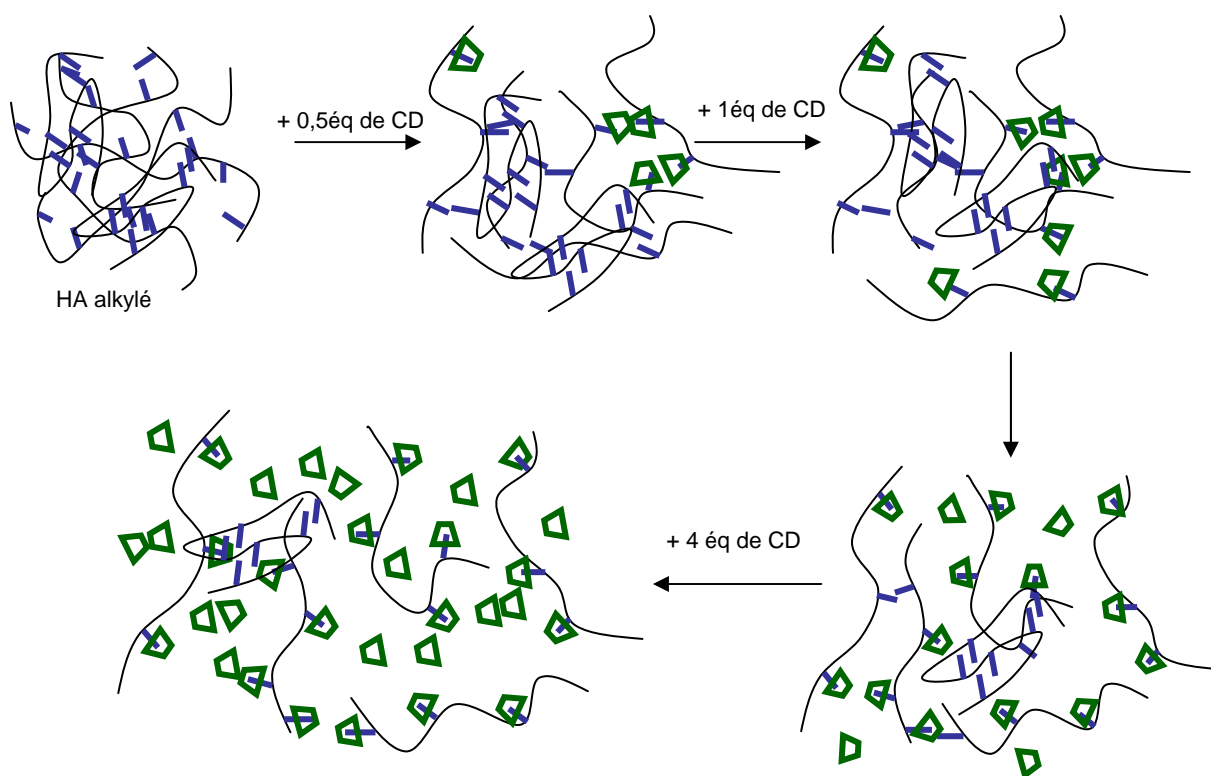


Schéma III- 8 : Représentation schématique du système HA5C12-600 avant et après ajout de CDs.

I.5.2 Ajout des β -cyclodextrines sur les dérivés alkylés HA5C8-600, HA5C10-600 et HA5C12-600.

Dans le cas de la β -CD, nous avons obtenus exactement les mêmes résultats de viscosité que pour l' α -CD. Dans la mesure où les courbes sont identiques, nous avons préféré représenter la variation de la viscosité (pour un gradient de cisaillement de $0,2 \text{ s}^{-1}$) en fonction du rapport $[\text{CD}]/[\text{chaîne alkyle greffée}]$ (figure III-27) pour les trois dérivés HA5C8-600, HA5C10-600 et HA5C12-600.

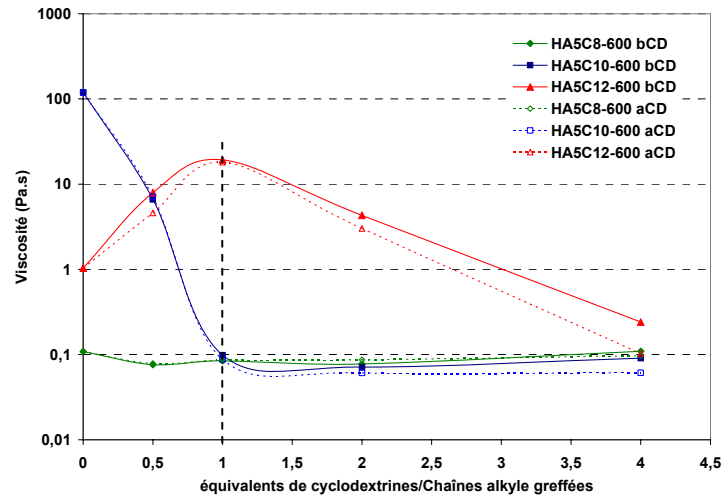


Figure III- 27 : Variation de la viscosité en fonction de la concentration en cyclodextrine pour les différents dérivés étudiés.

Dans le cas du HA5C8-600, nous pouvons voir qu'il n'y a pas d'effet significatif d'ajout de la cyclodextrine du fait vraisemblablement de la faible association entre les chaînes en C8 greffées, qui ne permet pas la formation de jonctions efficaces interchaînes conduisant à la formation du réseau tridimensionnel. Le HA5C10-600 a une viscosité élevée à l'état initial, ce qui indique que le réseau tridimensionnel est homogène, et que les associations hydrophobes sont fortes. Ces interactions sont dissociées par ajout de cyclodextrines et atteignent un plateau après l'ajout d'un équivalent molaire de cyclodextrines.

Pour le HA5C12-600, l'ajout de 1 éq de cyclodextrines, permet de renforcer le caractère associatif du polymère, vraisemblablement par « resolubilisation » de certaines chaînes polymères qui ne participaient pas à la formation du réseau 3D. La dissociation du réseau apparaît après l'ajout de 1 équivalent molaire de CD et ce réseau est détruit pour 4 équivalents. Ce comportement complexe est lié au caractère fortement hydrophobe du polysaccharide qui le rend partiellement soluble en milieu aqueux.

La figure III-25 montre par ailleurs que les viscosités obtenues après l'ajout de cyclodextrine en excès tendent vers une valeur commune de $\sim 0,1 \text{ Pa.s}$.

Or, la réaction d'alkylation du HA ne conduit pas normalement à sa dépolymérisation (cf chapitre II). Ce résultat pourrait donc traduire le fait que ces dérivés du HA alkylés complexés par des CDs en excès tendent à s'agréger en solution. Ceci se traduit alors par une diminution de la viscosité par rapport à celle du HA initial.

Enfin, ces résultats montrent aucune différence significative de comportement entre les α - et les β -CDs et ce, malgré des différences de propriétés de complexation mises en évidence par ITC (paramètres thermodynamiques) et par RMN (géométrie des complexes).

Des études antérieures au laboratoire, portant sur la complexation entre des dérivés du chitosane et du HA porteurs d'adamantanes ou de CDs et des molécules de CD ou d'adamantane libres, montrent une chute de la constante d'association des complexes due au greffage des molécules hôtes ou invitées sur le polymère. Cette baisse de K_a est liée à un terme entropique moins favorable.

Dans le présent travail, on peut penser que le greffage des chaînes alkyle sur le HA limite la formation des complexes 2:1 dans le cas des α -CDs. Dans la figure III-25, on peut évaluer la stœchiométrie apparente de complexation en utilisant l'approche utilisée par Alexandridis dans son étude [38]. On obtient ainsi une stœchiométrie apparente de 1 pour les différentes chaînes donnée par le point d'inflexion des courbes correspondantes aux chaînes en C10 et C12 (ligne en pointillée sur la figure III-27).

Ces résultats suggèrent donc que dans le cas du polymère, l' α -CD formerait préférentiellement des complexes 1 :1 avec les chaînes alkyle greffées, comme dans le cas de la β -CD. Par ailleurs, comme évoqué précédemment, le greffage des chaînes alkyle sur le polymère conduit à une baisse de la constante d'association des complexes. Ceci pourrait alors expliquer la faible différence de comportement de l' α -CD par rapport à la β -CD observée vis-à-vis de la complexation avec les dérivés alkylés du HA.

Ces résultats laissent ainsi penser que pour d'éventuelles applications, il serait plus judicieux d'utiliser la β -CD plus abondante et moins coûteuse que l' α -CD pour moduler la viscosité des solutions de HA-alkylés.

Nous avons par la suite effectué quelques simulations pour étudier le sens d'inclusion de la cyclodextrine dans la chaîne tensioactive.

1.6 Etude de la complexation de chaînes alkyle en C8, C10 et C12 par les CD (α et β) par modélisation moléculaire.

De nombreuses études portent sur la détermination de la structure des complexes de cyclodextrines par analyse des rayons X, RMN ou dichroïsme circulaire. Des méthodes informatiques tels que les calculs par la chimie computationnelle, la mécanique moléculaire et la dynamique moléculaire fournissent de nombreuses informations pour prédire ou pour interpréter les propriétés géométriques et énergétiques des systèmes moléculaires. La simulation par dynamique moléculaire consiste à calculer l'évolution d'un système de particules au cours du temps. Le calcul de l'énergie de la molécule est étroitement lié à sa structure et à sa conformation. Ces simulations servent de modèles structuraux et dynamiques pour la compréhension des résultats expérimentaux. Malgré cela, aucune étude portant sur la modélisation moléculaire de complexes α -CD : chaînes d'alkyle sulfate n'a été réalisée auparavant (à notre connaissance) [62, 63].

Ishikawa *et al.* ont été les premiers à publier une étude de modélisation moléculaire du complexe α -CD : dodécyle triméthylamonium de bromure (C12, DTAB) (Figure III-28) [64].

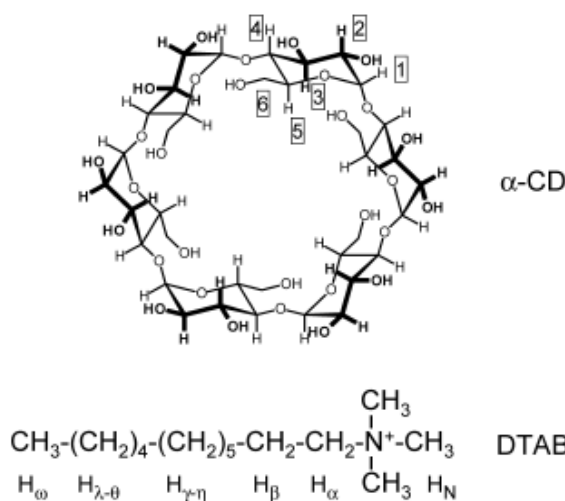


Figure III- 28 : structure chimique du DTAB et de l' α -CD [64].

Dans ces travaux, les mouvements moléculaires de l' α -CD sur la chaîne dodécyle du DTAB ont été étudiés par des simulations de dynamique moléculaire. Pour la molécule d' α -CD, les mouvements rotationnels et translationnels, la déformation du macrocycle ainsi que le mouvement de l' α -CD le long de la chaîne alkylde ont été analysés (Figure III-29).

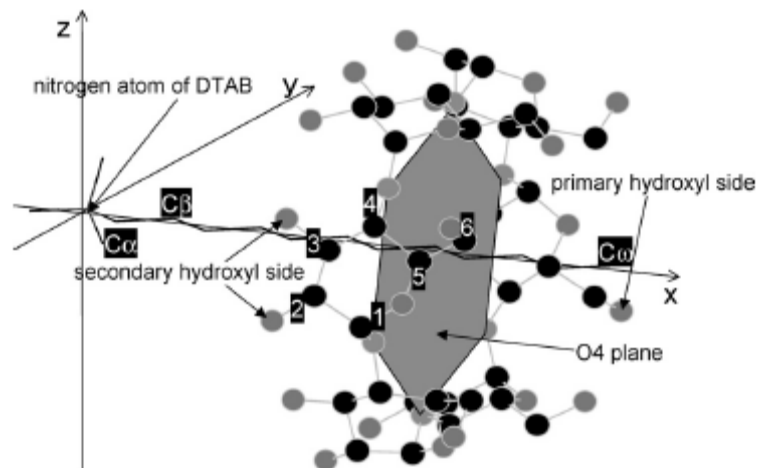


Figure III- 29 : Représentation schématique des mouvements translationnels de l' α -CD le long de la chaîne DTAB.

Lors de l'analyse des mouvements translationnels, toutes les liaisons C-C de la chaîne DTAB ont été fixées en conformation *trans* du plan *xy* (figure III-29). Cette analyse a permis de montrer que l' α -CD peut bouger le long du plan *xy* avec différents degrés de mouvement aléatoire.

Lors de l'analyse des mouvements rotationnels, les six atomes O4 de la molécule d' α -CD forme un hexagone, l'angle entre le plan *xy* et le plan vertical de l'hexagone est noté θ . Les données de simulations ont montré que la position la plus probable et la plus favorisée était pour un angle $\theta = 27,5^\circ$ (Figure III-30a et b).

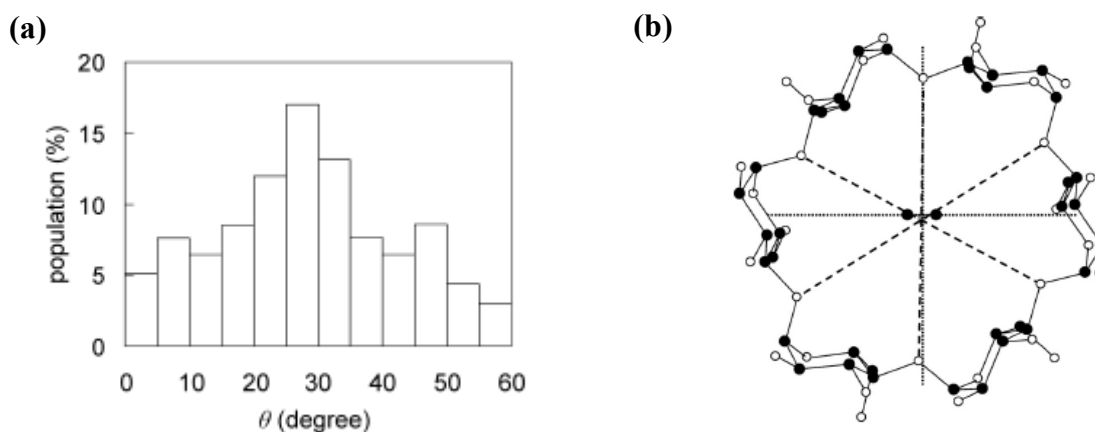


Figure III- 30 : Distribution des angles rotationnels à intervalles de 5 degrés (a). Représentation de la structure du complexe DTAB : α -CD la plus probable sur le plan *yz* (b).

Les résultats obtenus dans cette étude ont pu être comparés à une étude d'interaction du même complexe par résonance magnétique nucléaire (RMN) [61, 64]. En associant les

résultats de ces deux études, Ishikawa *et al* ont représenté sur la figure III-31 les structures de dynamique moléculaire les plus probables obtenues par les différentes méthodes de calculs.

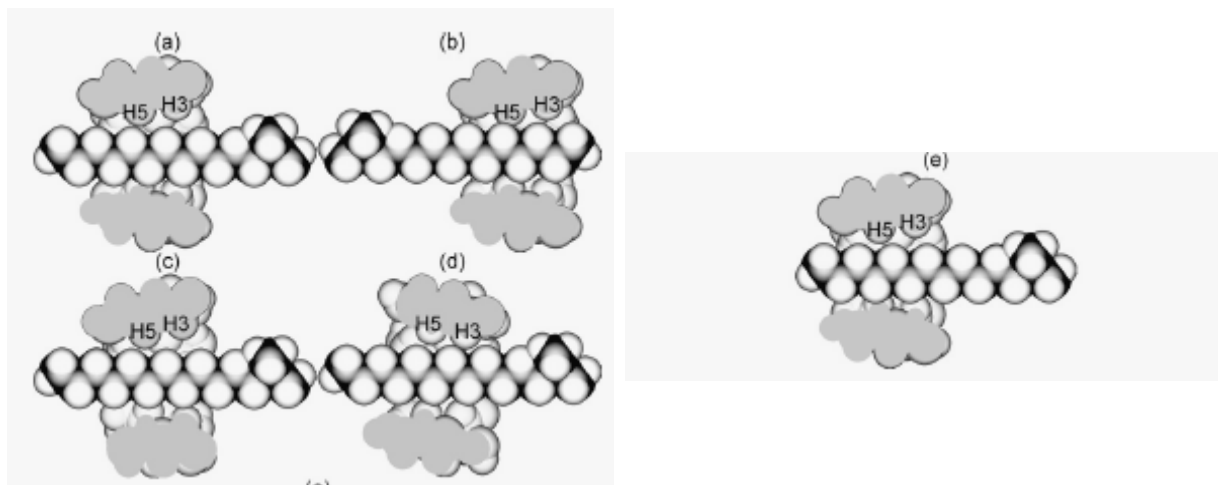


Figure III- 31 : Les structures de dynamique moléculaire les plus probables pour le complexe secondaire (a), le complexe primaire (b), la structure calculée par mécanique moléculaire utilisant un champ de force CVFF (c), la structure calculée par mécanique moléculaire utilisant un champ de force Amber (d) et la structure du complexe secondaire obtenue par RMN.

L'étude de modélisation moléculaire du complexe α -CD-DTAB est la première étude à ce jour qui porte sur l'étude de la complexation de cyclodextrine avec des chaînes alkyle par modélisation moléculaire. Malheureusement, cette étude ne démontre pas la formation du complexe 2 :1 (CD : DTAB) alors que celles-ci est suggérée dans l'analyse RMN.

Afin de compléter les résultats obtenus par titration calorimétrique et par RMN, nous avons décidé d'effectuer une analyse par modélisation moléculaire des différents systèmes α -CD et β -CD avec les tensioactifs C8, C10 et C12. Cette étude nous permettra d'obtenir les structures les plus probables pour ces différents systèmes.

La première étape de cette synthèse a consisté en la recherche de la position la plus favorable pour l'inclusion de la chaîne tensioactive dans la cavité de la cyclodextrine. Pour cela, nous avons testé 2 possibilités d'inclusion représentées sur la figure III-32.

Un des problèmes majeurs rencontrés dans l'étude conformationnelle des biomolécules par modélisation moléculaire est la prise en compte de l'environnement moléculaire du système étudié, c'est-à-dire dans la plupart des cas le solvant. L'ajout de molécules de solvant a pour effet d'augmenter considérablement le nombre d'atomes déjà important du système moléculaire, ce qui a pour conséquence d'accroître les temps de calculs. Dans le but de ramener les temps de calcul à un seuil plus raisonnable tout en conservant des conditions de

modélisation suffisamment réalistes, les simulations effectuées dans cette étude ce feront dans le vide sans présence de molécules d'eau.

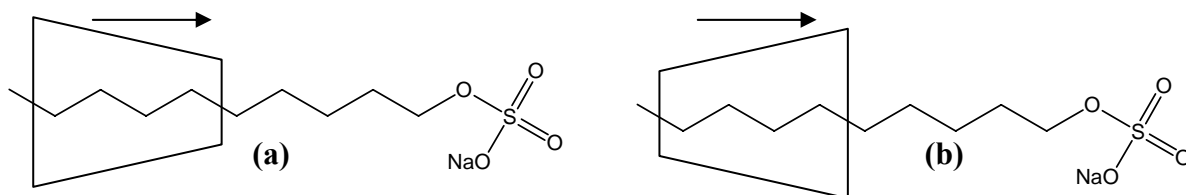


Figure III- 32 : Représentation des 2 possibilités d'inclusion de la chaîne alkyle (C10) dans les cavités des α - et β -CDs sans présence de solvant.

L'énergie potentielle du système moléculaire et les forces qui s'exercent en son sein sont décrites par une fonction empirique qui est la somme de différentes contributions énergétiques (éq III-3). Ces contributions énergétiques sont relatives d'une part à la géométrie interne du système (interactions liées), décrivant les elongations des liaisons, les déformations angulaires et les angles de torsion, et d'autre part aux interactions non liées entre les atomes séparés par plus de trois liaisons (interactions électrostatiques, interactions de Van der Waals et liaisons hydrogène). Tout écart géométrique par rapport à une position d'équilibre associée aux longueurs de liaison, angles de valence et angles de torsion, fait varier ces contributions internes et se traduit par une augmentation de l'énergie du système. L'énergie du système est donc fonction des positions atomiques. La fonction d'énergie potentielle se présente sous la forme suivante :

$$E_{\text{pot}} = E_{\text{interne}} + E_{\text{externe}} = E_{\text{liaison}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{VDW}} + E_{\text{elec}} + E_{\text{liaison H}} + \dots \quad \text{éq III- 2}$$

Chaque configuration représentée sur la figure III-32 a été équilibrée pendant 500ps. Nous avons représenté sur la figure suivante les moyennes de l'énergie totale pour chaque conformation.

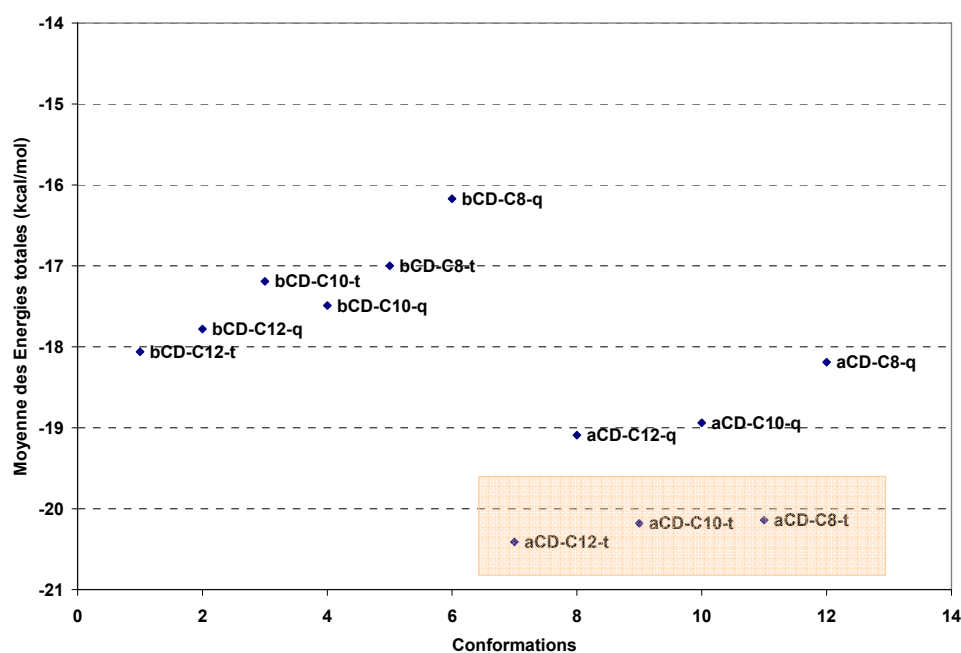


Figure III- 33 : Représentation de la moyenne des Energies totales pour les différentes conformations.

A partir de cette étude, nous pouvons voir que l'état d'équilibre le plus favorable pour la complexation avec la cyclodextrine semble être de type tête (t) ; c'est-à-dire que les H6 de la cyclodextrine sont proche de la tête polaire illustré dans la figure III-32 (a). Nous pouvons voir sur le graphique que les chaînes les plus longues sont les plus énergétiquement favorables et que les complexes avec l' α -CD semblent plus stables que les complexes de β -CD.

La figure III-34 montre les trois conformations les plus favorables issues de la complexation entre l' α -CD avec les chaînes en C8, C10 et C12.

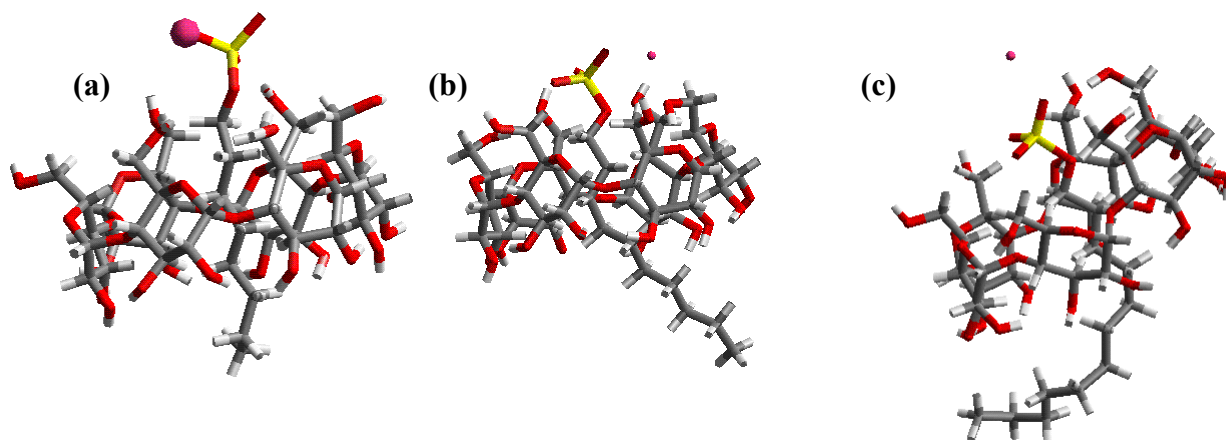


Figure III- 34 : Représentation des configurations à l'état d'équilibre pour les complexes (a) α -CD – C8 de type « tête », (b) α -CD – C10 de type « tête » et α -CD – C12 de type « tête ».

Par la suite nous avons généré différents systèmes de tensioactifs (TA) C8, C10, et C12 avec l' α -CD et la β -CD pour des complexes 2:1 (CD:TA) qui sont représentés sur la figure III-35.

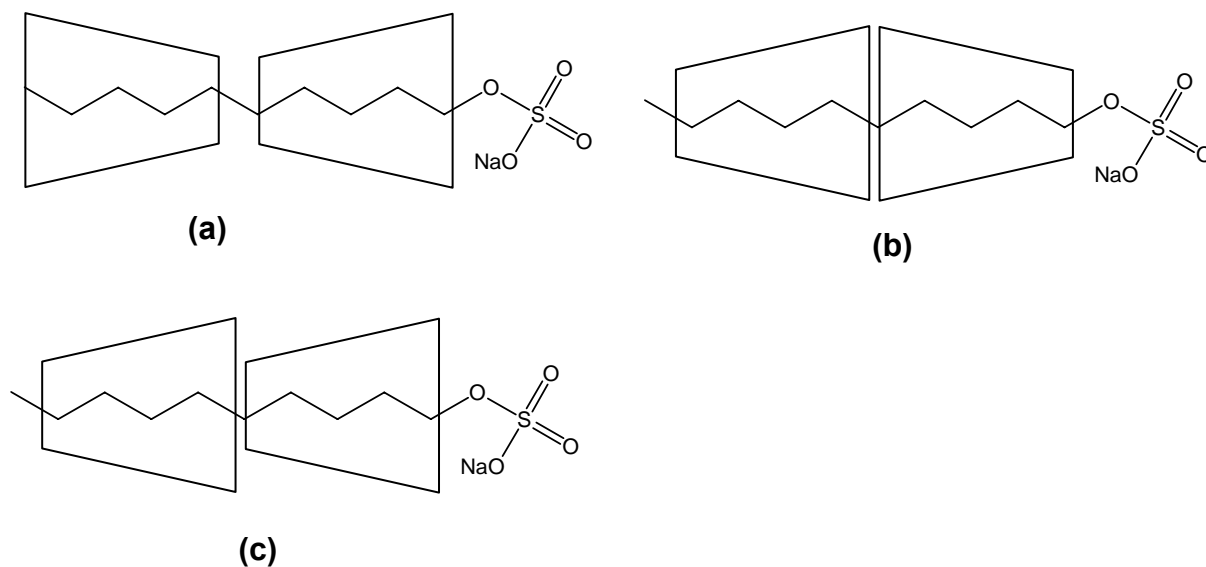


Figure III- 35 : Représentation schématique des différentes possibilités d'association des complexes d'inclusion CD : TA (2 :1 tête-tête (a), 2 :1 queue-queue (b), 2 :1 tête-queue (c)).

Chaque configuration a été équilibrée pendant 500ps et nous avons calculé l'énergie d'interaction entre les deux cyclodextrines et la chaîne tensioactive. Pour chaque conformation, nous avons calculé la moyenne de l'énergie totale que nous avons reportée dans la figure III-34.

Nous avons nommé « tt » les structures de type tête-tête (figure III-35 (a)), « qq » les structures de type queue-queue (figure III-35 (b)) et « tq » les structures de type tête-queue (figure III-35 (c)).

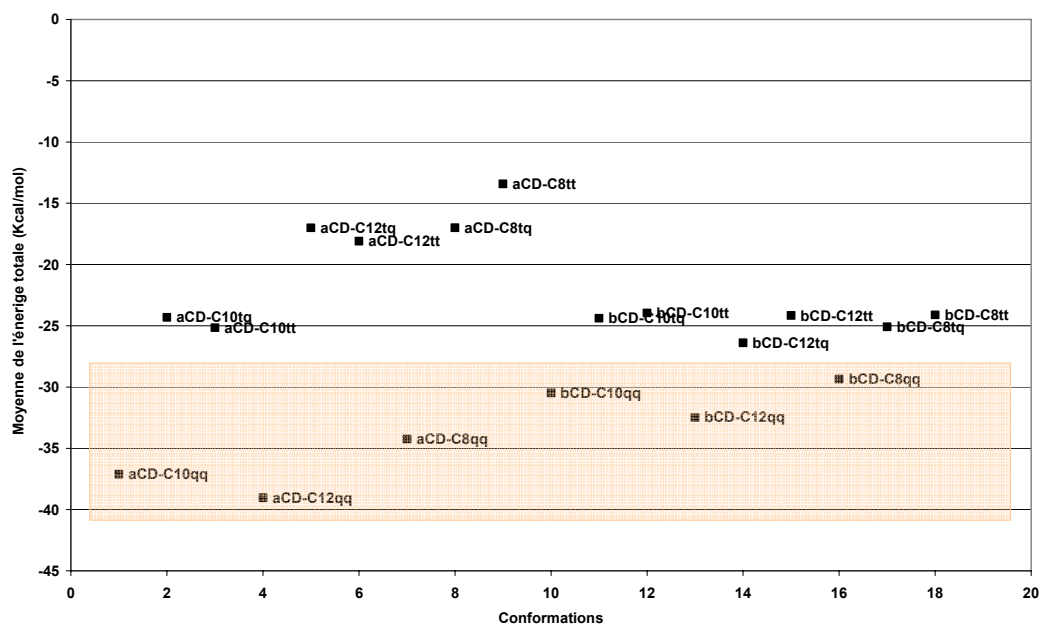


Figure III- 36 : Représentation de la moyenne des Energies totales pour les différentes configurations.

A partir de cette figure, nous pouvons voir que les structures les plus énergétiquement favorables sont celles de type « queue-queue ». Nous pouvons noter que les α -CDs forment des complexes énergétiquement plus stables que les β -CDs et que les complexes avec les chaînes alkyle les plus longues sont énergétiquement plus favorables. Ces résultats sont en bon accord avec les résultats obtenus en calorimétrie.

La figure III-37 (a, b et c) montre les trois configurations les plus favorables issues de la complexation entre l' α -CD avec les chaînes en C8, C10 et C12.

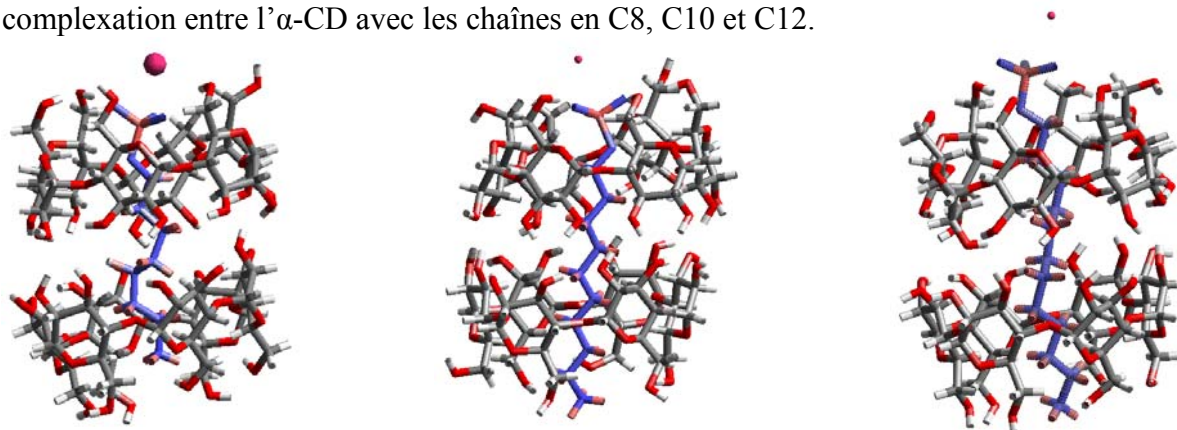


Figure III- 37 : Représentation des configurations à l'état d'équilibre pour les complexes (a) α -CD – C8 de type « queue-queue », (b) α -CD – C10 de type « queue-queue » et α -CD – C12 de type « queue-queue ».

La formation du complexe 2:1 n'est pas énergétiquement la plus favorable avec les chaînes en C8 par rapport aux chaînes en C10 et C12. Nous avons représenté ci-dessous les différentes

trajectoires de cette configuration pour montrer comment se situe la deuxième cyclodextrine par rapport à la chaîne alkyle.

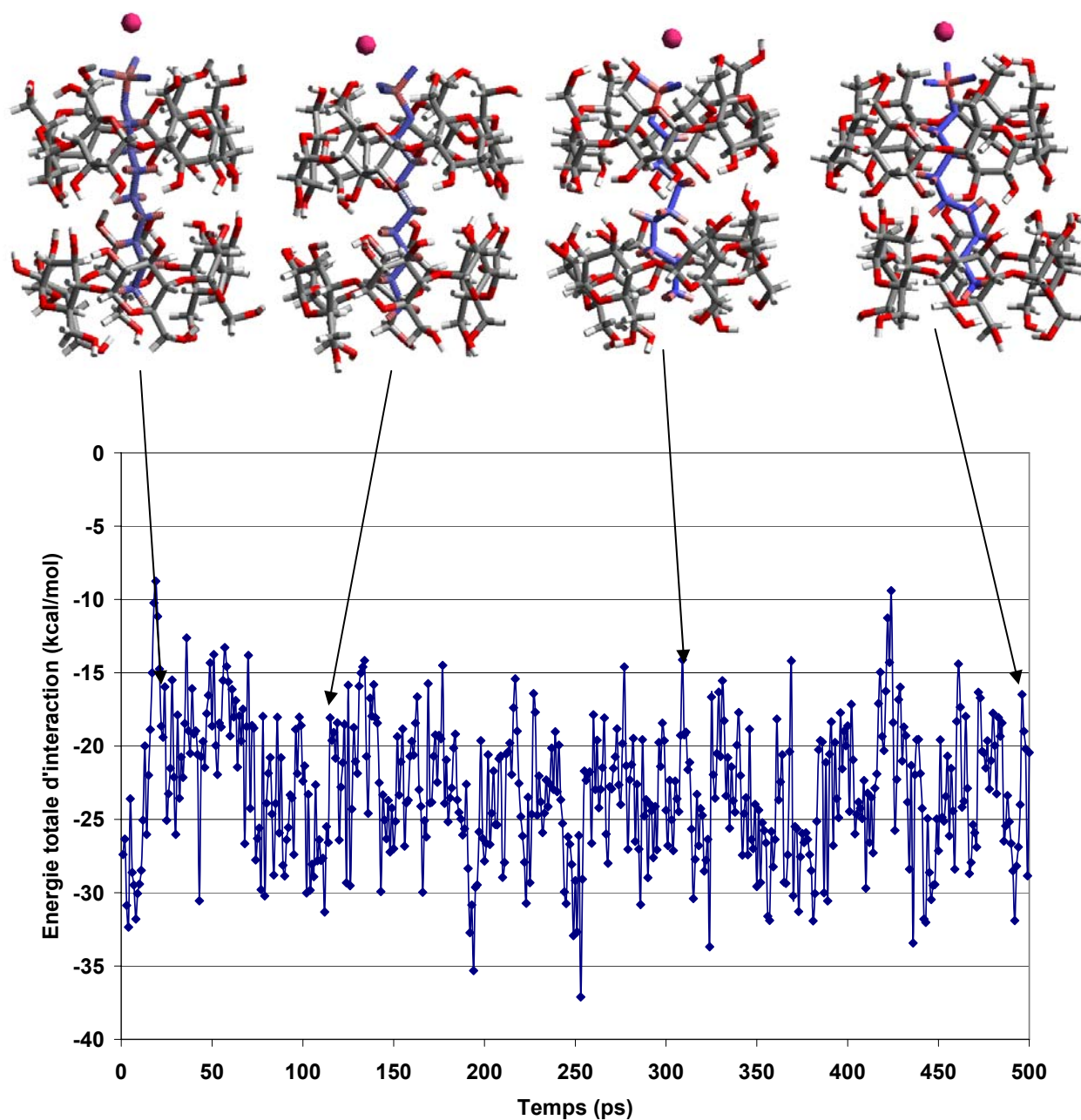


Figure III- 38 : Représentation des différentes trajectoires au cours de la dynamique moléculaire de 500ps.

Comme nous l'avons cité précédemment, l'ajout de molécules de solvant a pour effet d'augmenter considérablement le nombre d'atomes déjà important du système moléculaire, ce qui a pour conséquence d'accroître les temps de calculs (des mois de calculs au lieu de semaines de calculs). La figure III-38 montre que la deuxième cyclodextrine est proche de la terminaison de la chaîne alkyle mais sans que celle-ci soit complètement incluse. De plus si le

système était hydraté, nous pensons que les molécules d'eau vont s'insérer entre la tête polaire et la première cyclodextrine ce qui fera éloigner la deuxième cyclodextrine. La longueur de la chaîne en C8 est donc insuffisante pour permettre un bon enfilement des deux cyclodextrines. Ce résultat concorde avec ceux obtenus en RMN concernant la complexation de l' α -CD avec les chaînes en C8.

II Modulation des propriétés associatives par l'ajout de tensioactifs (TA).

Comme mentionné précédemment, une autre approche nous permettant de moduler les propriétés physico-chimiques du système consiste en l'introduction de molécules tensioactives libres dans le réseau physique. Contrairement aux cyclodextrines, les molécules tensioactives devraient renforcer les interactions hydrophobes jusqu'à une concentration limite pour provoquer ensuite la dissociation du réseau (schéma III-9).

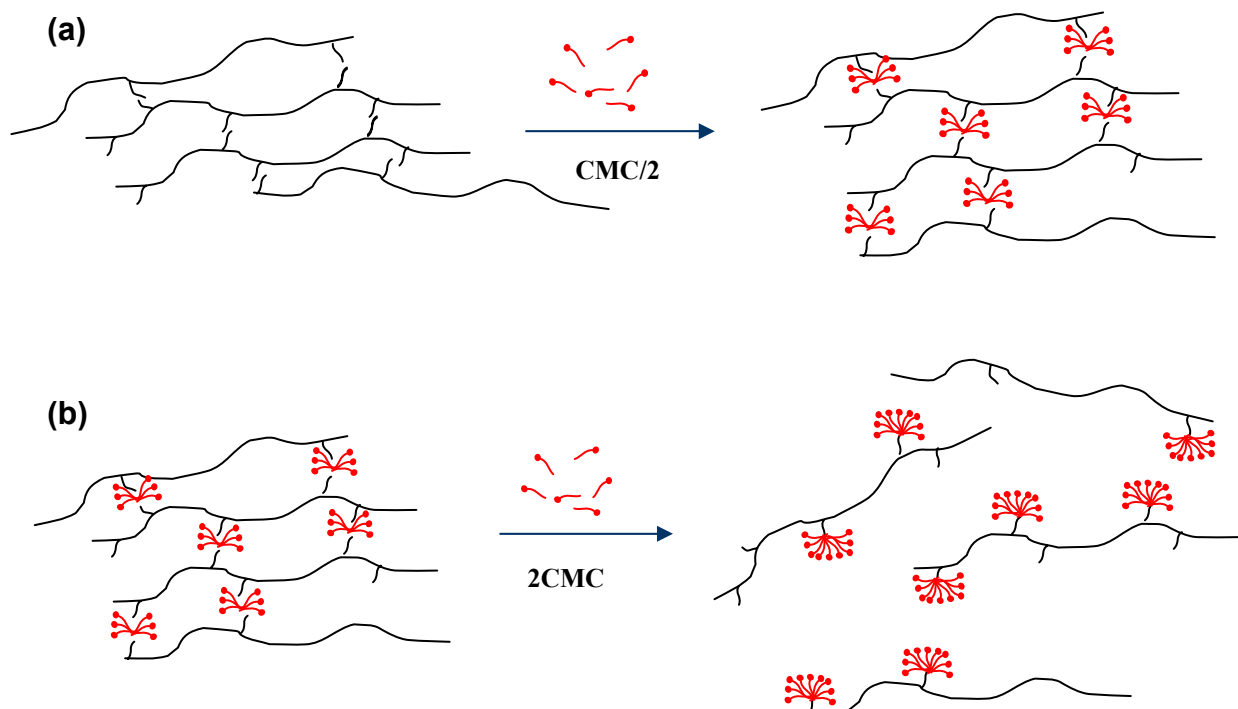


Schéma III- 9 : Représentation schématique de l'effet d'ajout de chaînes tensioactives : (a) à une concentration = $CMC/2$ et (b) à la concentration $2CMC$.

Lorsqu'on ajoute des tensioactifs à une concentration inférieure ou égale à la concentration critique micellaire (schéma III-9 (a)), il y a renforcement des interactions

hydrophobes. Si la quantité de tensioactif augmente (schéma III-9 (b)) au-delà de la CMC les répulsions électrostatiques sont prédominantes et le réseau physique se trouve déstabilisé (figure III-39).

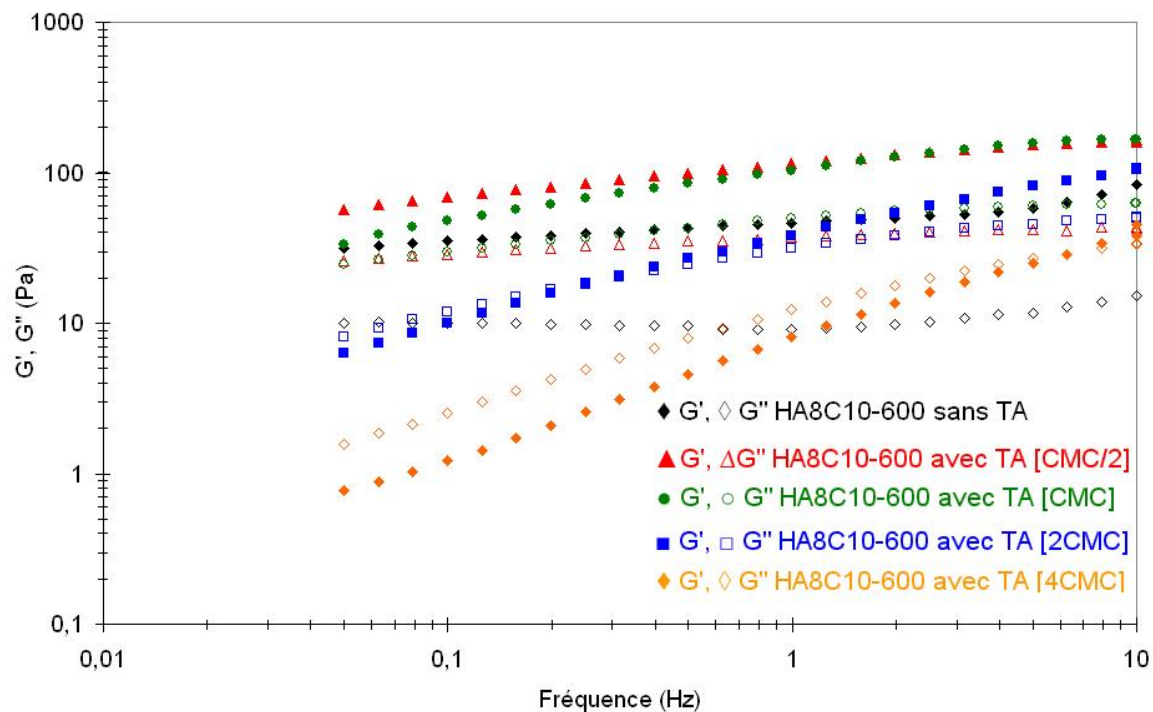


Figure III- 39 : Variation des modules élastiques et visqueux en fonction de la fréquence pour différentes concentrations en tensioactifs libres ajoutés au polymère.

La figure III-39 montre que les modules de conservation et de perte augmentent lors de l'ajout de quantités de tensioactifs inférieures ou égales à une concentration de CMC. Pour des quantités supérieures à CMC, nous avons une forte baisse des modules rhéologiques conduisant à l'effondrement du réseau associatif.

Conclusion

Cette étude de modulation des propriétés physico-chimiques des dérivés alkylés du HA par addition de petites molécules nous a permis de mettre en évidence différents phénomènes. L'addition de cyclodextrines libres au système associatif a permis non seulement de faire baisser les propriétés rhéologique d'un réseau physique homogène tel que les dérivés alkylés avec des greffons en C10, mais aussi de mettre en évidence la formation d'agrégats obtenus pour les dérivés alkylés avec des greffons en C12. Nous avons aussi à partir de cette étude, pu montrer que les réseaux physiques obtenus à partir des dérivés en C8 ne sont pas associatifs et que les chaînes sont trop courtes pour renforcer les propriétés physico-chimiques du HA.

Comme discuté précédemment, de nombreuses études avec des résultats contradictoires ont été publiées sur la complexation des cyclodextrines avec des tensioactifs. Nous avons pu obtenir des résultats reproductibles et mettant en évidence une double inclusion des α -CDs avec les tensioactifs et des mono-inclusions avec les β -CDs. Des études de la complexation CD-TA ont été effectuées par RMN et par calorimétrie confirmant ces résultats. Par ailleurs, les études réalisées par rhéologie sur la complexation des cyclodextrines avec les chaînes alkyle greffées sur le polymère ont montré que ce-dernier apportait une certaine rigidité qui empêche la double inclusion des cyclodextrines conduisant à des complexes 1:1 dans le cas des polymères alkylés.

L'ajout de chaînes de tensioactifs au réseau physique a permis de montrer que les propriétés physicochimiques du polymère associatif augmentent lors de l'ajout de quantités de tensioactifs inférieures ou égales à une concentration de CMC. Alors que pour des quantités supérieures à la CMC, nous avons obtenu une forte baisse des modules rhéologiques conduisant à l'effondrement du réseau associatif.

La modulation des propriétés physico-chimique nous permet de contrôler la viscosité du système associatif par addition de petites molécules tel que l' α -cyclodextrine ou des tensioactifs tel que le décyle sulfate de sodium (SDES).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rubinstein M, Dobrynin AV: **Solutions of associative polymers**. *Trends in Polymer Science (Cambridge, United Kingdom)* 1997, **5(6)**:181-186.
2. Winnik MA, Yekta A: **Associative polymers in aqueous solution**. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1997, **2(4)**:424-436.
3. Glass JE: **A perspective on the history of and current research in surfactant-modified, water-soluble polymers**. *Journal of Coatings Technology* 2001, **73(913)**:79-98.
4. Kroschwitz JI, Editor: **Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**; 1994.
5. Wang KT, Iliopoulos I, Audebert R: **Viscometric behavior of hydrophobically modified poly(sodium acrylate)**. *Polymer Bulletin (Berlin, Germany)* 1988, **20(6)**:577-582.
6. McCormick CL, Nonaka T, Johnson CB: **Water-soluble copolymers. 27. Synthesis and aqueous solution behavior of associative acrylamide/N-alkylacrylamide copolymers**. *Polymer* 1988, **29(4)**:731-739.
7. Xie X, Hogen-Esch TE: **Copolymers of N,N-Dimethylacrylamide and 2-(N-ethylperfluorooctanesulfonamido)ethyl Acrylate in Aqueous Media and in Bulk. Synthesis and Properties**. *Macromolecules* 1996, **29(5)**:1734-1745.
8. Iliopoulos I: **Association between hydrophobic polyelectrolytes and surfactants**. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1998, **3(5)**:493-498.
9. Magny B, Iliopoulos I, Audbert R, Piculell L, Lindman B: **Interactions between hydrophobically modified polymers and surfactants**. *Progress in Colloid & Polymer Science* 1992, **89**(Trends Colloid Interface Sci. VI):118-121.
10. Biggs S, Selb J, Candau F: **Effect of surfactant on the solution properties of hydrophobically modified polyacrylamide**. *Langmuir* 1992, **8(3)**:838-847.
11. Iliopoulos I, Wang TK, Audebert R: **Viscometric evidence of interactions between hydrophobically modified poly(sodium acrylate) and sodium dodecyl sulfate**. *Langmuir* 1991, **7(4)**:617-619.
12. Kwak JCT, Editor: **Polymer-Surfactant Systems**. , vol. 77; 1998.
13. Malmsten M: **Surfactants and Polymers in Drug Delivery**; 2002.
14. Galant C, Kjoniksen A-L, Nguyen GTM, Knudsen KD, Nystroem B: **Altering Associations in Aqueous Solutions of a Hydrophobically Modified Alginate in the Presence of β -Cyclodextrin Monomers**. *Journal of Physical Chemistry B* 2006, **110(1)**:190-195.

15. Harada A: **Supramolecular polymers based on cyclodextrins.** *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 2006, **44**(17):5113-5119.
16. Harada A: **Construction of supramolecular structures from cyclodextrins and polymers.** *Carbohydrate Polymers* 1997, **34**(3):183-188.
17. Harada A: **Supramolecular assemblies through macromolecular recognition by cyclodextrins.** *Supramolecular Science* 1996, **3**(1-3):19-23.
18. Harada A: **Preparation and structures of supramolecules between cyclodextrins and polymers.** *Coordination Chemistry Reviews* 1996, **148**:115-133.
19. Hashidzume A, Tomatsu I, Harada A: **Interaction of cyclodextrins with side chains of water soluble polymers: A simple model for biological molecular recognition and its utilization for stimuli-responsive systems.** *Polymer* 2006, **47**(17):6011-6027.
20. Pozuelo J, Mendicuti F, Mattice WL: **Inclusion Complexes of Chain Molecules with Cycloamyloses. 2. Molecular Dynamics Simulations of Polyrotaxanes Formed by Poly(ethylene glycol) and α -Cyclodextrins.** *Macromolecules* 1997, **30**(12):3685-3690.
21. Ceccato M, Lo Nostro P, Baglioni P: **α -Cyclodextrin/polyethylene glycol polyrotaxane: a study of the threading process.** *Langmuir* 1997, **13**(9):2436-2439.
22. Zhang H, Hogen-Esch TE, Boschet F, Margaillan A: **Complex Formation of β -Cyclodextrin- and Perfluorocarbon-Modified Water-Soluble Polymers.** *Langmuir* 1998, **14**(18):4972-4977.
23. Sandier A, Brown W, Mays H, Amiel C: **Interaction between an Adamantane End-Capped Poly(ethylene oxide) and a β -Cyclodextrin Polymer.** *Langmuir* 2000, **16**(4):1634-1642.
24. David C, Millot MC, Sebille B: **High-performance liquid chromatographic study of the interactions between immobilized beta-cyclodextrin polymers and hydrophobically end-capped polyethylene glycols.** *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 2001, **753**(1):93-99.
25. Karlson L, Thuresson K, Lindman B: **Cyclodextrins in Hydrophobically Modified Poly(ethylene glycol) Solutions: Inhibition of Polymer-Polymer Associations.** *Langmuir* 2002, **18**(23):9028-9034.
26. Galant C, Amiel C, Wintgens V, Sebille B, Auvray L: **Ternary Complexes with Poly(β -cyclodextrin), Cationic Surfactant, and Polyanion in Dilute Aqueous Solution: A Viscometric and Small-Angle Neutron Scattering Study.** *Langmuir* 2002, **18**(25):9687-9695.
27. Liao D, Dai S, Tam KC: **Rheological properties of hydrophobic ethoxylated urethane (HEUR) in the presence of methylated β -cyclodextrin.** *Polymer* 2004, **45**(25):8339-8348.
28. Kjoniksen A-L, Galant C, Knudsen KD, Nguyen GTM, Nystroem B: **Effects of β -Cyclodextrin Addition and Temperature on the Modulation of Hydrophobic**

- Interactions in Aqueous Solutions of an Associative Alginate.** *Biomacromolecules* 2005, **6**(6):3129-3136.
29. Szejtli J: **Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry.** *Chemical Reviews (Washington, D C)* 1998, **98**(5):1743-1753.
30. Charlot A, Auzely-Velty R: **Synthesis of Novel Supramolecular Assemblies Based on Hyaluronic Acid Derivatives Bearing Bivalent β -Cyclodextrin and Adamantane Moieties.** *Macromolecules* 2007, **40**(4):1147-1158.
31. Kohnke FH, Mathias JP, Stoddart JF: **Substrate-directed synthesis: the rapid assembly of novel macropolycyclic structures via stereoregular Diels-Alder oligomerizations.** *Topics in Current Chemistry-Supramolecular Chemistry I* 1993, **165**:1-69.
32. Saenger W: **Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry.** *Angewandte Chemie* 1980, **92**(5):343-361.
33. Connors KA: **The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution.** *Chemical Reviews (Washington, D C)* 1997, **97**(5):1325-1357.
34. Harata K: **Structural Aspects of Stereodifferentiation in the Solid State.** *Chemical Reviews (Washington, D C)* 1998, **98**(5):1803-1827.
35. Hunt MA, Tonelli AE, Balik CM: **Effect of Guest Hydrophobicity on Water Sorption Behavior of Oligomer/ α -Cyclodextrin Inclusion Complexes.** *Journal of Physical Chemistry B* 2007, **111**(15):3853-3858.
36. Guo X, Abdala AA, May BL, Lincoln SF, Khan SA, Prud'homme RK: **Rheology control by modulating hydrophobic and inclusion associations in modified poly(acrylic acid) solutions.** *Polymer* 2006, **47**(9):2976-2983.
37. Guo X, Abdala AA, May BL, Lincoln SF, Khan SA, Prud'homme RK: **Novel associative polymer networks based on cyclodextrin inclusion compounds.** *Macromolecules* 2005, **38**(7):3037-3040.
38. Tsianou M, Alexandridis P: **Control of the Rheological Properties in Solutions of a Polyelectrolyte and an Oppositely Charged Surfactant by the Addition of Cyclodextrins.** *Langmuir* 1999, **15**(23):8105-8112.
39. Wan Yunus WMZ, Taylor J, Bloor DM, Hall DG, Wyn-Jones E: **Electrochemical measurements on the binding of sodium dodecyl sulfate and dodecyltrimethylammonium bromide with α - and β -cyclodextrins.** *Journal of Physical Chemistry* 1992, **96**(22):8979-8982.
40. Sun D-Z, Wang S-B, Song M-Z, Wei X-L, Yin B-L: **A Microcalorimetric Study of Host-Guest Complexes of α -Cyclodextrin with Alkyl Trimethyl Ammonium Bromides in Aqueous Solutions.** *Journal of Solution Chemistry* 2005, **34**(6):701-712.
41. Lindner K, Saenger W: **β -Cyclodextrin dodecahydrate: accumulation of water molecules in a hydrophobic cavity.** *Angewandte Chemie* 1978, **90**(9):738-740.

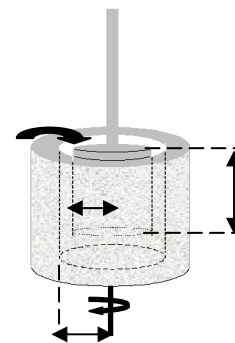
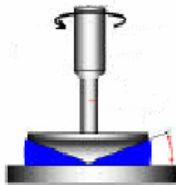
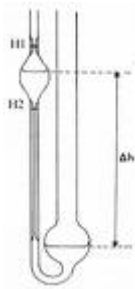
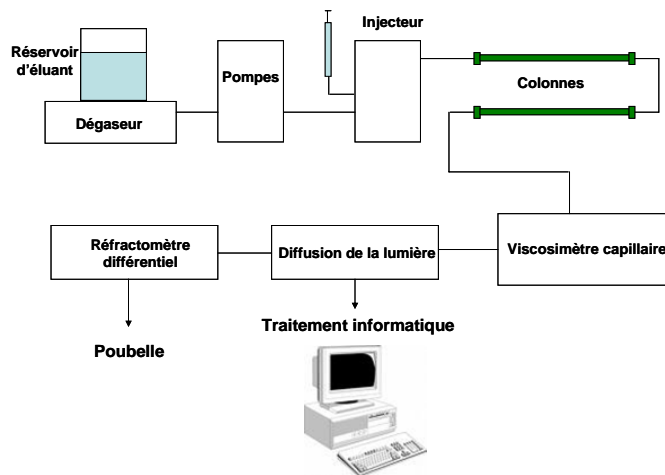
42. Okubo T, Kitano H, Ise N: **Conductometric studies on association of cyclodextrin with colloidal electrolytes.** *Journal of Physical Chemistry* 1976, **80**(24):2661-2664.
43. Satake I, Yoshida S, Hayakawa K, Maeda T, Kusumoto Y: **Conductometric determination of the association constants of β -cyclodextrin with amphiphilic ions.** *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1986, **59**(12):3991-3993.
44. Palepu R, Reinsborough VC: **Surfactant-cyclodextrin interactions by conductance measurements.** *Canadian Journal of Chemistry* 1988, **66**(2):325-328.
45. Saint Aman E, Serve D: **A conductimetric study of the association between cyclodextrins and surfactants - application to the electrochemical study of a mixed aqueous system: substrate, cyclodextrin, surfactant.** *Journal of Colloid and Interface Science* 1990, **138**(2):365-375.
46. Funasaki N, Yodo H, Hada S, Neya S: **Stoichiometries and equilibrium constants of cyclodextrin-surfactant complexations.** *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1992, **65**(5):1323-1330.
47. Dharmawardana UR, Christian SD, Tucker EE, Taylor RW, Scamehorn JF: **A surface tension method for determining binding constants for cyclodextrin inclusion complexes of ionic surfactants.** *Langmuir* 1993, **9**(9):2258-2263.
48. Park JW, Song HJ: **Association of anionic surfactants with β -cyclodextrin: fluorescence-probed studies on the 1:1 and 1:2 complexation.** *Journal of Physical Chemistry* 1989, **93**(17):6454-6458.
49. Sasaki KJ, Christian SD, Tucker EE: **Use of a visible spectral displacement method to determine the concentration of surfactants in aqueous solution.** *Journal of Colloid and Interface Science* 1990, **134**(2):412-416.
50. Shen X, Belletete M, Durocher G: **Studies of the Inclusion Complexation between a 3H-Indole and β -Cyclodextrin in the Presence of Urea, Sodium Dodecyl Sulfate, and 1-Propanol.** *Langmuir* 1997, **13**(22):5830-5836.
51. Xing H, Lin S-S, Yan P, Xiao J-X, Chen Y-M: **NMR Studies on Selectivity of β -Cyclodextrin to Fluorinated/Hydrogenated Surfactant Mixtures.** *Journal of Physical Chemistry B* 2007, **111**(28):8089-8095.
52. Guo Q-X, Li Z-Z, Ren T, Zhu X-Q, Liu Y-C: **Inclusion complexation of sodium alkyl sulfates with β -cyclodextrin. A ^1H NMR study.** *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* 1994, **17**(2):149-156.
53. Eli W, Chen W, Xue Q: **The association of anionic surfactants with β -cyclodextrin. An isothermal titration calorimeter study.** *Journal of Chemical Thermodynamics* 1999, **31**(10):1283-1296.
54. Mukerjee P, Mysels KJ: **Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems (NSRDS-NBS 36):** Drugs & the pharmaceutical sciences, vol. 122; 1971.

55. Funasaki N, Ohigashi M, Hada S, Neya S: **Surface Tensiometric Study of Multiple Complexation and Hemolysis by Mixed Surfactants and Cyclodextrins.** *Langmuir* 2000, **16**(2):383-388.
56. Fenyvesi E, Szente L, Russell NR, McNamara M: **Specific guest types.** *Comprehensive Supramolecular Chemistry* 1996, **3**:305-366.
57. Wilson LD, Verrall RE: **¹⁹F and ¹H NMR Investigation of Cyclodextrin/Fluorocarbon Alkyl Carboxylate Surfactant Inclusion Complexes.** *Langmuir* 1998, **14**(17):4710-4717.
58. Gonzalez-Gaitano G, Crespo A, Compostizo A, Tardajos G: **Study at a Molecular Level of the Transfer Process of a Cationic Surfactant from Water to β -Cyclodextrin.** *Journal of Physical Chemistry B* 1997, **101**(22):4413-4421.
59. Ishikawa S, Hada S, Neya S, Funasaki N: **Calculations of Molecular Surface Area Changes with Docking of Host and Guest and Applications to Cyclodextrin Inclusion.** *Journal of Physical Chemistry B* 1999, **103**(8):1208-1215.
60. Funasaki N, Ishikawa S, Neya S: **Proton NMR Study of α -Cyclodextrin Inclusion of Short-Chain Surfactants.** *Journal of Physical Chemistry B* 2003, **107**(37):10094-10099.
61. Funasaki N, Ishikawa S, Neya S: **1:1 and 1:2 Complexes between Long-Chain Surfactant and α -Cyclodextrin Studied by NMR.** *Journal of Physical Chemistry B* 2004, **108**(28):9593-9598.
62. Sherrod MJ: **Theoretical studies of cyclodextrins and their inclusion complexes.** *Spectroscopic and Computational Studies of Supramolecular Systems* 1992, **4**:187-205.
63. Lipkowitz KB: **Applications of Computational Chemistry to the Study of Cyclodextrins.** *Chemical Reviews (Washington, D C)* 1998, **98**(5):1829-1873.
64. Ishikawa S, Hirota S, Neya S, Funasaki N: **Molecular motions of α -cyclodextrin on a dodecyl chain studied by molecular dynamics simulations.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2006, **54**(4):528-534.
65. Bertrand P, Jonas A, Laschewsky A, Legras R: **Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties.** *Macromolecular Rapid Communications* 2000, **21**(7):319-348.
66. Decher G: **Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites.** *Science (Washington, D C)* 1997, **277**(5330):1232-1237.
67. Mason M, Vercrucyse KP, Kirker KR, Frisch R, Marecak DM, Prestwich GD, Pitt WG: **Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene, and polytetrafluoroethylene.** *Biomaterials* 2000, **21**(1):31-36.
68. Picart C, Lavalley P, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, Voegel JC: **Buildup Mechanism for Poly(L-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface.** *Langmuir* 2001, **17**(23):7414-7424.

69. Fukuda J, Khademhosseini A, Yeh J, Eng G, Cheng J, Farokhzad OC, Langer R: **Micropatterned cell co-cultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components.** *Biomaterials* 2006, **27**(8):1479-1486.
70. Richert L, Lavalle P, Payan E, Shu XZ, Prestwich GD, Stoltz J-F, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C: **Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects.** *Langmuir* 2004, **20**(2):448-458.
71. Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Silver J, Tabrizian M: **Bioactive Coatings of Endovascular Stents Based on Polyelectrolyte Multilayers.** *Biomacromolecules* 2003, **4**(6):1564-1571.
72. Burke SE, Barrett CJ: **Swelling Behavior of Hyaluronic Acid/Polyallylamine Hydrochloride Multilayer Films.** *Biomacromolecules* 2005, **6**(3):1419-1428.
73. Zhang S, Lu H, Zhou W: **Method for preparing bionic multilayered composite scaffold for repairing bone and cartilage defect.** In. Application: CN: (Huazhong University of Science and Technology, Peop. Rep. China). 2007: 9pp.
74. Zhang J, Senger B, Vautier D, Picart C, Schaaf P, Voegel J-C, Lavalle P: **Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid.** *Biomaterials* 2005, **26**(16):3353-3361.
75. Johansson Jan A, Halthur T, Herranen M, Soderberg L, Elofsson U, Hilborn J: **Build-up of collagen and hyaluronic acid polyelectrolyte multilayers.** *Biomacromolecules* 2005, **6**(3):1353-1359.
76. Schneider A, Vodouhe C, Richert L, Francius G, Le Guen E, Schaaf P, Voegel J-C, Frisch B, Picart C: **Multifunctional Polyelectrolyte Multilayer Films: Combining Mechanical Resistance, Biodegradability, and Bioactivity.** *Biomacromolecules* 2007, **8**(1):139-145.
77. Richert L, Boulmedais F, Lavalle P, Mutterer J, Ferreux E, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C: **Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking.** *Biomacromolecules* 2004, **5**(2):284-294.

CHAPITRE IV

PARTIE EXPERIMENTALE



I	PRODUITS CHIMIQUES ET SOLVANTS.....	178
II	MATERIELS ET METHODES GENERALES.....	178
II.1	Purification	178
II.1.1	Ultrafiltration frontale	178
II.1.2	Ultrafiltration tangentielle	179
II.1.3	Précipitation	180
II.1.4	Filtration à 0,22µm	180
II.2	Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire	181
II.2.1	Généralités.....	181
II.2.2	Séquences utilisées	181
II.2.3	Caractérisation des polysaccharides modifiés.....	182
II.3	Chromatographie d'exclusion stérique triple détection (SEC).....	182
II.4	Rhéologie.....	183
II.4.1	Préparation des échantillons.....	183
II.4.2	Rappels sur la viscosité	184
II.4.3	Rappels sur la viscoélasticité.....	185
II.4.4	Rhéomètres.....	185
II.5	Calorimétrie de titration isotherme (ITC).....	191
II.5.1	Principe de l'ITC	191
II.5.2	Appareillage	194
II.6	Fluorescence.....	194
II.7	Modélisation moléculaire.....	194
II.7.1	Champ de force	195
II.7.2	Minimisation, Monte Carlo et la dynamique	196
III	SYNTHESES	197

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). Les produits ont été utilisés sans purification préalable. Le solvant deutérié D₂O utilisé pour l'analyse RMN, est fourni par la société SDS (France).

L'acide hyaluronique initial de masse molaire moyenne en masse $M_w = 600\ 000$ g/mol provient de la société ARD (Pomacle, France). L'acide hyaluronique de masse molaire moyenne plus faible $M_w = 200\ 000$ g/mol provient de la société MEDIPOLE Distribution. Ils sont obtenus par fermentation bactérienne (bactérie *Spectrococcus zooepidemecus*).

II Matériels et méthodes générales

II.1 Purification

II.1.1 Ultrafiltration frontale

En ultrafiltration frontale, l'écoulement se fait perpendiculairement à la surface de la membrane. L'opération conduit à l'extraction des particules suspendues et à la purification du fluide (Figure IV-1). Ce type de mise en œuvre est souvent utilisé pour des essais à l'échelle de laboratoire, dans des cellules de filtration, ayant un volume de moins de quelques litres (Dans notre cas 200mL). L'inconvénient de cette méthode est le colmatage à la surface de la membrane.

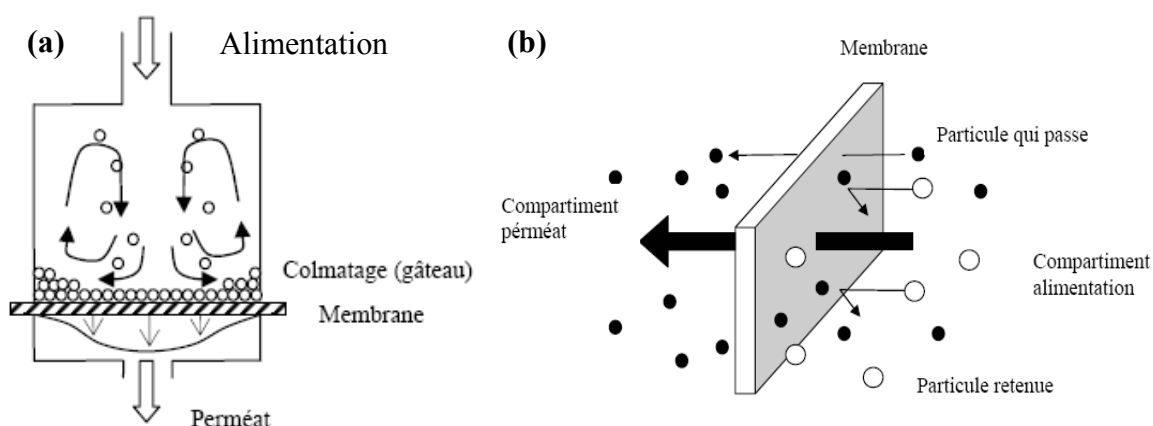


Figure IV- 1 : Représentation schématique d'une cellule d'ultrafiltration frontale (a) et d'une membrane sélective utilisée en ultrafiltration frontale (b).

L'ultrafiltration des solutions de polysaccharides modifiés est effectuée avec des membranes YM 100 (seuil de coupure 100 000 g/mol) en cellulose régénérée. Les diafiltrations sont arrêtées lorsque la conductivité du filtrat est stable et atteint une valeur inférieure à 5 μ S.

II.1.2 Ultrafiltration tangentielle

Les procédés de filtration associant des membranes et un flux tangentiel (Cross Flow) consistent à séparer des éléments dissous ou en suspension, en fonction de leurs masses molaires. Une différence de pression entre le rétentat et le perméat permet à la membrane de faire office de filtre. Les substances plus petites que les pores de la membrane sont entraînées avec le solvant, dénommé "perméat", tandis que les molécules ou les particules plus grosses sont retenues comme "rétentat". (Figure IV-2)

Ce type de mise en œuvre est utilisé aussi bien à grande échelle (industrielle) qu'à l'échelle laboratoire. Dans ce dernier cas, il faut noter que cela oblige à utiliser des volumes plus grands que dans le cas de l'écoulement frontal.

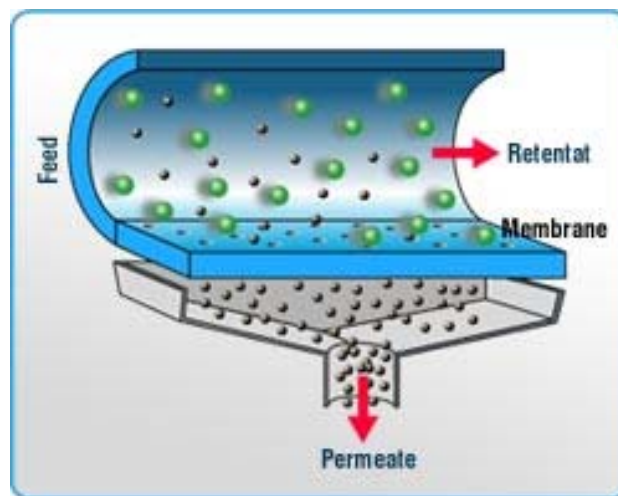


Figure IV- 2 : Représentation schématique du principe de l'ultrafiltration tangentielle.

Le principal avantage de l'écoulement tangentiel, par rapport à l'écoulement frontal, est le fait que le mouvement tangentiel de l'alimentation balaie la surface de la membrane. Ce balayage accélère la remise en suspension des particules déposées ou accumulées à proximité de la membrane. Le transport des solutés qui ont tendance à s'accumuler à la surface de la membrane est accéléré vers le cœur de l'écoulement ce qui permet d'éviter le colmatage.

II.1.3 Précipitation

La purification des polysaccharides modifiés est effectuée principalement par précipitation à l'éthanol dans les proportions EtOH/H₂O ((3/2) (v/v)) suivie de lavages dans différentes proportions ((EtOH/H₂O) (7/3), (3/1), (4/1) et (9/1)).

II.1.4 Filtration à 0,22µm

II.1.4.1 A l'échelle du laboratoire

Cette technique consiste à filtrer la solution à l'aide d'un filtre de très petite porosité (µm). Ce filtre retient toutes les particules de la taille des bactéries, le filtrat est alors stérile. Le choix des membranes est le critère le plus important pour la filtration, dans notre cas, nous utilisons des filtres avec des pores de diamètre 0,45 µm ou de 0,22 µm. Les bactéries sont toutes retenues par le filtre de 0,45 µm (le diamètre moyen des bactéries étant de 0,5 à 10µm), alors que les virus et les mycoplasmes sont retenus à 0,22 µm.

Les membranes utilisées sont planes et rondes, en acétate de cellulose. Elles sont montées sur des systèmes en inox (Sartorius) pour la filtration de petits volumes de liquides (max. 200mL) (figure IV-3). Ces membranes ont un très faible taux d'adsorption protéique et une excellente stabilité thermique. Le seuil de rétention 0,22 µm sert à stériliser les solutions. Nous appliquons une pression de 3 bars d'air comprimé pour permettre la filtration.

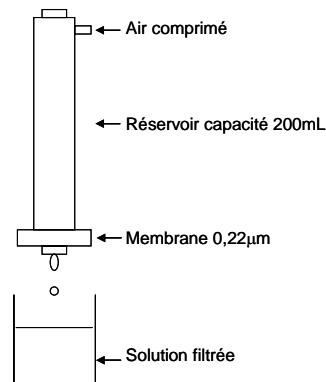


Figure IV- 3 : Représentation schématique du principe de filtration frontale à l'échelle du laboratoire.

II.1.4.2 A l'échelle semi-industrielle

A l'échelle semi-industrielle nous utilisons aussi un système Sartorius. La stérilisation est établie par passage de la solution à travers des membranes double porosités (0,45 + 0,22 μm) : référence Sartobran P grade pharmaceutique.

Une pompe est utilisée pour faire traverser la solution à travers le dispositif de filtration avec une pression qui n'excède pas les 3 bars. La vitesse de circulation de la solution est un paramètre important, le flux du perméat augmente avec la vitesse tangentielle car celle-ci augmente le coefficient de transport de matière, diminue l'épaisseur des couches de polarisation et du dépôt de grosses particules en suspension qui sont ainsi plus facilement entraînées. Le but est d'obtenir un régime d'écoulement turbulent pour diminuer le colmatage en surface.

II.2 Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire

II.2.1 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 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 expériences bidimensionnelles homo- sont calibrées par analogie avec les spectres à une dimension.

II.2.2 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 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.2.3 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 80°C, 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 Chromatographie d'exclusion stérique triple détection (SEC)

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) 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.
- Un appareil de diffusion de la lumière (figure IV- 4).

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. L'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.

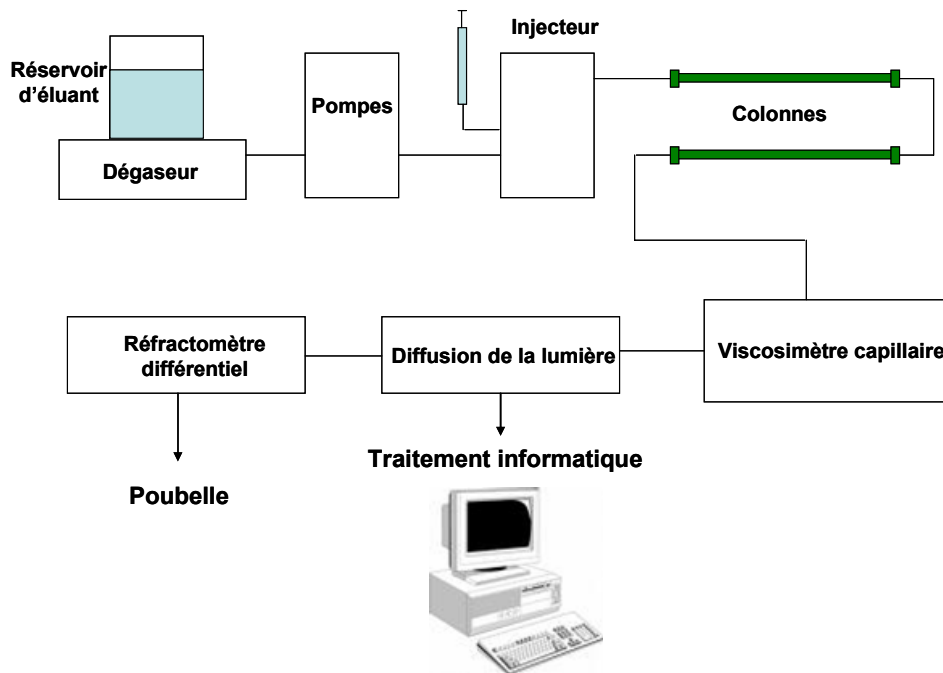


Figure IV- 4 : Représentation schématique de l'appareillage de la chromatographie d'exclusion stérique triple détection.

II.4 Rhéologie

II.4.1 Préparation des échantillons

A température ambiante : Les polysaccharides natifs et modifiés sont tout d'abord mis en solution dans l'eau pendant environ 3 à 6 heures pour permettre leur gonflement et sont ensuite agités (à faible vitesse) à température ambiante pendant environ 1 heure. On ajoute par la suite une certaine quantité de PBS afin que la concentration totale en sel soit de 0,15 M. L'agitation est maintenue pendant quelques heures jusqu'à homogénéisation. Après solubilisation totale des polysaccharides modifiés, et avant toute mesure, les échantillons sont laissés au repos pendant deux heures à température ambiante ou à 4°C.

En chauffant : Les polysaccharides natifs et modifiés sont tout d'abord mis en solution dans du PBS 0,15M en sel, pendant environ 3 à 6 heures, pour permettre leur gonflement et sont ensuite agités (à faible vitesse) à température ambiante pendant environ 1 heure. Par la suite, on place les piluliers qui contiennent les solutions dans un bain-marie et on chauffe jusqu'à 80°C pendant 1h.

II.4.2 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 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 $\dot{\gamma}$:

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad \text{éq IV- 1}$$

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 :

$$\eta_{rel} = \eta / \eta_0 \quad \text{éq IV- 2}$$

$$\eta_{sp} = (\eta - \eta_0) / \eta_0 \quad \text{éq IV- 3}$$

$$\eta_{red} = (\eta - \eta_0) / \eta_0 C \quad \text{éq IV- 4}$$

$$[\eta] = \lim_{\substack{C \rightarrow 0 \\ \dot{\gamma} \rightarrow 0}} (\eta - \eta_0) / \eta_0 C \quad \text{éq IV- 5}$$

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-5):

- le régime dilué dans lequel les chaînes sont isolées et indépendantes les unes des autres (figure IV-5(a)),
- lorsque la concentration C atteint une concentration critique appelée C^* (figure IV-5 (b)), les chaînes commencent à s'interpénétrer (figure IV-5 (c)). C'est le début du régime semi-dilué : les chaînes s'enchevêtrent progressivement et forment un réseau physique transitoire ou dynamique.

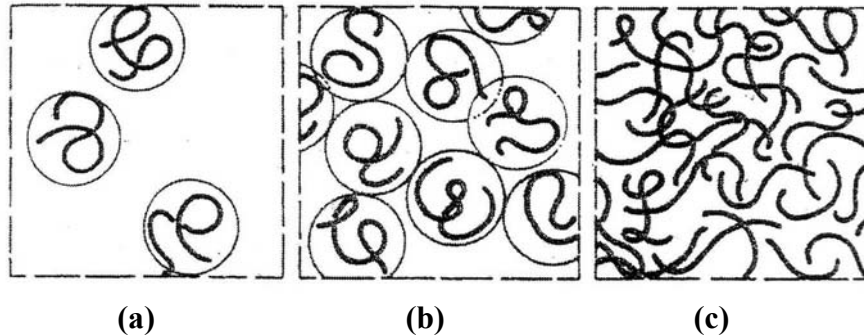


Figure IV- 5 : Influence de la concentration des polymères en solution

II.4.3 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 (ω) :

- le module $G'(\omega)$ 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 $G''(\omega)$ ou le module de perte, reflète le caractère "visqueux" de l'échantillon et caractérise l'énergie dissipée dans le matériau par frottements internes.

II.4.4 Rhéomètres

II.4.4.1 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 (Figure IV-6). Cet appareil, placé dans un thermostat maintenu à température

constante, mesure le temps d'écoulement d'un volume défini par deux repères. La seule force de pesanteur est responsable de l'écoulement.

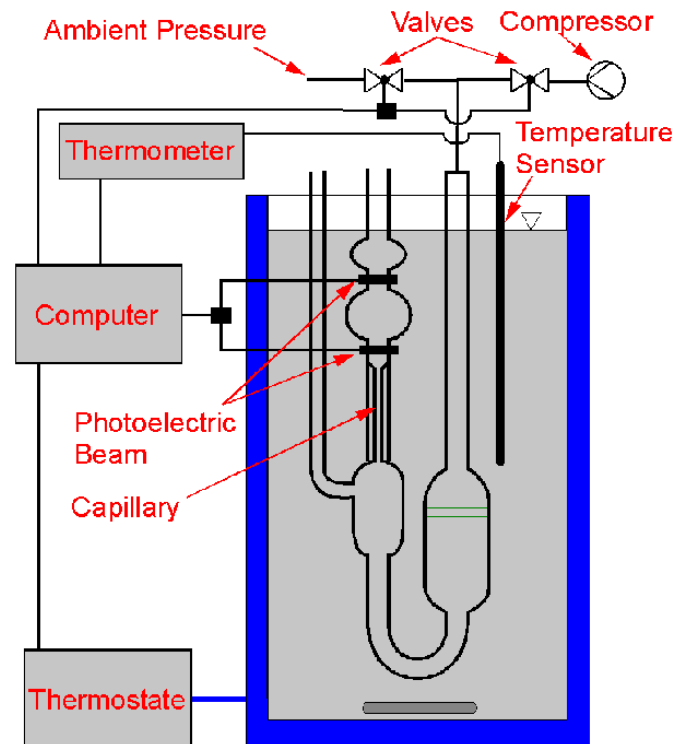


Figure IV- 6 : Représentation schématique du viscosimètre d'Ubbelohde.

La loi de Poiseuille permet de relier la viscosité et le temps d'écoulement :

$$\eta = \frac{\pi a^4}{8lV} Pt \quad \text{éq IV- 6}$$

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 :

$$\eta = A\rho t \quad \text{éq IV- 7}$$

où A est une constante du tube.

De ce fait,

$$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 C} \approx \frac{t - t_0}{t_0 C} \quad \text{éq IV- 8}$$

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 donc de caractériser 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.

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 :

$$\eta_{red} = [\eta] + k'[\eta]^2 C \quad \text{éq IV- 9}$$

où k' est la constante de Huggins qui tient compte des différentes interactions existant dans le milieu. Dans cette technique, le gradient de vitesse n'est pas contrôlé et n'est pas utilisable pour les fluides non newtonien.

II.4.4.2 Rhéomètre de type coutette : Low Shear LS30

C'est un rhéomètre de type Couette, rotatif, à cylindres coaxiaux (figure IV-7).

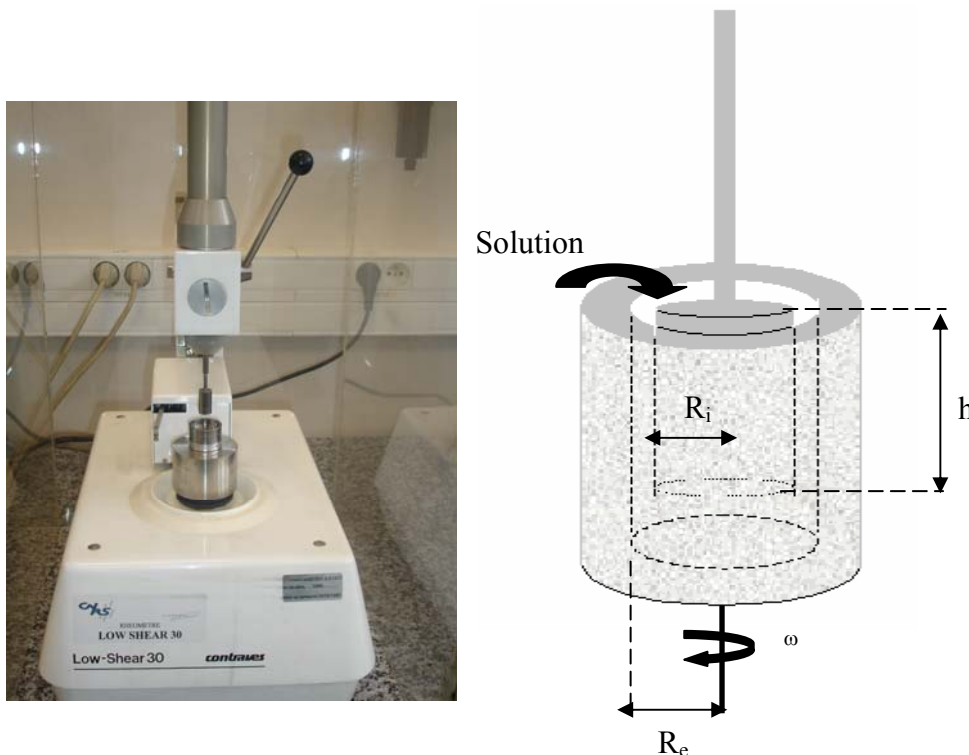


Figure IV- 7 : Images du Rhéomètre LS 30 avec une représentation schématique des cylindres coaxiaux.

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) suspendu à un fil de torsion, 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:

$$\eta = \frac{T}{\omega} \left(\frac{R_e^2 - R_i^2}{4\pi R_e^2 R_i^2 h} \right) \quad \text{éq IV- 10}$$

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 ($R_e - R_i < 1$ mm). Il s'exprime alors:

$$\dot{\gamma} = \omega \frac{R_e^2 + R_i^2}{R_e^2 - R_i^2} \quad \text{éq IV- 11}$$

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.4.4.3 AR 2000

L'AR 2000 utilisé (TA instruments) est un rhéomètre qui fonctionne à contrainte imposée. Nous avons utilisé des géométries cône-plan en acier ou en aluminium (cônes $R = 4$ cm, $\theta = 4$ degrés et $R = 6$ cm, $\theta = 1$ degré) pour effectuer les mesures sur des solutions de haute viscosité et sur des gels (figure IV-8).

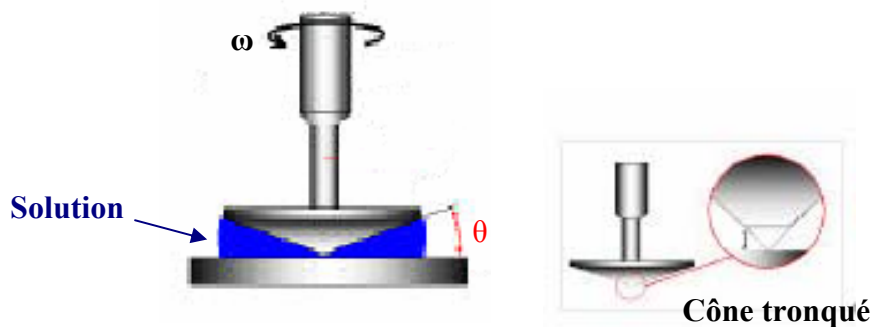


Figure IV- 8 : Représentation schématique de la géométrie cône-plan utilisé sur le rhéomètre AR2000.

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 contrôlée par un plan 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.

Mesures en mode écoulement :

Ce mode permet de mesurer des viscosités plus élevée que celles obtenues avec le Low Shear LS30 ($\eta > 10\text{mPa.s}$). 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 entre la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$, la contrainte et la viscosité sont :

$$\dot{\gamma} = \omega / \tan \theta \quad \text{éq IV- 12}$$

$$\tau = 3T / 2\pi R^3 \quad \text{éq IV- 13}$$

$$\eta = 3T \tan \theta / 2\pi R^3 \omega \quad \text{éq IV- 14}$$

Mesures en mode 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 :

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cos(\omega t) \quad \text{éq IV- 15}$$

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t + \delta) \quad \text{éq IV- 16}$$

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 $\gamma^*(t)$

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma^*(t)}{\gamma^*(t)} \quad \text{éq IV- 17}$$

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad \text{éq IV- 18}$$

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,

$$G'(\omega) = G \text{ et } G''(\omega) = 0$$

Dans le cas d'un liquide visqueux newtonien :

$$G'(\omega) = 0 \text{ et } G''(\omega) = \eta\omega$$

A partir des valeurs de G' et G'' , il est possible d'accéder à la viscosité complexe définie par la relation :

$$\eta^*(\omega) = \eta'(\omega) - i\eta''(\omega) = G'(\omega)/\omega - iG''(\omega)/\omega$$

D'où le module de viscosité complexe :

$$|\eta^*| = (G'^2 + G''^2)^{1/2}/\omega$$

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.4.4.4 ARES-RFS

L'ARES-RFS (Advanced Rheometric Expansion System de chez TA instruments) fonctionne à déformation imposée contrairement à l'AR2000. Nous avons utilisé des géométries en titane de type cône-plan (5cm, 4°) ou plan-plan (2,5 cm) pour effectuer les mesures sur des solutions de haute et basse viscosité ainsi que 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 contrôlée par régulation thermique du plan Peltier. Afin d'éviter les problèmes d'évaporation lors des mesures en température, une huile de silicone protège l'échantillon.

L'ARES, comme l'AR2000, peuvent travailler en mode écoulement et/ou en dynamique mais également en mode transitoire (par exemple pour des expériences à relaxation de contrainte).

II.5 Calorimétrie de titration isotherme (ITC)

II.5.1 Principe de l'ITC

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-9).

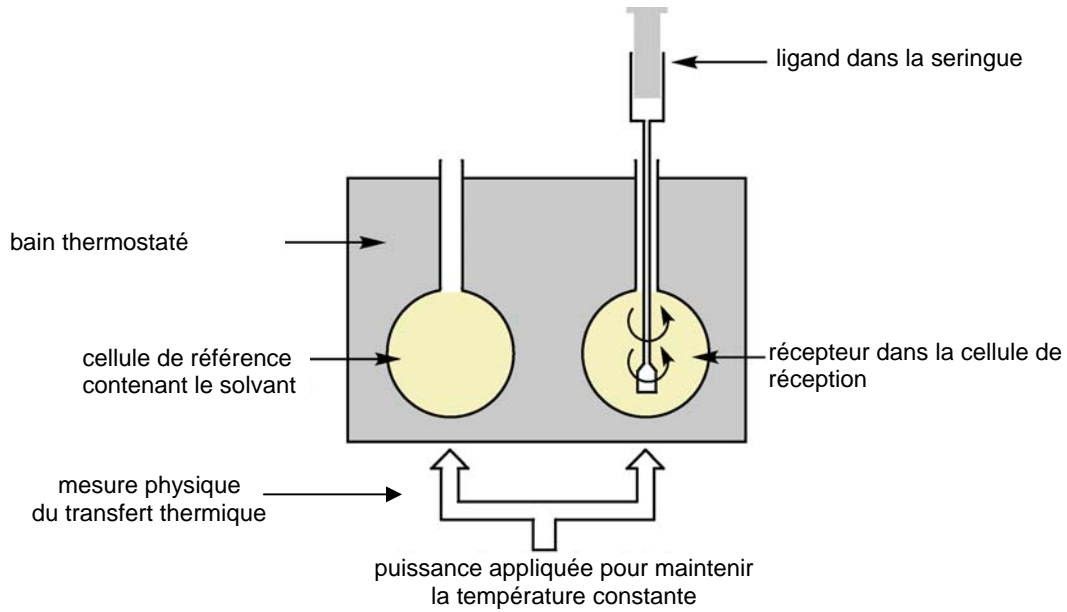


Figure IV- 9 : Schéma du dispositif d'ITC

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 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 .

$$K_a = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[X]} \quad \text{éq IV- 19}$$

$$X_t = [X] + n\Theta M_t \quad \text{éq IV- 20}$$

La combinaison des équations donne :

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nK_a M_t} \right] + \frac{X_t}{nM_t} = 0 \quad \text{éq IV- 21}$$

La chaleur totale dégagée Q est donnée par :

$$Q = n\Theta M_t \Delta H V_0 \quad \text{éq IV- 22}$$

Les équations 21 et 22 donnent :

$$Q = \frac{nX_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{M_t}{nX_t} + \frac{1}{nK_a X_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{M_t}{nX_t} + \frac{1}{nK_a X_t} \right)^2 - \left(\frac{4M_t}{nX_t} \right)} \right] \quad \text{éq IV- 23}$$

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 :

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad \text{éq IV- 24}$$

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 (Origin7.0, Microcal)) 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.5.2 Appareillage

Le calorimètre VP-ITC de MicroCal (Nothampon, USA). 30 additions de 10 μ L 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 300 s, la vitesse d'agitation à 300 tour/min et la température à 25°C. La cellule de réception non accessible interdit des expériences avec des solutions de polymère 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).

II.6 Fluorescence

Les spectres d'émission du pyrène sont mesurés à l'aide d'un spectromètre de luminescence de Perkin-Elmer LS 50B entre 360 et 500nm. Le pyrène est solubilisé dans l'éthanol à une concentration de 10^{-7} puis ajoutée à la solution de polymère qui est excitée à 334nm. Le rapport des intensités I1/I3 du premier et du troisième pic du spectre de fluorescence du pyrène est utilisé pour étudier la formation des micro-domaines hydrophobes résultant de l'association des molécules amphiphile.

II.7 Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire implique l'utilisation de méthodes de calcul théoriques (mécanique moléculaire, dynamique moléculaire, mécanique quantique ab-initio ou semi-empirique, ...) permettant de déterminer la représentation graphique de la géométrie ou de la configuration des atomes d'une molécule et d'évaluer les propriétés physico-chimiques de la molécule étudiée. La modélisation moléculaire associée à une représentation infographique des stéréochimies permet d'interpréter des phénomènes physico-chimiques, de suggérer des nouvelles expériences et d'analyser ainsi des résultats d'une façon plus critique que les expériences classiquement utilisées, mais ces 2 approches purement théoriques ou expérimentales sont complémentaires.

Les **objectifs de la modélisation moléculaire** sont principalement:

- Visualisation infographique et dessin des molécules à partir de données structurales et par l'utilisation d'un système informatique;
- Utilisation de banques de données pour identifier les systèmes moléculaires
- Obtention d'informations sur les mouvements dynamiques des molécules et sur leurs énergies;
- Calcul du champ de force empirique pour déterminer les propriétés moléculaires et les distances inter atomiques;
- Reproduction et prédiction qualitative des propriétés des molécules et des macromolécules;
- Corrélation entre des propriétés moléculaires et une structure moléculaire donnée;
- Évaluation de la validité d'une structure moléculaire.

Pour atteindre ces objectifs, différentes techniques de visualisation, manipulation, modification, construction, analyse ou calcul des structures moléculaires sont accessibles. On peut distinguer les techniques de représentation infographique des systèmes moléculaires qui permettent une visualisation directe de la structure des molécules en 2 ou 3 dimensions, leur manipulation interactive (rotation, translation, modification de leur conformation, ...) et l'analyse des paramètres géométriques (distance, angle, ...).

D'un certain point de vue, on peut considérer la mécanique moléculaire comme un système expert constitué d'un modèle mathématique et d'un jeu de paramètres permettant de représenter différentes molécules. Cet ensemble (potentiel/fonction mathématique) est appelé champ de force

II.7.1 Champ de force

Tous les calculs ont été réalisés avec le programme de modélisation moléculaire Cerius². Les paramètres de champ de force CVFF(91) ont été appliqués. Ce champ de force emploie des termes de longueur de liaison, d'angle de liaison et d'énergie de torsion utilisés pour la détermination de la fonction d'énergie potentielle E_{tot} .

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{liaison}} + E_{\text{flexion}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{interaction}} + \dots \quad \text{éq IV- 25}$$

E_{liaison} , représente l'énergie de liaison et traduit la compression ou l'extension d'une liaison à partir de sa longueur d'équilibre.

E_{flexion} , représente l'énergie de flexion et est fonction de l'angle de courbure d'une liaison par rapport à sa valeur d'équilibre.

E_{torsion} , représente l'énergie de torsion et traduit la modification de l'énergie lors de la rotation d'une molécule autour d'une liaison.

$E_{\text{interaction}}$, est l'énergie d'interaction entre deux atomes non liés.

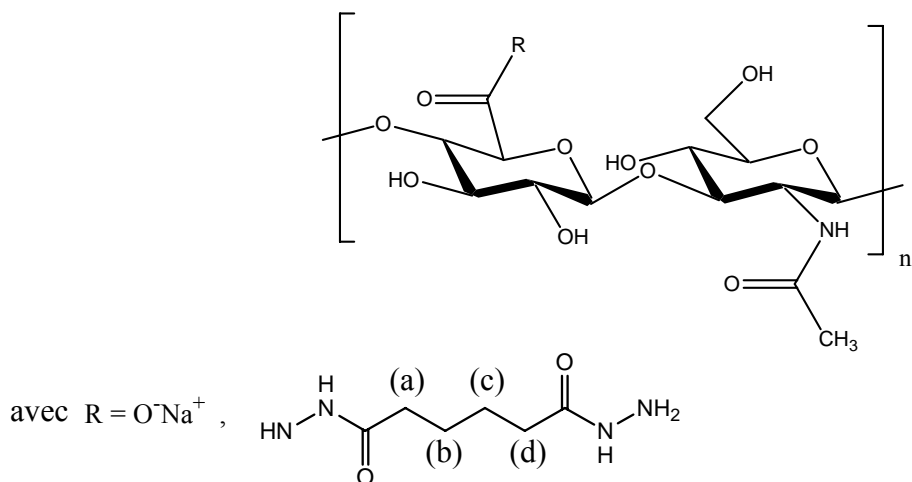
L'énergie E peut également être affectée par des mécanismes intramoléculaires (liaison hydrogène, répulsion électrostatique) à prendre en compte lors du calcul de l'énergie dans le champ de force induit par la molécule. Notons que l'énergie E est fonction de différentes énergies représentant une déformation moléculaire à partir d'une géométrie arbitraire de référence et qui varient d'un champ de force à un autre

II.7.2 Minimisation, Monte Carlo et la dynamique

Les cyclodextrines ont été générées à partir des coordonnées de la structure cristalline de l' α -CD et de la β -CD. La construction graphique des géométries des tensioactifs a été effectuée en utilisant des longueurs et des angles de liaison standards. La procédure Monte Carlo a été utilisée pour obtenir des conformations dans l'espace des molécules isolées. Par la suite, chaque conformation a été minimisée. Les expériences de dynamique moléculaire ont eu lieu dans un ensemble NVT (Nombre de moles, Volume et Température constantes) et les équations de mouvement brownien ont été résolues en utilisant l'algorithme Verlet avec un intervalle de 1fs. La durée des simulations de dynamique moléculaire varie de 500ps à 1ns (les premières 200ps servent à atteindre l'équilibre du système). Pour maintenir une température moyenne de 300K, la vitesse des particules est redimensionnée. Des vitesses aléatoires sont assignées aux atomes, qui correspondent à la distribution de Boltzmann à 300K.

III Synthèses

Exemple de synthèse d'un dérivé du HA porteur de groupements hydrazide HA-ADH (DS 8%) à partir du lot de HA de masse 600 000g/mol.



Le hyaluronane (4g, 9,97mmol) est solubilisé dans l'eau distillée (1000mL) (Cp~ 3C*). La solution est filtrée à 0,22 μ m à l'aide d'un filtre Sartorius[®]. A cette solution filtrée, On ajoute l'acide adipique dihydrazide (1,736g, 9,97mmol) préalablement mis en solution dans l'eau distillée (100mg/mL) puis ajouté, après l'avoir filtré, à la solution de HA. Le pH du milieu réactionnel est ajusté à 4,75 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,5M). Une solution aqueuse de l'EDC (1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]-carbodiimide) (0,287g, 1,49mmol) 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 (0,5M). La réaction est laissée sous vive agitation à température ambiante jusqu'à une stabilisation du pH (environ 4 heures). Le pH de la réaction est ensuite ajusté à 7,5 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,5M). Le HA modifié est ensuite transféré pour l'étape d'ultrafiltration tangentielle. Les lavages se font avec une solution d'eau distillée jusqu'à ce que le perméat ait une conductivité équivalente à celle de l'eau. Afin de vérifier que l'ADH en excès est éliminé, il est nécessaire de lyophiliser une partie du perméat. Si le ballon lyophilisé est vide cela voudrait dire que le produit est purifié. Le volume nécessaire pour un lavage total est d'environ 10 fois le volume initial.

Après l'étape d'ultrafiltration, le HA modifié peut être soit gardé pour continuer la synthèse de greffage de chaînes alkyle, soit lyophilisé pour être conservé pour d'autres analyses (RMN, rhéologie ...Etc.)

Quantités nécessaires du réactif limitant pour obtenir un le bon degré de substitution :

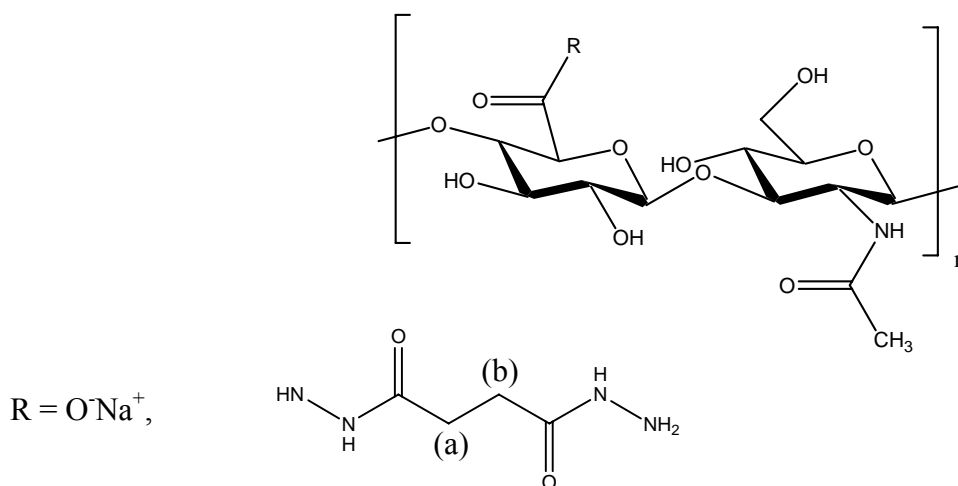
DS	5%	8%	10%
éq d'EDC nécessaire	0,094éq.	0,15éq.	0,188éq.

Rendement : 89%

Taux d'hydratation (mesuré par thermogravimétrie): 8%

RMN¹H (D₂O, 400MHz, 353K, δ (ppm)) : 1,45ppm ((CH₂)_c et (CH₂)_b), 1,85ppm (CH₃) du groupe acétamide du hyaluronane), 2,05ppm (CH₂)_d , 2,2ppm (CH₂)_a , 3,85-3,1 ppm (massif des protons des sucres du squelette polysaccharidique), 4,25ppm (H-1 de l'acide glucuronique), 4,4ppm (H-1 de l'unité N-acétylglucosamine).

Exemple de synthèse d'un dérive du HA porteur de groupements hydrazide HA-SDH (DS 5%) à partir du lot de HA de masse 600 000g/mol.



Le hyaluronane (4g, 9,97mmol) est solubilisé dans l'eau distillée (1000mL). La solution est filtrée à 0,22 μ m à l'aide d'un filtre Sartorius[®]. A cette solution filtrée, l'acide succinique dihydrazide (1,457g, 9,97mmol) est mis en solution dans de l'eau distillée (100mg/mL) puis ajouté, après l'avoir filtré, à la solution de HA. Le pH du milieu réactionnel est ajusté à 4,75 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,5M). Une solution

aqueuse de 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]-carbodiimide (0,180g, 0,937mmol) 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 (0,5M). La réaction est laissée sous vive agitation à température ambiante jusqu'à une stabilisation du pH (environ 4 heures). Le pH de la réaction est ensuite ajusté à 7,5 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,5M). Le HA modifié est ensuite transféré pour l'étape d'ultrafiltration tangentielle. Les lavages se font avec une solution d'eau distillée jusqu'à ce que le perméat ait une conductivité équivalente à celle de l'eau. De plus, pour être certaine d'avoir éliminé tout l'ADH en excès, il est nécessaire de lyophiliser une partie du perméat. Le volume nécessaire pour un lavage total est d'environ 10 fois le volume initial.

Après l'étape d'ultrafiltration, le HA modifié peut être soit gardé pour continuer la synthèse de greffage de chaînes alkyle, soit lyophilisé pour être conservé pour d'autres analyses (RMN, rhéologie ...Etc.)

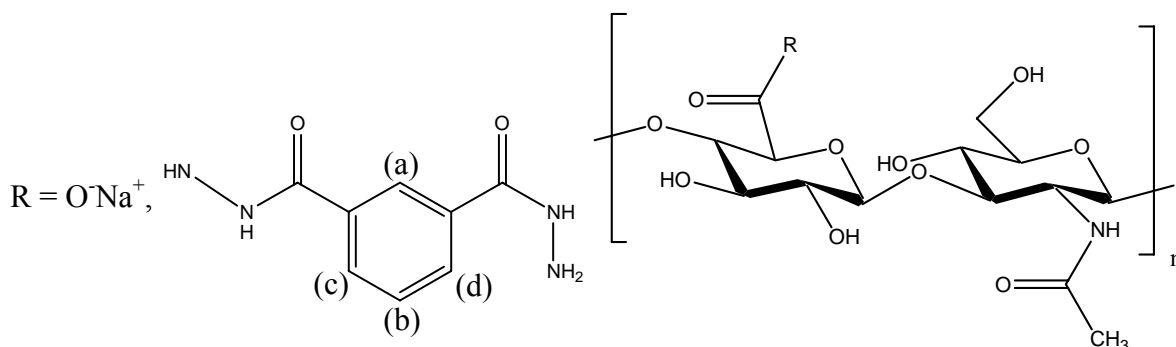
Quantités nécessaires du réactif limitant pour obtenir un bon degré de substitution :

DS	5%	10%
éq d'EDC nécessaire	0,094éq.	0,188éq.

Rendement : 89%

RMN¹H (D₂O, 400MHz, 353K, δ (ppm)) : 1,85 ppm ((CH₃) du groupe acétamide du hyaluronane), 2,45 ppm (CH₂)_b, 2,55 ppm (CH₂)_a, 3,85-3,1 ppm (massif des protons des sucres du squelette polysaccharidique), 4,35 ppm (H-1 de l'acide glucuronique), 4,5 ppm (H-1 de l'unité N-acétylglucosamine).

Exemple de synthèse d'un dérivé du HA porteur de groupements hydrazide HA-IDH (DS 5%) à partir du lot de HA de masse 600 000g/mol.



Le hyaluronane (4g, 9,97mmol) est solubilisé dans l'eau distillée (1000mL). La solution est filtrée à 0,22 μ m à l'aide d'un filtre Sartorius[®]. A cette solution filtrée, l'acide isophtalique dihydrazide (1,936g, 9,97mmol) est mis en solution dans de l'eau distillée (100mg/mL) puis ajouté, après l'avoir filtré, à la solution de HA. Le pH du milieu réactionnel est ajusté à 4,75 avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,5M). Une solution aqueuse de 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]-carbodiimide (0,180g, 0,937mmol) 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 (0,5M). La réaction est laissée sous vive agitation à température ambiante jusqu'à une stabilisation du pH (environ 4 heures). Le pH de la réaction est ensuite ajusté à 7,5 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,5M). Le HA modifié est ensuite transféré pour l'étape d'ultrafiltration tangentielle. Les lavages se font avec une solution d'eau distillée jusqu'à ce que le perméat ait une conductivité équivalente à celle de l'eau. De plus, pour être sûr d'avoir éliminé tout l'ADH en excès, il est nécessaire de lyophiliser une partie du perméat. Le volume nécessaire pour un lavage total est d'environ 10 fois le volume initial.

Après l'étape d'ultrafiltration, le HA modifié peut être soit gardé pour continuer la synthèse de greffage de chaînes alkyle, soit lyophilisé pour être conservé pour d'autres analyses (RMN, rhéologie ...Etc.)

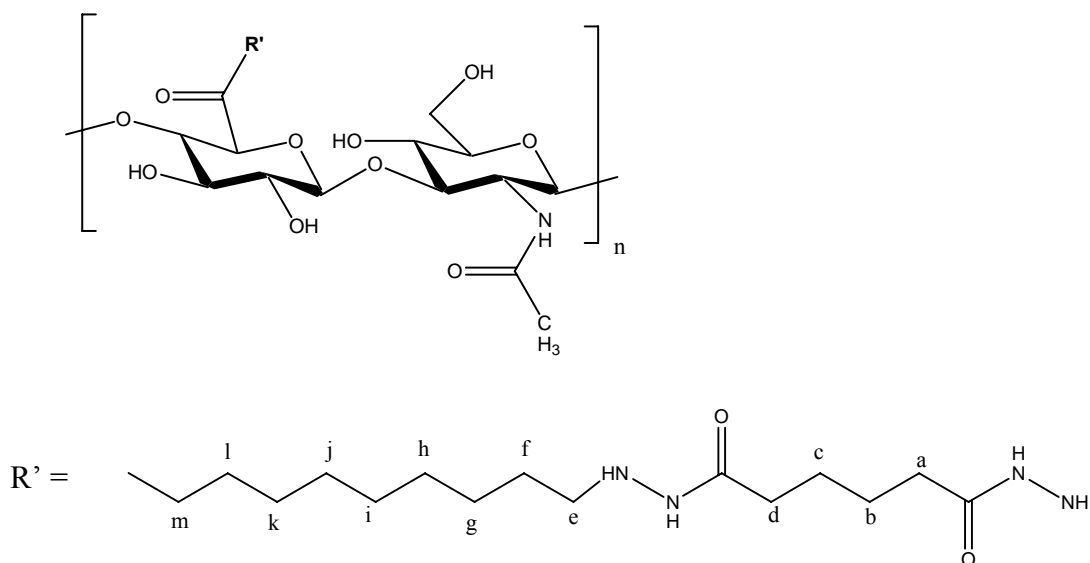
Quantités nécessaires du réactif limitant pour obtenir un bon degré de substitution :

DS	5%	10%
éq d'EDC nécessaire	0,094éq.	0,1868éq.

Rendement : 87%

RMN¹H (D₂O, 400MHz, 353K, δ (ppm)) : 1,85ppm ((CH₃) du groupe acétamide du hyaluronane), 3,85-3,1 ppm (massif des protons des sucres du squelette polysaccharidique), 4,35ppm (H-1 de l'acide glucuronique), 4,5ppm (H-1 de l'unité N-acétylglucosamine), 7,6ppm (CH₂)_b, 7,88ppm (CH₂)_d, 7,94ppm (CH₂)_c, 8,88ppm (CH₂)_a.

Exemple de synthèse d'un dérivé alkylé du HA porteur de groupements hydrazide HA-ADH (DS 5%) et des chaînes alkyle de longueur C10 (DS 5%) à partir du lot de HA de masse 600 000g/mol.



Si le dérivé dihydrazide précédemment décrit n'a pas été isolé, nous procédons directement à la réaction d'alkylation, sinon, il faut procéder d'abord à la solubilisation totale du HA-dihydrazide (dans notre exemple le HA-ADH de DS 5%).

Après solubilisation totale du HA-ADH (1g, 2,43mmol) dans l'eau (250mL), 150mL d'éthanol sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à 5,1 à l'aide d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,5M). Sont ajoutés successivement une solution de décanal (aldéhyde C10) (0,050g, 0,321mmol) dans l'éthanol (5mL) et une solution de picoline borane (0,130g, 1,21mmol) dans l'éthanol (5mL). La réaction est laissée sous agitation pendant 24h. Le pH de la réaction est ensuite ajusté à 7,5 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (0,1M). Après addition de chlorure de sodium de façon à obtenir une concentration en NaCl dans le mélange de 0,5M, le HA modifié est précipité par addition d'EtOH dans les proportions : EtOH/H₂O : 3/2 (v/v). Le précipité est lavé successivement avec différents mélanges EtOH/H₂O : 7/3, 3/1, 2/1, 9/1. Le composé est isolé par filtration sur fritté 4 et séché pendant 24 h à température ambiante. Le taux de greffage des groupements alkyle est de 5% ± 1% (calculé par RMN éq II-5).

RMN¹H (D₂O, 400MHz, 353K, δ (ppm)) : 0,80ppm (CH₃) de la chaîne alkyle, 1,2ppm ((CH₂)_f à (CH₂)_m), 1,3ppm (CH₂)_e, 1,45ppm ((CH₂)_c et (CH₂)_b), 1,85ppm (CH₃) du groupe acétamide du hyaluronane), 2,05ppm (CH₂)_d, 2,2ppm (CH₂)_a, 3,85-3,1 ppm (massif des

protons des sucres du squelette polysaccharidique), 4,25ppm (H-1 de l'acide glucuronique), 4,4ppm (H-1 de l'unité *N*-acétylglucosamine).

Conclusion Générale

Ce travail de thèse a concerné la synthèse et la caractérisation physico-chimique de nouveaux hydrogels physiques à base d'acide hyaluronique modifié chimiquement.

Nous nous étions fixés comme principal objectif l'obtention de différents réseaux physiques tridimensionnels résultant d'interactions hydrophobes entre des chaînes alkyles de différentes longueurs greffées sur l'acide hyaluronique. La société A.R.D cherchait à transposer à l'échelle industrielle la synthèse de ces systèmes pour des applications en viscosupplémentation.

La première étape de notre travail a consisté à mettre au point les deux étapes de greffage des groupements hydrazide réactifs sur le HA et de réaction de couplage entre le « bras espaceur » hydrazide et les chaînes aldéhydiques conduisant aux HA-alkylés. Nous avons préparé dans un premier temps des chaînes de polymère sur lesquelles sont greffées au hasard des groupements hydrazide adipique (HA-ADH) avec des taux de greffage en groupement hydrazide de 8%. Cette étude nous a permis de déterminer la quantité optimale de groupements hydrazide nécessaire pour obtenir un greffage compris entre 5 et 10%, ainsi qu'une technique de purification adaptée à ce type de dérivé. Dans un second temps, nous avons synthétisé des chaînes de polymère sur lesquelles sont greffées des groupements hydrazide succinique (HA-SDH) et isophtalique (HA-IDH) avec des taux de greffage en groupements hydrazide de 5 et 10%. La comparaison de l'effet de ces bras espaceurs sur les propriétés physico-chimiques des systèmes associatifs nous a permis de montrer que la nature chimique du bras joue un rôle important sur la stabilité du réseau physique.

Dans une deuxième étape, nous avons greffé en milieu aqueux des chaînons alkyle de différentes longueurs et degrés de substitution. Cette réaction repose sur la formation d'hydrazones intermédiaires stabilisées par réduction. La caractérisation des propriétés associatives de ces différents dérivés alkylés par des mesures rhéologiques et de spectrométrie de fluorescence nous a conduit à sélectionner un dérivé alkylé de longueurs de chaînes contenant 10 atomes de carbone pour la transposition de la synthèse à l'échelle industrielle. Le dérivé préparé à l'échelle pilote caractérisé par un DS de 8% donne une solution aqueuse parfaitement limpide et forme un réseau tridimensionnel homogène.

Des études de cytotoxicité de ce produit ont montré sa cytocompatibilité et son effet positif sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules ostéogénitrices. Une étude de stabilité thermique a montré la possibilité de conserver le produit en solution à 4°C ou 25°C, sans dégradation éventuelle de l'échantillon pendant une période minimale de 2 mois. De plus, une comparaison de la dégradation enzymatique du dérivé issu du lot industriel avec le Synvisc® (référence commerciale), montre que l'hydrogel physique que nous avons

développé résiste plus efficacement à la hyaluronidase que l'hydrogel chimique. Ainsi le gel physique montre un comportement d'autoréparation.

Après ces différentes études d'objectifs plutôt industriels, nous avons effectué quelques études plus fondamentales. Nous avons cherché à moduler les propriétés physico-chimiques des dérivés alkylés du HA par ajout de petites molécules. Des α - et β -cyclodextrines ont été ajoutées au système associatif afin d'évaluer leurs influences sur les interactions hydrophobes. Par ailleurs, nous avons ajouté des tensioactifs libres pour renforcer le réseau physique, à faible concentration, et pour le détruire en présence d'un excès de ces derniers. Cette étude a mis en évidence différents phénomènes, notamment la présence d'agrégats. L'addition de cyclodextrines libres au système associatif a permis non seulement de faire baisser les propriétés rhéologiques d'un réseau physique homogène obtenu avec un dérivé alkylé portant des greffons en C10, mais aussi de mettre en évidence la formation d'agrégats dans le cas des dérivés alkylés avec des greffons en C12. Nous avons pu aussi constater que les dérivés en C8 ne sont pas associatifs et que les chaînes semblent être trop courtes pour permettre un renforcement des propriétés viscosifiantes du HA en solution.

D'après cette étude, l'hypothèse d'une simple inclusion des chaînes alkyle greffées dans la β -CD ainsi que dans l' α -CD a été avancée pour expliquer l'absence de différence notable entre les 2 types de CD sur leurs propriétés de complexation vis-à-vis des dérivés alkylés.

Par ailleurs, l'ajout de chaînes de tensioactifs au réseau physique a montré que les propriétés physico-chimiques du polymère associatif augmentent lors de l'ajout de quantités de tensioactifs inférieures ou égales à une concentration de CMC. Cependant, pour des quantités supérieures à la CMC, nous avons obtenu une forte baisse des modules rhéologiques conduisant à l'effondrement du réseau associatif.

La modulation des propriétés physico-chimiques nous permet de contrôler la viscosité du système associatif par addition de petites molécules tel que l' α -cyclodextrine ou des tensioactifs tel que le décyle sulfate de sodium (SDES).

Il serait intéressant de poursuivre et de développer ce travail pour différents projets. Afin de compléter l'étude que nous avons effectuée et d'apporter des améliorations supplémentaires sur les propriétés physico-chimiques de ce type d'hydrogels, il nous semblerait intéressant de synthétiser de nouveaux dérivés similaires à ceux constituant cette étude en introduisant des quantités très limitées de jonctions covalentes entre les chaînes polysaccharidique. En effet, ceci pourrait augmenter la stabilité thermique et enzymatique de ces dérivés et améliorer leurs temps de demi-vie dans la matrice extracellulaire.

Par ailleurs, l'analyse de la formation des agrégats entre les greffons hydrophobes des polymères modifiés en solution par diffusion dynamique de la lumière pourrait apporter des résultats complémentaires. 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 d'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 préparation de films multicouches de polyélectrolytes constitue un nouveau moyen simple de fonctionnalisation des surfaces des matériaux. Ces films auto-assemblés à base de polyélectrolytes présentent un intérêt biologique car ils permettent de mimer des matrices extracellulaires. Leurs applications vont des dispositifs optiques jusqu'au recouvrement de biomatériaux. La technique de construction de ces films est basée sur la déposition alternée et successive de polycations et polyanions.

L'acide hyaluronique qui a de nombreuses applications dans l'adhésion cellulaire est un agent intéressant pour ce genre de système. Des fines couches de HA ont été adsorbées et greffées sur des surfaces pour l'adhésion et la croissance des cellules. Le HA a été utilisé dans des assemblées de multicouches par combinaison avec différents polycations et biopolymères tel que la poly(L-lysine) (PLL), le chitosane (CHI), l'hydrochloride polyallylamine (PAH) et le collagène (COLL). Très récemment, de nouveaux films à base d'acide hyaluronique, seul non associé à d'autres polymères, ont été développés. Ces films sont obtenus par la technique de dépôt couche par couche de HA⁺ modifié avec du HA en contrôlant l'épaisseur du film à l'échelle nanométrique. L'inconvénient de ce type de film est qu'à une concentration en sel de 0,15M aucune croissance de l'épaisseur du film n'est observée, contrairement aux assemblages HA/PAH et HA/PLL. La réticulation par le carbodiimide a permis d'obtenir des liaisons covalentes entre la fonction amide du HA⁺ et la fonction carboxylique du HA, ce qui a permis d'obtenir de meilleures propriétés et résistance à la modification des forces électrostatiques.

Nous pensons que la formation des multicouches, à base d'acide hyaluronique hydrophobiquement modifié, pourrait avoir un fort intérêt pour ce type d'applications. Outre la modification des propriétés mécaniques des films multicouches, les dérivés alkylés pourraient encapsuler des molécules actives hydrophobes par formation de nanocavités.

PUBLICATIONS :

Creuzet C, Kadi S, Rinaudo M, Auzely-Velty R: **New associative systems based on alkylated hyaluronic acid. Synthesis and aqueous solution properties.** *Polymer* 2006, 47(8):2706-2713.

Rinaudo M, Auzely R, Kadi S, Bresin A, Kubik E: **New derivatives of hyaluronic acid, their preparation process and their uses.** WO : 2007/059890: (CNRS, Fr.; A.R.D.). 2007: 80pp.

Annexes

LISTE DES ACRONYMES ET DES ABREVIATIONS

A	ACPT TM	auto crosslinked polymer
	AD	adamantane
	ADF	zone pour des réactions à risques explosifs
	ADH	acide adipique dihydrazide
B	BDDE	1,4 butanediol diglycidylether
C	CDH	acide carbodihydrazide
	α -CD	α -cyclodextrine
	β -CD	β -cyclodextrine
	γ -CD	γ -cyclodextrine
D	DMSO	diméthylsulfoxyde
	DR	degré de réticulation
	DS	degré de substitution
E	ECH	épichlorohydrine
	ECM	matrice extracellulaire
	EDC	1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]-carbodiimide
	EtOH	éthanol
H	H ₂ O	eau
	HA	acide hyaluronique
	HA(AD)	hyaluronane porteur de monomères d'adamantane
	HA(AD) ₂	hyaluronane porteur de dimères d'adamantane
	HA(CD)	hyaluronane porteur de monomères β -cyclodextrine
	HA(CD) ₂	hyaluronane porteur de dimères β -cyclodextrine
	HA-ADH	hyaluronane porteur de groupements hydrazide
	HAase	hyaluronidase
	HCl	acide chlorhydrique
	HOP	cellules ostéoprogénitrices humaines

I	IDH	acide isophthalique dihydrazide
	ITC	isotherm thermodynamic calorimetry
L	LDH	acide icosanedioïque dihydrazide
	Lp	longueur de persistance intrinsèque
	LS	liquide synovial
M	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
N	NaCl	chlorure de sodium
	NaCNBH ₃	cyanoborohydrure de sodium
	NaOH	hydroxyde de sodium
	NIF-NaHA	non inflammatory sodium hyaluronate
O	ODH	acide oxalique dihydrazide
P	PBS	phosphate buffer solution
	PDH	acide pimélique dihydrazide
	PicBH ₃	picoline borane
	PVA	polyvinylique alcool
R	réf.	référence
	RMN ¹³ C	résonnance magnétique nucléaire du carbone
	RMN ¹ H	résonnance magnétique nucléaire du proton
	RN	rouge neutre
	ROESY	rotational nuclear overhauser effect spectroscopy
S	SDH	acide succinique dihydrazide
	SEC	chromatographie d'exclusion stérique multidétection
	SVF	sérum de veau fœtal
U	UE	unité enzymatique

V VDH acide valine dihydrazide

LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES

ΔG°	variation d'énergie libre standard de la complexation
ΔH°	variation d'enthalpie standard de la complexation à 298 K et à 1 bar
ΔS°	variation d'entropie standard de la complexation
C	concentration en polymère
C*	concentration critique de recouvrement
d	doublet
G'	module de stockage (ou de conservation)
G''	module de perte
G*	module de rigidité complexe
G ₀	module au plateau
k	constante de Boltzmann
k'	constante de Huggins
K _a	constante d'association de la complexation
L	ligand
L _p	longueur de la persistance intrinsèque
M	fractions massiques
m	multiplet
M _n	masse molaire moyenne en nombre
M _v	masse molaire moyenne viscométrique
M _w	masse molaire moyenne en masse
n	stœchiométrie de la complexation
pH	potentiel hydrogène
pK _a	constante d'acidité
R	récepteur
R _g	rayon de giration
RL	complexe récepteur-ligand
s	singulet
T	température
t	triplet
t	temps
t	temps de relaxation

γ	déformation
$\dot{\gamma}$	gradient de vitesse
γ^*	déformation complexe
δ	déplacement chimique
ε	temps infiniment petit
η	viscosité de la solution
η_0	viscosité du solvant
η_{red}	viscosité réduite
η_{rel}	viscosité relative
η_{sp}	viscosité spécifique
$ \eta^* $	viscosité complexe
$[\eta]$	viscosité intrinsèque
ρ	masse volumique
ω	fréquence angulaire
σ	contrainte
σ^*	contrainte complexe

LISTE DES FIGURES

Figure I- 1 : Unité de répétition disaccharidique du hyaluronane.....	11
Figure I- 2 : Structure secondaire du HA dans du DMSO avec et sans présence d'eau	13
Figure I- 3 : Vue du plan de l'hélice 21.....	14
Figure I- 4 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de vitesse pour des solutions d'acide hyaluronique de masse molaire moyenne en masse ($M_w=1,3 \times 10^6$ g/mol) à différentes concentration.....	16
Figure I- 5 : Dépendance de la viscosité spécifique η_{sp} au plateau newtonien en fonction de $[\eta]C$ pour l'acide hyaluronique en solution dans du NaCl 0,1M à 25°C.....	16
Figure I- 6 : Courbes maîtresses de G' et G'' en fonction de la fréquence obtenues par translation en utilisant comme référence les courbes $G'(\square)$ et $G''(\square)$ du HA à 39,9g/L ($M_w = 1,3 \times 10^6$; $T=25^\circ\text{C}$).....	17
Figure I- 7 : Représentation schématique d'une partie de la matrice extracellulaire avec un agrandissement du complexe protéoglycane-HA	19
Figure I- 8: (a)Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour 3 liquides synoviaux différents. (b)Comparaison de l'articulation en état normal, arthrite et arthrose.....	22
Figure I- 9 : Comparaison du comportement élastique et visqueux de liquide synovial d'un patient sain, malade par rapport au HA de faible masse molaire à 10g/L et du Hylan viscosupplément (Synvisc®)	24
Figure I- 10 : Représentation schématique d'un exemple de réseau physique et d'un réseau chimique.....	26
Figure I- 11 : Principaux sites pour la modification chimique sélective du hyaluronane.....	27
Figure I- 12 : structure chimique de l'unité disaccharidique de deux chaînes réticulées par la formation de liaisons esters.....	31
Figure I- 13 : Variation des modules élastiques G' et visqueux G'' (Pa) pour un échantillon composé de 100% d'ACP™ à 10g/L dans du PBS (a), et pour les mélanges d'ACP™ et de HA linéaire à une concentration de 10g/L en polymère (b) G' (ronds vides) et G'' (ronds pleins).....	31
Figure I- 14 : Comportement rhéologique du mélange ACP™/HA : 50/50, sachant que le degré de réticulation est de 20%, la concentration en polymère est de 10g/L dans du PBS.....	32

Figure I- 15 : comparaison de la viscosité complexe des composés ACP développés par Fidia et d'autres viscosuppléments commerciaux.....	32
Figure I- 16 : Schéma de la procédure de synthèse du HA doublement réticulé.....	33
Figure I- 17 : Propriétés rhéologiques du HA linéaire non modifié à 15 g/L (A) et du HA doublement réticulé (B) à 16g/L.....	34
Figure I- 18 : Structure chimique du N-acylurée (R1 = Et, R2 = Me2N-(CH2)3) A et de la β -cyclodextrine B, ainsi que le complexe d'inclusion HA-EDC et HA- β CD.....	36
Figure I- 19 : Représentation schématique du réseau tridimensionnel (A) HA(AD)/HA(CD) et du système (B) HA(AD) ₂ / HA(CD) ₂	37
Figure I- 20 : Variation des modules élastiques et visqueux en fonction de la fréquence pour les mélanges HA(AD) ₂ / HA(CD) ₂ et HA(AD)/HA(CD) à 10g/L dans NaCl 0,025M à 25°C.....	38
Figure I- 21 : Représentation schématique des interactions hydrophobes qui pontent les chaînes polysaccharidiques.....	39
Figure I- 22 : Propriétés rhéologiques du dérivé HA porteur de chaînes en C12 avec un degré de substitution (DS) de 5% à 6 et 8g/L (a) et du HA porteur de chaînes en C18 avec deux DS de 1 et 2% à 7 et 4g/L respectivement, dans du NaCl 0,15M à 37°C.....	39
Figure I- 23 : Comportement en écoulement du (a) dérivé HA porteur de 4% de chaînes alkyle en C12 à différentes concentrations, et du (b) dérivé HA porteur de 5% de chaînes alkyle en C10 à différentes concentration.....	40
Figure I- 24 : comparaison des modules élastiques G' et visqueux G'' en fonction de la fréquence pour des solutions de HA greffés par 5% de chaînes alkyle de longueurs C10 et des solutions de HA greffé par 4% de chaînes alkyle de longueurs C12 (7g/L dans NaCl 0,1M à 25°C).....	41
Figure II- 1 : Principaux sites pour la modification chimique sélective du hyaluronate de sodium (1).....	60
Figure II- 2 : Spectre RMN 1H (400 MHz, 80°C, D2O, 6 mg/mL) du dérivé HA-ADH (8).....	63
Figure II- 3 : Comparaison de la méthode de purification : (a) : ultrafiltration et lyophilisation et (b) : précipitation et séchage.....	65
Figure II- 4 : Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour des solutions de HA-ADH avec différents équivalents dans PBS à 25°C.....	66
Figure II- 5 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement du HA initial (Mw 600 000 g/mol) dans une solution de PBS à 25°C.....	68

Figure II- 6 : Variation de la viscosité newtonienne en fonction de la concentration en polymère pour les différents lots synthétisés.....	69
Figure II- 7 : Spectre RMN 1H (400 MHz, 80°C, D2O, 6 mg/mL) du dérivé HA10C8-200.....	73
Figure II- 8 : Variation des modules de conservation (G') et de perte (G'') en fonction de la température pour le dérivé alkylé HA5C10-300 à 7 g/L dans du NaCl 0,025M (issu de la référence [1]).....	74
Figure II- 9 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence. Comparaison du comportement rhéologique d'un liquide synovial d'un patient sain et celui d'un sujet souffrant d'arthrose.....	76
Figure II- 10 : Effet des mouvements lents et rapides sur l'articulation du genou.....	77
Figure II- 11 Variation des modules G' (□) et G'' (□) en fonction de la fréquence pour le HA initial 600 000 g/mol à 20 g/L et 200 000 g/mol à 60 g/L dans le PBS à 25°C.....	78
Figure II- 12 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour le HA initial à 20 g/L dans le PBS et les HA5C10-600, HA5C12-600 et HA5C14-600 à 10 g/L dans le PBS à 25°C.....	80
Figure II- 13 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour le HA initial-600 à 20 g/L dans le PBS et les HA10C10-600, HA10C12-600 et HA10C14-600 à 10 g/L dans le PBS à 25°C.....	80
Figure II- 14 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour HA5C12-200, HA5C14-200 à 10g/L dans le PBS à 25°C.....	82
Figure II- 15 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour HA10C10-200, HA10C14-200 et HA10C8r-200 à 10g/L dans le PBS.....	83
Figure II- 16 : Comparaison des modules élastiques et visqueux pour des longueurs de chaînes alkyle en C10 à 10 g/L dans du PBS à 25°C.....	84
Figure II- 17 : Comparaison des modules élastiques et visqueux pour des longueurs de chaînes alkyle en C12 à 10 g/L dans du PBS à 25°C.....	84
Figure II- 18 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour les différents HA alkylés à 10 g/L de masse molaire 200 000 g/mol et le HA initial à 10 g/L. Les solutions sont étudiées à 25°C dans du PBS.....	86
Figure II- 19 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour les différents HA alkylés à 10g/L de masse molaire 600 000 g/mol et le HA initial à 10g/L. Les solutions sont étudiées à 25°C dans du PBS.....	87
Figure II- 20 : Spectre d'émission du pyrène pour une solution de HA5C10-600 à 1 g/L contenant du pyrène à une concentration de $6 \times 10^{-7} M$	88

Figure II- 21 : Rapport des intensités I1/I3 du spectre d'émission du pyrène pour les différents dérivés alkylés de HA de masse molaire 600 000 g/mol.....	89
Figure II- 22 : Spectre RMN1H (400MHz, 80°C, D2O, 6mg/mL) du dérivé HA-SDH (20) DS 10%.....	94
Figure II- 23 : Spectre RMN1H (400MHz, 80°C, D2O, 6mg/mL) du dérivé HA-IDH (20) de DS 10%.....	95
Figure II- 24 : Courbes de distribution en volume d'éluion obtenues pour les dérivés HA-ADH, HA-SDH et HA-IDH pour des DS de 5% et 10% ainsi que le HAinitial-600.....	96
Figure II- 25 : Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration pour des solutions de HA initial-600, HA-ADH, HA-SDH et HA-IDH possédant deux DS différents 5 et 10% à 25°C dans du PBS.....	98
Figure II- 26 : Variation de la viscosité newtonienne en fonction de la concentration pour le HA initial HAinitial-600 (noir) et les dérivés du HA de DS 5% (rouge) et de DS 10% (vert).....	99
Figure II- 27 : Variation des modules G' et G'' en fonction de la fréquence pour les dérivés HA5C10-IDH et HA5C8r-IDH à une concentration de 10g/L et le HAinitial-600 à 20g/L dans le PBS.....	101
Figure II- 28 : Effet du bras espaceur sur les propriétés rhéologiques du réseau physique de DS 5% avec des chaînes alkyle en C10.....	102
Figure II- 29 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour le HA initial de masse molaire moyenne en masse 600 000 g/mol à différents temps de mise en solution à 10 g/L dans du PBS à 25°C.....	105
Figure II- 30 : influence de la concentration du HA8C10-600 sur les propriétés physico-chimiques du réseau physique final.....	108
Figure II- 31 : Résultat du test au MTT pour deux échantillons de HA natif non modifié et HA alkyle issu de la synthèse à l'échelle industrielle.....	110
Figure II- 32 : Résultat du test du rouge neutre pour les deux échantillons de HA natif non modifié et HA alkyle issu de la synthèse à l'échelle industrielle.....	110
Figure II- 33 : Etude de la stabilité thermique des différents lots HA8C10-600 (à 10g/L dans du PBS), HA initial (à 10 g/L dans du PBS) et du Synvisc® (à 5 g/L) à 4°C, 25°C et 40°C. (Gradient de cisaillement 1s-1).....	112
Figure II- 34 : Variation de la viscosité en fonction de la durée de la dégradation enzymatique du HA initial-600 pour 5 concentrations croissantes en HAase.....	114

Figure II- 35 : Comparaison de la dégradation enzymatique entre le HA-initial-600, le HA8C10-600 et le Synvisc®.....	115
Figure II- 36 : Propriétés viscoélastiques des produits commerciaux réticulés chimiquement.....	118
Figure II- 37. Propriétés viscoélastiques des produits commerciaux linéaires.....	118
Figure II- 38. Comportement en écoulement des différents produits commerciaux.....	119
Figure II- 39 : Comparaison des propriétés du Synvisc avec les produits issus des différentes synthèses au laboratoire à 10g/L dans du PBS à 25°C.....	120
Figure III- 1 : Structure chimique et dimensions des cavités de l' α -, de la β - et de la γ -cyclodextrine.....	129
Figure III- 2: Représentation schématique de l'association entre les HMPAA seuls (a) et les mélanges HMPAA/CDMPAA (b) [36, 37].....	131
Figure III- 3 : Variation de la viscosité en fonction de la quantité de α -CD et β -CD ajoutée a un système de HMPAA hydrophobiquement modifié par 0,5 % (molaire)de chaînes en C18. (Gradient de vitesse fixé à 20 s-1)[37].....	131
Figure III- 4 : Représentation schématique du système associatif avant et après introduction des cyclodextrines libres.....	132
Figure III- 5 : Variation des modules élastiques, G' , et visqueux, G'' , en fonction de la concentration en β -CD pour une solution d'alginate hydrophobiquement modifié à 20g/L[14].....	133
Figure III- 6 : Influence de la concentration en β -CD sur la longueur de persistance L_p et sur la longueur de corrélation ξ [14].....	133
Figure III- 7 : Variation de la viscosité d'une solution de JR400 à 10g/L en fonction de la concentration en SDS (a). Variation de la viscosité d'un mélange JR400 + 1mM SDS et JR400 + 2,5mM SDS en fonction de la concentration en α - et β - CD (b).....	134
Figure III- 8 : Représentation schématique d'une titration d'une solution de polymère HA8C10-600 par une solution d' α -CD et β -CD.....	137
Figure III- 9 : Titration calorimétrique d'une solution polymère HA8C10 par (a) l' α -CD avec $[\alpha\text{-CD}]=(8\text{mM})$ et $[\text{HA8C10}]=(5\text{g/L})$ et par (b) la β -CD avec $[\beta\text{-CD}] = (20\text{mM})$ et $[\text{HA8C10}]=(10\text{g/L})$ dans l'eau à 25°C. Expériences avec le calorimètre VP-ITC de Microcal.....	138
Figure III- 10 : Titration calorimétrique de solutions d' α et de β -CD par des tensioactifs alkyle sulfate ayant des chaînes en C8, C10 et C12 dans l'eau à 25°C. Expériences effectuées avec le calorimètre VP-ITC de Microcal.....	141

Figure III- 11 : Titration calorimétrique des solutions d'alkyle sulfate de longueurs C8, C10 et C12 par les α et β -CD dans l'eau à 25°C. Expériences avec le calorimètre VP-ITC de Microcal.....	144
Figure III- 12 : Spectres RMN 1H de l' α -CD et de la β -CD (400MHz, 25°C, 3mM, D2O).....	147
Figure III- 13 : Représentation des protons internes et externes de la cyclodextrine.....	147
Figure III- 14 : Spectres RMN 1H des différents tensioactifs alkyle sulfate (400MHz, 25°C, 6mg/mL, D2O).....	148
Figure III- 15 : Spectres RMN 1H (400MHz, 25°C, D2O) du (a) tensioactif SOS (C8) à 6mg/mL ; (b) l' α -CD à 3mM ; (c) mélange α -CD-C8 avec un rapport 1:1 (3mM : 3mM) ; (d) mélange α -CD :C8 avec un rapport 4:1 (12mM : 3mM).....	149
Figure III- 16 : Carte T-ROESY (400 MHz, 25°C, D2O, 3mM en C8 et 3mM en α -CD) du mélange α -CD : C8 avec le rapport 1:1.....	150
Figure III- 17 : Carte T-ROESY (400 MHz, 25°C, D2O, 3mM en C8 et 12mM en α -CD) du mélange α -CD : C8 avec le rapport 4:1.....	151
Figure III- 18 : Spectres RMN 1H (400MHz, 25°C, D2O) du (a) tensioactif SDES (C10) à 6mg/mL ; (b) l' α -CD à 3mM ; (c) mélange α -CD-C10 avec un rapport 1:1 (3mM : 3mM) ; (d) mélange α -CD:C10 avec un rapport 4:1 (12mM : 3mM).....	152
Figure III- 19 : Carte T-ROESY (400 MHz, 25°C, D2O, 3mM en C10 et 3mM en α -CD) du mélange α -CD : C10 avec le rapport 1:1.....	153
Figure III- 20 : Carte ROESY (400 MHz, 25°C, D2O, 3mM en C10 et 12mM en α -CD) du mélange α -CD : C10 avec le rapport 4:1.....	154
Figure III- 21 : Spectres RMN 1H (400MHz, 25°C, D2O) du (a) tensioactif SDOS (C12) à 6mg/mL ; (b) l' α -CD à 3mM ; (c) mélange α -CD-C12 avec un rapport 1:1 (3mM : 3mM) ; (d) mélange α -CD :C12 avec un rapport 4:1 (12mM : 3mM).....	155
Figure III- 22 : Carte T-ROESY (400 MHz, 25°C, D2O, 3mM en C10 et 3mM en α -CD) du mélange α -CD : C12 avec le rapport 1:1.....	156
Figure III- 23 : Carte T-ROESY (400 MHz, 25°C, D2O, 3mM en C10 et 3mM en α -CD) du mélange α -CD : C12 avec le rapport 4:1.....	157
Figure III- 24 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour le dérivé HA5C8-600 en présence de quantités croissantes en α -CD. La concentration en polymère est de 10g/L dans du PBS à 25°C.....	158

Figure III- 25 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour le dérivé HA5C10-600 avec des concentrations croissantes en α -CD. La concentration en polymère est de 10g/L dans du PBS à 25°C.....	159
Figure III- 26 : Variation de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement pour le dérivé HA5C12-600 avec des concentrations croissantes en α -CD. La concentration en polymère est de 10g/L dans du PBS à 25°C.....	160
Figure III- 27 : Variation de la viscosité en fonction de la concentration en cyclodextrine pour les différents dérivés étudiés.....	162
Figure III- 28 : structure chimique du DTAB et de l' α -CD [64].....	164
Figure III- 29 : Représentation schématique des mouvements translationnels de l' α -CD le long de la chaîne DTAB.....	165
Figure III- 30 : Distribution des angles rotationnels à intervalles de 5 degrés (a). Représentation de la structure du complexe DTAB : α -CD la plus probable sur le plan yz (b).....	165
Figure III- 31 : Les structures de dynamique moléculaire les plus probables pour le complexe secondaire (a), le complexe primaire (b), la structure calculée par mécanique moléculaire utilisant un champ de force CVFF (c), la structure calculée par mécanique moléculaire utilisant un champ de force Amber (d) et la structure du complexe secondaire obtenue par RMN.....	166
Figure III- 32 : Représentation des 2 possibilités d'inclusion de la chaîne alkyle (C10) dans les cavités des α - et β -CDs sans présence de solvant.....	167
Figure III- 33 : Représentation de la moyenne des Energies totales pour les différentes conformations.....	168
Figure III- 34 : Représentation des configurations à l'état d'équilibre pour les complexes (a) α -CD – C8 de type « tête », (b) α -CD – C10 de type « tête » et α -CD – C12 de type « tête ».....	168
Figure III- 35 : Représentation schématique des différentes possibilités d'association des complexes d'inclusion CD : TA (2 :1 tête-tête (a), 2 :1 queue-queue (b), 2 :1 tête-queue (c)).....	169
Figure III- 36 : Représentation de la moyenne des Energies totales pour les différentes configurations.....	170
Figure III- 37 : Représentation des configurations à l'état d'équilibre pour les complexes (a) α -CD – C8 de type « queue-queue », (b) α -CD – C10 de type « queue-queue » et α -CD – C12 de type « queue-queue ».....	170
Figure III- 38 : Représentation des différentes trajectoires au cours de la dynamique moléculaire de 500ps.....	171

Figure III- 39 : Variation des modules élastiques et visqueux en fonction de la fréquence pour différentes concentrations en tensioactifs libres ajoutés au polymère.....	173
Figure IV- 1 : Représentation schématique d'une cellule d'ultrafiltration frontale (a) et d'une membrane sélective utilisée en ultrafiltration frontale (b).....	184
Figure IV- 2 : Représentation schématique du principe de l'ultrafiltration tangentielle.....	185
Figure IV- 3 : Représentation schématique du principe de filtration frontale à l'échelle du laboratoire.....	186
Figure IV- 4 : Représentation schématique de l'appareillage de la chromatographie d'exclusion stérique triple détection.....	189
Figure IV- 5 : Influence de la concentration des polymères en solution.....	191
Figure IV- 6 : Représentation schématique du viscosimètre d'Ubbelohde.....	192
Figure IV- 7 : Images du Rhéomètre LS 30 avec une représentation schématique des cylindres coaxiaux.....	193
Figure IV- 8 : Représentation schématique de la géométrie cône-plan utilisé sur le rhéomètre AR2000.....	194
Figure IV- 9 : Schéma du dispositif d'ITC.....	198

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I- 1 : Récapitulatifs des différents viscosuppléments présents sur le marché.....	25
Tableau I- 2 : Comparaison des propriétés du hyaluronane et des préparations de hylane dans des conditions salines physiologiques (tableau extrait à partir de la référence [35]).....	29
Tableau I- 3 : Propriétés rhéologiques du liquide synovial prélevé chez des humains sains dans différents groupes d'âge et chez des patients atteints d'arthrose [35, 81].....	30
Tableau I- 4 : Solutions viscoélastiques à base de HA développées par CORNEAL® pour la chirurgie oculaire.....	34
Tableau II- 1 : Rappel des conditions de synthèse du dérivé HA-ADH lors de travaux antérieurs effectués au laboratoire.....	61
Tableau II- 2 : récapitulatif des différentes synthèses effectuées lors de ce travail.....	62
Tableau II- 3. Concentration critique de recouvrement et constante de Huggins calculées pour différents lots de HA-ADH lyophilisés et pour le HA initial.....	66
Tableau II- 4. Masses moyennes viscosimétriques calculées à partir des valeurs de viscosité intrinsèque, en utilisant la loi de Mark-Houwink, dans du PBS à 25°C.....	67
Tableau II- 5. Récapitulatif des conditions utilisées pour la synthèse des dérivés alkylés.....	71
Tableau II- 6. Récapitulatif des rendements (Rdts) de la synthèse (réaction d'alkylation) des différents dérivés alkylés.....	72
Tableau II- 7 : Valeurs des modules élastiques G' (Pa) et visqueux G'' (Pa) ainsi que la viscosité complexe $ \eta^* $ (Pa.s).....	79
Tableau II- 8 : Valeurs des modules élastiques G' (Pa) et visqueux G'' (Pa) ainsi que la viscosité complexe $ \eta^* $ (Pa.s).....	82
Tableau II- 9 : coût des différents dihydrazides sélectionnés pour l'étude de l'effet du bras dihydrazide.....	92
Tableau II- 10 : Récapitulatif des conditions de la synthèse des dérivés HA-SDH et HA-IDH.....	92
Tableau II- 11 : Valeurs des masses molaires moyennes obtenues par SEC triple détection pour les HA modifiés comparé au HA initial de masse M_w 600 000 g/mol.....	97
Tableau II- 12 : Concentration critique de recouvrement C^* , Constante de Huggins, viscosité intrinsèque et les masses molaires moyennes viscosimétriques pour les différents dérivés hydrazides.....	98

Tableau II- 13. Valeurs des modules élastiques G' (Pa) et visqueux G'' (Pa) ainsi que la viscosité complexe $ \eta^* $ (Pa.s). Tous les échantillons ont une concentration de 20 g/L dans du PBS.....	100
Tableau II- 14. Valeurs des modules élastiques, G' (Pa), et visqueux, G'' (Pa), ainsi que de la viscosité complexe $ \eta^* $ (Pa.s). Tout les échantillons ont une concentration de 10g/L dans du PBS.....	101
Tableau II- 15 : Tableau récapitulatif des conditions expérimentales de la synthèse pilote.....	103
Tableau II- 16. Quelques préparations de HA destinées à la viscosupplémentation articulaire en France.....	117
Tableau III- 1 : Données de la littérature concernant la complexation des chaînes d'alkyle sulfate et les cyclodextrines α et β	140
Tableau III- 2 : Concentrations micellaires critiques CMC pour les tensioactifs utilisés dans l'eau à 20°C [54].....	140
Tableau III- 3 : Grandeurs thermodynamiques obtenues à partir d'expériences d'ITC en titrant des solutions d' α et de β -CD par des tensioactifs SOS, SDES et SDOS à 25°C dans l'eau.....	142
Tableau III- 4: Grandeurs thermodynamiques obtenues par des expériences d'ITC en titrant des tensioactifs SOS, SDES et SDOS par des solutions d' α et β -CD par à 25°C dans l'eau.....	144

LISTE DES SCHEMAS

Schéma II- 1 : Formation du réseau physique tridimensionnel dû aux interactions hydrophobes entre les chaînes alkyle greffées sur le polymère.....57

Schéma II- 2 : Stratégie de synthèse de dérivés alkylés du HA mise au point lors de travaux antérieurs au laboratoire [1].....58

Schéma II- 3 : Réaction d'alkylation du dérivé HA-ADH.....70

Schéma II- 4 : Chaînes aldéhydiques linéaires avec $x = 6, 8, 10, 12, 14$ (a) et la chaîne aldéhydique ramifiée (Citronellal) (b) utilisées pour la synthèse des dérivés alkylés du HA cibles.....70

Schéma II- 5 : Représentation schématique de l'expansion de la chaîne polysaccharidique dans le solvant : (a) pour des masses de 200 000 et (b) des masses 600 000g/mol.....85

Schéma II- 6 : (5) Acide 9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracène-11,12-dicarboxylique dihydrazide.....91

Schéma II- 7 : Schéma réactionnel des dérivés HA-SDH (19) et HA-IDH (20) avec des DS de 5%.....93

Schéma II- 8. Etapes de synthèse du dérivé alkylé (HA8C10) à l'échelle semi-industrielle.....104

Schéma III- 1 : Représentation schématique des structures cristallines de type :(a) cages, (b) multicouches et (c) chaînes [35].....130

Schéma III- 2 : Représentation schématique des interactions entre les polymères cationiques, les tensioactifs anioniques et la cyclodextrine conduisant à la modulation des propriétés rhéologiques observées : (a) association des tensioactifs avec le polymère conduisant à un réseau 3D ; (b) Formation du complexe d'inclusion entre la CD et la partie hydrophobe du tensioactif conduisant à la dissociation de l'hydrogel physique et à la baisse de la viscosité [38].....135

Schéma III- 3 : Représentation schématique de l'addition d' α - et de β -CD sur les différents tensioactifs SOS, SDES et SDOS.....143

Schéma III- 4 : Différentes possibilités d'enfilement de la chaîne tensioactive dans la cyclodextrine.....145

Schéma III- 5 : Représentation schématique de l'interaction des H2 et H4 de la cyclodextrine avec les CH2 et les CH3 de la chaîne du tensioactif.....150

Schéma III- 6 : Représentation schématique du système HA5C8-600 avant et après ajout de CDs.....159

Schéma III- 7 : Représentation schématique du système HA5C10-600 avant et après ajout de CDs.....160

Schéma III- 8 : Représentation schématique du système HA5C12-600 avant et après ajout de CDs.....161

Schéma III- 9 : Représentation schématique de l'effet d'ajout de chaînes tensioactives : (a) à une concentration = CMC/2 et (b) à la concentration 2CMC.....172

SYSTEMES ASSOCIATIFS A BASE D'ACIDE HYALURONIQUE MODIFIE: SYNTHESE ET ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE/PROPRIETES RHEOLOGIQUES

Les travaux décrits dans ce mémoire sont consacrés au développement de nouveaux dérivés amphiphiles de l'acide hyaluronique (HA) obtenus par greffage de chaînes alkyle hydrophobes le long de la chaîne macromoléculaire hydrophile. La stratégie de greffage présentée a été optimisée afin de pouvoir transposer la synthèse à l'échelle industrielle.

Le comportement en milieu aqueux des polymères natifs et les propriétés viscoélastiques des systèmes associatifs ont été étudiés par des mesures rhéologiques en écoulement et en régime dynamique.

Une modulation des propriétés physico-chimiques est obtenue par la variation de la longueur de la chaîne du HA, de l'hydrophobicité des greffons et/ou de l'introduction dans le système associatif des molécules hôtes (alpha et beta cyclodextrines) ou des tensioactifs. Des expériences de titration calorimétrique couplées à de la RMN bidimensionnelle (ROESY), à des mesures de viscosités et à la modélisation moléculaire ont permis, suite à une analyse détaillée, d'élucider les interactions entre des HA alkylés et des cyclodextrines.

Au cours de ce travail, nous avons présenté différents types de produits industriels développés par des sociétés européennes et américaines en tant que viscosupplément, la viscosupplémentation étant l'application visée pour nos dérivés développés dans le cadre de cette thèse.

MOTS CLES : Polysaccharides, biomatériaux, hydrogels physiques, systèmes associatifs, acide hyaluronique, interactions hydrophobes, rhéologie, viscosupplémentation.

ASSOCIATIVE SYSTEMS BASED ON MODIFIED HYALURONIC ACID: SYNTHESIS AND STUDY OF THE RELATIONS BETWEEN THE STRUCTURE AND THE RHEOLOGICAL PROPERTIES

The work described in this memory is devoted to the development of new amphiphilic derivatives of hyaluronic acid (HA) obtained by grafting hydrophobic alkyl chains along the hydrophilic macromolecular backbone. The strategy of grafting presented was optimized in order to be able to transpose the synthesis on an industrial scale. The behavior in aqueous medium of the native polymers and the viscoelastic properties of the associative systems were studied by flow and dynamic rheological measurements. A modulation of the physicochemical properties is obtained by the variation of the HA molecular weight, the hydrophobicity of the grafts and/or the introduction into the associative system of host molecules (alpha and beta cyclodextrins) or of surfactants. Calorimetric titration coupled with two-dimensional NMR experiments (ROESY), viscosity measurements and molecular modeling, allowed us, after a detailed analysis, to elucidate the interactions between the alkylated HA derivatives and cyclodextrins. During this work, we presented various types of industrial products developed by European and American companies as viscosupplements, viscosupplementation being the application targeted for our derivatives developed within the framework of this thesis.