



HAL
open science

Élaboration de nouveaux biopolyesters bactériens fonctionnalisés pour des applications dans le domaine biomédical

Pierre Lemechko

► **To cite this version:**

Pierre Lemechko. Élaboration de nouveaux biopolyesters bactériens fonctionnalisés pour des applications dans le domaine biomédical. Autre. Université Paris-Est, 2012. Français. NNT : 2012PEST1143 . tel-00804382

HAL Id: tel-00804382

<https://theses.hal.science/tel-00804382>

Submitted on 25 Mar 2013

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 PARIS-EST

Ecole doctorale Sciences, Ingénierie et Environnement

Doctorat

Spécialité Chimie et sciences des Matériaux

Présenté par

Pierre LEMECHKO

Elaboration de nouveaux biopolyesters bactériens fonctionnalisés pour
des applications dans le domaine biomédical

le 13 juillet 2012

Jury

Dr. Patricia Albanese	Rapporteur
Dr. Isabelle Linossier	Rapporteur
Pr. Philippe Guégan	Examineur
Pr. Estelle Renard	Examineur
Dr. Christelle Simon-Colin	Directeur de thèse
Pr. Valérie Langlois	Directeur de thèse
Dr. Jean Guezennec	Invité

Résumé

Les poly(3-hydroxyalcanoate)s ou PHAs sont des biopolyesters linéaires biodégradables et biocompatibles synthétisés par des microorganismes bactériens en tant que réserve de carbone et d'énergie. Ils sont synthétisés par des bactéries à partir de ressources renouvelables et la diversité de leurs structures possibles se traduit par un large éventail de polymères ayant des propriétés mécaniques très différentes.

Nous avons tout d'abord testé les capacités de production de PHAs de nouvelles souches bactériennes marines provenant de tapis microbiens de Polynésie française, en utilisant, entre autres, des substrats naturels comme l'huile de coprah, le glucose et l'acide oléique. Nous avons notamment montré que la souche *Pseudomonas guezenei* est capable de produire des PHAs avec des taux d'insaturation contrôlés et de masse molaire très élevée. Puis, des oligomères de PHAs fonctionnalisés de structures contrôlées portant des fonctions terminales alcynes ou alcènes ont été préparés par transestérification. Ces oligomères ont ensuite été utilisés pour l'élaboration par chimie click de copolymères amphiphiles greffés EPS-g-PHA avec des exopolysaccharides (EPS) bactériens. Enfin la dernière partie de ces travaux a consisté en la réalisation d'un support de croissance pour le développement de cellules souches pour l'ingénierie tissulaire combinant les propriétés mécaniques des PHAs et les propriétés hydrophiles et bioactives des EPS.

Mots clés: poly(3-hydroxyalcanoate), polyester bactérien, copolymère amphiphile, polysaccharide, exopolysaccharide, chimie click, oligoester fonctionnalisé

Summary

Poly(3-hydroxyalkanoate)s, or PHAs, are linear biodegradable and biocompatible biopolyesters synthesized by bacterial microorganisms as energy and carbon supply. They are synthesized by bacteria from renewable resources and the diversity of the achievable structures leads to a large range of mechanical properties.

First, we studied the PHAs production ability of several new marine bacteria strains, isolated from microbial mats from French Polynesia, using, among others, natural substrates such as coprah oil, glucose and oleic acid. We showed particularly that the strain *Pseudomonas guezenei* was able to produce PHAs with controlled amounts of insaturations and high molar masses. Then, we prepared functionalized PHAs oligomers with controlled structure and bearing a terminal alkyne or alkene function. Following that, these oligomers were used to elaborate amphiphilic by click chemistry graft copolymers EPS-*g*-PHA with bacterial exopolysaccharide (EPS). Finally, the last part of this work was the making of a scaffold for stem cell culture for tissue engineering which combined the mechanical properties of PHAs and the hydrophilicity and bioactive properties of EPS.

Keywords: poly(3-hydroxyalkanoate), bacterial polyester, amphiphilic copolymer, polysaccharide, exo-polysaccharide, click chemistry, functionalized oligoesters

Laboratoires



Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est, UMR 7182, CNRS, UPEC

Equipe Systèmes Polymères Complexes

2-8 rue Henri Dunant

94320 Thiais France



Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

Département Biotechnologie Ressources Marines

Laboratoire Biotechnologie et Molécules Marines

Equipe Biotechnologie Environnementale

B.P. 70, 29280 Plouzane, France

Remerciements

Cette étude a été réalisée au Laboratoire Biotechnologie et Molécules Marines de l'IFREMER et dans l'équipe Systèmes Polymères Complexes de l'Institut de Chimie et des Matériaux de Paris-Est. Je remercie d'abord le Dr. Sylvia Colliéc-Jouault, chef de laboratoire du LBMM et le Dr. Patrick Hémerly, directeur de l'ICMPE de m'avoir accueilli.

Je voudrais surtout remercier le Pr. Valérie Langlois, le Dr. Jean Guézennec et le Dr. Christelle Simon-Colin pour m'avoir confié ce sujet et dirigé cette thèse.

Je tiens également à remercier les Drs Patricia Albanese (Université de Paris-Est Créteil) et Isabelle Linossier (Université de Bretagne Sud) pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je remercie tout particulièrement le Pr Philippe Guégan (Université Evry Val d'Essonne) pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Enfin je remercie le Pr. Estelle Renard dont les conseils ont été précieux tout au long de ces années. Je voudrais vous exprimer toute ma reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour les discussions intéressantes que nous avons eues.

Un grand merci aux personnes qui m'ont particulièrement aidé, Sophie Schmitt qui m'a initié aux manips de microbio, Christelle Gouin pour la GC/MS et Julien Ramier qui a pris sur son temps de thèse pour faire les tests in vitro de mes matériaux. Je n'oublie bien sûr pas tous ceux qui m'ont aidé, que ce soit par un coup de main ou des conseils avisés, Dr. Véronique Wintgens, Dr. Gisèle Volet, Dr. Amani El-Fagui, Julien Babinot, Dr. Marie-France Trichet, Dr. Florent Dalmas, Rémy Pires.

Et je n'oublie pas tous les autres, les membres du club Mots Fléchés (niveaux Master!) de la pause midi de l'IFREMER, Valentin, Marie, Mathieu, Benji, Cyrielle, Eloïse ainsi que tous les autres, bretons ou non, qui m'ont fait aimer ce petit bout de France qui perce les flancs de l'Atlantique, Jojo, Tinou et tous les autres...

Thiais, un laboratoire entre cimetière et travaux du tram, caché derrière un bricorama... Heureusement, les personnes présentes et passées en font un lieu agréable et plein de vie. Je n'oublierai pas ceux que j'y ai croisé : les Juliens, David, Wendy, Mathieu, Rim, Amani, Nassima, Tong-Po, Benjamin, Ming, Nico, les Romains, Marie, Marlène, Fabienne... Grâce à vous, je n'ai pas trop souffert de la grisaille parisienne et de son manque de mer (et Paris-Plage ne compte pas!).

Je n'oublie pas le Sg. Bisoli car rien de tel pour décompresser qu'une soirée geek à massacrer du mob. Et Darius, on se voit pas souvent mais à chaque fois notre plan de conquête du monde prend forme petit à petit.

Enfin, je tiens à remercier les personnes qui m'ont soutenu durant ces années et les moments difficiles : mes parents, Marc, c'est dommage que vous n'ayez pu tous assister à la soutenance et Lucile qui m'a accompagné, supporté et soutenu pendant ces années.

Sommaire

Introduction générale.....	17
-----------------------------------	-----------

Chapitre 1: Revue bibliographique sur les PHAs ... 23

1. Introduction.....	27
2. Production bactérienne des PHAs	28
2.1. Présentation des PHAs	28
2.1.1. Structure des PHAs	28
2.1.2. Conditions de culture.....	29
2.2. Nature des inclusions	29
2.3. Procédés d'extraction des PHAs	31
2.4. Biosynthèse des PHAs	32
2.4.1. Les PHAscl	34
2.4.2. Les PHAmcl	35
3. Propriétés des PHAs bactériens.....	40
3.1. Dégradabilité.....	40
3.1.1. Dégradation intracellulaire	40
3.1.2. Dégradation extracellulaire	42
3.2. Biocompatibilité	44
3.3. Propriétés physico-chimiques.....	46
3.3.1. Les PHAscl	46
3.3.2. Les PHAmcl	47
4. Modifications des PHAs	49
4.1. Fonctionnalisation des PHAs	49
4.1.1. Biosynthèse de PHAs fonctionnalisés.....	50
4.1.2. Modification chimique de PHAs.....	51
4.2. Copolymères greffés	57
4.2.1. Copolymères greffés à squelette PHAs	57
4.2.2. Copolymères greffés à greffons PHAs	59
4.3. Copolymères à blocs	61

5.	Applications des PHAs dans le domaine biomédical.....	65
	5.1. Libération contrôlée de principes actifs.....	65
	5.1.1. Les micro/nanoparticules.....	67
	5.1.2. Les implants.....	69
	5.2. La régénération tissulaire.....	71
6.	Conclusion	76
7.	Références bibliographiques.....	78

Chapitre 2: Biosynthèse de PHAs 87

1.	Introduction.....	91
2.	Criblage de couples souches/substrats pour la production de PHAs.....	92
	2.1. Production de PHAmcl.....	94
	2.2. Production de PHAscl.....	106
3.	Conclusion	113
4.	Partie expérimentale.....	114
5.	Références bibliographiques.....	118

Chapitre 3: Préparation d'oligomères de PHAs

fonctionnalisés 121

1.	Introduction.....	125
2.	Oligoesters de PHAscl possédant une fonction alcyne terminale.....	126
	2.1. Résumé	126
	2.2. Article 1: Functionalized oligoesters from poly(3-hydroxyalkanoate)s containing reactive end group for click chemistry: Application to novel copolymer synthesis with poly(2-methyl-2-oxazoline)	128
	2.2.1. Abstract.....	128
	2.2.2. Introduction.....	129
	2.2.3. Experimental Section.....	130
	2.2.4. Results and Discussion	133
		12

2.2.4.1. Influence of the solvent reaction for the preparation of alkyne terminated PHBV oligomers.	133
2.2.4.2. Influence of the Catalyst Amount.....	138
2.2.4.3. Transesterification of Different Polyesters.....	139
2.2.4.4. Click chemistry reactions.....	140
2.2.4.5. Conclusion	144
2.2.4.6. Acknowledgment	144
2.2.4.7. References.....	144
2.3. Influence de la nature du polyester.....	147
2.4. Comparaison du chauffage micro-onde et du chauffage conventionnel	149
3. Applications du procédé d'alcoolyse.....	150
3.1. En présence d'alcool allylique.....	150
3.2. Formation d'oligoesters de PHBV par hydrolyse	153
4. Conclusion	156
5. Partie expérimentale.....	158
6. Références bibliographiques.....	159

Chapitre 4: Préparation de copolymères greffés à base de PHAs et de polysaccharides 161

1. Introduction.....	165
2. Elaboration de copolymères dextrane-g-PHA: comparaison du greffage par estérification directe et chimie click.....	166
2.1. Résumé	166
2.2. Article 2: Synthesis of Dextran-graft-PHBHV amphiphilic copolymer using click chemistry approach.....	168
2.2.1. Abstract.....	168
2.2.2. Introduction.....	169
2.2.3. Experimental section	170
2.2.4. Results and Discussion	173
2.2.4.1. Synthesis of graft copolymers dextran-g-poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	173
2.2.4.2. Properties of Dextran-g-PHBHV copolymers	183
2.2.5. Conclusion.....	187
2.2.6. Acknowledgments.....	188
2.2.7. References	188
2.3. Synthèse de dextrane-g-PHAMcl.....	190

3. Synthèse de copolymères greffés amphiphiles à partir d'exopolysaccharides et de PHAs	192
4. Conclusion	197
5. Références bibliographiques.....	198

Chapitre 5: Préparation d'un support de croissance cellulaire..... 199

1. Introduction.....	203
2. Elaboration d'une structure tridimensionnelle à base d'exopolysaccharide-g-poly(3-hydroxyalcanoate): influence de l'EPS sur l'adhésion cellulaire.....	204
2.1. Résumé	204
2.2. Article 3: Designing Exopolysaccharide-graft-Poly(3-hydroxyalkanoate) Copolymers for Electrospun Scaffolds	206
2.2.1. Abstract.....	206
2.2.2. Introduction.....	207
2.2.3. Materials and Methods	209
2.2.4. Results and discussion.....	213
2.2.4.1. <i>Synthesis of graft copolymer HE800-g-PHBHV.....</i>	<i>213</i>
2.2.4.2. <i>Scaffold preparation.....</i>	<i>215</i>
2.2.4.3. <i>Adhesion and Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells</i>	<i>218</i>
2.2.5. Conclusion.....	221
2.2.6. Acknowledgements.....	222
2.2.7. References	222
3. Conclusion	224

Conclusion Générale et Perspectives..... 225

Liste des abréviations

PHAs	Poly(3-hydroxyalcanoate)s
EPS	Exopolysaccharides
PHB	Poly(3-hydroxybutyrate)
PHAscl	PHA short chain length (PHA à chaînes latérales courtes)
PHAmcl	PHA medium chain length (PHA à chaînes latérales moyennes)
PHAlcl	PHA long chain length (PHA à chaînes latérales longues)
PHB	Poly(3-hydroxybutyrate)
PHBHV	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)
P3HB4HB	Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)
PHO	Poly(3-hydroxyoctanoate)
PHOHNe	Poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxynonénoate)
PHOU	Poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyundécénoate)
3HB	3-hydroxybutyrate
3HV	3-hydroxyvalérate
3HHx	3-hydroxyhexanoate
3HHp:1	3-hydroxyhepténoate
3HO	3-hydroxyoctanoate
3HN:1	3-hydroxynonénoate
3HD	3-hydroxydécanoate
3HUD:1	3-hydroxyundécénoate
3HDD	3-hydroxydodécanoate
PEG	Poly(ethylene glycol)
PLA	Poly(lactide)
PLLA	Poly(L-lactide)
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
PS	Poly(styrène)
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PVA	Poly(alcool vinylique)
PHEMA	Poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle)
POXZ	Poly(2-méthyl-2-oxazoline)
PTFE	Poly(tétrafluoroéthylène)
DBTDL	Dilaurate de dibutyl étain
PMDETA	N,N,N,N',N'',N'''-pentaméthyl-diéthylène-triamine
CuAAC	Cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre

DS	Degré de substitution
hMSC	Cellules souches mésenchymateuses humaines
MST	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
TCP	Tissue Culture Plate (Puits de culture tissulaire)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight
AED	Analyse enthalpique différentielle
IRTF	Infrarouge à transformée de Fourier
CG/SM	Chromatographie gazeuse / Spectrométrie de masse
CPG	Chromatographie à perméation de gel
DDL	Diffusion de lumière
SEC	Size exclusion chromatography (Chromatographie d'exclusion stérique)
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ADN	Acide désoxyribonucléique
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase)
CoA	Coenzyme A
ORF	Open Reading Frame (Cadre ouvert de lecture)
ACP	Acyl Carrier Protein
IPD	Indice de polydispersité
MCS	Masse de Cellules Sèches
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMF	Diméthylformamide
THF	Tétrahydrofurane
TFE	Trifluoroéthanol
DCC	Dicyclohexylcarboxydiimide
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMDS	Disulfure de diméthyle
BSTFA	N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide)

Introduction générale

Introduction générale

Au cours des dernières années, les matières plastiques pour la plupart issues de ressources fossiles (poly(éthylène), poly(propylène), poly(styrène), poly(chlorure de vinyle)...) ont remplacé de nombreux autres matériaux et ont été largement utilisées pour des applications domestiques, industrielles et médicales. Dans le contexte actuel qui penche vers une réduction de la dépendance vis-à-vis des ressources fossiles, des alternatives sont explorées. De plus, la gestion de l'après-vie de ces produits, souvent à usage unique dans les domaines médical et de l'emballage, génère des problèmes économiques car ils sont un fardeau pour la filière de gestion des déchets solides, et environnementaux: la Grande Plaque de Déchets du Pacifique Nord en étant un exemple extrême. Réduire la consommation de ces matières plastiques paraît difficile tant ils sont utiles, en raison de l'étendue de leurs propriétés. Une alternative serait de remplacer petit à petit ces polymères synthétiques par des bioplastiques. Qu'est-ce qu'un bioplastique? D'après l'European Bioplastics Association, un bioplastique doit satisfaire au moins l'une de ces conditions: une part significative du carbone du matériau doit provenir d'une ressource renouvelable et/ou le matériau doit être biodégradable¹. Si la première propriété ne bénéficie pas encore d'un standard international, le critère de biodégradabilité est maintenant défini en Europe (norme EN13432, 2000).

Parmi les différents polymères entrant dans cette définition des bioplastiques, les poly(3-hydroxyalcanoate)s (PHAs) constituent une famille de polymères très prometteuse. En effet, ils sont entièrement biosynthétisés par des bactéries à partir de ressources renouvelables et sont par nature biodégradables. Les PHAs sont des polyesters linéaires qui sont souvent des copolymères statistiques dont plus de 150 types de monomères ont été identifiés depuis la découverte du premier d'entre eux, le poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) par Maurice Lemoigne à l'Institut Pasteur en 1926. Les PHAs sont généralement classés en trois sous-groupes: les PHAscl (short chain length) à courtes chaînes latérales, plutôt

¹ <http://en.european-bioplastics.org/bioplastics/> (dernière consultation le 20/05/2012).

thermoplastiques, les PHAmcl (medium chain length) à moyennes chaînes latérales, plutôt élastomériques, et les PHAlcl (long chain length) à longues chaînes latérales. Les PHAscl ont été les premiers découverts, les plus étudiés et sont les seuls à être produits commercialement à l'heure actuelle. Un certain nombre de compagnies produisent différents types de PHAscl avec des productions de l'ordre de dizaines de milliers de tonnes par an avec des prix allant de 1,70 à 3,70 €/kg.

Les PHAs sont des biopolyesters biocompatibles pouvant être utilisés comme biomatériaux. D'après la définition de la Société Européenne des Biomateriaux, un biomatériau est un « matériau non-vivant utilisé dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques »². Toutefois, récemment à la notion de biocompatibilité des biomatériaux s'est ajoutée la notion de biocompatibilité élargie qui est «la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique». Pour cela, il est alors nécessaire de coupler le PHA avec un autre composant, molécule ou macromolécule, présentant l'activité biologique désirée.

Le but de cette étude est donc, dans un premier temps d'obtenir de nouveaux PHAs à partir de souches bactériennes issues du milieu marin peu exploitées du point de vue de la biosynthèse des PHAs, puis de développer des stratégies de modification chimique afin de réaliser des biomatériaux bioactifs à partir de PHAs. Le caractère bioactif sera apporté par des exopolysaccharides (EPS) qui sont des biopolymères sécrétés par certaines souches bactériennes marines.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à une revue bibliographique présentant les principales connaissances sur les PHAs bactériens.

Dans le deuxième chapitre, nous étudierons la biosynthèse de PHAs par six souches bactériennes marines. Cette étude est réalisée au Laboratoire Biotechnologie et Molécules

² Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986, édité par D.F. Williams, New York, Elsevier, 1987.

Marines de l'IFREMER de Brest. Les capacités de production de PHAs de ces souches seront évaluées sur différents substrats dont des substrats naturels comme l'huile de coprah ou l'acide oléique. Les résultats de ce criblage souche/substrat seront exposés ainsi que les caractérisations des PHAs originaux obtenus.

La suite de ces travaux se sont déroulés au sein de l'équipe Systèmes Polymères Complexes (SPC) de l'ICMPE à Thiais. Pour élaborer de nouvelles structures à base de PHAs, des copolymères à blocs et des copolymères greffés, nous avons dans ce troisième chapitre préparé des oligomères de PHAs fonctionnalisés. La présence de fonctions réactives en bout de chaînes comme des fonctions alcyne, alcène ou acide carboxylique permettra par la suite d'envisager des réactions de couplage avec des polymères hydrophiles.

Le quatrième chapitre exposera deux stratégies de synthèse développées pour préparer des copolymères amphiphiles greffés avec un squelette polysaccharide et des greffons PHAs. Le dextrane, polysaccharide ne présentant que des fonctions alcools secondaires, sera utilisé comme polysaccharide modèle pour la mise au point de la synthèse des copolymères. La première synthèse est basée sur une réaction de chimie click, la cycloaddition-addition de Huisgen, à partir des oligomères de PHAs portant des fonctions alcynes terminales et de polysaccharide porteur de fonctions azotures. La deuxième voie est une estérification entre la fonction acide carboxylique terminale d'oligomères de PHAs activée par du chlorure de thionyle et les fonctions alcools du dextrane. Le caractère amphiphile de ces copolymères sera abordé.

Le cinquième chapitre sera consacré à une application biomédicale des copolymères amphiphiles. Le copolymère greffé à base d'un exopolysaccharide, le HE800, similaire à l'acide hyaluronique, sera utilisé pour la réalisation d'un support bioactif réalisé par un procédé original combinant électrospinning et électrospraying pour de l'ingénierie tissulaire. La biocompatibilité de ce biomatériau sera évaluée *in vitro* par des cultures de cellules souches. Cette étude est réalisée en collaboration avec le CRRET de Créteil.

Chapitre 1: Revue bibliographique sur les PHAs

Chapitre 1: Revue bibliographique sur les PHAs

1.	Introduction.....	27
2.	Production bactérienne des PHAs	28
	2.1. Présentation des PHAs	28
	2.1.1. Structure des PHAs	28
	2.1.2. Conditions de culture.....	29
	2.2. Nature des inclusions	29
	2.3. Procédés d'extraction des PHAs	31
	2.4. Biosynthèse des PHAs	32
	2.4.1. Les PHAscl	34
	2.4.2. Les PHAmcl.....	35
3.	Propriétés des PHAs bactériens.....	40
	3.1. Dégradabilité.....	40
	3.1.1. Dégradation intracellulaire	40
	3.1.2. Dégradation extracellulaire	42
	3.2. Biocompatibilité.....	44
	3.3. Propriétés physico-chimiques.....	46
	3.3.1. Les PHAscl	46
	3.3.2. Les PHAmcl.....	47
4.	Modifications des PHAs	49
	4.1. Fonctionnalisation des PHAs	49
	4.1.1. Biosynthèse de PHAs fonctionnalisés.....	50
	4.1.2. Modification chimique de PHAs.....	51
	4.2. Copolymères greffés	57
	4.2.1. Copolymères greffés à squelette PHAs	57
	4.2.2. Copolymères greffés à greffons PHAs	59
	4.3. Copolymères à blocs	61
5.	Applications des PHAs dans le domaine biomédical.....	65
	5.1. Libération contrôlée de principes actifs.....	65
	5.1.1. Les micro/nanoparticules.....	67
	5.1.2. Les implants.....	69
	5.2. La régénération tissulaire.....	71
6.	Conclusion	76

7. Références bibliographiques..... 78

1. Introduction

Le premier poly(3-hydroxyalcanoate) ou PHA découvert fut le poly(3-hydroxybutyrate), PHB, isolé par Lemoigne en 1926 chez la bactérie *Bacillus megaterium* (Lemoigne 1926; Lemoigne 1927). Le PHB a également été mis en évidence dans un nombre important de microorganismes comme par exemple les archées, les bactéries Gram-négatif et Gram-positif et les cyanobactéries... (Forsyth 1958). En 1974, Wallen et Rohwedder ont identifié de nouveaux poly(3-hydroxyalcanoate)s différents du PHB, qui sont des copolymères contenant des unités 3-hydroxyvalérate (3HV) et 3-hydroxyhexanoate (3HHx) (Wallen 1974). Par la suite, des études ont permis d'isoler d'autres types de poly(3-hydroxyalcanoate)s. La découverte de ces nouveaux polyesters permettant d'élargir le champ des propriétés de ces matériaux a eu un impact considérable sur l'intérêt économique et la recherche portés à ces polymères.

Dans les années 80, le développement de la recherche sur les PHAs a concerné le clonage et la caractérisation des gènes impliqués dans le processus de biosynthèse de ces composés. Les gènes codant pour les enzymes responsables de la synthèse des polymères ont été identifiés et clonés dans des bactéries modèles comme *Escherichia coli*. Il a alors été possible de faire produire des PHAs par des organismes génétiquement modifiés que ce soit pour essayer d'augmenter la productivité, pour comprendre les mécanismes de la biosynthèse ou pour obtenir des structures non usuelles. Depuis les années 90, les modifications chimiques de PHAs permettent d'envisager l'apparition de matériaux à base de PHAs aux propriétés élargies.

La commercialisation du PHBHV sous le nom de Biopol a été initiée dans les années 70 par ICI (Imperial Chemical Industries). D'autres entreprises se sont lancées récemment dans la course aux PHAs avec, parmi d'autres, Telles (USA) qui commercialise du PHB sous le nom de Mirel, PHB Industrial S. A. (Brésil) qui produit du PHB et du poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate) (PHBHV) sous le nom de Biocycle, Biomer (Allemagne) qui produit du PHB et du PHBHV sous le nom de Biomer, Procter & Gamble (USA) qui commercialise du

poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) sous le nom de Nodax et Tianjin Green Bio-Science/DSM (Chine) qui commercialise du poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (P3HB4HB) sous le nom de Green Bio.

Cette étude bibliographique vise à passer en revue la biosynthèse et les propriétés des différents PHAs ainsi que les opportunités offertes par les réactions de modification chimique, en présentant les différentes structures à base de PHAs. Puis nous présenterons quelques utilisations potentielles de ces biopolyesters dans le domaine biomédical, telles que la libération contrôlée de molécules bioactives et l'ingénierie tissulaire.

2. Production bactérienne des PHAs

2.1. Présentation des PHAs

2.1.1. Structure des PHAs

Les PHAs sont des polyesters linéaires produits par des bactéries possédant des chaînes latérales de longueur variable. La nature de cette chaîne latérale dépend de la nature du substrat carboné et de la souche bactérienne. Dans la chaîne principale, les PHAs possèdent un carbone asymétrique de configuration (R), ce sont donc des polymères isotactiques. Cette stéréospécificité qui leur donne aussi un caractère cristallin est due à la stéréospécificité des enzymes responsables de la biosynthèse des PHAs.

Selon la longueur de la chaîne latérale, trois types de PHAs peuvent être différenciés, les PHAs à courtes, moyennes et longues chaînes latérales (**Figure 1**):

- les PHAs à chaînes latérales courtes ou PHAscl (short chain length), possèdent 1 à 2 atomes de carbone dans leur chaîne latérale (R= CH₃ à C₂H₅).
- les PHAs à chaînes latérales moyennes ou PHAmcl (medium chain length) comportent un groupement R constitué de 3 à 9 atomes de carbone (R= C₃H₇ à C₉H₁₉).

- les PHAs à chaînes latérales longues ou PHAlcl (long chain length) comportent un groupement R constitué de plus de 10 atomes de carbone.

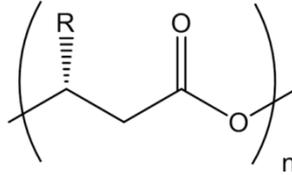


Figure 1: Formule générale des PHAs.

2.1.2. Conditions de culture

Lorsque des bactéries sont dans un milieu favorable, elles utilisent les éléments à leur disposition pour synthétiser les constituants nécessaires à leur métabolisme, leur croissance et leur multiplication. Si un nutriment, notamment un élément nécessaire à leur croissance, est limité, certaines bactéries sont capables d'accumuler des PHAs. La biosynthèse de PHA a été observée en cas de pénuries en magnésium, sulfate, azote, phosphate et/ou oxygène (Repaske 1976; Ward 1977). Le polymère sert essentiellement de réserve de carbone et d'énergie. A cet effet les PHAs sont idéaux. Grâce à leur faible solubilité et leur haut poids moléculaire, il n'exerçent ainsi qu'une faible pression osmotique sur les parois de la cellule bactérienne. Le PHA stocké sera ensuite dépolymérisé afin de mobiliser le carbone en fonction des besoins cellulaires.

2.2. Nature des inclusions

Les PHAs se présentent, *in vivo*, sous la forme de granules intracytoplasmique, de diamètre compris entre 0,2 et 0,5 μm . Du fait de leur caractère réfringent, ces granules peuvent ainsi être observées directement par microscopie optique à contraste de phase (**Figure 2**). Par cette technique, il est aisé de visualiser des granules de PHAscl, en revanche

le contraste entre des granules de PHAmcl et l'intérieur des bactéries est beaucoup moins prononcé. La coloration, *in vivo*, par du Noir Soudan révèle la nature lipidique de la membrane des granules (Williamson 1958).

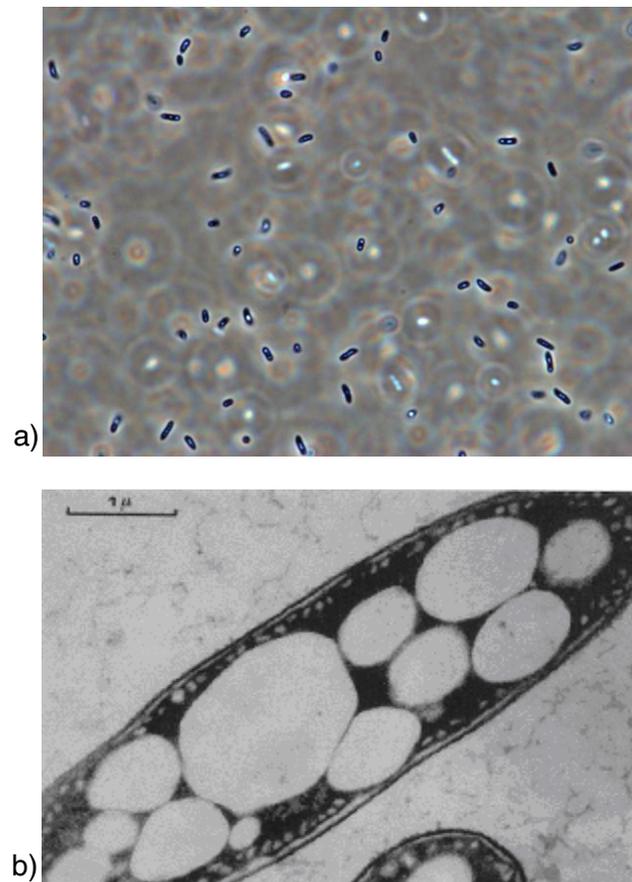


Figure 2: Inclusions de PHBV a) chez *Halomonas profundus* en microscopie optique à contraste de phase et b) chez *Azobacter chroococcum* en microscopie électronique à transmission (Lenz 2005).

Les granules sont composées d'un cœur en PHA entouré par une monocouche de phospholipides dans laquelle sont fixées la PHA synthase et la PHA dépolymérase, mais aussi des protéines structurantes appelées phasines et des protéines de régulation (**Figure 3**). Les phasines sont des protéines non catalytiques, amphiphiles, servant à la formation et à la stabilisation de l'inclusion. Les protéines de régulation servent à contrôler la synthèse des granules de PHA (Grage 2009).

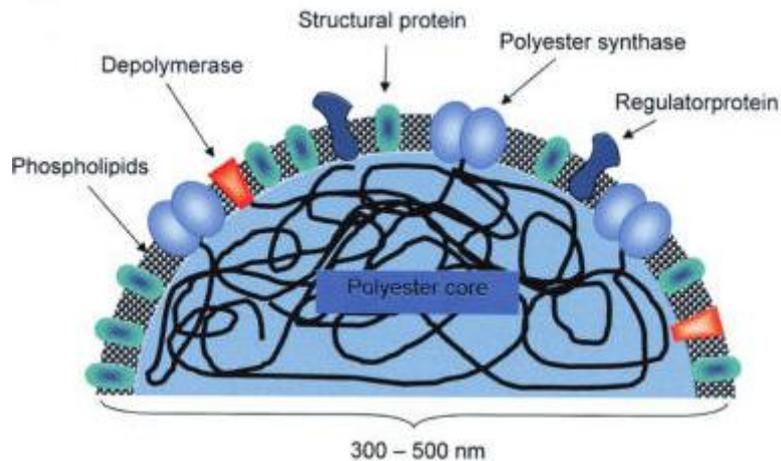


Figure 3: Schéma d'un granule de PHA (Grage 2009).

Barnard et al. ont montré par spectroscopie RMN du ^{13}C que le PHB était amorphe dans les granules intracytoplasmiques (Barnard 1988; Barnard 1989). Ceci a permis de comprendre notamment les différences de dégradabilité entre le polymère *in vivo* et après des traitements de récupération qui entraînent sa cristallisation. Cependant la question se pose à propos des raisons qui empêchent la cristallisation *in vivo* puisque la température est largement supérieure à la T_v du polymère ($T_v=4^\circ\text{C}$ pour le PHB). Dekoning et al. ont montré que l'état amorphe du polymère pouvait s'expliquer simplement par la cinétique de cristallisation (Dekoning 1992). Cette conservation du polymère à l'état amorphe dans les granules est important pour la bactérie car les PHA-dépolymérase agissent préférentiellement sur le polymère amorphe.

2.3. Procédés d'extraction des PHAs

Des études ont montré que le chloroforme est un bon solvant des PHAs. La solvation s'expliquerait d'une part par l'interaction polaire entre le chlore et l'atome de carbone du carbonyle du PHA et d'autre part la formation d'une liaison hydrogène entre le carbonyle et l'hydrogène déficitaire en électron (Terada 1999; Jacquél 2007). Cette structure forme alors un cycle à cinq sommets qui la stabilise.

Les PHAs peuvent donc être extraits des cellules bactériennes lyophilisées par le chloroforme ou le dichlorométhane. Par cette technique, les lipides sont également co-extraits. Pour éliminer les lipides, le polymère est purifié par précipitations successives dans un solvant adéquat (méthanol ou éthanol). Une méthode récente permet de diminuer les quantités de solvants pour les PHAmcl (Wampfler 2010a; Wampfler 2010b). Après extraction du PHAmcl de la biomasse par du méthyl *tertio*-butyl éther (MTBE), la solution est filtrée plusieurs fois sur du charbon activé avant d'être précipitée une fois dans du méthanol (ou éthanol). Cette méthode n'utilise donc pas de solvants chlorés.

L'utilisation de l'hypochlorite de sodium constitue une alternative à l'utilisation de solvants organiques. En effet, l'emploi d'une solution aqueuse à 30% d'hypochlorite de sodium pendant 30 à 60 minutes conduit à la destruction de l'organisation de la membrane bactérienne et à la libération des granules de polyester (Doi 1990; Taniguchi 2003). Cependant un traitement supérieur à 60 minutes entraîne une dégradation des chaînes du polyester. Les granules de PHB ainsi obtenus, sont précipités au méthanol ou à l'éther éthylique afin d'éliminer les lipides.

Dans le cadre du traitement enzymatique, les granules de PHB sont isolés en traitant les cellules bactériennes à l'aide d'enzymes qui détruisent tous les composants cellulaires excepté le PHB (Griebel 1968). Le procédé implique le traitement par ultrasons des cellules traitées au lysozyme pour permettre la libération des granules de PHB. Les granules sont séparés des débris cellulaires par centrifugation à faible vitesse. Un processus similaire a été employé avec succès pour l'extraction des PHAmcl (deKoning 1997a; deKoning 1997b).

2.4. Biosynthèse des PHAs

Il est connu maintenant que les PHA synthases responsables de la biosynthèse des PHAs montrent une affinité pour une large gamme de substrats. Des microorganismes sont capables de produire des PHAs à partir de substrats complexes comme de la mélasse de

canne à sucre, des huiles végétales, des alcanes ou même de simples carbohydrates (Kellerhals 2000; Ballistreri 2001; Chen 2001; Ashby 2005; Simon-Colin 2008; Silva-Queiroz 2009; Simon-Colin 2009). Les voies métaboliques identifiées, intervenant dans la synthèse des PHAs, peuvent être regroupées en deux classes principales. La première est représentée par *Ralstonia eutropha* et regroupe les microorganismes synthétisant principalement des PHAscl. Les *Pseudomonas* appartenant au groupe d'homologie d'ARNr I sont caractéristiques de la deuxième classe qui synthétise principalement des PHAmcl. Ces deux principales familles d'organismes capables de synthétiser des PHAs possèdent chacune des enzymes spécifiques impliquées dans la synthèse des PHAs dont les gènes codants ont été identifiés (**Figure 4**). Les gènes *phaC*, *phaC1* et *phaC2* codent pour les PHA-synthases et *phaZ* pour la PHA-dépolymérase. Dans le cas des bactéries de la classe I, les gènes codant pour la β -céthiolase (*phaA*) et l'acétoacétyl-CoA réductase (*phaB*), deux enzymes impliquées dans la biosynthèse des PHAscl, sont aussi connus. *phaD* et ORF1 sont des sections codantes mais dont la fonction est encore inconnue.

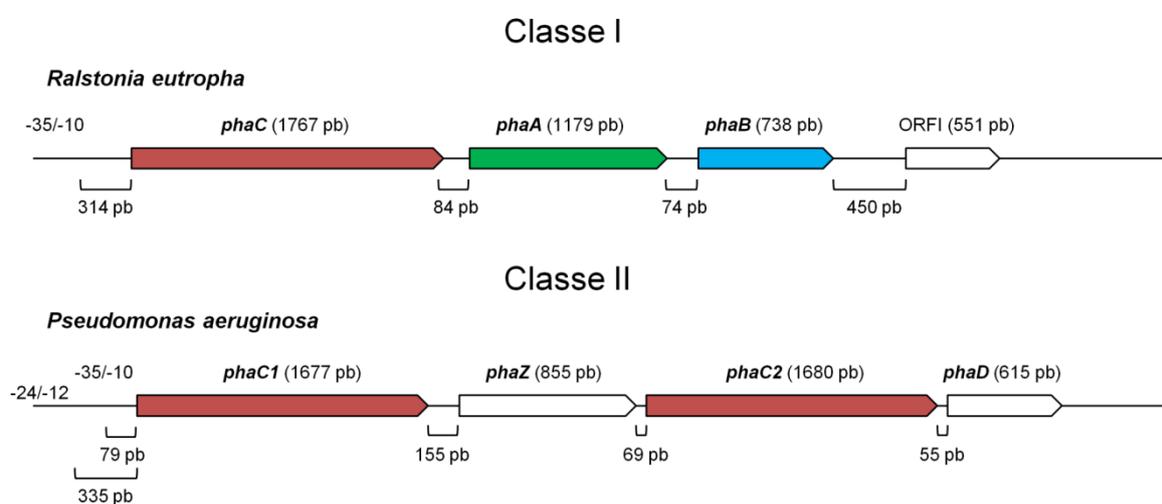


Figure 4: Organisation des gènes codant pour les enzymes des deux biosynthèses principales. *phaC/C1/C2* : gènes codant la PHA synthase. *phaA* : gène codant la β -céthiolase. *phaB* : gène codant l'acétoacétyl-CoA réductase. *phaZ* : gène codant la PHA dépolymérase. *phaD* et ORF1 (Open Reading Frame) : cadres ouvert de lecture de fonctions inconnues. (Rehm 2003)

2.4.1. Les PHAscl

La biosynthèse des PHAscl comme le PHB fait intervenir trois enzymes à partir de l'acétyl-CoenzymeA (acétyl-CoA) (**Figure 5**) (Zinn 2001). L'acétyl-CoA est un intermédiaire clé du métabolisme primaire. Il est produit à la fois lors de l'oxydation des acides gras et des sucres.

- La première réaction est catalysée par la β -cétotliolase qui par condensation de Claisen lie deux molécules d'acétyl-CoA entre elles pour former l'acétoacétyl-CoA. *Ralstonia eutropha* possède deux β -cétotliolases (A et B) capables de jouer un rôle dans la synthèse du PHB. La différence entre ces deux enzymes concerne leur spécificité de substrat. L'enzyme A catalyse la synthèse de l'acétoacétyl-CoA et est impliquée dans la biosynthèse du PHB. L'enzyme B, possède une gamme de substrats plus étendue, elle est plutôt impliquée dans le catabolisme des acides gras et peut fournir les unités 3HV lors de la synthèse du PHBV.

- Dans un deuxième temps, la réductase, NADPH dépendante, réduit le carbonyle en alcool pour donner le (R)-3-hydroxyacyl-CoA.

- La PHB polymérase, la dernière enzyme, catalyse les étapes successives de condensation des résidus 3-hydroxyacyl-CoA pour aboutir à la synthèse du PHB. Cette enzyme est stéréospécifique et ne reconnaît que les (R)-3-hydroxyacyl-CoA.

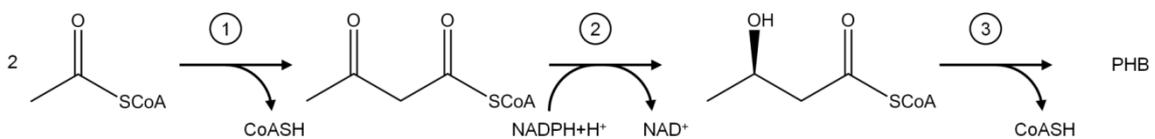


Figure 5: Biosynthèse du PHB en 3 étapes: 1) β -cétotliolase, 2) acétoacétyl-CoA réductase, 3) PHA synthase.

2.4.2. Les PHAmcl

Le métabolisme de synthèse des PHAmcl est totalement différent de celui des PHAscl. En effet, il ne constitue pas une voie métabolique, il est plutôt une déviation des voies métaboliques impliquant les acides gras. Selon le substrat présent dans le milieu de culture, le métabolisme anabolique ou catabolique des acides gras est activé et la synthèse des PHAmcl utilise les intermédiaires métaboliques de ces deux voies. Les deux voies métaboliques responsables de la synthèse des précurseurs des PHAmcl sont:

- la dégradation des acides gras par β -oxydation, qui est la voie principale quand les acides gras sont utilisés comme substrats,
- la biosynthèse *de novo* des acides gras qui est la voie principale lors de la croissance bactérienne sur des sucres (Witholt 1999).

Le métabolisme de synthèse à partir d'acides gras est directement associé au métabolisme catabolique des acides gras (β -oxydation) (Lageveen 1988). L'entrée dans le cycle se fait par activation d'un alcanolate par fixation du coenzyme A (HS-CoA) (**Figure 6**) pour conduire à un dérivé acyl-CoA. Au cours de ce chaînon oxydatif, les acides gras sont progressivement dégradés par une série de quatre réactions décrivant un processus en boucle (rectangle bleu, **Figure 6**). Après un cycle, deux atomes de carbone sont éliminés sous forme d'acétyl-CoA.

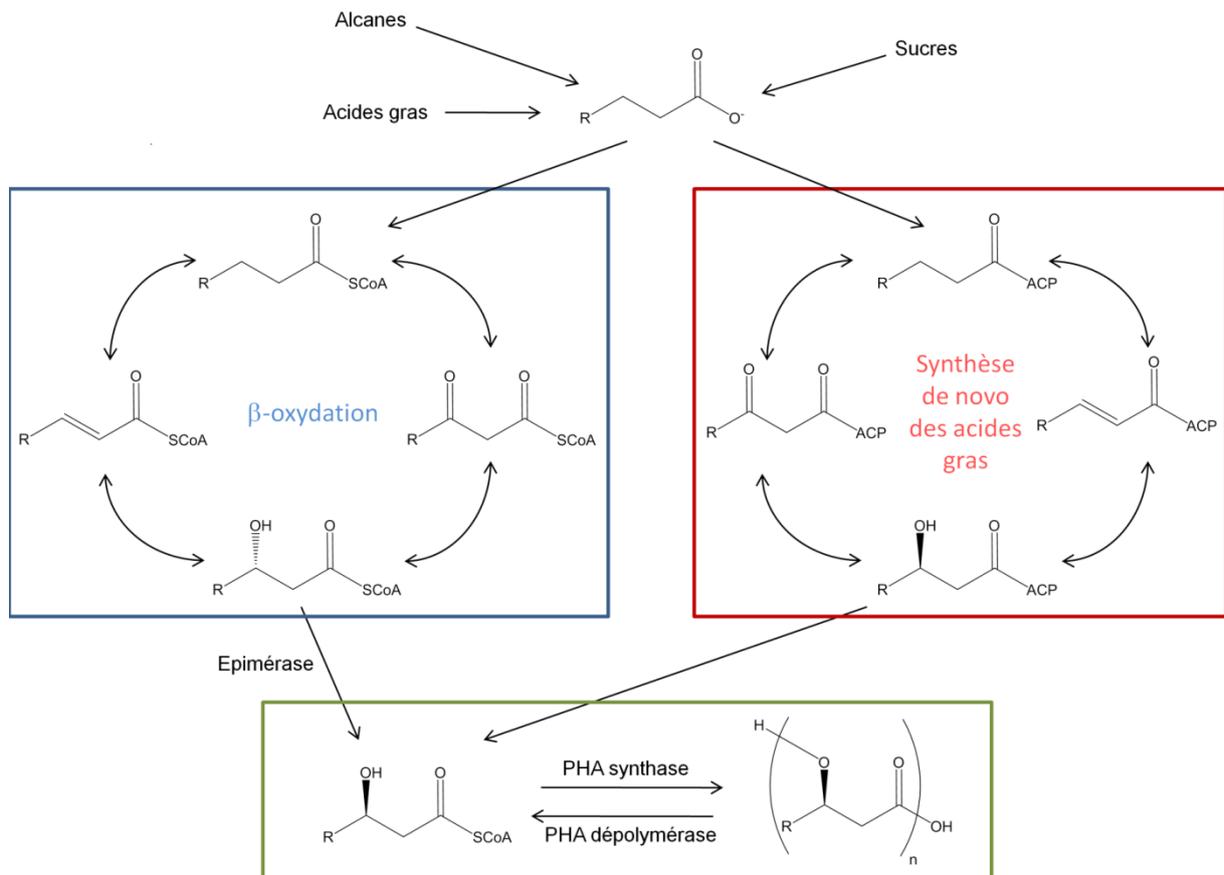


Figure 6: Détails des voies métaboliques de biosynthèse des PHAmcl. (CoA = coenzyme A, ACP = acyl carrier protein).

Le résidu acyl-CoA (avec deux carbones en moins) recommence alors un cycle. A partir de cette voie métabolique se greffe la synthèse des PHAs (rectangle vert, **Figure 6**). La PHA polymérase utilise comme co-substrat les (R)-3-hydroxyalcanoyl-CoA dont la longueur est comprise entre 6 et 14 atomes de carbone. Comme les intermédiaires du cycle de la β-oxydation sont de configuration S et que la PHA polymérase ne reconnaît que les substrats de configuration R, cela implique une étape enzymatique supplémentaire faisant intervenir une épimérase (Gross 1989).

Lorsque l'acide gras (source de carbone) comporte 6 à 12 atomes de carbone, les PHAs formés comportent, dans la plupart des cas, des unités de répétition avec un nombre d'atomes de carbone égal à celui de la source de carbone ou avec deux atomes de carbone en moins. Par exemple, la culture de *Pseudomonas* sp. GP01 en présence d'octanoate de

sodium ou d'octane comme seule source de carbone (Desmet 1983; Preusting 1990), conduit à la synthèse d'un copolymère statistique, le poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyhexanoate) PHOHHx, possédant comme unité majoritaire le 3-hydroxyoctanoate (Ballistreri 1990; Gagnon 1992).

L'utilisation de mélanges d'acides gras, d'alcanes et d'alcènes comme source de carbone pour la bactérie se traduit par la formation de PHAs dont la composition est le plus souvent le reflet du ratio de chacun des composants du milieu de culture (**Tableau 1**). L'utilisation de n-alcane ou de n-alcène comme substrat est possible si la bactérie possède les gènes permettant l'oxydation des alcanes ou alcènes en acides (**Figure 6**) (Witholt 1990).

Si la bactérie est cultivée avec un mélange d'octane et d'octène, le ratio de monomères présentant une insaturation est fonction de la quantité initiale d'octène. La fraction molaire en unités insaturées peut atteindre 50% lorsque le mélange initial est constitué exclusivement d'octène. De même, l'introduction dans le milieu de culture de différents alcanes substitués en tant que co-substrat (7-méthyl-octanoate, 8-bromo-octanoate, phénylundécénoate, cyanophénoxyhexanoate) permet de synthétiser des polymères originaux du point de vue de leur composition (Fritzsche 1990b; Haywood 1990; Kim 1991; Kim 1995). Cette facilité à incorporer directement des monomères exotiques explique en partie la diversité des copolymères de PHAs générés par les bactéries.

Tableau 1: Composition des PHAmcl accumulés par *Pseudomonas* sp. GP01 à partir de différents alcanes et alcanoates (Anderson 1990).

Source de carbone	PHA (% g/g)	Unités 3-hydroxyacides incorporées dans les PHAs (mol %)								
		C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂
Alcane										
Hexane	2	-	-	100	-	-	-	-	-	-
Heptane	11,4	-	-	-	100	-	-	-	-	-
Octane	25,3	-	-	11	-	89	-	-	-	-
Nonane	24,3	-	-	-	37	-	63	-	-	-
Decane	21,9	-	-	10	-	66	-	24	-	-
Undecane	14,3	-	-	-	23	-	63	-	14	-
Dodecane	5,8	-	-	2	-	31	-	36	-	31
Alcаноate										
Hexanoate	5	3	<1	72	-	22	-	3	-	-
Heptanoate	22	-	7	<1	86	<1	7	-	-	-
Octanoate	41	<1	1	6	-	75	-	17	-	-
Nonanoate	49	-	3	<1	20	5	72	-	-	-
Decanoate	37	<1	1	7	-	44	-	47	-	-

Lorsque la source de carbone est composée de sucres, le PHA accumulé dans les bactéries est composé majoritairement de monomères constitués de 8 à 10 atomes de carbone (Timm 1990; Eggink 1992; Huijberts 1992). Ces monomères dérivent de la biosynthèse des acides gras (Rectangle rouge, **Figure 6**). Les différentes étapes de la biosynthèse des acides gras se déroulent grâce à un complexe multi-enzymatique de grande taille: l'ACP (Acyl-Carrier-Protein). A l'issue de cette suite de réactions, le dérivé (R)-3-hydroxyacyl-CoA constitue le substrat de la PHA polymérase. La composition du PHA accumulé reflète la composition chimique des intermédiaires métaboliques de la biosynthèse des acides gras ainsi que l'affinité de la PHA polymérase pour ces différents substrats.

De nombreuses espèces de *Pseudomonas* utilisent les deux voies métaboliques, c'est le cas de *Pseudomonas putida* pour laquelle le cycle de la β -oxydation et la synthèse *de novo* des acides gras contribuent à la formation des substrats de la PHA polymérase (Haywood 1989; Huijberts 1994).

Les voies de synthèse présentées ici ne sont pas les seules voies existantes. De nombreux travaux ont été réalisés pour élucider les voies de synthèse chez d'autres bactéries sauvages ou mutantes (Haywood 1991; Steinbuchel 1992).

Les méthodes de détection de microorganismes capables de synthétiser et d'accumuler du PHA basées sur des colorations des lipides au Noir Soudan ou Bleu de Nil peuvent réagir avec d'autres inclusions lipidiques et ne sont donc pas spécifiques. De plus, le microorganisme doit être dans les conditions lui permettant d'accumuler le PHA. Une stratégie basée sur la détection d'une séquence homologe des gènes de PHA synthase semble plus efficace. La PHAmcl synthase est codée par deux gènes *phaC1* et *phaC2* séparés par le gène codant pour la PHA dépolymérase *phaZ* formant l'opéron *phaC1ZC2* (**Figure 7**) (Huisman 1991). L'opéron *phaC1ZC2* est bien caractérisé et, par alignement, il a été mis en évidence que les séquences d'ADN des gènes *phaC1*, *phaZ* et *phaC2* de nombreuses espèces de *Pseudomonas* sont homologues (Solaiman 2000). Une méthode a ainsi été mise au point en utilisant des amorces spécifiques aux gènes *phaC1* et *phaC2* (Ciesielski 2006). Le schéma de l'opéron *phaC1ZC2* de la **figure 7** montre que l'utilisation des amorces I-179L et I-179R permet d'amplifier par PCR (Polymerase Chain Reaction, réaction en chaîne par polymérase) une séquence homologe aux gènes *phaC1* et *phaC2*. Le fragment d'ADN amplifié, délimité par les amorces choisies, fait environ 540 paires de bases. Cette méthode est simple à mettre en œuvre et permet de déterminer rapidement la capacité d'une souche à produire ou non des PHAmcl.

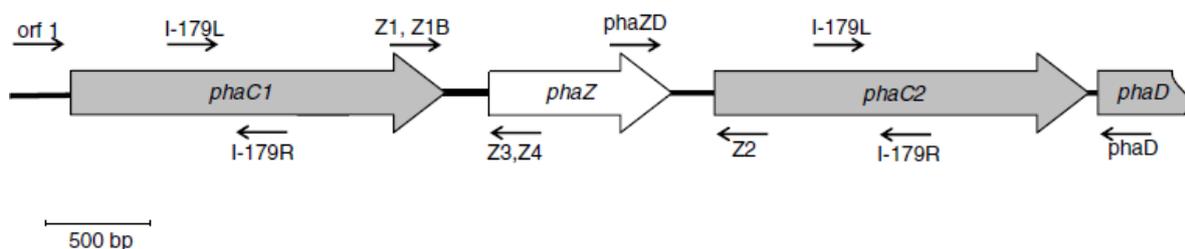


Figure 7: Schéma de l'opéron *phaC1ZC2* montrant la position des amorces I-179L et I-179R. *phaC1* et *phaC2* sont les gènes codant la PHA synthase, *phaZ* la PHA dépolymérase et *phaD* un gène de fonction encore inconnue.

Si la biosynthèse des PHAmcl commence à être bien comprise, le phénomène de régulation l'est moins (Luengo 2003). L'identification de la dépolymérase intracellulaire codée par le gène *phaZ* est récente (de Eugenio 2007) et le rôle des phasines et des autres protéines présentes à la surface des granules n'est pas encore totalement élucidé.

3. Propriétés des PHAs bactériens

Les PHAs peuvent être obtenus à partir de ressources renouvelables (carbohydrates, acides gras...). Ils sont aussi biodégradables, biocompatibles et les nombreuses compositions possibles donnent accès à une large gamme de propriétés physico-chimiques. Toutes ces propriétés font des PHAs des polymères très prometteurs pour de futures applications.

3.1. Dégradabilité

La biodégradabilité des PHAs est liée au fait que de nombreux microorganismes naturellement présents dans l'environnement sont capables de les dégrader totalement en dioxyde de carbone et en eau. En effet, le processus de polymérisation est un processus réversible. Sous l'action d'une PHA dépolymérase, les bactéries sont capables de dégrader le polymère afin de récupérer les métabolites et l'énergie nécessaires à leur survie lorsque les conditions de culture deviennent défavorables. Ce procédé de biodégradation peut être divisé en deux catégories, la biodégradation intracellulaire et la biodégradation extracellulaire.

3.1.1. Dégradation intracellulaire

En fonction des besoins cellulaires, les PHAs peuvent être remobilisés grâce à l'intervention d'une PHA dépolymérase intracellulaire (Moskowitz 1969). La **Figure 8**

représente la dégradation intracellulaire du PHB par la PHA dépolymérase. Cette enzyme intra-cytoplasmique est située à la surface des granules de PHAs.

Le cycle de dégradation combiné au cycle de synthèse du PHB représente le métabolisme complet du PHB. Lors de la dégradation, le PHB est dépolymérisé par la PHB dépolymérase en présence d'une hydrolase pour donner l'acide (R)- β -hydroxybutyrique. Cet acide est oxydé par la déshydrogénase pour conduire à l'acide acétoacétique qui est ensuite thioestérifié en acétoacétyl-CoA avant d'être dégradé en acétyl-CoA par la β -cétotliolase. La β -cétotliolase est la seule enzyme à être utilisée à la fois dans la biosynthèse et la dégradation des PHAs. Elle sert de système de régulation pour les deux voies métaboliques. En présence d'oxygène, l'acétyl-CoA issu de la dégradation des PHAs peut entrer dans le cycle de l'acide citrique pour être oxydé en deux molécules de dioxyde de carbone.

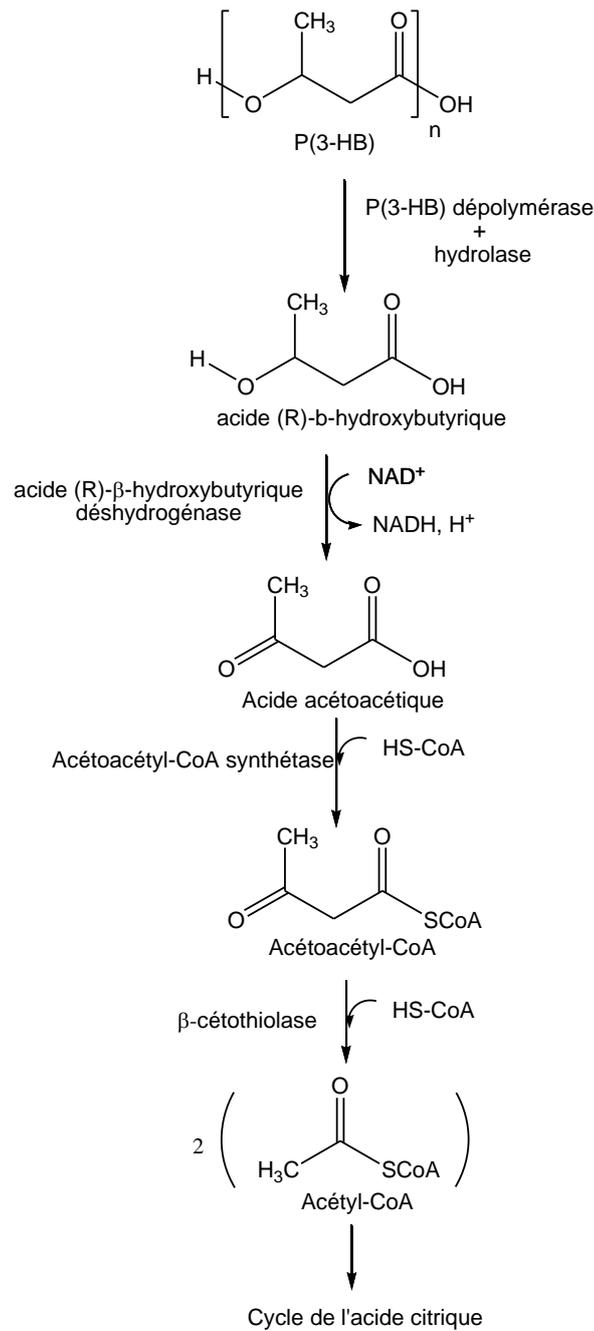


Figure 8: Dégradation intracellulaire du PHB (Hocking 1998).

3.1.2. Dégradation extracellulaire

Parallèlement à la dégradation intracellulaire, certains microorganismes sécrètent dans l'environnement des PHAs dépolymérase et hydrolases, capables de dégrader les PHAs en nutriments assimilables par de nombreux microorganismes. Une des propriétés très

particulières des PHAs est leur biodégradabilité dans différents environnements, aérobies ou anaérobies. En milieu naturel, des microorganismes tels que des bactéries ou des champignons sont capables de sécréter des enzymes extracellulaires de dégradation des PHAs leur permettant d'hydrolyser le PHA solide en oligomères ou monomères solubles dans l'eau afin de les utiliser comme nutriments avec production de molécules de base telles que le CO_2 , H_2O ou CH_4 . La biodégradabilité de PHAs en milieu naturel a été étudiée et il en résulte que de nombreux facteurs affectent cette propriété. Des facteurs environnementaux comme le type de milieu: sols (Mergaert 1993; Mergaert 1996), eau douce (Doi 1992; Volova 2007), eau de mer (Kasuya 2000; Volova 2011), la température, le pH, le taux d'humidité, la quantité de nutriments et des facteurs relatifs aux PHAs étudiés comme sa composition monomérique, sa cristallinité, la présence d'additifs et le type de surface du matériau (Mochizuki 1997; Tokiwa 2004). Il a été déterminé que la vitesse de biodégradation diminuait lorsque la cristallinité du polymère augmentait. Par exemple, Weng et al. ont étudié la biodégradation de différents PHAscl par un procédé de compost intensif aérobie et les vitesses de dégradation se classent comme suit $\text{P3HB4HB} > \text{PHBHV} (20\%3\text{HV}) > \text{PHBHV} (3\%3\text{HV}) > \text{PHB}$ (Weng 2011). Ces résultats se retrouvent dans les différents environnements de biodégradation. Il est à noter que la biodégradation se fait par érosion de la surface vers le cœur, la forme et la surface du matériau sont donc deux paramètres importants. Les masses molaires des polymères évoluent peu au cours de la dégradation, on a donc une dépolymérisation des chaînes de PHAs par les enzymes et non des coupures statistiques.

Les PHA dépolymérase extracellulaires sont divisées en deux groupes (PHAscl dépolymérase et PHAmcl dépolymérase) suivant leurs substrats spécifiques. Jusqu'à maintenant, plus de 80 PHA dépolymérase ont été isolées et caractérisées à partir de nombreux microorganismes mais la plupart de ces enzymes sont des PHAscl dépolymérase. Même si plusieurs bactéries sont capables de décomposer des PHAmcl (Ramsay 1994; Foster 1995; Quinteros 1999), seul un petit nombre de PHAmcl dépolymérase ont été isolées (Schirmer 1993; Rhee 2006; Papanophytou 2011). Kim et al. ont listé les espèces connues dégradant les PHAmcl et ont conclu que les principaux microorganismes présents dans le sol

capables de dégrader les PHAmcl appartiennent aux genres *Pseudomonas* ou *Stenotrophomonas* (Kim 2007).

3.2. Biocompatibilité

La biocompatibilité, peut être définie comme la capacité d'un biomatériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique (Prime 1991). Il existe un certain nombre de travaux relatifs à la biocompatibilité des PHAs et notamment celle du PHB. La biocompatibilité du PHB est en parfaite adéquation avec le fait que l'unité monomérique, l'acide 3-(R)-hydroxybutyrique, mais également des oligomères de PHB soient présents dans le plasma humain à des concentrations comprises entre 0,3 et 1,3 mM pour le monomère et 0,6 et 18,2 mg.L⁻¹ pour les oligomères (Adams 1987; Reusch 1992; Wiggam 1997; Yajnik 1997). De plus, des oligomères de PHB ont également été détectés dans le tissu aortique chez l'homme (Seebach 1999). Ces oligomères existent sous forme complexés à des lipoprotéines de faible densité et à de l'albumine.

Les tests de biocompatibilité, *in vivo*, consistent à implanter les polymères, le plus généralement sous la peau. A l'interface du biomatériau et des tissus environnants, de nombreuses réactions biologiques peuvent provoquer des réactions non désirées (inflammatoires, mutagènes, carcinogènes) dans les premières minutes de contact. Elles peuvent durer plusieurs jours, plusieurs mois ou même plusieurs années, ce qui entraîne alors de graves dommages cellulaires (Vanwachem 1985; Kowalczyńska 2002; Liu 2002; Yoon 2002). L'infiltration des tissus environnants par les macrophages, les fibroblastes et la formation d'une capsule fibreuse vascularisée autour de l'implant sont caractéristiques de la réponse tissulaire (Saad 1997). L'endommagement que pourrait provoquer l'implant sur les tissus voisins reflète donc la biocompatibilité d'un matériau. Elle est évaluée en mesurant l'apparition d'une couche tissulaire fibreuse autour de l'implant, démontrant ainsi que le matériau est bien toléré. Les résultats montrent que des PHAs à chaînes latérales moyennes, comme le PHOHHx induisent une réaction inflammatoire aiguë de courte durée (2-5 jours) et

une inflammation chronique d'intensité faible jusqu'à 180 jours (Marois 1999; Williams 1999). Après quelques jours, les implants sont recouverts d'un tissu de collagène. Après 40 semaines, la quantité de tissus adhérant à l'implant n'a pas augmenté. Williams et al. ont également évalué la tolérance cutanée du PHOHHx en déposant des patchs de PHOHHx imprégnés d'une solution saline sur la peau de cochons de Guinée (Williams 1999). Après 24h, les patchs sont retirés et des analyses sont pratiquées à plusieurs heures d'intervalle. Aucune formation d'érythème, d'escarre n'est observée, alors que la solution saline utilisée, seule, lors de l'expérience servant de référence, provoque la formation d'érythèmes et d'escarres importants. Plus récemment, Hazer et al. ont implanté dans des rats des films de PHOU contenant des nanoparticules d'or (Hazer 2011). Après 45 jours, les films, avec ou sans nanoparticules, entraînent la formation d'une fine capsule. La présence de nanoparticules d'or améliore la biocompatibilité en inhibant la néovascularisation ce qui diminue l'inflammation.

Le PHB et ses copolymères PHBHV sont également bien tolérés par les tissus quand ils sont implantés sous la peau de souris ou au niveau des muscles puisqu'aucune formation d'abcès ou de nécrose des tissus environnants n'est observée (Gogolewski 1993; Muller 1993). Cependant, après une semaine *in vivo*, une inflammation apparaît, avec un grand nombre de macrophages, neutrophiles, lymphocytes et fibrocytes, et avec formation d'une capsule autour de l'implant. Après 11 semaines, l'intensité de l'inflammation décroît bien que des lymphocytes subsistent dans la capsule et les cellules musculaires. Certains auteurs mettent en avant l'influence du degré de pureté des PHAs sur les réactions inflammatoires observées. En effet, si la purification est insuffisante, il peut rester des débris cellulaires, des endotoxines, et/ou des acides gras qui sont responsables de l'inflammation, et de la formation d'une couche de collagène épaisse autour de l'implant (Rouxhet 1998; Sevastianov 2003). Malgré cela, il est important de souligner que la plupart des PHAs provoquent des réactions inflammatoires d'intensité plus faible que celles généralement observées avec d'autres polyesters comme le poly(acide lactique) (PLA) ou le poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) (Taylor 1994).

3.3. Propriétés physico-chimiques

Les PHAs sont solubles dans les solvants chlorés et plus la taille des chaînes latérales augmentent, plus la solubilité des PHAs augmentent dans d'autres solvants comme le tétrahydrofurane (THF), l'acétone... (Jacquel 2007). Tous les PHAs restent insolubles dans l'eau et sont relativement résistants à la dégradation hydrolytique. Le PHB, le plus étudié, peut être moulé, renforcé avec des charges minérales, filé et possède d'excellentes propriétés barrière aux gaz (Poirier 1995).

3.3.1. Les PHAscl

Les PHAscl sont des polymères très cristallins avec, pour des copolymères PHBHV de différentes compositions, des températures de transition vitreuse T_v comprises entre -6 et 8°C et des températures de fusion T_f entre 65 et 180°C . Les propriétés thermiques et la cristallinité du PHB sont modulées par la présence d'unités de nature différente. Introduire des monomères 3HV dans du PHB permet de diminuer la T_v et la T_f mais a peu d'incidence sur le taux de cristallinité, 60% pour du PHB (Sudesh 2000) et 54% pour un PHBHV avec 25% de 3HV (Noda 2004). En effet, ces deux monomères peuvent co-cristalliser. Mais l'introduction d'unités portant des chaînes latérales plus longues comme le HHx entraîne une perturbation de la cristallisation et diminue ainsi le taux de cristallinité. Un PHBHHx avec 20% de HHx a un taux de cristallinité de 18% (Doi 1995). Un PHBHHx avec 25% de HHx présente une T_v de -4°C et une T_f de 52°C (Doi 1995). La T_v d'un P3HB4HB peut descendre jusqu'à -48°C pour un P4HB et la T_f jusqu'à 130°C (Saito 1994; Saito 1996).

Les propriétés mécaniques du PHB (**Tableau 2**) telles que le module d'Young ($3,5$ GPa) et la contrainte à la rupture (40 MPa) sont proches de celles du polypropylène ($1,7$ GPa et 38 MPa). En revanche, son allongement à la rupture (4%) est très inférieur à celui du polypropylène (400%). C'est donc un matériau plus rigide et plus cassant que le polypropylène (Anderson 1990; Sudesh 2000). L'introduction d'unités 3HV entraîne une

diminution de la rigidité, le module d'Young diminue, de 2,9 GPa pour un PHBHV contenant 3% de 3HV à 0,7 GPa pour 25% de 3HV.

Le PHBHHx possède des propriétés similaires à celle du polyéthylène de faible densité (LDPE) (Module d'Young = 0,2 GPa, contrainte à la rupture = 10 MPa, élongation à la rupture = 620%). La présence d'unités HHx entraîne également une plus grande flexibilité par rapport au PHBHV. La contrainte à la rupture décroît de 43 à 20 MPa et l'élongation à la rupture augmente de 6 à 850% quand la quantité d'unités HHx augmente de 2,5 à 20%.

Tableau 2: Caractéristiques mécaniques des PHAscl (Rai 2011).

Composition (%mol)			Module d'Young (GPa)	Contrainte à la rupture (MPa)	Elongation à la rupture (%)
3HB	3HV	3HHx			
100	-	-	3,5	40	4
97	3	-	2,9	38	5
91	9	-	1,9	37	8
86	14	-	1,5	35	12
80	20	-	1,2	32	50
75	25	-	0,7	30	-
98,5	-	2,5	0,63	43	6
90	-	10	0,23	21	400
80	-	20	0,15	20	850

3.3.2. Les PHAmcl

Les PHAmcl présentent des T_v de -25 à -65°C et des T_f comprises entre 42 et 65°C (**Tableau 3**). Ces polymères ont donc des propriétés d'élastomères thermoplastiques.

Les PHAmcl sont des élastomères dont les parties cristallines jouent le rôle de points de réticulations physiques. L'une des premières évaluations des propriétés mécaniques des PHAmcl est l'étude de Marchessault et al. sur le PHO (**Tableau 4**) (Marchessault 1990). Des études ultérieures ont montré que l'introduction de comonomères au PHO augmentait sa flexibilité (élongation à la rupture) tout en diminuant sa rigidité (module d'Young).

Tableau 3: Caractéristiques thermiques de PHAmcl (Gross 1989; Barbuzzi 2004; Ouyang 2007).

Organismes	Substrat	PHA	Tv (°C)	Tf (°C)
<i>P. oleovorans</i>	Hexanoate	C6, C8	-25	nd
	Heptanoate	C7	-33	45
	Octanoate	C6, C8	-36	51
	Nonanoate	C7, C9	-39	54
	Décanoate	C8, C10	-40	54
<i>P. putida</i>	Huile de coco	PHAmcl	-43.7	42
	Acide oléique	PHAmcl	-56.3	nd
	Suif	PHAmcl	-59.8	nd
	Huile de lin	PHAmcl	-61.7	nd
<i>P. putida</i> KT2442	Dodécanoate	PHAmcl	-44	53
<i>P. putida</i> KTOYO6	Dodécanoate	PHAmcl	-45	58
<i>P. putida</i> KTOYO6	Dodécanoate et glucose	et PHAmcl	-43	65
Organismes	Substrat	Longueur moyenne des chaînes latérales (en atomes de C)	Tv (°C)	Tf (°C)
<i>P. aeruginosa</i>	Ac. nonanoïque	5.0	-38	49
	Ac. undécanoïque	5.4	-48	43
	Ac. tridécanoïque	5.7	-42	47
	Ac. pentadécanoïque	6.1	-50	45
	Ac. octanoïque	4.9	-37	58
	Ac. décanoïque	5.5	nd	nd
	Ac. dodécanoïque	5.8	nd	nd
	Ac. tétradécanoïque	5.8	-42	54
	Ac. hétéradécanoïque	6.1	nd	nd
	Ac. octadécanoïque	6.3	-46	50
	Ac. eicosanoïque	6.5	-44	54

Tableau 4: Propriétés mécaniques de divers PHAmcl (Asrar 2002; Hartmann 2006).

PHA	Contrainte à la rupture (MPa)	Module (MPa)	Elongation à la rupture (%)
P(3HB)	40	3500	6
P(4HB)	104	149	1000
P(3HB-co-17%3HHx)	20	0.173	850
P(3HO-co-12%3HHx)	9	0.008	380
P(3HO)	-	17	250-350
P(3HO-co-12%3HHx-co-2%3HD)	9.3	7.6	380
P(3HO-co-4.6%3HHx)	22.9	599.9	6.5
P(3HO-co-5.4%3HHx)	23.9	493.7	17.6
P(3HO-co-7%3HHx)	17.3	288.9	23.6
P(3HO-co-8.5%3HHx)	15.6	232.3	34.3
P(3HO-co-9.5%3HHx)	8.8	155.3	43.0

4. Modifications des PHAs

4.1. Fonctionnalisation des PHAs

Des PHAs fonctionnalisés peuvent être nécessaires pour concevoir des matériaux sur mesure correspondant au cahier des charges des applications auxquelles ils sont destinés. Par exemple, l'introduction de fonctions réactives spécifiques (fonctions polaires) modifie la nature hydrophobe des PHAs et, grâce à certaines fonctions comme les acides carboxyliques, il devient possible de greffer des molécules bioactives.

Deux démarches peuvent être envisagées pour synthétiser des PHAs fonctionnalisés, ces deux démarches pouvant être associées:

- La biosynthèse directe du PHA fonctionnalisé par la bactérie en introduisant dans le milieu de culture un précurseur qui permettra l'introduction d'une fonction spécifique au sein du polymère.
- La modification chimique du PHA après biosynthèse.

4.1.1. Biosynthèse de PHAs fonctionnalisés

Selon le choix du microorganisme, de la source de carbone et des conditions de culture utilisées, il est possible d'orienter la bactérie vers la synthèse de nombreux homopolymères et copolymères comportant des unités très différentes comme des groupements latéraux alkyles, aromatiques, insaturés (Preusting 1990; Bear 1997), branchés (Fritzsche 1990a), époxydés (Bear 1997; Park 1998), bromés (Kim 1992) ou chlorés (Arkin 2000), esters (Scholz 1994), ou phénoxy (Kim 1999). Cette démarche demeure très attrayante, mais la toxicité vis à vis de la bactérie et les coûts élevés des substrats limitent cette voie de synthèse. Par ailleurs, le contrôle de la composition des copolymères s'avère plus délicat car il dépend de l'aptitude de la bactérie à utiliser le substrat réactif lors de la polymérisation. En particulier, il est difficile pour la bactérie de produire un polymère à partir de substrats complexes contenant un chlore, un brome ou un époxyde. Le **tableau 5** illustre la diversité des monomères obtenus déjà décrits dans la littérature. Le plus courant est le poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyundécènoate), noté PHOU. La production de ces PHAs, contenant entre 0 et 100% d'unités de répétition insaturées, est maintenant relativement bien contrôlée (Park 1998; Bear 2001).

Tableau 5: Diversité des monomères constitutifs des PHAmcl bactériens. Adapté de (Zinn 2001).

Acide 3-hydroxylique-	Acides 3-hydroxyliques- (insaturés)	Acides 3-hydroxyliques- (branchés)	Acides 3-hydroxyliques- (substitués)	Acides n-hydroxyliques-	Aromatiques
hexanoïque	4-hexenoïque	2,6-diméthyl-5-heptenoïque	7-fluoro-heptanoïque	4-hydroxy-hexanoïque	3-hydroxy-phenylhexanoïque
heptanoïque	5-hexenoïque	4-méthyl-hexanoïque	9-fluoro-nonanoïque	4-hydroxy-octanoïque	3-hydroxyl-phenylheptanoïque
octanoïque	6-heptenoïque	5-méthyl-hexanoïque	6-chloro-hexanoïque	5-hydroxy-heptanoïque	3-hydroxy-phényloctanoïque
nonanoïque	6-octenoïque	4-méthyl-octanoïque	8-chloro-octanoïque	4-hydroxy-hexanoïque	3-hydroxy-6-p-méthylphénoxy-hexanoïque
décanoïque	7-octenoïque	5-méthyl-octanoïque	6-bromo-hexanoïque	2-hydroxy-dodécanoïque	
undécanoïque	8-nonenoïque	6-méthyl-octanoïque	8-bromo-octanoïque		
dodécanoïque	9-decenoïque	6-méthyl-nonanoïque	11-bromo-undécanoïque		
tétradécanoïque	10-undécenoïque	7-méthyl-nonanoïque	7-cyano-heptanoïque		
	6-dodécenoïque	8-méthyl-nonanoïque	9-cyano-nonanoïque		
	5-tétradécenoïque	7-méthyl-décanoïque	12-hydroxy-dodécanoïque		
	5,8-tétradécadienoïque		Succinate de méthyl		
	5,8,11-tétradécatrienoïque				
	4-hexadécenoïque				
	4,7-hexadécadienoïque				

4.1.2. Modification chimique de PHAs

Différents travaux de modifications chimiques réalisés sur les PHOU ont permis d'obtenir de nouveaux matériaux possédant en position terminale des chaînes latérales des groupes hydroxyle, époxy ou acide carboxylique (Bear 1997; Park 1998; Lee 2000a; Lee 2000b; Kurth

2002; Stigers 2003; Renard 2005). Les différentes réactions de modification chimique réalisées sur le PHOU et décrites dans la littérature sont illustrées dans la **Figure 9**.

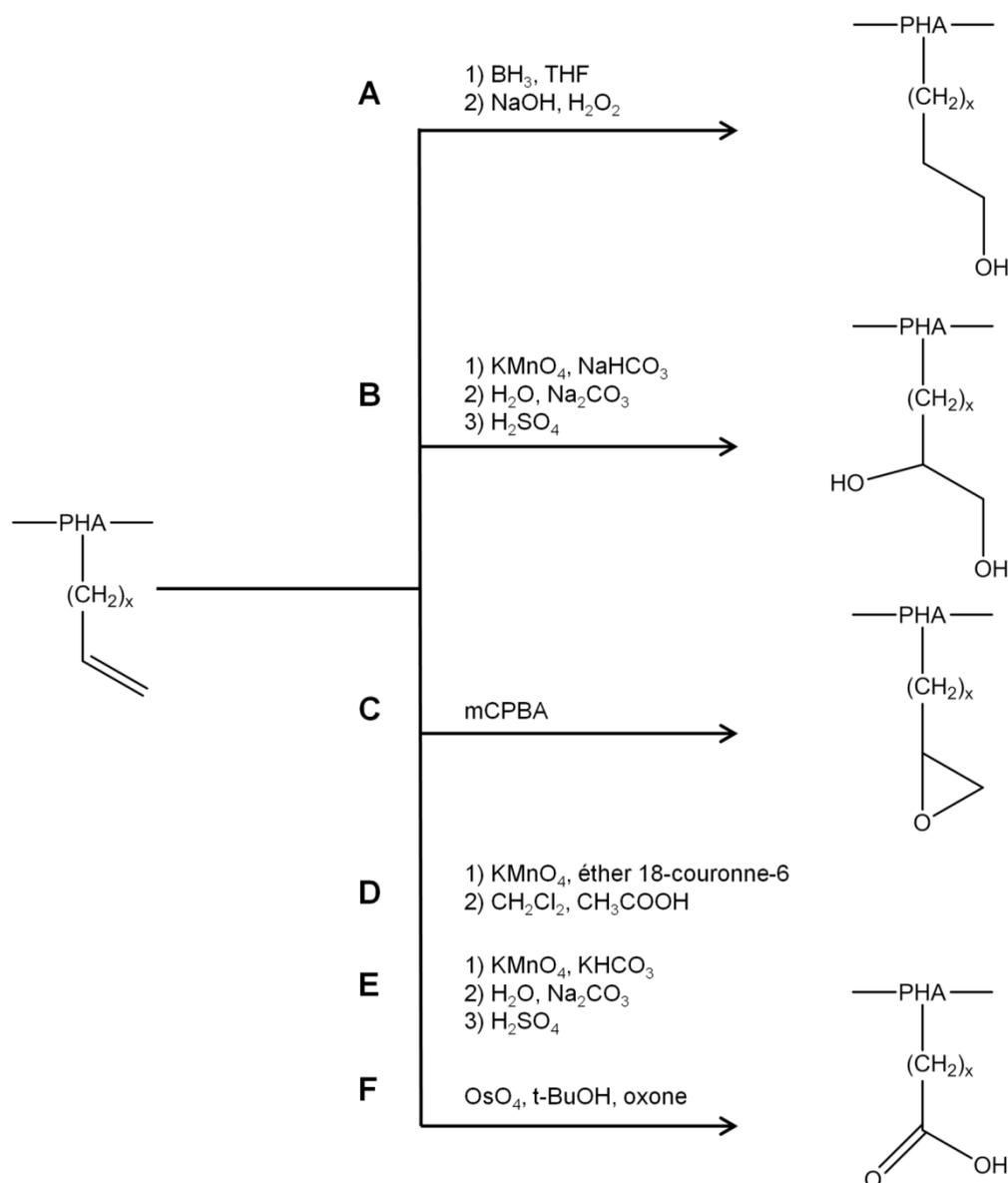


Figure 9: Modifications chimiques du PHOU par oxydation. **A** (Renard 2005), **B** (Lee 2000b), **C** (Bear 1997; Park 1998), **D** (Kurth 2002), **E** (Lee 2000a), **F** (Stigers 2003).

La conversion des groupes alcènes pendants en groupes hydroxyles pendants d'un PHOU avec 25% de monomères insaturés a été décrite par plusieurs auteurs. La réticulation

du PHOU par du borane suivie de la coupure du réseau trialkyleborane par ajout de NaOH/H₂O₂, génère des PHAs portant jusqu'à 25% de groupes hydroxyles pendants (Renard 2005). La masse molaire du polymère diminue de 86.10³ à 56.10³ g.mol⁻¹ après réaction. Eroglu et al. ont aussi atteint une conversion proche de 100% de groupements pendants hydroxylés sur le poly(3-hydroxyundécènoate), PHU, en utilisant le 9-borobicyclononane en première étape mais par contre une forte diminution de la masse molaire du polymère de 32000 à 8100 g.mol⁻¹ est observée dans ces conditions (Eroglu 2005). Dans les deux cas, le polymère obtenu devient soluble dans le méthanol.

L'introduction de deux fonctions alcools sur les insaturations d'un PHOU contenant 93% de monomères insaturés atteint au maximum 59% de conversion avec une légère perte de masse du polymère de Mn = 110.10³ à 86.10³ g.mol⁻¹ (Lee 2000b). Le PHA modifié devient soluble dans les solvants comme le méthanol et insoluble dans le chloroforme, le THF et l'acétone. L'introduction de fonctions diols vicinales sur les chaînes latérales rend donc le PHA soluble uniquement dans des solvants protiques polaires.

L'introduction de fonctions acides carboxyliques sur un PHOU, alors noté PHOCOOH, permet aussi de diminuer l'hydrophobicité du polymère. Kurth et al. ont oxydé les doubles liaisons de PHOU contenant 25% de monomères insaturés en présence d'un éther couronne. Le PHOCOOH est alors soluble dans le méthanol et un mélange acétone/eau 85/15 (Kurth 2002). La synthèse par Lee et al. de PHOCOOH par oxydation en présence de KMnO₄ sans utiliser d'éther couronne atteint des taux de conversion de 43% sur un PHOU contenant 90% de monomères insaturés mais avec une forte perte de masse du polymère de Mn = 137.10³ à 19.10³ g.mol⁻¹ (Lee 2000a). L'oxydation en présence d'OsO₄ permet d'obtenir quantitativement le PHOCOOH sans diminution de la masse molaire du polymère (Stigers 2003).

Des PHAs chargés positivement ont été préparés à partir de PHOU époxydés obtenus en présence d'acide *m*-chloroperbenzoïque (mCPBA). Le cycle époxy du poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxy-10-époxyundécènoate), noté PHOE, a été ouvert avec du

diéthanolamine pour former du poly(3-hydroxyoctanoate-co-(3-hydroxy-11-(bis(2-hydroxyéthyl)amino)-10-hydroxyundécénoate)). L'amine tertiaire résultante a un pKa estimé entre 8,0 et 8,5 faisant de ce polymère un polycation hydrosoluble à pH neutre et physiologique (Sparks 2008). Toutefois cette réaction entraîne une diminution importante de la masse molaire de $M_w = 271\ 000$ à $49\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Ceci n'empêche pas le polycation de complexer l'ADN plasmidique, le protégeant ainsi de la dégradation par de l'ADNase. La taille des particules passe de 800 nm à 200 nm lorsque du polycation est rajouté. Le potentiel zeta atteint une valeur de +40 mV prouvant l'encapsulation totale du plasmide, les charges positives du polycation ayant écrantées les charges négatives de l'ADN (voir **Figure 10**).

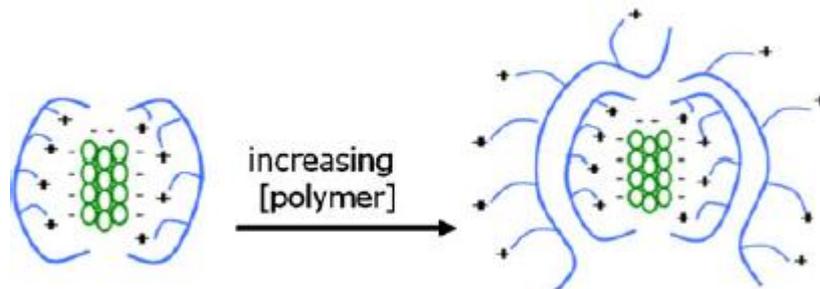


Figure 10: Complexation de l'ADN plasmidique (en vert) par un PHA polycationique (en bleu), l'encapsulation totale entraîne une charge de surface positive sur les nanoparticules (Sparks 2008).

De nombreux auteurs ont également étudié la préparation d'oligomères à partir de PHA scl ou mcl natifs de haute masse molaire. Selon la méthode chimique employée, la nature des oligomères obtenus diffère. Quatre méthodes ont été développées: le traitement thermique (Kunioka 1990; Nguyen 2002), les réactions de transestérification (Hirt 1996; Andrade 2002b), l'hydrolyse (Lauzier 1994; Seebach 1999) et la méthanolyse (Reeve 1990; Gross 1995) (**Figure 11**).

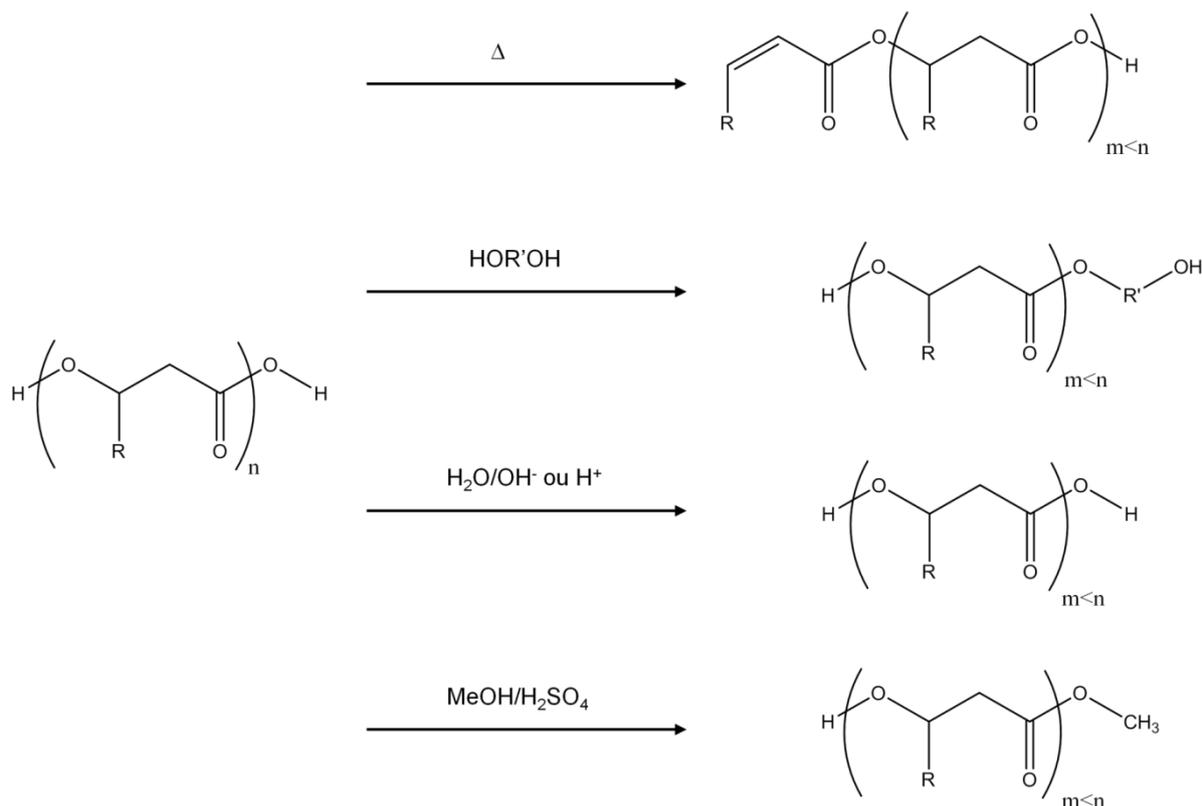


Figure 11: Structure des oligomères obtenus par traitement thermique, transestérification, hydrolyse et méthanolyse.

Des auteurs ont préparé des oligomères par traitement thermique (Kopinke 1997; Aoyagi 2002; Nguyen 2002; Daly 2005) car les PHAs sont connus comme étant des composés instables thermiquement. Ce procédé conduit à la formation de structures terminées par une insaturation résultant de réactions de β -élimination (**Figure 12**). La longueur et la nature des chaînes latérales du PHA influencent cependant la vitesse de dégradation thermique. Les longues chaînes latérales gênent, en effet, la formation du cycle à six centres, ralentissant ainsi la vitesse de dégradation (Lee 2001). Récemment, Sin et al. ont observé que pour des PHAmCl la dégradation thermique se faisait par une coupure hydrolytique des fonctions esters suivie d'une déshydratation (Sin 2010).

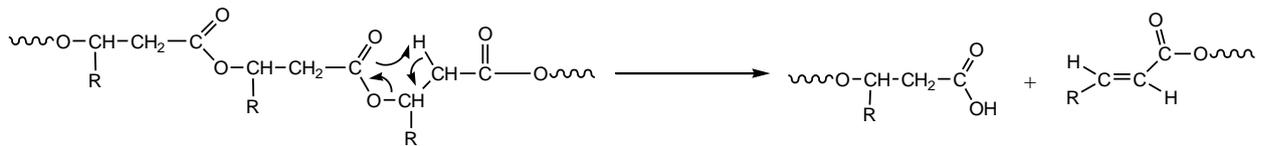


Figure 12: Réaction de β -élimination.

Des oligomères hydroxytélechéliques de PHB et de PHBV ou PHO ont également été préparés par transestérification en utilisant des petites molécules ou des oligomères portant des fonctions alcools comme l'éthylène glycol (Hirt 1996; Andrade 2002b), le polyéthylène glycol (Ravenelle 2002) ou d'autres diols (Reeve 1990; Hori 1992; Saad 2004). Les réactions avec l'éthylène glycol ont été les plus étudiées et trois types d'extrémités ont été identifiés, notamment par Hirt et al. (Hirt 1996) suivant le type de catalyseur et la température. La réaction produit majoritairement un alcool primaire à l'extrémité comportant l'éthylène glycol et un alcool secondaire à l'autre extrémité. On observe parfois la formation d'une extrémité oléfine qui est attribuée à une élimination d'eau de l'alcool secondaire conduisant à la formation d'un ester crotonique. Seules les réactions de transestérification réalisées à 60°C en présence d'acide *p*-toluènesulfonique (APTS) ou de dilaurate de dibutylétain, conduisent à la formation exclusive d'oligomères dihydroxytélechéliques.

Une autre méthode consiste à préparer des oligomères de PHB ou de PHBV par hydrolyse (Lauzier 1994; Seebach 1999). Dans ces conditions, les produits obtenus sont constitués d'une extrémité hydroxyle et d'une extrémité acide carboxylique. Pour le PHO, plusieurs conditions d'hydrolyse ont été étudiées par Timbart et al. (Timbart 2007). Les résultats de ces travaux révèlent qu'en cas d'hydrolyse basique, la distribution des masses molaires est bimodale. En cas de catalyse acide, en présence d'APTS, la formation de macrocycles de PHO a été mise en évidence par MALDI-TOF.

La méthanolyse réalisée en présence d'acide sulfurique et de méthanol, a été employée pour la synthèse d'oligomères de PHB (Reeve 1990; Gross 1995; Marchessault 1999). Elle permet d'obtenir des oligomères possédant un groupement hydroxyle terminal et

un groupement méthyl ester. C'est aussi une méthode de choix pour la synthèse d'oligomères de PHAmcl de longueur contrôlée (Timbart 2007).

4.2. Copolymères greffés

4.2.1. Copolymères greffés à squelette PHAs

Pour synthétiser ce type de structure, il est souvent nécessaire de partir d'un polymère possédant une fonction réactive en position latérale ou sur le squelette principal. Cette fonction qui sert de point de départ pour la polymérisation de greffons peut être de nature chimique diverse (alcool, acide carboxylique, insaturations...). La synthèse se fait soit par greffage de chaînes préformées sur la chaîne principale, « grafting onto », comme dans le cas du greffage d'oligomères, soit par greffage à partir de la chaîne principale, « grafting from », lors de la polymérisation d'un monomère. La méthode « grafting onto » ne permet cependant pas de coupler de grandes chaînes de polymère.

Les doubles liaisons portées par des PHAmcl ont été utilisées pour réaliser des réactions de greffage par voie radicalaire par amorçage thermique ou par irradiations gamma ou UV (Gagnon 1994; Hazer 1999). Ces réactions sont relativement faciles à mettre en œuvre, mais les produits obtenus sont mal définis car les réactions conduisent souvent à des produits insolubles en raison des réactions de réticulation. Il est possible de greffer des oligomères de différentes natures. Du poly(méthacrylate de méthyle), (PMMA), a été polymérisé par grafting from à partir des insaturations d'un PHAmcl (Ilter 2001). Des groupements fonctionnalisés comme de l'acide cinnamique ou des groupements sulfates, des chaînes alkyles et un polysilsesquioxane (POSS) cyclique ont été greffés par addition thiol-ène sur les insaturations d'un PHOU (Hany 2004a; Hany 2004b; Hany 2005). Cakmakli et al. ont greffé des oligomères de polystyrène (PS) ou de PMMA portant une fonction peroxide terminale (Cakmakli 2001). Le PS, le PMMA et les chaînes alkyles sont utilisées pour augmenter la tenue mécanique du PHA tandis que le greffage de POSS amène un effet mémoire de forme (Ishida 2012).

Eroglu et al. ont également greffé du PMMA par grafting from sur un PHAmcl saturé, du poly(3-hydroxynonanoate), par une activation sous rayonnement gamma.

Pour augmenter l'hydrophilie du matériau, du monoacrylate de PEG a été greffé sur du PHO sous irradiation UV (Kim 2005b). L'hydrophilie du PHO est ainsi augmentée et permet une libération contrôlée d'ibuprofène utilisée comme principe actif modèle (Kim 2005a).

Une autre approche consiste à ne greffer que la surface d'un matériau afin de moduler les propriétés de surface sans altérer les propriétés mécaniques du matériau. Du poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (PHEMA) a été polymérisé à la surface de films de PHBHV en utilisant plusieurs types de polymérisation: polymérisation radicalaire amorcée par voie thermique (peroxyde de benzoyle), par irradiation UV en présence d'eau oxygénée ou de benzophénone et également la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes pour contrôler la longueur des chaînes greffées (Lao 2007; Lao 2010; Lao 2011). Cette dernière méthode se fait à température ambiante et limite le greffage à la surface du film.

Des copolymères greffés ont également été obtenus par des réactions d'estérification entre les fonctions réactives introduites sur les chaînes latérales des PHAs et des oligomères de PLA et de PEG (Renard 2003a; Renard 2003b). Ces copolymères sont préparés par couplage d'oligomères de PEG de 350 et 2000 g.mol⁻¹ ou de PLA de 350 g.mol⁻¹ sur des fonctions acide carboxylique latérales de PHAs (**Figure 13**). L'introduction de greffons PEG de 2000 g.mol⁻¹ améliore la solubilité du copolymère dans l'eau. Ces copolymères permettent l'élaboration de nanoparticules stables sans addition de tensioactifs.

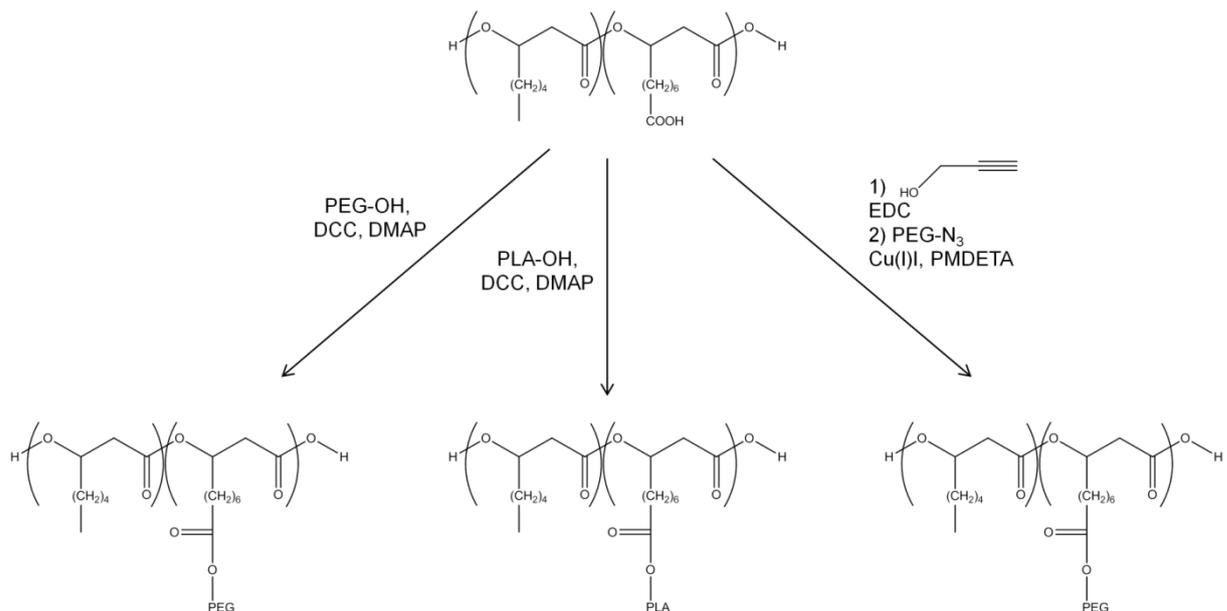


Figure 13: Greffage de PEG et de PLA sur du PHOHHx portant des fonctions acide carboxylique (Renard 2003b; Babinot 2010).

Afin d'atteindre des taux de conversions plus élevés, Babinot et al. ont utilisé la cycloaddition de Huisgen entre les fonctions alcynes latérales introduites sur un PHAmcl modifié et un PEG modifié avec une fonction azoture terminale (Babinot 2010) (**Figure 13**). Des PHOU-*g*-PEG avec des greffons PEG de 550 et 5000 g.mol⁻¹ sont obtenus avec des conversions de respectivement 94 et 84%.

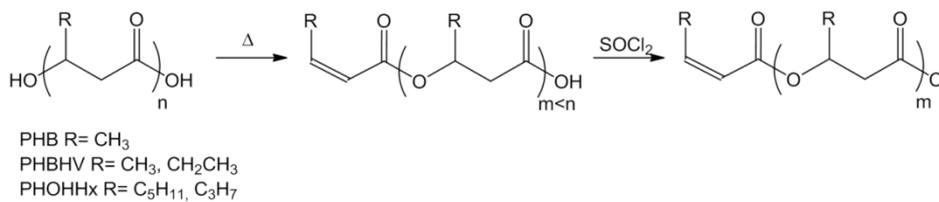
4.2.2. Copolymères greffés à greffons PHAs

Certains auteurs ont greffé des oligomères de PHAs sur des polysaccharides tels que la cellulose, le chitosan ou leurs dérivés. Arslan et al. ont greffé des oligomères de PHBHV et de PHO sur du chitosan par condensation entre l'extrémité acide carboxylique des PHAs et les fonctions amines du chitosan (Arslan 2007). Ce greffage diminue la solubilité du polymère dans une solution d'acide acétique (20%) et le copolymère devient insoluble lorsque le taux de greffage atteint 22% pour le PHBHV et 52% pour le PHO. Bhatt et al. ont greffé un PHAmcl sur du carboxyméthylchitosan (Bhatt 2008). Dans cette étude, le produit obtenu se révèle

insoluble dans la plupart des solvants classiques (eau, acide acétique, chloroforme, acétate d'éthyle, hexane, phénol, benzène, DMSO...). Des tests de biodégradation par la bactérie *Burkholderia cepacia* et le champignon *Aspergillus fumigatus* montre que le carboxyméthylchitosan-*g*-PHAmcl est dégradé moins vite que le carboxyméthylchitosan ce qui confirme la présence des chaînes de PHAmcl greffées.

Récemment, divers oligomères de PHAs ont été greffés sur de la cellulose par condensation entre les extrémités acide carboxylique des PHAs, activées en chlorure d'acide par du chlorure de thionyle, et les alcools de la cellulose (**Figure 14**) (Samain 2011).

1^{ère} étape: Préparation de l'oligomère fonctionnalisé



2^{ème} étape: Condensation de l'oligomère fonctionnalisé sur la cellulose

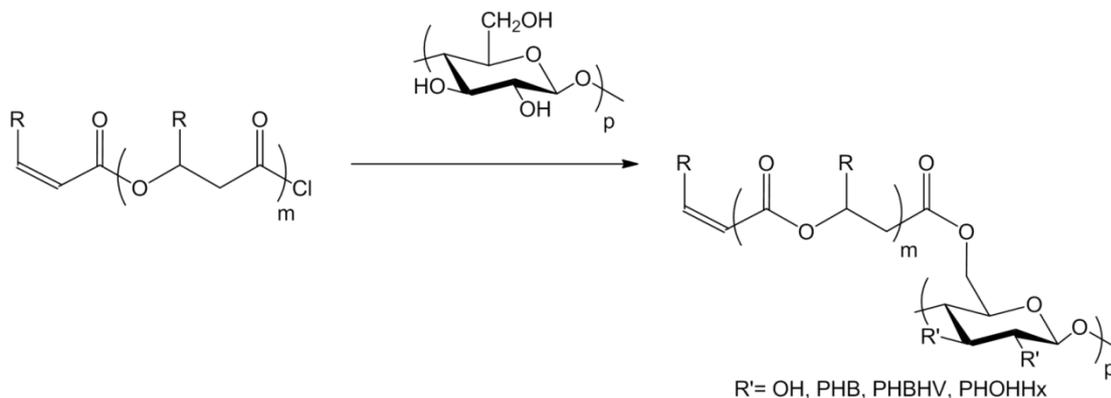


Figure 14: Condensation de greffons PHAs sur des films de cellulose (Samain 2011).

isocyanates. Naguib et al. ont préparé des copolymères en condensant un bloc PHB avec un bloc PCL-*b*-PEG-*b*-PCL (Naguib 2011). Ou et al. ont préparé des diblocs en condensant des blocs de poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), noté P3HB4HB, de différentes proportions; un bloc riche en 4HB donc peu cristallin et un bloc riche en 3HB très cristallin (Ou 2011).

D'autres méthodes permettant de condenser des blocs polymères ont été utilisées. Li et al. ont préparé des triblocs PEG-*b*-PHB-*b*-PEG en condensant le PHB diol avec des segments PEG portant une extrémité méthoxy et une extrémité acide carboxylique en présence de 1,3-N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de 4-(diméthylamino)pyridine (DMAP) (Li 2003; Li 2005a). Dai et al. ont réalisé des copolymères PHB-*b*-PHO par polycondensation avec du divinyl adipate catalysée par une lipase (Dai 2009). Le schéma réactionnel en une ou deux étapes est montré **Figure 16**. Lorsque la réaction est réalisée en une étape, les blocs PHB et PHO sont répartis aléatoirement alors que la réaction en deux étapes permet d'avoir un copolymère à blocs alternés de type A-B-A-B.

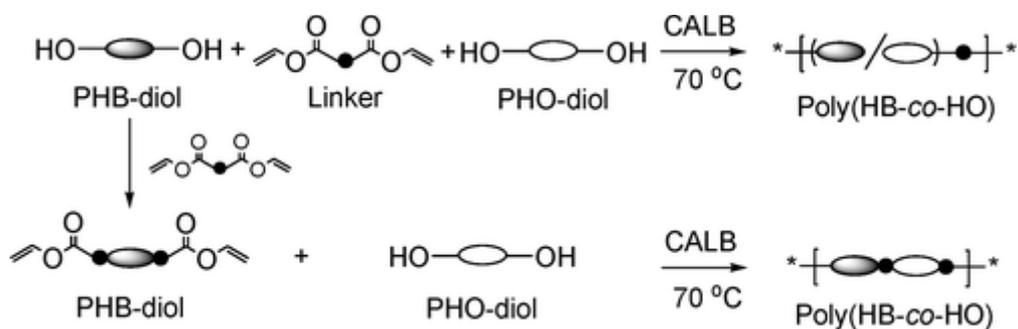


Figure 16: Préparation de copolyesters à blocs par polycondensation enzymatique de PHB-diol, PHO-diol et divinyl adipate (=linker) en une ou deux étapes (Dai 2009).

Afin de préparer des copolymères PHBHV-*b*-PEG et P3HB4HB-*b*-PEG, Shah et al. ont repris la méthode utilisée par Ravenelle et al. (Ravenelle 2002) pour synthétiser du PHB-*b*-PEG (**Figure 17**) (Shah 2010). Toutefois cette méthode met en jeu deux mécanismes différents: la dégradation thermique du PHA par β -scission et la transesterification du PHA par

le PEG. Il en résulte que la longueur finale du bloc PHA est peu contrôlable et les copolymères sont mal définis.

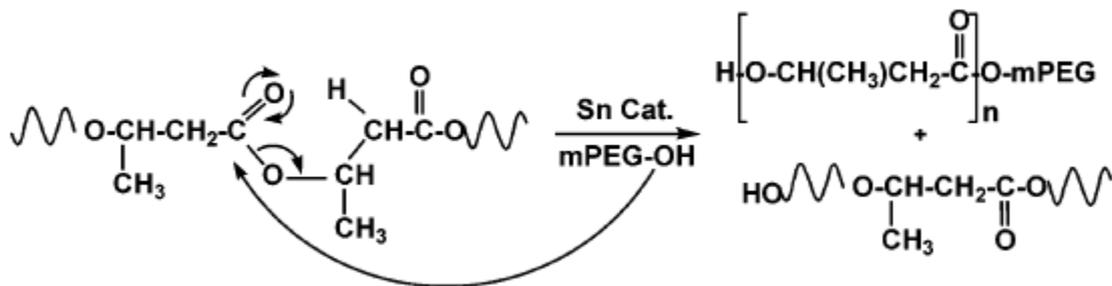


Figure 17: Réaction de transestérification entre du PHB et du PEG lors de la pyrolyse du PHB à 190°C sous vide (Ravenelle 2002).

Babinot et al. ont décrit la préparation de copolymères à blocs PHA-*b*-PEG en associant les deux blocs par une réaction de chimie click: la cycloaddition de Huisgen (Babinot 2011). Différents oligomères de PHBHV (Mn de 3400 à 13300 g.mol⁻¹), de PHBHHx (Mn de 4100 à 8100 g.mol⁻¹) et de PHOHHx (Mn de 3500 à 8100 g.mol⁻¹) portant une fonction alcyne terminale ont été couplés avec succès à un bloc PEG de 5000 g.mol⁻¹ portant une fonction azoture terminale (**Figure 18**).

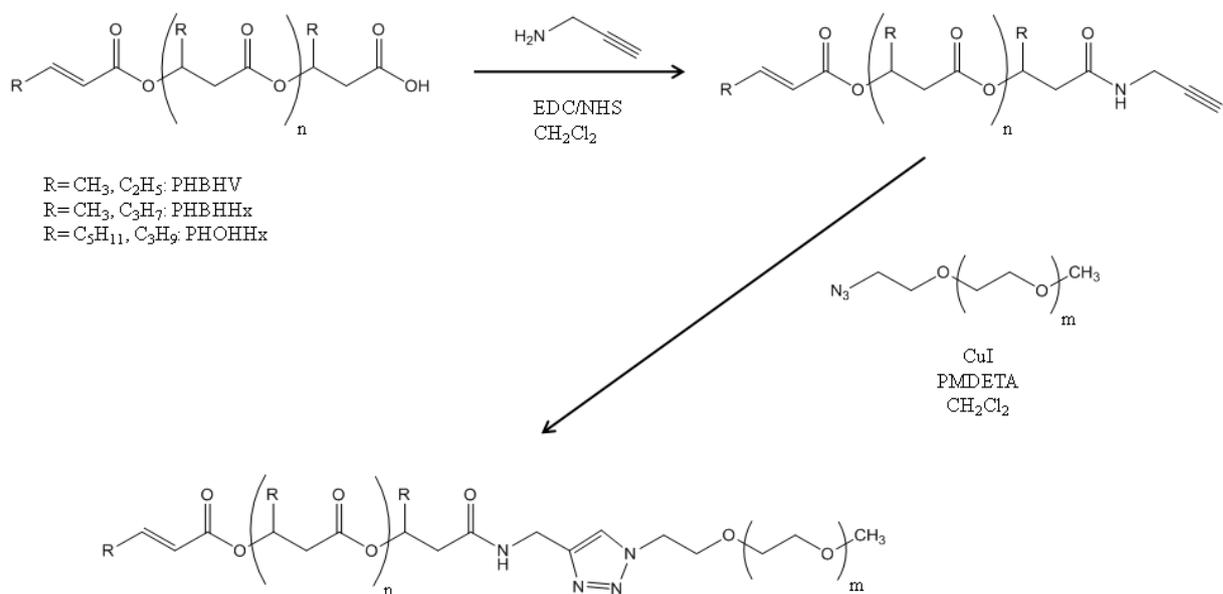


Figure 18: Schéma de synthèse de PHA-*b*-PEG par cycloaddition de Huisgen (Babinot 2011).

La synthèse de copolymères à blocs peut également provenir de la polymérisation par ouverture de cycle, ce processus procédant alors en deux étapes consécutives. Un premier bloc PHA fonctionnalisé est tout d'abord formé. La fonction réactive de ce bloc va amorcer la polymérisation du second bloc. Gross et al. utilisent des oligomères de PHB, préparés par méthanolyse, comme macro-amorceurs en présence de triéthylaluminium pour préparer des copolymères à base d' ϵ -caprolactone et de lactide (Gross 1995). Timbart et al. ont synthétisé des copolymères PHO-*b*-PCL et PHOU-*b*-PCL par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone en utilisant les oligomères de PHAmcl méthanolysés comme macroinitiateur (Timbart 2007). Les blocs PHO ont des masses molaires entre 800 et 20000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et des blocs PCL entre 12000 et 47700 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Les copolymères PHOU-*b*-PCL obtenus ont des blocs PHOU entre 4800 et 25000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et des blocs PCL de 12000 à 58500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. L'oxydation ultérieure des insaturations des blocs PHOU en acide carboxylique permet d'obtenir des copolymères PHOCOOH-*b*-PCL qui présentent la particularité de former des nanoparticules hydrolysables dans des conditions physiologiques.

5. Applications des PHAs dans le domaine biomédical

Les PHAs, du fait de leur origine naturelle et de leurs propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité peuvent être employés dans le domaine biomédical. Ils peuvent notamment être utilisés comme substitut résorbable dans le cadre de l'ingénierie tissulaire ou pour élaborer des systèmes de libération contrôlée de principes actifs.

5.1. Libération contrôlée de principes actifs

Les polymères sont largement employés dans le domaine pharmaceutique et entrent dans la composition de différentes formes galéniques comme les comprimés, les capsules, où ils sont utilisés en tant qu'excipients, adjuvants ou agents émulsifiants (Domb 1992). L'efficacité de l'administration de principes actifs dans le corps humain par voie parentérale ou autre, peut être limitée par la stabilité, la solubilité ou la toxicité de ces principes actifs. Le désir d'utiliser des polypeptides ou des acides nucléiques comme agents thérapeutiques a stimulé la mise au point de nouvelles formes galéniques plus efficaces permettant notamment de protéger le principe actif de la dégradation et du milieu environnant (Pouton 1996). Ces systèmes doivent permettre d'encapsuler un principe actif et de le libérer de manière contrôlée au cours du temps afin de limiter les effets secondaires et les prises répétées du médicament (Chen 2000; Dellacherie 2001). Ces systèmes de libération diffusent l'agent thérapeutique dans le corps selon une cinétique bien définie (**Figure 19**) qui dépend de la nature du matériau encapsulant. Dans le cas de systèmes de diffusion, le site de libération et le site d'action du principe actif ne sont pas obligatoirement les mêmes. En revanche, les systèmes de libération ciblée doivent vectoriser l'agent thérapeutique au niveau de son site d'action. Une forte concentration locale en principe actif est ainsi obtenue et le principe actif n'est pas distribué de manière aléatoire dans tout l'organisme.

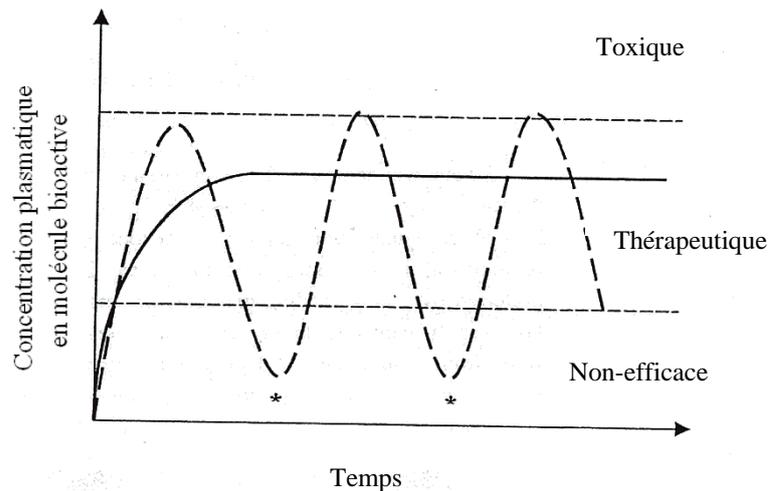


Figure 19: Evolution de la concentration en principe actif après injection en fonction du temps. (pointillés): profil de délivrance habituellement observé dans le cas d'administrations répétées (*), (trait plein) : système de délivrance idéal.

De nombreux systèmes d'encapsulation ont été mis au point, leurs différences résident dans leur mode de préparation, la nature des composés utilisés, la voie d'administration et le mode de libération du principe actif (diffusion, bio-érosion, système gonflant, système osmotique). De plus, le contrôle de la dégradation de la matrice permet une libération contrôlée du principe actif afin d'éviter l'effet de toxicité lié à une libération trop rapide et trop importante. La cristallinité et la nature chimique du polymère influencent également ces propriétés comme la vitesse et le mécanisme de dégradation, la biocompatibilité, la diffusion et la libération de la biomolécule.

L'utilisation de polymères à base de PHAs a été envisagée pour l'encapsulation de molécules bioactives. En effet, en plus d'être biodégradables et biocompatibles, les produits de dégradation des PHAs ne sont pas toxiques et peuvent être facilement éliminés par l'organisme. Dans le cas de libération de petites biomolécules à partir de matrices de PHB ou de PHBHV, la libération se fait essentiellement par diffusion. La différence de concentration entre l'intérieur du système d'encapsulation et l'extérieur module la vitesse de libération. Cette libération par diffusion est indépendante de l'érosion du polymère. En effet, la diffusion du principe actif est beaucoup plus rapide que l'hydrolyse des PHAs.

Les PHAs sont utilisés sous forme de particules (micro ou nanoparticule), de comprimés (le principe actif étant compressé dans une matrice polymérique) ou sous forme de patchs pour une libération transdermique.

5.1.1. Les micro/nanoparticules

Les PHAs sont utilisés dans le domaine de l'encapsulation le plus souvent en tant que particules. Les systèmes « sphères » sont composés d'une matrice, réseau entièrement rempli par les chaînes macromoléculaires, dans laquelle est dispersée la substance à encapsuler. Les systèmes particuliers permettent donc de protéger les molécules bioactives de l'acidité des muqueuses digestives, d'améliorer la biodisponibilité du principe actif et d'accroître le temps de libération. Le principe actif est dissous, enfermé ou attaché à la matrice de la particule et selon la méthode employée, des nanoparticules, ou des microparticules peuvent être préparées. Ce sont des systèmes intéressants du point de vue de leurs applications dans la libération de principes actifs, dans leur potentialité à cibler un tissu ou un organe particulier, leur capacité à encapsuler de l'ADN dans le cadre de la thérapie génique et dans leur capacité à délivrer des protéines, des peptides ou des gènes.

Kawaguchi et al. ont étudié la libération d'agents anticancéreux (la doxorubicine) à partir de microsphères de PHB obtenues par le procédé de double émulsion (Kawaguchi 1992). La libération assez lente peut être attribuée à l'hydrophobie du principe actif et à la taille importante de la particule. Les auteurs ont alors introduits des acides gras dans les microsphères, afin d'induire la formation de canaux facilitant la libération. Les résultats montrent que l'ajout d'acides gras possédant 10 à 12 atomes de carbone améliore la vitesse de libération de la molécule encapsulée.

Des microsphères de PHB chargées en rifampicine, un antibiotique, ont également été testées comme agents de chimio-embolisation contre les embolies cancéreuses (Kassab 1997). Les embolies sont caractérisées par la migration d'un composant anormal (embole), qui se retrouve dans la circulation sanguine. L'embole peut être un caillot qui obture une artère

plus ou moins importante ou il peut s'agir d'un embolie de cellules cancéreuses qui s'arrête dans les vaisseaux sanguins de petits calibres (capillaires) et donne alors naissance sur place à une métastase. Afin de provoquer la nécrose de la tumeur, un matériau solide peut être délibérément injecté pour boucher l'artère nourricière principale d'une tumeur (embolisation) afin de la priver de son apport sanguin. La technique de chimio-embolisation combine à la fois la technique de l'embolisation et celle de la chimiothérapie. Des microsphères de PHB ont été employées dans cet objectif. Les microsphères sont préparées par la technique solvant-évaporation de solvant avec le poly(alcool vinylique) comme émulsifiant, l'eau comme milieu dispersant et le dichlorométhane comme solvant. La taille des microsphères obtenues est comprise entre 5 et 100 μm . La vitesse de libération du principe actif, la rifampicine, est assez rapide, de l'ordre de 90% en 24h. Il est possible de la contrôler en jouant sur la quantité encapsulée et la taille des particules.

Sendil et al. ont publié des travaux similaires (Sendil 1999). Ils ont décrit l'encapsulation de tétracycline, sous forme neutre ou acide, dans des microparticules de PHBV. La forme neutre de la tétracycline favorise l'encapsulation (52-65% g/g). La vitesse de libération est rapide, semblable dans les deux cas et aucun signe de dégradation des particules n'est observé. La libération du principe actif procède donc par diffusion.

Les nanoparticules ont de nombreux avantages (Soppimath 2001). Elles possèdent de bonnes propriétés de libération contrôlée, selon le polymère employé. De plus, elles sont connues comme étant plus stables dans le système sanguin du fait d'une diminution des interactions et des échanges avec les composants du sang (Brigger 2002). Les nanoparticules sont employées pour la vectorisation de principes actifs en chimiothérapie dans le cadre des traitements de cancer (Labhasetwar 1997).

Kurth et al. ont étudié la faisabilité de nanoparticules à base de P(3-HO-co-3-COOH) par nanopréciipitation à température ambiante (acétone/eau) (Kurth 2002). La présence des fonctions acide carboxylique tend à limiter la formation d'agrégats. En effet, les nanoparticules à base de P(HO-co-OH) coalescent immédiatement après leur formation, celles à base de

P(HO-co-10%COOH) forment quelques agrégats et ne sont pas stables dans le temps alors que celles à base de P(HO-co-25%COOH) sont bien isolées (**Figure 20**).

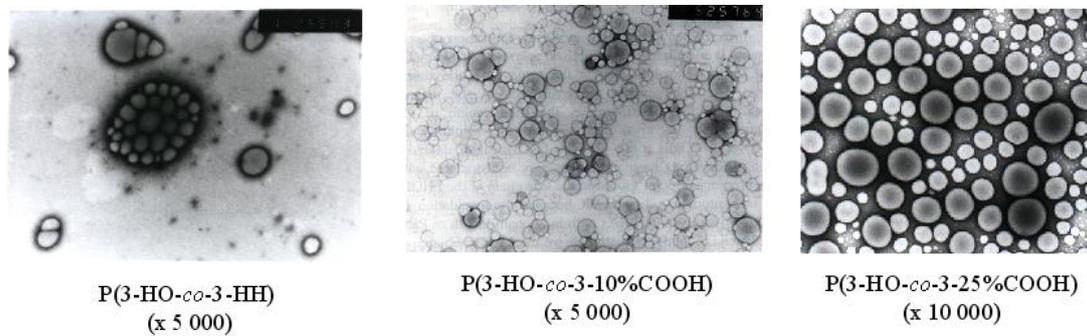


Figure 20: Images obtenues en Microscopie Electronique à Transmission de nanoparticules de PHAs obtenues par nanopréciptation (Kurth 2002).

Des copolymères P(HO-co-25%COOH)-b-PCL ont été synthétisés (Renard 2010) et ont servi à élaborer des nanoparticules pour l'encapsulation de doxorubicine, un anticancéreux. Un faible effet burst est observé, inférieur à 10% au bout de 10h, puis le pourcentage de principe actif relargué cumulé atteint 25% après 5 jours.

5.1.2. Les implants

Les PHAs sont également utilisés dans le domaine biomédical sous forme d'implants. Une étude a notamment porté sur l'emploi de PHAs dans le cadre du traitement de l'ostéomyélite chronique (Yagmurlu 1999). L'objectif est de lutter contre les foyers infectieux difficilement accessibles aux antibiotiques dans le cas des ostéomyélites où l'administration systémique d'antibiotiques peut être inefficace à cause d'une vascularisation défectueuse. L'antibiotique est intégré dans des bâtonnets (20 x 0,3 x 0,3 cm, 100 mg) de PHBV (22% 3HV) qui sont implantés dans le tibia d'un lapin infecté par *Staphylococcus aureus*. L'infection subsiste après 15 jours et la guérison est complète après 1 mois. La libération *in-vitro* d'antibiotiques (céfopérazone, gentamicine) a été étudiée par Gurselt (Gursel 2002). La

libération a été suivie dans des conditions physiologiques (température, pH). La libération d'antibiotiques se fait rapidement au départ, puis la cinétique de libération devient plus lente et se prolonge dans le temps. En faisant varier la composition du polymère, la cinétique de libération a pu être ajustée à 2 mois, temps de traitement idéal dans le cas du traitement de l'ostéomyélite.

Korsatko et al. ont étudié la libération *in-vitro* et *in-vivo* de la 7-hydroxyéthylthéophylline (analeptique cardiaque ou respiratoire) à partir d'implants à base de PHB préparés par compression de l'agent thérapeutique avec le PHB. La libération *in-vitro* dépend du taux d'encapsulation. Si l'implant contient 60 à 80% de principe actif, la libération se fait sur 24h tandis que s'il en contient 5 à 30%, la libération se fait sur 50 jours. Dans le second cas, la différence de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de l'implant n'est pas suffisante pour induire un gradient de diffusion élevé. La libération du principe actif est donc plus lente. De plus, si l'implant est placé sous la peau de l'animal au niveau du cou, la libération est ralentie. Ceci est lié à la faible quantité d'eau autour de l'implant dans le cas des analyses *in vivo*.

Des PHAs, PHBHV, PHO, PHOCOOH et PHBHV-*b*-PLA, contenant du sirolimus, un agent anti-proliférant, ont été déposés sur des stents métalliques (Vergnol 2012). Le sirolimus est relargué avec un très fort effet burst avec plus de 80% de relargage en quelques heures sauf pour le copolymère PHBH-*b*-PLA où l'effet est un peu moins prononcé. En rajoutant une couche de PHBHV ne contenant pas de principe actif, la diffusion du principe actif vers le milieu est fortement ralentie, notamment pour les sous-couches en PHBHV-*b*-PLA et PHBHV (**Figure 21**).

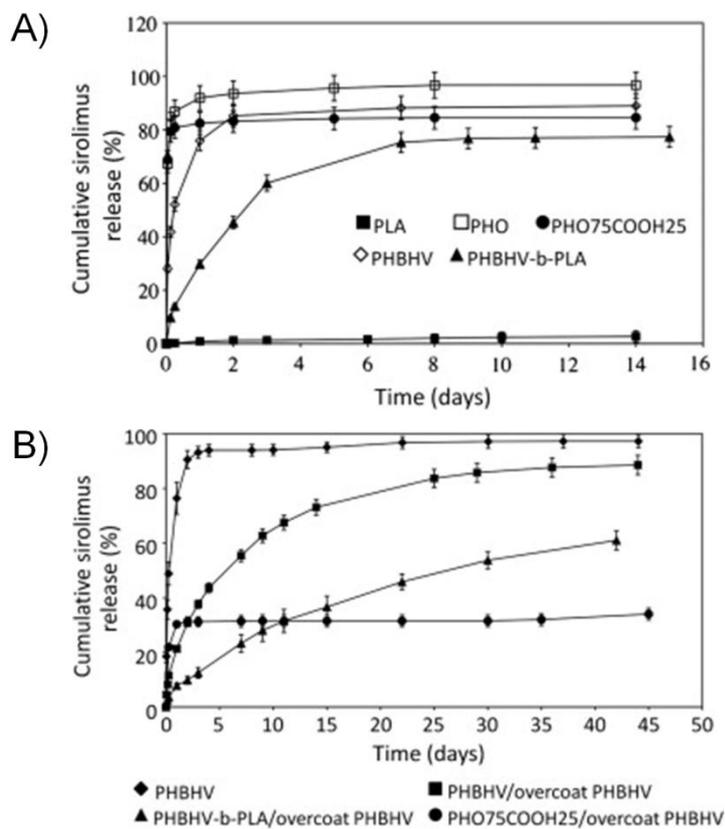


Figure 21: Profils de relargage du sirolimus A) des dépôts monocouches et B) des dépôts bicouches à 37°C et pH 7,4.

5.2. La régénération tissulaire

La régénération tissulaire (tissue engineering) est un domaine en pleine évolution, à la recherche de nouveaux biomatériaux pouvant apporter des solutions durables aux dommages tissulaires. L'approche de base nécessite la complémentarité des cellules, d'un support et de facteurs bioactifs. Par exemple pour la régénération de tissu cartilagineux, des chondrocytes (cellules osseuses responsables de la formation du cartilage) sont placées dans un support biodégradable macroporeux de poly(acide lactique-co-acide glycolique) possédant de l'acide hyaluronique greffé en surface, l'acide hyaluronique étant un facteur de croissance des

chondrocytes (Yoo 2005). Le support doit idéalement présenter les propriétés suivantes (Chung 2008):

- Se dégrader de façon contrôlée
- Promouvoir l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules ainsi que la production de matrice extra-cellulaire (à base de collagène)
- Permettre la diffusion des nutriments nécessaires aux cellules et l'évacuation des déchets
- Adhérer aux tissus environnants
- Pouvoir combler intégralement le défaut
- Avoir les mêmes propriétés mécaniques que le tissu remplacé

De nombreux matériaux ont été étudiés principalement sous trois formes: les hydrogels, les mousses et les mailles fibreuses. Les hydrogels ont l'avantage d'être injectables directement dans le défaut qu'ils vont remplir quelles que soient sa taille et sa forme. Des cellules peuvent être suspendues de façon homogène dans les trois dimensions et les contraintes mécaniques environnantes sont transmises jusqu'à elles, simulant encore plus les conditions physiologiques normales. Un des principaux défauts de ce type d'architecture est leur faible tenue mécanique, notamment pour de la régénération osseuse ou cartilagineuse. Les mousses ont des propriétés mécaniques intéressantes mais leur porosité doit être parfaitement contrôlée et l'interconnectivité entre les pores doit être totale afin de permettre la diffusion des nutriments. Une répartition homogène des cellules dans le volume du support peut être difficile. Enfin les mailles de fibres présentent de grands volumes vides et de grandes surfaces de contact adaptées au développement cellulaire. En effet, ce type d'architecture imite fortement le réseau de fibres de collagène constituant la matrice extra-cellulaire. Il est de plus possible d'obtenir des fibres orientées avec des propriétés mécaniques anisotropes comme de nombreux tissus organiques. La méthode de choix actuellement pour la préparation de ces mailles de fibres est la technique de l'électrospinning. Ce procédé utilise les forces électrostatiques pour générer des fibres polymères entre 100 nm

et quelques μm . Le principe de l'électrospinning est connu depuis plus de 100 ans mais c'est en 1934 que Formalas développe le premier appareil capable de générer des fibres de petit diamètre de façon satisfaisante (Formalas 1934). Un équipement d'électrospinning consiste en un capillaire à travers lequel le liquide à électrospinner est poussé par une pompe à seringue ou du gaz pressurisé, une source de haute tension, positive ou négative, reliée au liquide par une électrode immergée ou directement au capillaire lorsque celui-ci est une aiguille de seringue en métal et un collecteur relié à la terre (**Figure 22**). La source de tension induit des charges dans le liquide. Lorsque le champ électrique augmente les charges identiques se repoussent entre elles dans le liquide d'une part, et d'autre part le liquide chargé et le collecteur s'attirent exerçant ainsi une force de traction sur le liquide, allongeant ainsi la goutte pendante à la pointe du capillaire. A partir d'une certaine valeur du champ électrique, les forces électrostatiques contrebalancent la tension de surface créant alors un cône de Taylor. Un jet de fibres est alors éjecté de l'apex du cône et est accéléré vers le collecteur. Le type de collecteur est important. Par exemple un collecteur stationnaire va former un mat de fibres orientées aléatoirement tandis qu'un collecteur rotatif va former un mat de fibres orientées.

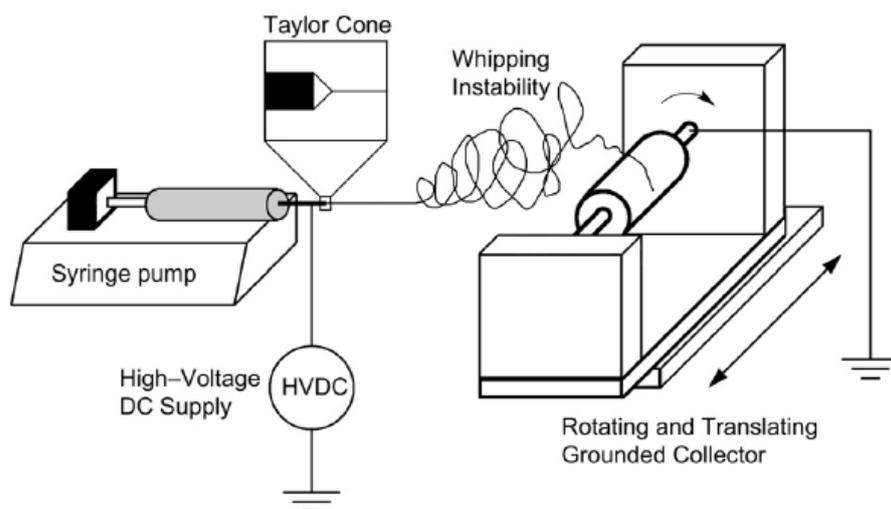
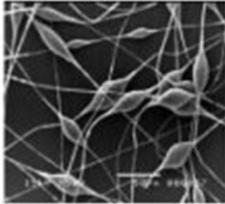
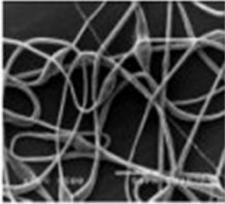
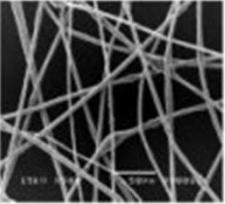
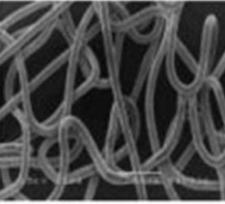


Figure 22: Schéma d'un montage typique d'électrospinning (Sill 2008).

Les différents paramètres permettant d'influer sur la géométrie des fibres obtenues sont la tension appliquée, le débit de la solution de polymère, la distance entre le capillaire et le collecteur, la viscosité de la solution, sa conductivité et la volatilité du solvant.

L'électrospinning de PHAscl est en pleine expansion (Puppi 2010) depuis quelques années car ces polymères sont maintenant de plus en plus disponibles à des prix compétitifs et ont l'avantage par rapport au PLA de conduire à des produits de dégradation moins acides et moins inflammatoires (Ying 2008). Des fibres de PHAscl ont été obtenues dans différentes conditions et des tests *in vitro* sur différentes lignées cellulaires ont à chaque fois montré des améliorations par rapport à des films préparés par évaporation de solvant. Lee et al. ont préparé des réseaux de fibres de PHBHV en utilisant du tétrafluoroéthanol (TFE) comme solvant (Lee 2004). La prolifération de chondrocytes a été plus importante sur les réseaux de fibres que sur des films. Des réseaux de fibres de PHBHV ont aussi été préparés par Ito et al. puis trempés dans une solution contenant de l'hydroxyapatite (un phosphate de calcium composant les os) (Ito 2005). La valeur de l'angle de contact entre une goutte d'eau et la surface des fibres passe alors d'environ 110° à 0°, l'eau étant absorbé par le matériau. Il est aussi montré que l'hydrophilie du matériau accélère sa biodégradation par une PHB dépolymérase. Sombatmankhong et al. ont électrospinné du PHB et du PHBHV en solution dans le chloroforme et ont étudié l'influence de divers paramètres comme la distance avec le collecteur, la concentration de la solution ou la tension appliquée (Sombatmankhong 2006). Dans tous les cas, les diamètres moyens sont entre 1,6 et 8,8 µm. Quand la distance avec le collecteur augmente, le diamètre moyen diminue et il augmente quand la concentration est plus importante ou la tension plus élevée. La variation des diamètres et de la morphologie de fibres de PHB sont illustrées dans le **tableau 6**. On peut voir que pour obtenir des fibres de diamètre régulier, sans nodule, la tension et la concentration de la solution doivent être élevées. Des fibroblastes ont été mis en culture sur ces réseaux de fibres de PHB et de PHBHV et ont proliféré (Suwantong 2007).

Tableau 6: Images MEB montrant la morphologie de fibres de PHB et leurs diamètres moyens suivant la concentration de la solution dans le chloroforme et le potentiel appliqué. La distance entre la pointe de la seringue et le collecteur est de 20 cm (Sombatmankhong 2006).

Concentration (%w/v)	Potentiel électrique appliqué (kV)	
	8	14
10	 d = 1,6 μm	 d = 3,5 μm
14	 d = 4,1 μm	 d = 6,6 μm

L'utilisation d'un mélange de DMF et de chloroforme pour solubiliser le PHA permet d'obtenir plus facilement des fibres lisses et sans nodules. En effet, le DMF augmente la conductivité de la solution ce qui augmente les forces électrostatiques. Les fibres sont donc plus rapidement étirées vers le collecteur (Cheng 2008). Des études de dégradation *in vivo* de réseaux de fibres de PHB, PHBHHx et P(3HB4HB) sur 12 semaines ont montré que ceux-ci étaient très bien tolérés (Ying 2008). La cinétique de dégradation peut être contrôlée par le taux de cristallinité, le P(3HB4HB) étant le moins cristallin il se dégrade plus rapidement. Les réseaux à base de PHAs ont ainsi montré qu'ils étaient adaptés à des applications de types ingénierie tissulaire.

Afin d'améliorer encore la prolifération des différentes lignées cellulaires potentielles, des mélanges sont de plus en plus étudiés afin d'avoir un effet bioactif des fibres sur la croissance cellulaire. Des mélanges électrospinnés de PHBHV avec du PLLA, du PLGA ou du P(LDL)LA ont montré que l'ajout de PLA permettait d'obtenir plus facilement des fibres lisses et sans nodules (Ndreu 2008). Ces matériaux ont prouvé leur biocompatibilité par des études de prolifération de cellules humaines d'ostéosarcome. De plus, un traitement au plasma en présence d'oxygène de ces matériaux permet d'augmenter encore la prolifération de ces cellules. Un mélange de PHBHV et de gélatine en solution dans le TFE donne un réseau de fibres sur lequel des fibroblastes prolifèrent mieux que sur un réseau de PHBHV (Meng 2008). Ma et al. ont préparé des fibres à partir de mélange de PHB et de chitosan (Ma 2010). Les tests in vitro ont alors montré que la présence du chitosan améliore la prolifération de fibroblastes. L'ajout d'alcool polyvinylique (PVA) dans des fibres de PHB diminue leur cristallinité et permet donc d'améliorer la cinétique de dégradation (Asran 2010). Des fibres de PHB chargées en sulfate de kanamycine, un antibiotique, ont été élaboré et permettent un relargage de 95% en 8h (Naveen 2010).

La fabrication de matrices pour l'ingénierie tissulaire par électrospinning se révèle donc un domaine en pleine expansion depuis une dizaine d'années. Les PHAs offrent de grandes possibilités d'applications mais sont encore comparativement peu étudiés par rapport aux matrices à base de PLA ou de PCL.

6. Conclusion

Cette étude bibliographique des PHAs bactériens montre que, bien que découverts depuis environ un siècle, la plupart des études ont eu lieu dans les dernières décennies et particulièrement à partir des années 90. La découverte de nouvelles souches bactériennes, sauvages ou recombinantes et les études sur les conditions de culture permettent d'élargir de plus en plus la gamme de PHAs accessibles. On se dirige ainsi de plus en plus vers une biosynthèse à façon des PHAs. Dans le deuxième chapitre de cette thèse nous nous

pencherons d'ailleurs sur les capacités de biosynthèse de PHAs de souches sauvages marines originales.

Les PHAs ont de nombreuses propriétés intéressantes que ce soit leur biocompatibilité, leur biodégradabilité ou une large gamme de propriétés thermiques et mécaniques. Cet ensemble de propriétés peut encore être élargi en modifiant chimiquement les PHAs. Relativement à d'autres familles de polymères, les copolymères synthétisés à base de PHAs sont encore peu nombreux dans la littérature et notamment les copolymères de PHAs et de polysaccharides. C'est pourquoi, nous mettrons au point dans le troisième chapitre de cette thèse, une méthode originale permettant de synthétiser en une étape des oligomères fonctionnalisés de PHAs parfaitement définis. Puis ces oligomères fonctionnalisés pourront alors être utilisés pour la synthèse de copolymères greffés polysaccharide-g-PHAs dans le quatrième chapitre.

Enfin, comme nous venons de le voir dans la littérature, l'électrospinning des PHAs est une méthode de choix pour l'élaboration de biomatériaux pour l'ingénierie. De plus, une évolution récente est de combiner aux fibres de PHAs d'autres polymères afin d'améliorer la réponse biologique. Nous préparerons donc un matériau par électrospinning à base de PHAs et de copolymères polysaccharide-g-PHA et sa biocompatibilité sera testée *in vitro* par des cultures de cellules souches.

7. Références bibliographiques

- Adams, J. H., Irving, G., Koeslag, J. H., Lochner, J. D., Sandell, R. C. and Wilkinson, C., *Journal of Physiology-London* **1987** 386: 439-454.
- Anderson, A. J. and Dawes, E. A., *Microbiological Reviews* **1990** 54 (4): 450-472.
- Andrade, A. P., Neuenschwander, P., Hany, R., Egli, T., Witholt, B. and Li, Z., *Macromolecules* **2002a** 35 (13): 4946-4950.
- Andrade, A. P., Witholt, B., Hany, R., Egli, T. and Li, Z., *Macromolecules* **2002b** 35 (3): 684-689.
- Aoyagi, Y., Yamashita, K. and Doi, Y., **2002** - 76 (- 1): - 59.
- Arkin, A. H., Hazer, B. and Borcakli, M., *Macromolecules* **2000** 33 (9): 3219-3223.
- Arslan, H., Hazer, B. and Yoon, S. C., *Journal of Applied Polymer Science* **2007** 103 (1): 81-89.
- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y. and Foglia, T. A., *Biomacromolecules* **2005** 6 (4): 2106-2112.
- Asran, A. S., Razghandi, K., Aggarwal, N., Michler, G. H. and Groth, T., *Biomacromolecules* **2010** 11 (12): 3413-3421.
- Asrar, J., Valentin, H. E., Berger, P. A., Tran, M., Padgett, S. R. and Garbow, J. R., *Biomacromolecules* **2002** 3 (5): 1006-1012.
- Babinot, J., Renard, E. and Langlois, V., *Macromolecular Rapid Communications* **2010** 31 (7): 619-624.
- Babinot, J., Renard, E. and Langlois, V., *Macromolecular Chemistry and Physics* **2011** 212 (3): 278-285.
- Ballistreri, A., Giuffrida, M., Guglielmino, S. P. P., Carnazza, S., Ferreri, A. and Impallomeni, G., *International Journal of Biological Macromolecules* **2001** 29 (2): 107-114.
- Ballistreri, A., Montaudo, G., Impallomeni, G., Lenz, R. W., Kim, Y. B. and Fuller, R. C., *Macromolecules* **1990** 23 (24): 5059-5064.
- Barbuzzi, T., Giuffrida, M., Impallomeni, G., Camazza, S., Ferreri, A., Guglielmino, S. P. P. and Ballistreri, A., *Biomacromolecules* **2004** 5 (6): 2469-2478.
- Barnard, G. N. and Sanders, J. K. M., *Febs Letters* **1988** 231 (1): 16-18.
- Barnard, G. N. and Sanders, J. K. M., *Journal of Biological Chemistry* **1989** 264 (6): 3286-3291.
- Bear, M. M., LeboucherDurand, M. A., Langlois, V., Lenz, R. W., Goodwin, S. and Guerin, P., *Reactive & Functional Polymers* **1997** 34 (1): 65-77.
- Bear, M. M., Renard, E., Randriamahefa, S., Langlois, V. and Guerin, P., *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Ii Fascicule C-Chimie* **2001** 4 (4): 289-293.
- Bhatt, R., Panchal, B., Patel, K., Sinha, V. K. and Trivedi, U., *Journal of Applied Polymer Science* **2008** 110 (2): 975-982.
- Brigger, I., Morizet, J., Aubert, G., Chacun, H., Terrier-Lacombe, M. J., Couvreur, P. and Vassal, G., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002** 303 (3): 928-936.
- Cakmakli, B., Hazer, B. and Borcakli, M., *Macromolecular Bioscience* **2001** 1 (8): 348-354.

- Chen, D. R., Bei, J. Z. and Wang, S. G., *Polymer Degradation and Stability* **2000** 67 (3): 455-459.
- Chen, G. Q., Xu, J., Wu, Q., Zhang, Z. M. and Ho, K. P., *Reactive & Functional Polymers* **2001** 48 (1-3): 107-112.
- Cheng, M.-L., Lin, C.-C., Su, H.-L., Chen, P.-Y. and Sun, Y.-M., **2008** - 49 (- 2): - 553.
- Chung, C. and Burdick, J. A., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008** 60 (2): 243-262.
- Ciesielski, S., Cydzik-Kwiatkowska, A., Pokoj, T. and Klimiuk, E., *Journal of Applied Microbiology* **2006** 101 (1): 190-199.
- Dai, S., Xue, L., Zinn, M. and Li, Z., *Biomacromolecules* **2009** 10 (12): 3176-3181.
- Daly, P. A., Bruce, D. A., Melik, D. H. and Harrison, G. M., *Journal of Applied Polymer Science* **2005** 98 (1): 66-74.
- de Eugenio, L. I., Garcia, P., Luengo, J. M., Sanz, J. M., San Roman, J., Garcia, J. L. and Prieto, M. A., *Journal of Biological Chemistry* **2007** 282 (7): 4951-4962.
- deKoning, G. J. M., Kellerhals, M., vanMeurs, C. and Witholt, B., *Bioprocess Engineering* **1997a** 17 (1): 15-21.
- Dekoning, G. J. M. and Lemstra, P. J., *Polymer* **1992** 33 (15): 3292-3294.
- deKoning, G. J. M. and Witholt, B., *Bioprocess Engineering* **1997b** 17 (1): 7-13.
- Dellacherie, E., Gref, R. and Quellec, P., *M S-Medecine Sciences* **2001** 17 (5): 619-626.
- Desmet, M. J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J. and Wynberg, H., *Journal of Bacteriology* **1983** 154 (2): 870-878.
- Doi, Y., *Microbial polyesters*. **1990**, Wiley-VCH.
- Doi, Y., Kanosawa, Y., Tanahashi, N. and Kumagai, Y., *Polymer Degradation and Stability* **1992** 36 (2): 173-177.
- Doi, Y., Kitamura, S. and Abe, H., *Macromolecules* **1995** 28 (14): 4822-4828.
- Domb, A., Amselem, S., Shah, J. and Maniar, M., *Polymers for Advanced Technologies* **1992** 3 (6): 279-292.
- Eggink, G., Dewaard, P. and Huijberts, G. N. M., *Fems Microbiology Reviews* **1992** 9 (2-4): 159-163.
- Eroglu, M. S., Hazer, B., Ozturk, T. and Caykara, T., *Journal of Applied Polymer Science* **2005** 97 (5): 2132-2139.
- Formal, A. (1934).
- Forsyth, W. G. C., Hayward, A. C. and Roberts, J. B., *Nature* **1958** 182 (4638): 800-801.
- Foster, L. J. R., Zervas, S. J., Lenz, R. W. and Fuller, R. C., *Biodegradation* **1995** 6 (1): 67-73.
- Fritzsche, K., Lenz, R. W. and Fuller, R. C., *International Journal of Biological Macromolecules* **1990a** 12 (2): 92-101.
- Fritzsche, K., Lenz, R. W. and Fuller, R. C., *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1990b** 191 (8): 1957-1965.
- Gagnon, K. D., Lenz, R. W., Farris, R. J. and Fuller, R. C., *Macromolecules* **1992** 25 (14): 3723-3728.
- Gagnon, K. D., Lenz, R. W., Farris, R. J. and Fuller, R. C., *Polymer* **1994** 35 (20): 4358-4367.
- Gogolewski, S., Jovanovic, M., Perren, S. M., Dillon, J. G. and Hughes, M. K., *Journal of Biomedical Materials Research* **1993** 27 (9): 1135-1148.

- Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A. and Rehm, B. H. A., *Biomacromolecules* **2009** 10 (4): 660-669.
- Griebel, R., Smith, Z. and Merrick, J. M., *Biochemistry* **1968** 7 (10): 3676-&.
- Gross, R. A., Demello, C., Lenz, R. W., Brandl, H. and Fuller, R. C., *Macromolecules* **1989** 22 (3): 1106-1115.
- Gross, R. A. C., MA), Mccarthy, Stephen P. (Tyngsboro, MA), Reeve, Michael S. (Lowell, MA) (1995). Biodegradable and hydrodegradable diblock copolymers composed of poly(.beta . United States, University of Massachusetts Lowell (Lowell, MA).
- Gursel, I., Yagmurlu, F., Korkusuz, F. and Hasirci, V., *Journal of Microencapsulation* **2002** 19 (2): 153-164.
- Hany, R., Bohlen, C., Geiger, T., Hartmann, R., Kawada, J., Schmid, M., Zinn, M. and Marchessault, R. H., *Macromolecules* **2004a** 37 (2): 385-389.
- Hany, R., Bohlen, C., Geiger, T., Schmid, M. and Zinn, M., *Biomacromolecules* **2004b** 5 (4): 1452-1456.
- Hany, R., Hartmann, R., Bohlen, C., Brandenberger, S., Kawada, J., Lowe, C., Zinn, M., Witholt, B. and Marchessault, R. H., *Polymer* **2005** 46 (14): 5025-5031.
- Hartmann, R., Hany, R., Pletscher, E., Ritter, A., Witholt, B. and Zinn, M., *Biotechnology and Bioengineering* **2006** 93 (4): 737-746.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J. and Dawes, E. A., *Fems Microbiology Letters* **1989** 57 (1): 1-6.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Ewing, D. F. and Dawes, E. A., *Appl. Env. Microbiol.* **1990** 56 (11): 3354-3359.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Williams, D. R., Dawes, E. A. and Ewing, D. F., *International Journal of Biological Macromolecules* **1991** 13 (2): 83-88.
- Hazer, B., Lenz, R. W., Cakmakli, B., Borcakli, M. and Kocer, H., *Macromolecular Chemistry and Physics* **1999** 200 (8): 1903-1907.
- Hazer, D. B. and Hazer, B., *Journal of Polymer Research* **2011** 18 (2): 251-262.
- Hirt, T. D., Neuenschwander, P. and Suter, U. W., *Macromolecular Chemistry and Physics* **1996** 197 (5): 1609-1614.
- Hocking, P. and Marchessault, R. H., *Biopolymers from Renewable Ressources, Chapter 9.1998*.
- Hori, Y., Suzuki, M., Okeda, Y., Imai, T., Sakaguchi, M., Takahashi, Y., Yamaguchi, A. and Akutagawa, S., *Macromolecules* **1992** 25 (19): 5117-5118.
- Huijberts, G. N. M., Derijk, T. C., Dewaard, P. and Eggink, G., *Journal of Bacteriology* **1994** 176 (6): 1661-1666.
- Huijberts, G. N. M., Eggink, G., Dewaard, P., Huisman, G. W. and Witholt, B., *Applied and Environmental Microbiology* **1992** 58 (2): 536-544.
- Huisman, G. W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P. and Witholt, B., *Journal of Biological Chemistry* **1991** 266 (4): 2191-2198.
- Ilter, S., Hazer, B., Borcakli, M. and Atici, O., *Macromolecular Chemistry and Physics* **2001** 202 (11): 2281-2286.
- Ishida, K., Hortensius, R., Luo, X. F. and Mather, P. T., *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **2012** 50 (6): 387-393.

- Ito, Y., Hasuda, H., Kamitakahara, M., Ohtsuki, C., Tanihara, M., Kang, I. K. and Kwon, O. H., *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2005** 100 (1): 43-49.
- Jacquel, N., Lo, C. W., Wu, H. S., Wei, Y. H. and Wang, S. S., *Aiche Journal* **2007** 53 (10): 2704-2714.
- Kassab, A. C., Xu, K., Denkbass, E. B., Dou, Y., Zhao, S. and Piskin, E., *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **1997** 8 (12): 947-961.
- Kasuya, K., Mitomo, H., Nakahara, M., Akiba, A., Kudo, T. and Doi, Y., *Biomacromolecules* **2000** 1 (2): 194-201.
- Kawaguchi, T., Tsugane, A., Higashide, K., Endoh, H., Hasegawa, T., Kanno, H., Seki, T., Juni, K., Fukushima, S. and Nakano, M., *J. Pharm. Sci.* **1992** 81 (508-512).
- Kellerhals, M. B., Kessler, B., Witholt, B., Tchouboukov, A. and Brandl, H., *Macromolecules* **2000** 33 (13): 4690-4698.
- Kim, D. Y., Kim, H. W., Chung, M. G. and Rhee, Y. H., *Journal of Microbiology* **2007** 45 (2): 87-97.
- Kim, H. W., Chung, C. W., Hwang, S. J. and Rhee, Y. H., *International Journal of Biological Macromolecules* **2005a** 36 (1-2): 84-89.
- Kim, H. W., Chung, C. W. and Rhee, Y. H., *International Journal of Biological Macromolecules* **2005b** 35 (1-2): 47-53.
- Kim, O. Y., Gross, R. A. and Rutherford, D. R., *Canadian Journal of Microbiology* **1995** 41: 32-43.
- Kim, Y. B., Kim, D. Y. and Rhee, Y. H., *Macromolecules* **1999** 32 (19): 6058-6064.
- Kim, Y. B., Lenz, R. W. and Fuller, R. C., *Macromolecules* **1991** 24 (19): 5256-5260.
- Kim, Y. B., Lenz, R. W. and Fuller, R. C., *Macromolecules* **1992** 25 (7): 1852-1857.
- Kopinke, F. D. and Mackenzie, K., **1997** - 40-41 (- 0): - 53.
- Kowalczyńska, H. M., Nowak-Wyrzykowska, M., Dobkowski, J., Kolos, R., Kaminski, J., Makowska-Cynka, A. and Marciniak, E., *Journal of Biomedical Materials Research* **2002** 61 (2): 260-269.
- Kunioka, M. and Doi, Y., *Macromolecules* **1990** 23 (7): 1933-1936.
- Kurth, N., Renard, E., Brachet, F., Robic, D., Guerin, P. and Bourbouze, R., *Polymer* **2002** 43 (4): 1095-1101.
- Labhasetwar, V., Song, C. X. and Levy, R. J., *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997** 24 (1): 63-85.
- Lageveen, R. G., Huisman, G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. and Witholt, B., *Applied and Environmental Microbiology* **1988** 54 (12): 2924-2932.
- Lao, H.-K., Renard, E., El Fagui, A., Langlois, V., Vallee-Rehel, K. and Linossier, I., *Journal of Applied Polymer Science* **2011** 120 (1): 184-194.
- Lao, H.-K., Renard, E., Langlois, V., Vallee-Rehel, K. and Linossier, I., *Journal of Applied Polymer Science* **2010** 116 (1): 288-297.
- Lao, H.-K., Renard, E., Linossier, I., Langlois, V. and Vallee-Rehel, K., *Biomacromolecules* **2007** 8 (2): 416-423.
- Lauzier, C., Revol, J. F., Debzi, E. M. and Marchessault, R. H., *Polymer* **1994** 35 (19): 4156-4162.

- Lee, I. S., Kwon, O. H., Meng, W. and Kang, I. K., *Macromolecular Research* **2004** 12 (4): 374-378.
- Lee, M. Y., Lee, T. S. and Park, W. H., *Macromolecular Chemistry and Physics* **2001** 202 (7): 1257-1261.
- Lee, M. Y. and Park, W. H., *Macromolecular Chemistry and Physics* **2000a** 201 (18): 2771-2774.
- Lee, M. Y., Park, W. H. and Lenz, R. W., *Polymer* **2000b** 41 (5): 1703-1709.
- Lemoigne, M., *Bulletins de la Société de Chimie Biologique* **1926** 8: 770-782.
- Lemoigne, M., *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* **1927** 41: 148-165.
- Lendlein, A., Neuenchwander, P. and Suter, U. W., *Macromolecular Chemistry and Physics* **1998** 199 (12): 2785-2796.
- Lenz, R. W. and Marchessault, R. H., *Biomacromolecules* **2005** 6 (1): 1-8.
- Li, J., Li, X., Ni, X. P. and Leong, K. W., *Macromolecules* **2003** 36 (8): 2661-2667.
- Li, J., Ni, X. P., Li, X., Tan, N. K., Lim, C. T., Ramakrishna, S. and Leong, K. W., *Langmuir* **2005a** 21 (19): 8681-8685.
- Li, X., Loh, X. J., Wang, K., He, C. B. and Li, J., *Biomacromolecules* **2005b** 6 (5): 2740-2747.
- Liu, V. A., Jastromb, W. E. and Bhatia, S. N., *Journal of Biomedical Materials Research* **2002** 60 (1): 126-134.
- Loh, X. J., Goh, S. H. and Li, J., *Biomaterials* **2007** 28 (28): 4113-4123.
- Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E. R., *Current Opinion in Microbiology* **2003** 6 (3): 251-260.
- Ma, G., Yang, D., Wang, K., Han, J., Ding, S., Song, G. and Nie, J., *Journal of Applied Polymer Science* **2010** 118 (6): 3619-3624.
- Marchessault, R. H., Monasterios, C. J., Morin, F. G. and Sundararajan, P. R., *International Journal of Biological Macromolecules* **1990** 12 (2): 158-165.
- Marchessault, R. H. and Yu, G. E., *Polymer Preprints* **1999**: 527-528.
- Marois, Y., Zhang, Z., Vert, M., Deng, X. Y., Lenz, R. and Guidoin, R., *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **1999** 10 (4): 469-482.
- Meng, W., Xing, Z.-C., Jung, K.-H., Kim, S.-Y., Yuan, J., Kang, I.-K., Yoon, S. C. and Shin, H. I., *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2008** 19 (8): 2799-2807.
- Mergaert, J. and Swings, J., *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **1996** 17 (5-6): 463-469.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A. and Swings, J., *Applied and Environmental Microbiology* **1993** 59 (10): 3233-3238.
- Mochizuki, M. and Hiram, M., *Polymers for Advanced Technologies* **1997** 8 (4): 203-209.
- Moskowitz, G. J. and Merrick, J. M., *Biochemistry* **1969** 8 (7): 2748-&.
- Muller, H. M. and Seebach, D., *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1993** 32 (4): 477-502.
- Naguib, H. F., Aziz, M. S. A., Sherif, S. M. and Saad, G. R., *Journal of Polymer Research* **2011** 18 (5): 1217-1227.
- Naveen, N., Kumar, R., Balaji, S., Uma, T. S., Natrajan, T. S. and Sehgal, P. K., *Advanced Engineering Materials* **2010** 12 (8): B380-B387.

- Ndreu, A., Nikkola, L., Ylikauppila, H., Ashammakhi, N. and Hasirci, V., *Nanomedicine* **2008** 3 (1): 45-60.
- Nguyen, S., Yu, G. E. and Marchessault, R. H., *Biomacromolecules* **2002** 3 (1): 219-224.
- Noda, I., Satkowski, M. M., Dowrey, A. E. and Marcott, C., *Macromolecular Bioscience* **2004** 4 (3): 269-275.
- Ou, W., Qiu, H., Chen, Z. and Xu, K., *Biomaterials* **2011** 32 (12): 3178-3188.
- Ouyang, S. P., Luo, R. C., Chen, S. S., Liu, Q., Chung, A., Wu, Q. and Chen, G. Q., *Biomacromolecules* **2007** 8 (8): 2504-2511.
- Papaneophytou, C. P., Velali, E. E. and Pantazaki, A. A., *Polymer Degradation and Stability* **2011** 96 (4): 670-678.
- Park, W. H., Lenz, R. W. and Goodwin, S., *Macromolecules* **1998** 31 (5): 1480-1486.
- Poirier, Y., Nawrath, C. and Somerville, C., *Bio-Technology* **1995** 13 (2): 142-150.
- Pouton, C. W. and Akhtar, S., *Advanced Drug Delivery Reviews* **1996** 18 (2): 133-162.
- Preusting, H., Nijenhuis, A. and Witholt, B., *Macromolecules* **1990** 23 (19): 4220-4224.
- Prime, K. L. and Whitesides, G. M., *Science* **1991** 252 (5009): 1164-1167.
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A. M. and Chiellini, E., *Progress in Polymer Science* **2010** 35 (4): 403-440.
- Quinteros, R., Goodwin, S., Lenz, R. W. and Park, W. H., *International Journal of Biological Macromolecules* **1999** 25 (1-3): 135-143.
- Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R. and Roy, I., *Materials Science & Engineering R-Reports* **2011** 72 (3): 29-47.
- Ramsay, B. A., Saracovan, I., Ramsay, J. A. and Marchessault, R. H., *Journal of Polymers and the Environment* **1994** 2 (1): 1-7.
- Ravenelle, F. and Marchessault, R. H., *Biomacromolecules* **2002** 3 (5): 1057-1064.
- Reeve, M., McCarthy, S. and Gross, R. A., *Polymer Preprints* **1990** 31: 437-438.
- Rehm, B. H. A., *Biochemical Journal* **2003** 376: 15-33.
- Renard, E., Poux, A., Timbart, L., Langlois, V. and Guerin, P., *Biomacromolecules* **2005** 6 (2): 891-896.
- Renard, E., Tanguy, P. Y., Samain, E. and Guerin, P., *Macromolecular Symposia* **2003a** 197: 11-18.
- Renard, E., Ternat, C., Langlois, V. and Guerin, P., *Macromolecular Bioscience* **2003b** 3 (5): 248-252.
- Renard, E., Timbart, L., Vergnol, G. and Langlois, V., *Journal of Applied Polymer Science* **2010** 117 (4): 1888-1896.
- Repaske, R. and Repaske, A. C., *Applied and Environmental Microbiology* **1976** 32 (4): 585-591.
- Reusch, R. N., Sparrow, A. W. and Gardiner, J., *Biochimica Et Biophysica Acta* **1992** 1123 (1): 33-40.
- Rhee, Y. H., Kim, Y. H. and Shin, K. S., *Enzyme and Microbial Technology* **2006** 38 (3-4): 529-535.
- Rouxhet, L., Legras, R. and Schneider, Y. J., *Macromolecular Symposia* **1998** 130: 347-366.
- Saad, B., Hirt, T. D., Welti, M., Uhlschmid, G. K., Neuenschwander, P. and Suter, U. W., *Journal of Biomedical Materials Research* **1997** 36 (1): 65-74.

- Saad, G. R., *Macromolecular Bioscience* **2001** 1 (9): 387-396.
- Saad, G. R., Lee, Y. J. and Seliger, H., *Journal of Applied Polymer Science* **2002** 83 (4): 703-718.
- Saad, G. R. and Seliger, H., *Polymer Degradation and Stability* **2004** 83 (1): 101-110.
- Saito, Y. and Doi, Y., *International Journal of Biological Macromolecules* **1994** 16 (2): 99-104.
- Saito, Y., Nakamura, S., Hiramitsu, M. and Doi, Y., *Polymer International* **1996** 39 (3): 169-174.
- Samain, X., Langlois, V., Renard, E. and Lorang, G., *Journal of Applied Polymer Science* **2011** 121 (2): 1183-1192.
- Schirmer, A., Jendrossek, D. and Schlegel, H. G., *Applied and Environmental Microbiology* **1993** 59 (4): 1220-1227.
- Scholz, C., Fuller, R. C. and Lenz, R. W., *Macromolecular Chemistry and Physics* **1994** 195 (4): 1405-1421.
- Seebach, D. and Fritz, M. G., *International Journal of Biological Macromolecules* **1999** 25 (1-3): 217-236.
- Sendil, D., Gursel, I., Wise, D. L. and Hasirci, V., *Journal of Controlled Release* **1999** 59 (2): 207-217.
- Sevastianov, V. I., Perova, N. V., Shishatskaya, E. I., Kalacheva, G. S. and Volova, T. G., *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2003** 14 (10): 1029-1042.
- Shah, M., Naseer, M. I., Choi, M. H., Kim, M. O. and Yoon, S. C., *International Journal of Pharmaceutics* **2010** 400 (1-2): 165-175.
- Sill, T. J. and von Recum, H. A., *Biomaterials* **2008** 29 (13): 1989-2006.
- Silva-Queiroz, S. R., Silva, L. F., Pradella, J. G. C., Pereira, E. M. and Gomez, J. G. C., *Journal of Biotechnology* **2009** 143 (2): 111-118.
- Simon-Colin, C., Alain, K., Colin, S., Cozien, J., Costa, B., Guezenec, J. G. and Raguenes, G. H. C., *Journal of Applied Microbiology* **2008** 104 (2): 581-586.
- Simon-Colin, C., Alain, K., Raguenes, G., Schmitt, S., Kervarec, N., Gouin, C., Crassous, P., Costa, E. and Guezenec, J. G., *Bioresource Technology* **2009** 100 (23): 6033-6039.
- Sin, M. C., Gan, S. N., Annuar, M. S. M. and Tan, I. K. P., *Polymer Degradation and Stability* **2010** 95 (12): 2334-2342.
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D. and Foglia, T. A., *Applied Microbiology and Biotechnology* **2000** 53 (6): 690-694.
- Sombatmankhong, K., Suwanton, O., Waleetorncheepsawat, S. and Supaphol, P., *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **2006** 44 (19): 2923-2933.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. and Rudzinski, W. E., *Journal of Controlled Release* **2001** 70 (1-2): 1-20.
- Sparks, J. and Scholz, C., *Biomacromolecules* **2008** 9 (8): 2091-2096.
- Steinbuchel, A. and Wiese, S., *Applied Microbiology and Biotechnology* **1992** 37 (6): 691-697.
- Stigers, D. J. and Tew, G. N., *Biomacromolecules* **2003** 4 (2): 193-195.
- Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y., *Progress in Polymer Science* **2000** 25 (10): 1503-1555.
- Suwanton, O., Waleetorncheepsawat, S., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Cheepsunthorn, P., Bunaprasert, T. and Supaphol, P., *International Journal of Biological Macromolecules* **2007** 40 (3): 217-223.

- Taniguchi, I., Kagotani, K. and Kimura, Y., *Green Chemistry* **2003** 5 (5): 545-548.
- Taylor, M. S., Daniels, A. U., Andriano, K. P. and Heller, J., *Journal of Applied Biomaterials* **1994** 5 (2): 151-157.
- Terada, M. and Marchessault, R. H., *International Journal of Biological Macromolecules* **1999** 25 (1-3): 207-215.
- Timbart, L., Renard, E., Langlois, V. and Guerin, P., *Macromolecular Bioscience* **2004** 4 (11): 1014-1020.
- Timbart, L., Renard, E., Tessier, M. and Langlois, V., *Biomacromolecules* **2007** 8 (4): 1255-1265.
- Timm, A. and Steinbuchel, A., *Applied and Environmental Microbiology* **1990** 56 (11): 3360-3367.
- Tokiwa, Y. and Calabia, B. P., *Biotechnology Letters* **2004** 26 (15): 1181-1189.
- Vanwachem, P. B., Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Detmers, J. P. and Vanaken, W. G., *Biomaterials* **1985** 6 (6): 403-408.
- Vergnol, G., Sow, H., Renard, E., Haroun, F. and Langlois, V., *Reactive & Functional Polymers* **2012** 72 (4): 260-267.
- Volova, T. G., Boyandin, A. N., Vasil'ev, A. D., Karpov, V. A., Kozhevnikov, I. V., Prudnikova, S. V., Rudnev, V. P., Xuan, B. B., Dung, V. V. T. and Gitel'zon, I., *Microbiology* **2011** 80 (2): 252-260.
- Volova, T. G., Gladyshev, M. I., Trusova, M. Y. and Zhila, N. O., *Polymer Degradation and Stability* **2007** 92 (4): 580-586.
- Wallen, L. L. and Rohwedde, W., *Environmental Science & Technology* **1974** 8 (6): 576-579.
- Wampfler, B., Ramsauer, T., Kehl, K., Zinn, M. and Thony-Meyer, L., *Chimia* **2010a** 64 (11): 784-788.
- Wampfler, B., Ramsauer, T., Rezzonico, S., Hischer, R., Kohling, R., Thony-Meyer, L. and Zinn, M., *Biomacromolecules* **2010b** 11 (10): 2716-2723.
- Ward, A. C., Rowley, B. I. and Dawes, E. A., *Journal of General Microbiology* **1977** 102 (SEP): 61-68.
- Weng, Y.-X., Wang, X.-L. and Wang, Y.-Z., *Polymer Testing* **2011** 30 (4): 372-380.
- Wiggam, M. I., Okane, M. J., Harper, R., Atkinson, A. B., Hadden, D. R., Trimble, E. R. and Bell, P. M., *Diabetes Care* **1997** 20 (9): 1347-1352.
- Williams, S. F., Martin, D. P., Horowitz, D. M. and Peoples, O. P., *International Journal of Biological Macromolecules* **1999** 25 (1-3): 111-121.
- Williamson, D. H. and Wilkinson, J. F., *Journal of General Microbiology* **1958** 19 (1): 198-200.
- Witholt, B., Desmet, M. J., Kingma, J., Vanbeilen, J. B., Kok, M., Lageveen, R. G. and Eggink, G., *Trends in Biotechnology* **1990** 8 (2): 46-52.
- Witholt, B. and Kessler, B., *Current Opinion in Biotechnology* **1999** 10 (3): 279-285.
- Yagmurlu, M. F., Korkusuz, F., Gursel, I., Korkusuz, P., Ors, U. and Hasirci, V., *Journal of Biomedical Materials Research* **1999** 46 (4): 494-503.
- Yajnik, C. S., Sardesai, B. S., Bhat, D. S., Naik, S. S., Raut, K. N., Shelgikar, K. M., Orskov, H., Alberti, K. and Hockaday, T. D. R., *Metabolism-Clinical and Experimental* **1997** 46 (1): 1-4.

Ying, T. H., Ishii, D., Mahara, A., Murakami, S., Yamaoka, T., Sudesh, K., Samian, R., Fujita, M., Maeda, M. and Iwata, T., *Biomaterials* **2008** 29 (10): 1307-1317.

Yoo, H. S., Lee, E. A., Yoon, J. J. and Park, T. G., *Biomaterials* **2005** 26 (14): 1925-1933.

Yoon, J. J., Nam, Y. S., Kim, J. H. and Park, T. G., *Biotechnology and Bioengineering* **2002** 78 (1): 1-10.

Zhao, Q., Cheng, G. X., Song, C. J., Zeng, Y., Tao, H. and Zhang, L. G., *Polymer Degradation and Stability* **2006** 91 (6): 1240-1246.

Zinn, M., Witholt, B. and Egli, T., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001** 53 (1): 5-21.

Chapitre 2:

Biosynthèse de PHAs

Chapitre 2: Biosynthèse de PHAs

1.	Introduction.....	91
2.	Criblage de couples souches/substrats pour la production de PHAs.....	92
	2.1. Production de PHAmcl.....	94
	2.2. Production de PHAscl.....	106
3.	Conclusion	113
4.	Partie expérimentale.....	114
5.	Références bibliographiques.....	118

1. Introduction

La présence d'inclusions lipidiques intracellulaires a été initialement observée chez la bactérie *Azotobacter chroococcum* au début du siècle dernier (Meyer 1903). La composition chimique de semblables inclusions chez la souche *Bacillus megaterium* a été identifiée en tant que poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) par Lemoigne en 1926 (Lemoigne 1926). Aujourd'hui de nombreuses études continuent encore d'explorer les capacités de production de différents types de PHAs par des souches sur de nombreux substrats (Brauneg 1998; Solaiman 2001; Tsuge 2002; Ashby 2004; Ashby 2005). La principale limite actuelle à une exploitation commerciale à grande échelle de ces polymères est surtout liée à leur coût de production. Le perfectionnement, ces dernières années, des procédés de fermentation (Lee 1999; Valappil 2007) et des méthodes d'extraction et de purification (Yasotha 2006; Jacquel 2008; Wampfler 2010) a permis de réduire ce coût et l'on peut penser que les PHAs seront, dans les années à venir, compétitifs et pourront remplacer une partie des plastiques conventionnels dans de nombreuses applications.

La première partie de cette thèse a consisté à étudier les capacités de production de six souches bactériennes issues de milieux marins au Laboratoire de Biotechnologies et Molécules Marines, IFREMER, centre de Brest. Ces souches bactériennes proviennent de nappes de kopara, tapis microbiens stratifiés situés dans les lagunes de Polynésie Française, pour cinq d'entre elles et une provenant d'une source hydrothermale profonde. L'influence de la nature de la source de carbone sur les rendements et sur la nature des polyesters produits sont étudiées en utilisant des substrats d'origine naturelle comme le glucose, l'huile de coprah et l'acide oléique ainsi que des acides gras comme l'acide valérique, l'octanoate de sodium et l'acide 10-undécénoïque. Ce criblage souche/substrat a pour objectif de produire différents types de PHAs, de composition contrôlée, par ces souches marines à partir de divers substrats.

2. Criblage de couples souches/substrats pour la production de PHAs

Des six souches bactériennes retenues pour cette étude (**Tableau 1**), quatre sont capables d'accumuler du PHAmcl et deux produisent du PHAscl. Les souches productrices de PHAmcl sont: RA26 *Pseudomonas guezennei*, RA16 (en cours de description), TIK669 *Pseudomonas guezennei* biovar. *tikehau* et TE9 *Pseudomonas ragenesii*. Elles ont été collectées à partir de tapis microbiens appelés "kopara" situés sur l'atoll de Tikehau en Polynésie française pour la souche TIK669, sur l'atoll de Rangiroa pour les souches RA26 et RA16 et sur l'atoll de Tetiaroa pour la souche TE9. La caractérisation phylogénétique et la description des polymères associés ont été décrites par Simon-Colin et al. (Simon-Colin 2008a ;2008b ;2008c ; 2009). La souche TIK669 s'est révélée être capable d'accumuler jusqu'à 63% de sa masse de matière sèche en PHAmcl saturé à partir d'huile de coprah (Simon-Colin 2008a). La souche RA26 a été cultivée sur du glucose et du glucose additionné d'acides gras saturés pour obtenir des PHAmcl saturés (Simon-Colin 2008b ; 2008c). La production de PHAmcl par la souche TE9 a été évaluée sur des mélanges saturés et insaturés d'acides gras (Simon-Colin 2009). Sur un substrat contenant 92,7% d'acides gras insaturés, cette souche produit un PHAmcl ne contenant que 7% de monomères insaturés. Ces souches ont été cultivées chacune sur des substrats bien différents, il est donc difficile de comparer leurs capacités de production de PHAmcl.

En plus de ces quatre souches produisant des PHAmcl, deux souches produisant des PHAscl ont été étudiées. Il s'agit de la souche RA19 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* subsp. *payriae* isolée d'un tapis microbien sur l'atoll de Rangiroa en Polynésie Française (Raguénès 2004) et de la souche AT1214 *Halomonas profundus* isolée de la carapace d'une crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* provenant du site Rainbow, à 2291 m de profondeur sur la dorsale médio-atlantique (Simon-Colin 2008d). Ces souches ont montré qu'elles étaient capables de produire du PHBHV.

Tableau 1: Souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Nom	Abréviation	Provenance
<i>Pseudomonas guezenei</i>	RA26	Rangiroa
<i>Pseudomonas guezenei</i> biovar. <i>tikehau</i>	TIK669	Tikehau
<i>Pseudomonas ragenesii</i>	TE9	Tetiaroa
non décrite	RA16	Rangiroa
<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> subsp. <i>payriae</i>	RA19	Rangiroa
<i>Halomonas profundus</i>	AT1214	Crevette hydrothermale

Différents substrats carbonés tels que l'huile de coprah, l'acide oléique, le glucose, l'octanoate de sodium, l'acide valérique et l'acide 10-undécénoïque, ont été testés sur ces six souches bactériennes. Le glucose permet d'évaluer la capacité des souches à synthétiser un PHAmcl en utilisant la voie de synthèse *de novo* des acides gras. L'octanoate de sodium, l'acide 10-undécénoïque et l'acide oléique sont des acides gras qui seront convertis en PHAmcl en utilisant la voie de β -oxydation des acides gras. L'huile de coprah est une huile végétale dont l'intérêt principal est d'être composée à plus de 90% d'acides gras saturés (composition: environ 50% d'acide dodécénoïque, 15% d'acide tétradécénoïque, 10% d'acide hexadécénoïque, 8% d'acide octanoïque, 8% d'acide décénoïque, <8% d'acide octadécénoïque). C'est donc le substrat naturel idéal pour la synthèse de PHAmcl saturés. L'acide oléique est un acide gras à longue chaîne (18 carbones) comportant une insaturation en ω 9 qui pourrait servir à synthétiser des PHAmcl comportant des insaturations en milieu de chaîne latérale. L'acide valérique est à l'origine des monomères 3HV dans les PHBHV produits par les souches RA19 et AT1214.

Le but de cette étude est de déterminer les couples souches/substrats permettant de produire des PHAmcl saturés ou insaturés avec des taux d'insaturations contrôlés et des PHAscl, notamment du PHBHV avec des ratios 3HB/3HV variables et contrôlés.

La fermentation bactérienne est réalisée en deux étapes. La première étape est la production de biomasse afin d'obtenir des milieux concentrés en bactéries au bout de 2 jours

de croissance exponentielle. Les milieux sont centrifugés afin de récupérer le culot bactérien puis ce culot sert à ensemer les milieux contenant le substrat carboné et dépourvu de sources d'azote. La phase d'accumulation de PHA commence alors et elle est fixée à 3,5 jours pour toutes les expériences. Au-delà, les PHA-dépolymérase des bactéries vont commencer à dépolymériser le polymère accumulé pour prolonger leur survie.

2.1. Production de PHAmcl

Les souches RA26 , RA16, TIK669 et TE9 ont été cultivées en présence de glucose, octanoate de sodium, acide 10-undécénoïque, huile de coprah, acide oléique (90%) seuls ou en mélange. Les résultats de ces cultures sont rassemblés dans le **Tableau 2** où sont reportés pour chaque culture:

- la Masse de Cellules Sèches (MCS) par litre de culture obtenue après lyophilisation,
- m_{extr} , la proportion en masse de PHAs extraits par rapport à la MCS
- le rendement de la culture exprimé en mg de PHAs par litre de culture.

La souche TIK669 ayant montré dans une précédente étude (Simon-Colin 2008a) une forte production de PHAmcl sur huile de coprah ($m_{\text{ext}}=63\%$) (Simon-Colin 2008a), elle reste plus intéressante que les souches RA26 et RA16 qui présentent un taux de masse de PHA extrait sur la masse de matière sèche (m_{extr}) de 18%. En présence de glucose, une m_{extr} de 25% a été obtenue avec la souche TIK669 mais n'a pu être reproduit malgré 2 réplicats (m_{extr} de 2 et 9%). Les souches TE9, RA16 et RA26, cultivées sur glucose, présentent des m_{extr} faibles variant de 6 à 15% en masse sèche. Ces valeurs sont donc bien en-deçà de celle de la souche TIK669 pour la production de PHAmcl saturé.

Les souches RA26 et TE9 ont été cultivées en présence de mélanges de concentrations variables en octanoate de sodium (entre 2 et 5 g.L⁻¹) et en acide 10-

undécénoïque (entre 1,4 et 3 g.L⁻¹). Les résultats obtenus pour la souche RA26 mettent en évidence une diminution du rendement en PHA au-delà de 3 g.L⁻¹ d'octanoate de sodium (de 27% à 5%) ainsi que pour une concentration en acide 10-undécénoïque supérieure à 2 g.L⁻¹. Pour la production de PHAmcl insaturé par la souche RA26, les concentrations de ces deux substrats doivent donc être inférieures à ces valeurs pour éviter tout effet toxique sur la viabilité des cellules. Dans les mêmes conditions de fermentation, aucun PHA n'a pu être produit par la souche TE9. Cette souche ayant produit des PHAmcl sur des substrats à base d'esters d'acides gras dans une précédente étude (Simon-Colin 2009), les conditions de fermentation utilisées ici ne semblent pas adaptées pour cette souche.

Tableau 2: Résultats du criblage souche/substrat sur les souches productrices de PHAmcl.

Souche	Substrat	MCS (g.L ⁻¹)	m _{extr} (%)	Rendement (mg.L ⁻¹)
RA26	Huile de coprah 10 g.L ⁻¹	2,0	18	360
RA16	Huile de coprah 10 g.L ⁻¹	2,0	18	360
TIK669	Glucose 10 g.L ⁻¹	1,2	2	24
TIK669	Glucose 10 g.L ⁻¹	3,6	25	903
TIK669	Glucose 10 g.L ⁻¹	1,1	6	63
TE9	Glucose 10 g.L ⁻¹	0,7	9	65
RA26	Glucose 10 g.L ⁻¹	1,2	8	96
RA26	Glucose 10 g.L ⁻¹	0,7	11	79
RA26	Glucose 10 g.L ⁻¹	0,6	15	94
RA16	Glucose 10 g.L ⁻¹	1,2	12	146
RA16	Glucose 10 g.L ⁻¹	0,9	6	54
RA26	Na-Oct. 5 g.L ⁻¹	0,5	5	26
RA26	Na-Oct. 3 g.L ⁻¹	1,0	27	278
RA26	Na-Oct. 3 g.L ⁻¹	1,2	17	196
RA26	Na-Oct. 2 g.L ⁻¹	0,8	34	272
RA26	Ac. 10-undécèn. 3 g.L ⁻¹	0,6	0	5
RA26	Na-Oct. 3 g.L ⁻¹ + Ac. 10-undécèn. 3 g.L ⁻¹	0,3	12	34
RA26	Na-Oct. 3 g.L ⁻¹ + Ac. 10-undécèn. 3 g.L ⁻¹	1,2	0	5
RA26	Na-Oct. 2 g.L ⁻¹ + Ac. 10-undécèn. 2 g.L ⁻¹	1,1	36	401
TE9	Na-Oct. 1 g.L ⁻¹	1,3	0	0
TE9	Ac. 10-undécèn. 3 g.L ⁻¹	1,6	0	0
TE9	Ac. 10-undécèn. 1,4 g.L ⁻¹	2,4	0	0
TE9	Na-Oct. 1 g.L ⁻¹ + Ac. 10-undécèn. 1,4 g.L ⁻¹	2,7	0	0
TE9	Ac. olé.(90%) 10 g.L ⁻¹	3,3	28	932
TIK669	Ac. olé. (90%) 10 g.L ⁻¹	1,4	27	370
TIK669	Ac. olé. (90%) 10 g.L ⁻¹	1,6	27	433
RA16	Ac. olé. (90%) 10 g.L ⁻¹	2,2	52	1147
TE9	Ac. olé. (90%) 5 g.L ⁻¹ + Huile de cop. 5 g.L ⁻¹	1,7	18	302
TE9	Ac. olé. (90%) 5 g.L ⁻¹ + Glucose 5 g.L ⁻¹	2,5	27	672
TIK669	Ac. olé. (90%) 5 g.L ⁻¹ + Huile de cop. 5 g.L ⁻¹	3,1	25	765
TIK669	Ac. olé. (90%) 5 g.L ⁻¹ + Huile de cop. 5 g.L ⁻¹	1,5	30	443
TIK669	Ac. olé. (90%) 5 g.L ⁻¹ + Glucose 5 g.L ⁻¹	1,1	35	394
RA16	Ac. olé. (90%) 5 g.L ⁻¹ + Huile de cop 5 g.L ⁻¹	2,0	37	746
RA16	Ac. olé. (90%) 5 g.L ⁻¹ + Glucose 5 g.L ⁻¹	1,2	32	370

MCS est la Masse de Cellules Sèches mesurée après lyophilisation, m_{extr} est la masse de produit après extraction et le rendement correspond à la masse obtenue après extraction par rapport au volume de culture. Na-Oct.: Octanoate de sodium. Ac. 10-undécèn.: Acide 10-undécénoïque. Ac. olé.: Acide oléique. Huile de cop.: Huile de coprah.

Les souches TIK669, TE9 et RA16 ont également été cultivées en présence d'acide oléique et de mélanges acide oléique/glucose et acide oléique/huile de coprah dans le but d'orienter la synthèse vers la production d'un PHAmcl biosourcé comportant des insaturations. Après extraction par le chloroforme le produit obtenu se présente sous la forme d'un résidu visqueux à température ambiante composé de PHA à longue chaîne en mélange avec l'acide oléique. La purification par précipitation dans le méthanol ne permet pas de purifier suffisamment ce mélange huileux pour pouvoir déterminer les proportions des composants. Les valeurs de m_{extr} et de rendements pour ces cultures sont donc surestimées par rapport aux quantités réelles de PHA produites sur ces substrats.

La production de PHAmcl comportant des monomères insaturés a été réalisée avec la souche RA26 cultivée sur des mélanges octanoate de sodium/acide 10-undécénoïque, les concentrations limites ayant été déterminées précédemment. Les rendements de production obtenus sont indiqués dans le **Tableau 3**. Ces productions ont été réalisées en fermenteurs de 20 litres contenant 14 litres de milieu. Les pourcentages d'extraits bruts (m_{extr}) sont très similaires (entre 35 et 38%) et ne dépendent pas des proportions du mélange de substrats. Ces valeurs sont proches de celles obtenues avec *Pseudomonas putida* GPo1 (entre 30 et 40%) (Hartmann 2006) ou de celles de *P. putida* KT2440 (entre 38 et 45%) (Follonier 2012).

Tableau 3: Résultats de la production de PHAmcl sur RA26.

Substrat Na-Oct./Ac. 10-undécèn. (g.L ⁻¹)	MCS (g.L ⁻¹)	m_{extr} (%)	Rendement (mg.L ⁻¹)
3/1,0	0,8	37	215
3/0,5	1,0	35	312
3/0,2	1,0	38	333

MCS est la Masse de Cellules Sèches mesurée après lyophilisation, m_{extr} est la masse de produit après extraction et le rendement a été calculé à partir de la masse de PHA obtenue après trois purifications.

Les spectres RMN ^1H permettent de déterminer le pourcentage d'insaturations. Sur le spectre RMN ^1H d'un PHAmcl saturé (**Figure 1**), sont observés les signaux du proton du carbone **3** (CH) à 5,18 ppm, des protons du groupe méthyle terminal sous la forme d'un triplet à 0,88 ppm et les protons situés sur le carbone **2** sous la forme d'un multiplet à 2,47-2,60 ppm. Le signal des protons situés sur le carbone **4** se trouve à 1,57 ppm alors que le signal des autres protons de la chaîne latérale saturée se trouve à 1,27 ppm. Sur les spectres des PHAmcl insaturés (**Figure 2**), le multiplet à 5,00 ppm est attribué aux protons **a** de la double liaison terminale ($\text{H}_2\text{C}=\text{}$) et le multiplet à 5,77 ppm au proton **b** de la double liaison ($=\text{CH}$). Le multiplet à 2,03 ppm est attribué aux protons **c** en alpha de la double liaison. La proportion entre les monomères saturés et insaturés peut ainsi être calculée en faisant le rapport entre l'intégration du pic à 5,77 ppm ($I_{5,77 \text{ ppm}}$) et celle du pic à 5,18 ppm ($I_{5,18 \text{ ppm}}$) (**Equation 1**).

$$\%(\text{C} = \text{C}) = \frac{I_{5,77\text{ppm}}}{I_{5,18\text{ppm}}} * 100$$

Equation 1: Calcul du pourcentage de double liaison dans un PHAmcl.

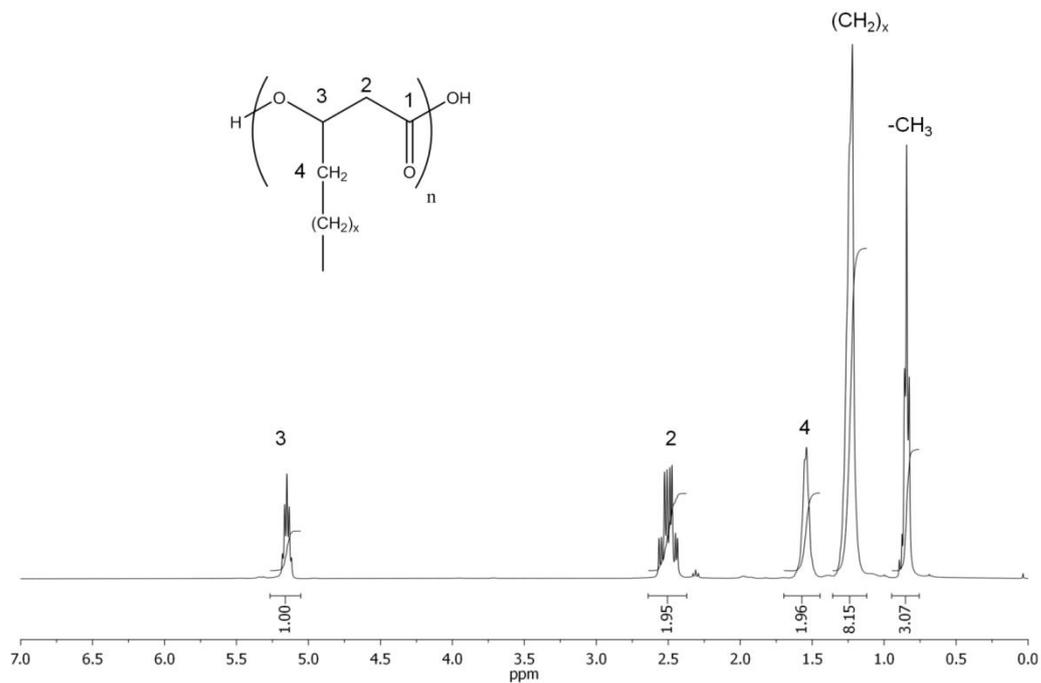


Figure 1: Spectre RMN ^1H du PHAmcl saturé produit par la souche TIK669 sur huile de coprah.

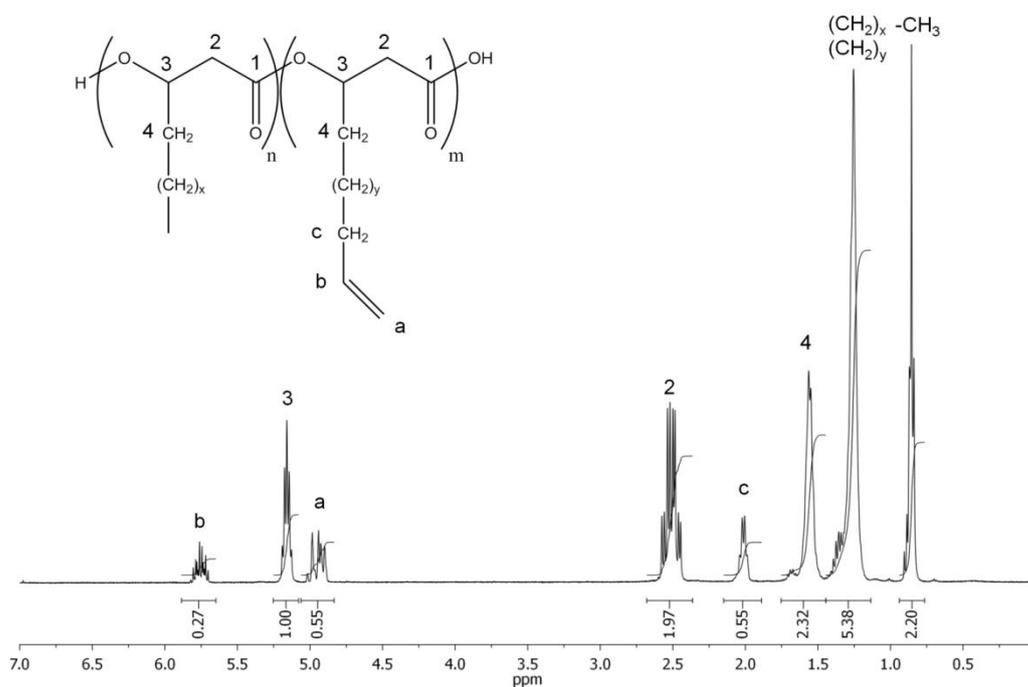


Figure 2: Spectre RMN ^1H du PHAmcl (27% d'insaturations) produit par la souche RA26 sur de l'octanoate de sodium (3 g.L^{-1}) et de l'acide 10-undécénoïque (1 g.L^{-1}).

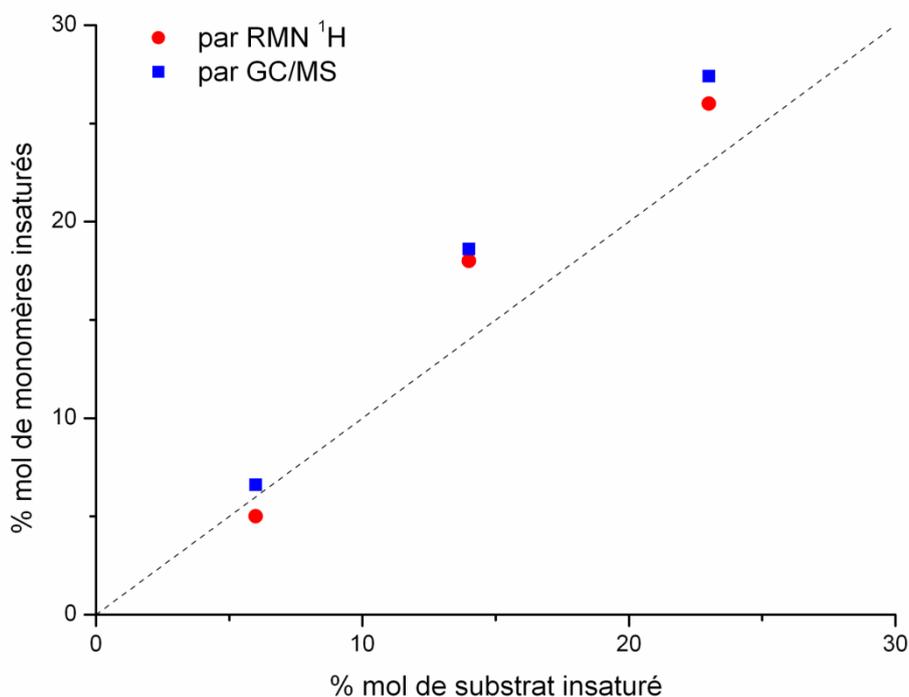


Figure 3: Taux d'insaturation des PHAmcl produit par la souche RA26 en fonction du pourcentage molaire d'acide 10-undécénoïque dans le substrat.

Les analyses par CG/SM (**Tableau 4**) permettent de déterminer la composition des PHAmcl. Les spectres de masse des esters méthyliques triméthylsilylés présentent des fragments caractéristiques $[(CH_3)_3SiO^+=CHCH_2CO_2CH_3]$ à $m/z = 175$ et $[RCH=O^+Si(CH_3)_3]$ à $m/z = [M-73]$ résultant du clivage en alpha du groupement hydroxyl triméthylsilylé (**Figure 4**). Les fragments à m/z $[M-15]$, $[M-31]$ et $[M-73]$ renseignent sur la longueur du squelette carboné de chaque monomère constitutif, l'ion moléculaire $[M]$ n'étant pas visible. La présence d'insaturation(s) est déduite de la valeur du fragment à $[M-15]$ qui est de 2 unités inférieures à celle attendue pour le monomère saturé. D'autres fragments communs aux acides 3-hydroxyalcanoïques sont également détectés : m/z 73 $[(CH_3)_3Si^+]$, m/z 89 $[(CH_3)_3SiO^+]$, m/z 131 $[(C_5H_{11}SiO_2)^+]$, m/z 159 $[(C_6H_{11}SiO_3)^+]$ et m/z 133 $[(C_5H_{13}SiO_2)^+]$ (**Figure 5**).

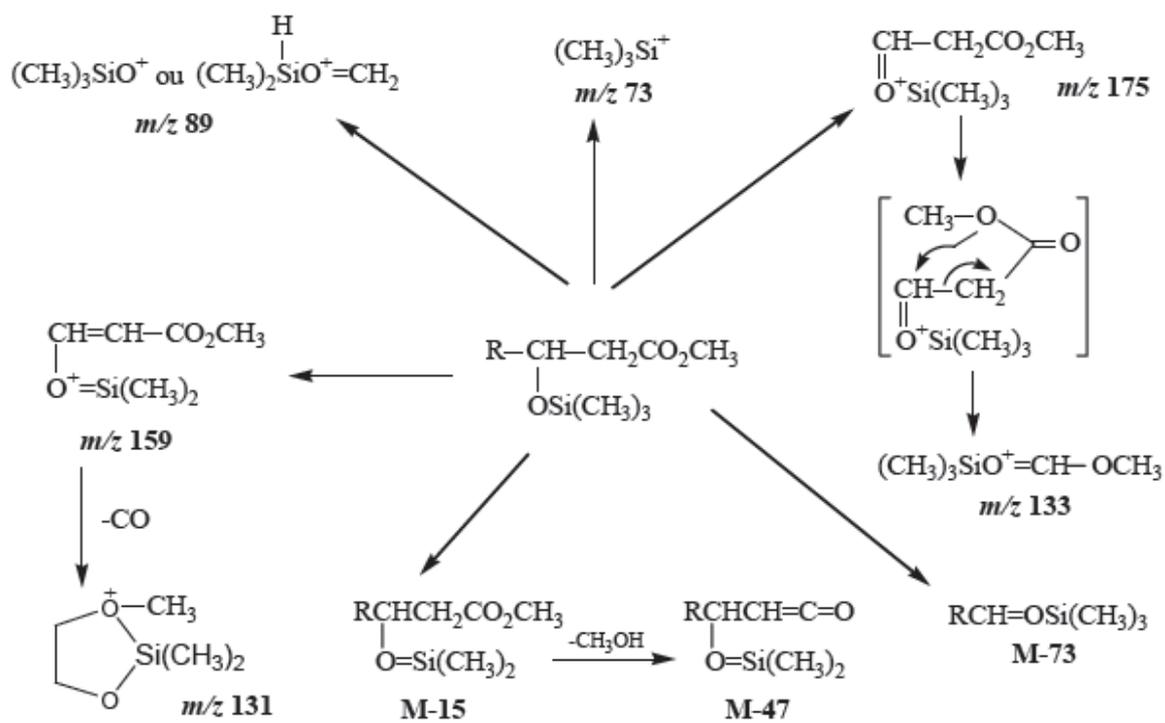


Figure 4: Fragments principaux des 3-hydroxyalcanoates de méthyle triméthylsilylés (Lee 1995).

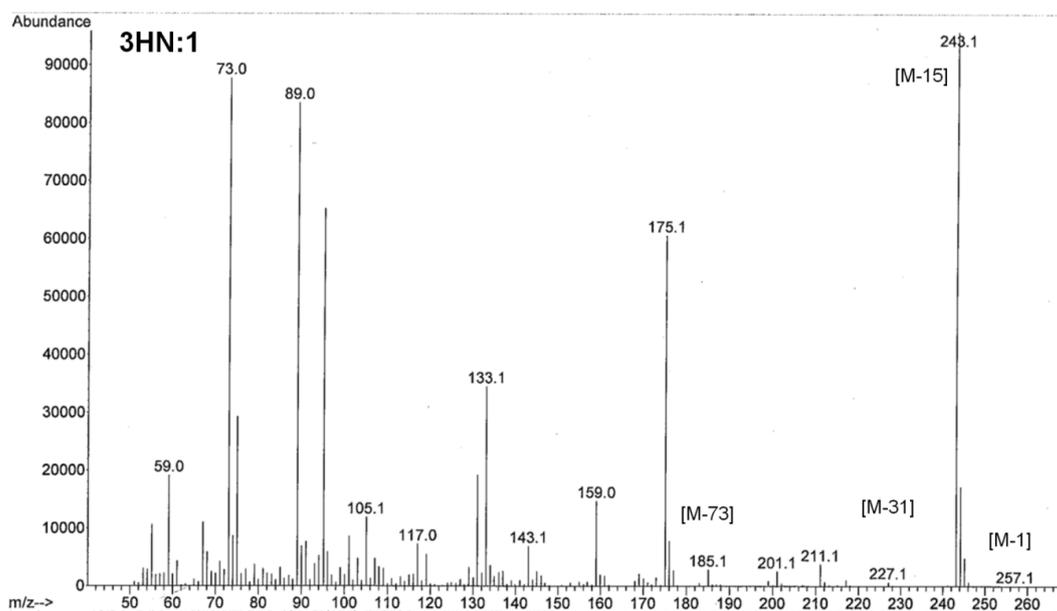
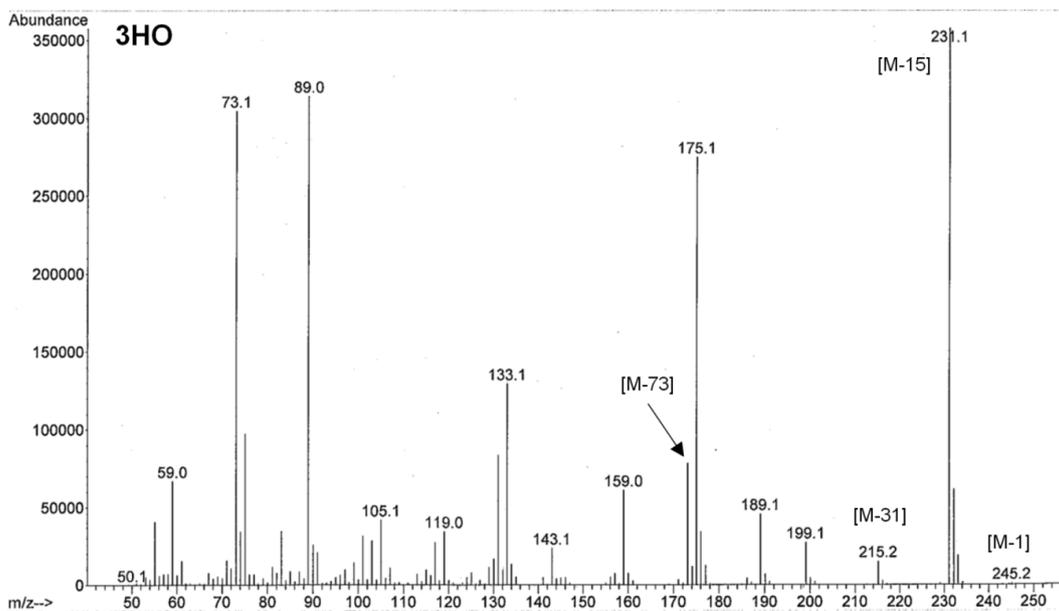


Figure 5: Spectres de masse des esters méthyliques triméthylsilylés des monomères 3-hydroxyoctanoate (3HO) et 3-hydroxy-8-nonénoate (3HN:1) du PHA produit par la souche RA26 sur un mélange d'octanoate de sodium (3 g.L^{-1}) et d'acide 10-undécénoïque (1 g.L^{-1}).

Les copolymères obtenus à partir de la souche RA26 cultivée sur de l'octanoate de sodium et de l'acide 10-undécénoïque contiennent 6 monomères: l'acide 3-hydroxyhexanoïque (3HHx), l'acide 3-hydroxy-6-hepténoïque (3HHp:1), l'acide 3-hydroxyoctanoïque (3HO), l'acide 3-hydroxy-8-nonénoïque (3HN:1), l'acide 3-hydroxydécénoïque (3HD) et l'acide 3-hydroxy-10-undécénoïque (3HUD:1) dont les

proportions, déterminées par CG/SM, sont rassemblées dans le **tableau 4**. Il apparaît que le monomère saturé majoritaire est le 3HO. Le monomère insaturé majoritaire est le 3HN:1. Le taux d'insaturation mesuré par CG/SM est cohérent avec celui déterminé par RMN (**Figure 3**). Les cultures réalisées en présence de 23%, 14% et 6% d'insaturations (soit 1 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹ et 0,2 g.L⁻¹ d'acide 10-undécénoïque respectivement) permettent de récupérer des PHAs avec des taux d'insaturations de 27,4%, 18,6% et 5,5%. La composition du substrat permet donc de contrôler la composition du polymère.

Tableau 4: Composition (mol%) déterminées par CG/SM des PHAmcl insaturés produits par la souche RA26 sur des mélanges d'octanoate de sodium et d'acide 10-undécénoïque.

Na- Oct./Ac. 10-undécén. (g.L ⁻¹)	10-undécén. (mol% C=C)	3HHx	3HHp:1	3HO	3HN:1	3HD	3HUD:1	%C=C
3/1,0	23	1,1	1,1	69,1	19	2,7	7,3	27,4
3/0,5	14	2,3	1,5	76,8	12,8	2,3	4,3	18,6
3/0,2	6	2,7	0,5	88,3	3,9	3,4	1,1	5,5

La localisation de l'insaturation sur la chaîne latérale a été réalisée à partir des monomères dérivés au disulfure de diméthyle (DMDS). Une rupture simple de la double liaison entraîne la formation de deux fragments A et B à $m/z = [M_A]$ et $[M_B]$ (**Figure 6**). Le fragment attribué à A est celui pour lequel se retrouvent les fragments $[M_A-32]$ (perte de MeOH), $[M_A-48]$ (perte de HSCH₃), $[M_A-48-32]$ (perte de HSCH₃ puis de MeOH) et $[M_A-48-60]$ (perte de HSCH₃ puis de HCO₂Me). La souche RA26 cultivée sur un mélange d'octanoate de sodium et d'acide undécénoïque produit un PHAmcl dont les monomères saturés portent une double liaison en position terminale, indépendamment de la longueur de la chaîne carbonée. Toutefois il est à noter que la réaction de dérivation utilisée (DMDS suivie de la méthanolyse) induit une élimination de la fonction β-hydroxyle.

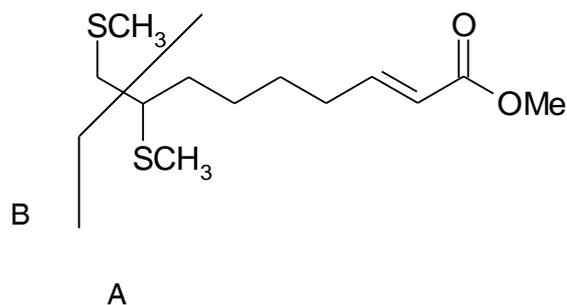


Figure 6: Monomère 3-hydroxy-8-nonénoïque après dérivation au DMDS et méthanolyse.

La méthode de dérivation au DMDS valide donc la position terminale de la double liaison précédemment déterminée par RMN. Toutefois cette méthode donne encore de nombreux produits secondaires en chromatographie gazeuse; le produit permettant de déterminer la position de la double liaison est lui-même un produit secondaire obtenu par élimination de l'alcool.

Les masses molaires en poids (M_w) et les indices de polymolécularité ($I_p = M_w/M_n$) des PHAmcl insaturés produits par la souche RA26, ont été déterminés par CPG/DDL, (**Tableau 5**). Les masses molaires et la polymolécularité varient peu en fonction de la proportion d'acide 10-undécénoïque, la masse molaire varie de 499 à $530 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ et l'indice de polymolécularité reste inférieur à 2. Ces masses molaires sont remarquablement élevées car la plupart des M_w de PHAmcl saturés ou insaturés recensées sont comprises entre 170 et $339 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Rai 2011).

Tableau 5: Masse molaire et indice de polymolécularité déterminés par CPG/DDL des PHAmcl insaturés produits par la souche RA26.

Souche	Substrat Na-Oct./Ac. 10-undécèn. (g.L ⁻¹)	Mw (g.mol ⁻¹)	Ip
RA26	3/1,0	530000	1,6
RA26	3/0,5	511000	1,7
RA26	3/0,2	499000	1,9

Na. Oct.: Octanoate de sodium. Ac. 10-undécèn.: Acide 10-undécénoïque.

La composition des polymères obtenus illustre les voies de biosynthèse des PHAmcl chez les souches étudiées en relation avec la nature du(des) substrat(s) carboné(s). Ces deux voies sont:

- La β -oxydation des acides gras, principalement utilisée lorsque le substrat carboné est de nature lipidique.
- La biosynthèse *de novo*, la voie de synthèse privilégiée lorsque des composés simples (glucose par exemple) sont utilisés comme source carbonée.

Quel que soit le substrat carboné, les PHAmcl produits par la souche RA26 sont majoritairement composés des monomères 3HO (et 3HD) même en utilisant le glucose comme substrat. De plus, avec l'acide 10-undécénoïque comme substrat, le monomère insaturé majoritaire est le HN:1. Ce résultat est en accord avec d'autres travaux sur les *Pseudomonas* mettant en évidence une activité plus forte des PHA polymérase sur les intermédiaires en C8 et en C10 (Huisman 1989 ; Huijberts 1992 ; Thakor 2005).

Les résultats obtenus dans cette étude ont permis de sélectionner deux couples bactérie/substrat intéressants en termes de rendement de production et de composition du PHAmcl. La souche TIK669 cultivée sur l'huile de coprah qui produit un PHAmcl saturé

composé de 53 mol% de 3HO, 32 mol% de 3HD et 15 mol% de 3HDD et la souche RA26 qui, en présence d'un mélange acide octanoïque/acide 10-undécénoïque, produit un PHAmcl insaturé présentant un taux d'insaturation contrôlé et compatible avec les réactions de fonctionnalisation envisagées par la suite. En jouant sur la composition du milieu de culture, et notamment sur la concentration en acide undécénoïque, des copolymères PHOU composés d'unités monomériques 3HHx, 3HHp:1, 3HO, 3HN:1, 3HD et 3HUD:1 présentant des taux d'insaturation de 5,5%, 18,6%, et 27,4% ont pu être produits.

2.2. Production de PHAscl

Les souches RA19 et AT1214 cultivées sur des mélanges glucose/acide valérique produisent des poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBHV). Ces productions ont été réalisées en fermenteurs de 5L et les résultats sont présentés dans le **Tableau 6**. Le PHBHV accumulé par la souche AT1214 représente en moyenne 24,4% de la masse de cellules sèches tandis que la souche RA19 accumule en moyenne 33,2% de PHBHV. La souche RA19 a donc un rendement de production de PHA supérieur à la souche AT1214.

Tableau 6: Résultats de la production de PHBHV avec les souches RA19 et AT1214.

Souche	Glucose/Ac. Valérique (g.L ⁻¹)	MCS (g.L ⁻¹)	m _{extr} (%)	Rendement (mg.L ⁻¹)
RA19	5/5	1,4	nd	517
RA19	5/5	1,8	38	454
RA19	10/5	1,7	33	317
RA19	10/5	1,8	27	311
RA19	5/10	1,5	34	403
RA19	5/10	1,0	34	306
AT1214	10/2	0,4	24	71
AT1214	10/3	1,3	34	317
AT1214	10/5	1,3	22	183
AT1214	10/10	1,2	24	120
AT1214	10/10	0,8	18	64

MCS est la Masse de Cellules Sèches mesurée après lyophilisation, m_{extr} est la masse d'extrait brut et le rendement a été calculé à partir de la masse de PHA obtenue après trois purifications.

Les PHBHV sont analysés par RMN ¹H après trois purifications. Le spectre (**Figure 7**) montre le signal du proton du carbone **3** (CH) à 5,15 ppm pour le monomère 3HV et 5,25 ppm pour le monomère 3HB. Le triplet (³J_{HH} = 8 Hz) à 0,89 ppm correspond au groupe méthyle terminal **5** du 3HV tandis que le doublet (³J_{HH} = 8 Hz) à 1,27 ppm correspond au groupe méthyle **4** du 3HB. Le multiplet à 1,62 ppm est attribué aux protons du 3HV situés sur l'atome de carbone **4** et le multiplet à 2,54 ppm aux protons situés sur l'atome de carbone **2** des monomères 3HB et 3HV. La composition des PHBHV est déterminée à partir des intégrations des protons à 5,15-5,25 ppm et de l'intégration du groupe méthyle terminal à 0,82 ppm selon l'équation 2.

$$\%3HV = \frac{I_{0,82\text{ppm}}/3}{I_{5,15-5,25\text{ppm}}} * 100$$

Equation 2: Calcul de la proportion des monomères 3HV et 3HB à partir des intégrations des signaux de RMN H.

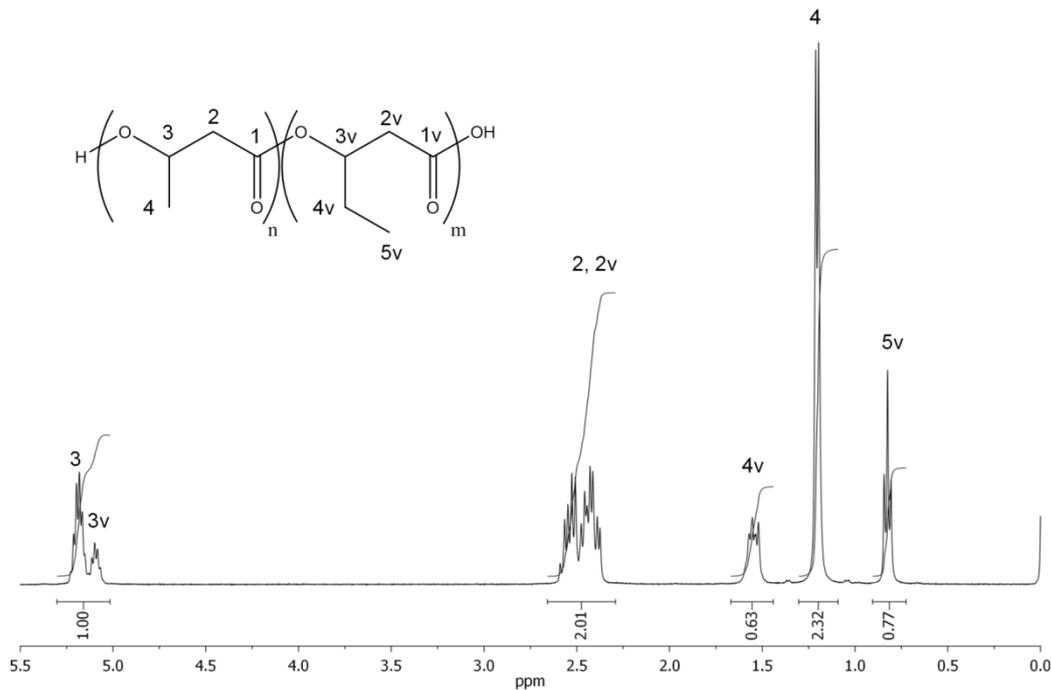


Figure 7: Spectre RMN H d'un PHBHV produit par la souche AT1214 sur un mélange glucose/acide valérique (10/10 g.L⁻¹).

Les compositions des copolymères de PHBHV produits par les souches RA19 et AT1214 sont présentées dans le **Tableau 7**. Les copolymères de PHBHV obtenus à partir des souches RA19 et AT1214 présentent une large gamme de composition, comportant de 10 à 81% d'unités 3-hydroxyvalérate. La **Figure 8** montre la relation entre le ratio acide valérique/glucose présent dans le milieu de culture et la proportion en unités 3-hydroxyvalérate (3HV) au sein des polymères produits. Il apparaît que la souche RA19 est capable de métaboliser aussi bien le glucose que l'acide valérique car la composition du polymère est très proche de la composition du substrat. En revanche, la souche AT1214

semble métaboliser préférentiellement le glucose, la proportion en 3HV du polymère restant inférieure à celle ajoutée dans le milieu de culture.

Tableau 7: Composition des PHBHV déterminée par RMN ¹H.

Souche	Glucose/Ac. Valérique (g.L⁻¹)	Composition (%3HV)
RA19	5,0/5,0	70
RA19	5,0/5,0	60
RA19	10/5,0	45
RA19	10/5,0	43
RA19	5,0/10	81
RA19	5,0/10	56
AT1214	10/2,0	10
AT1214	10/3,0	33
AT1214	10/5,0	35
AT1214	10/10	26
AT1214	10/10	45

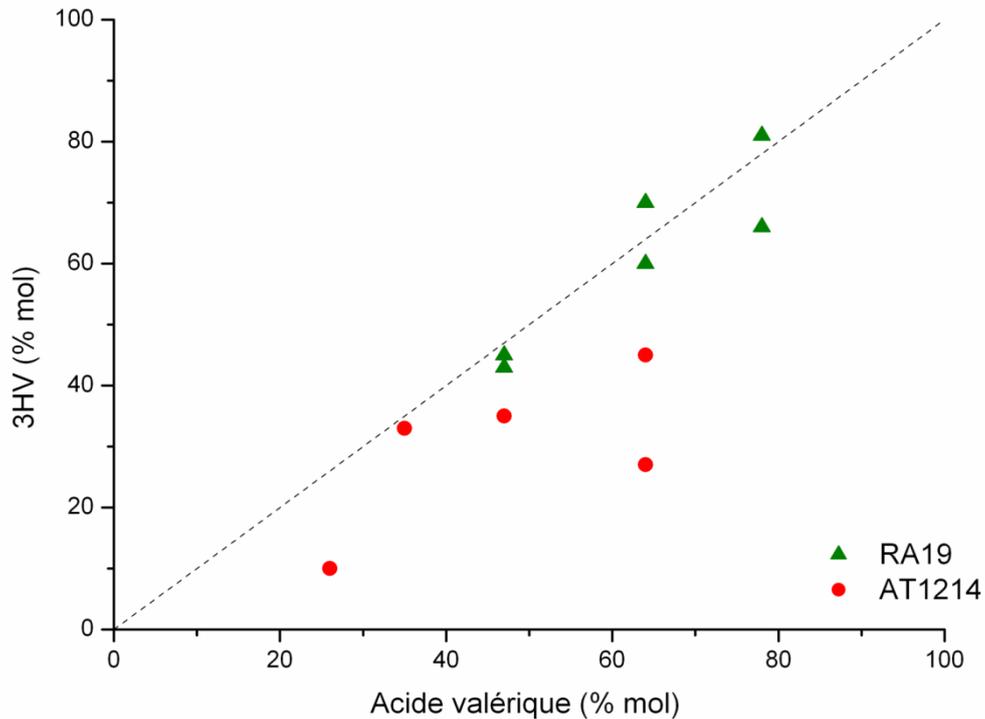


Figure 8: Variation du pourcentage en monomère 3-hydroxyvalérate (3HV) en fonction du pourcentage molaire en acide valérique du substrat.

Les résultats des analyses AED des PHBHV obtenus sont reportés dans le **Tableau 8**. Les températures de transition vitreuse (T_v) sont comprises entre $-9,9$ et $-1,6^\circ\text{C}$ ce qui est conforme aux valeurs décrites dans la littérature (Bluhm 1986). On observe sur la **figure 9** que la température de fusion (T_F) diminue lorsque la proportion en monomères 3-hydroxyvalérate (3HV) augmente en passant par un minimum de 69°C pour 45% de 3HV avant de remonter pour des proportions en 3HV supérieures à 45%, atteignant la T_F de 96°C pour un taux de 3HV de 81%.

Tableau 8: Températures de transition vitreuse (T_v), de fusion (T_F) et enthalpies de fusion ΔH_F des PHBV déterminées par AED.

Souche	Glucose/Ac. Valérique (g.L⁻¹)	%3HV	T_v (°C)	T_F (°C)	ΔH_F (J.g⁻¹)
RA19	5/5	70	-9,9	86	16
RA19	5/5	60	-8,3	75	51
RA19	10/5	45	-1,8	69	41
RA19	10/5	63	-7,1	70	43
RA19	5/10	81	-7,5	96	48
RA19	5/10	66	-5,7	78	47
AT1214	10/2	10	-1,6	131	57
AT1214	10/3	33	-7,7	80	39
AT1214	10/5	35	-4,7	81	39
AT1214	10/10	27	-6,1	106	29
AT1214	10/10	45	-7,5	73	43

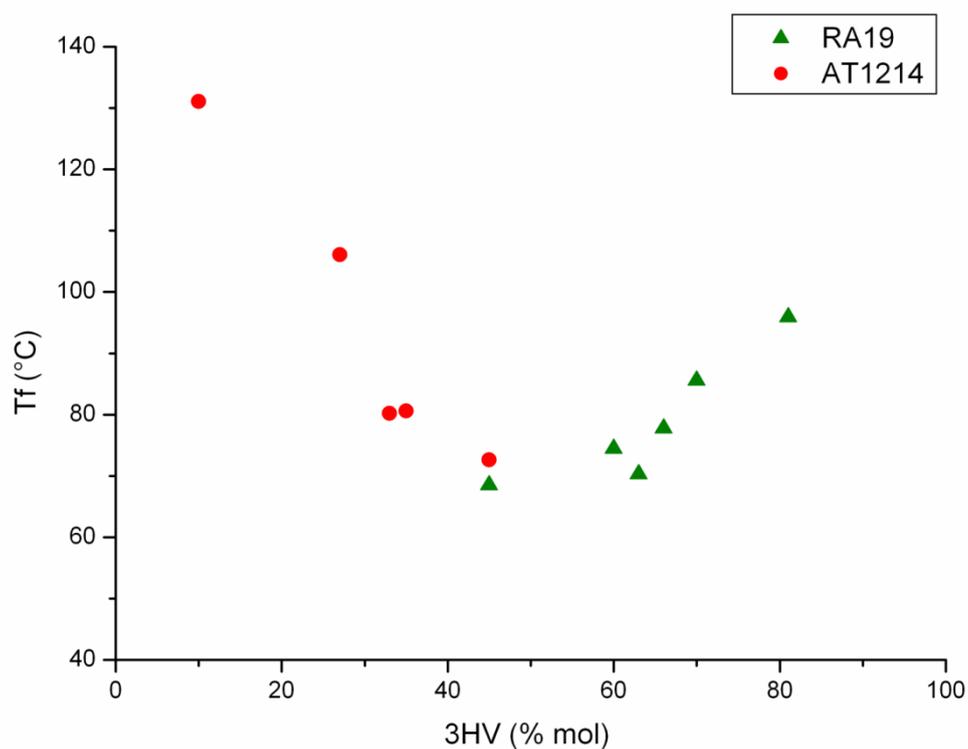


Figure 9: Variation de la température de fusion (T_F) en fonction de la teneur en 3HV du PHBHV.

L'évolution de la température de fusion en fonction du ratio 3HV/3HB s'explique par l'inclusion progressive des monomères de 3-hydroxyvalérate dans la phase cristalline de PHB jusqu'à une composition de 45% en 3-hydroxyvalérate puis par l'inclusion des monomères 3-hydroxybutyrate dans la phase cristalline de PHV (Bluhm 1986). La température de fusion peut donc ainsi être prédéterminée entre 180 et 70°C, en ajustant simplement la proportion entre unités 3HV et 3HB au sein du polyester et ceci en contrôlant les concentrations respectives des deux sources de carbone, acide valérique et glucose, dans le milieu de culture.

3. Conclusion

Parmi les quatre souches productrices de PHAmcl étudiées, nous avons démontré la capacité de la souche *Pseudomonas guezenei* (RA26) à synthétiser des PHAmcl insaturés dont les monomères principaux sont le 3-hydroxyoctanoate (3HO), le 3-hydroxynonanoate (3HN:1), le 3-hydroxydécanoate (3HD) et le 3-hydroxyundécanoate (3HUD:1). Le rapport entre les monomères insaturés et saturés peut être ajusté précisément (de 5,5% à 27,4% d'insaturations) en ajustant la composition du substrat c'est-à-dire le rapport molaire entre octanoate de sodium et acide 10-undécénoïque du substrat. De plus les polymères produits par cette souche possèdent des masses molaires élevées (M_n de 500000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ environ), bien plus que les PHAmcl insaturés décrits dans la littérature. Nous avons aussi vu que la souche TIK669 cultivée sur huile de coprah restait la plus efficace pour la production de PHAmcl avec une proportion en PHA de 63% de la masse de cellules sèches. Les monomères principaux de ce PHA sont le 3HO et le 3HD.

La souche *Paracoccus zeaxanthinifaciens* subsp. *payriae* (RA19) s'est révélée plus intéressante que la souche *Halomonas profundus* (AT1214) dans la synthèse de PHBHV car elle permet, outre un rendement plus élevé, un meilleur contrôle de la composition monomérique en 3HB et 3HV. La composition du substrat en glucose et acide valérique se retrouve également dans le rapport molaire des deux monomères.

4. Partie expérimentale

Souches bactériennes

Les souches bactériennes retenues pour l'étude sont la souche RA26 *Pseudomonas guezennei* (numéro d'accèsion EMBL AJ876736, déposée sous le numéro de souche I-3358 à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) de l'Institut Pasteur, Paris, France), la souche TIK669 *Pseudomonas guezennei* biovar. *tikehau* (numéro d'accèsion EMBL AM922198, numéro de souche I-3766 à la CNCM), la souche TE9 *Pseudomonas ragenesii* (numéro d'accèsion EMBL AM989924, numéro de souche I-4063 à la CNCM) et la souche RA16 (en cours de description). Ces souches ont été collectées à partir de tapis microbiens appelés "kopara" situés sur l'atoll de Tikehau en Polynésie française pour la souche TIK669, sur l'atoll de Rangiroa pour les souches RA26 et RA16 et sur l'atoll de Tetiaroa pour la souche TE9. La caractérisation phylogénétique et la description des polymères associés ont été décrits par Simon-Colin et al. (Simon-Colin 2008a; Simon-Colin 2008b; Simon-Colin 2009). En plus de ces quatre souches produisant des PHAmcl, deux souches produisant des PHAscl ont été étudiées. Il s'agit de la souche RA19 *Paracoccus zeaxanthinifaciens* subsp. *payriae* (numéro d'accèsion EMBL AJ507806, numéro de souche I-2926 à la CNCM) isolée d'un tapis microbien sur l'atoll de Rangiroa en Polynésie Française (Raguénès 2004) et de la souche AT1214 *Halomonas profundus* (numéro d'accèsion EMBL AM989924, numéro de souche I-3351 à la CNCM) isolée d'une crevette provenant d'une source hydrothermale profonde (Simon-Colin 2008d).

Production de PHA

La production de PHA en erlenmeyers de 2L est réalisée en 2 étapes. Deux erlenmeyers contenant 2L de milieu Zobell (par litre d'eau distillée : 5g de peptone, 1g d'extrait de levure, 15g de Sea Salts et pH ajusté à 7,6 avec une solution de NaOH 2N) sont inoculés à 10% (v/v) avec une suspension de cellules en phase exponentielle. Les erlenmeyers sont agités à la température de croissance optimale de la souche pendant 6h (30

ou 34°C selon les bactéries). Après centrifugation (8000g pendant 20min) les culots bactériens sont transférés dans un erlenmeyer contenant 2L de milieu de culture (par litre d'eau distillée : 15g de Sea Salt) contenant le substrat carboné. Les bactéries sont laissées en culture pendant 3,5 jours sous agitation à température constante. Les cellules sont récupérées par centrifugation (8000g pendant 20min), lavées deux fois avec de l'eau de mer diluée de moitié, suivi d'un lavage à l'aide d'un mélange eau de mer diluée/hexane (9/1, v/v) dans le cas où le substrat carboné est de nature lipidique et ceci afin d'éliminer l'excès pouvant adhérer aux cellules. Le culot bactérien est finalement lyophilisé avant analyse.

La production de PHA en fermenteurs de 5L est réalisée en 2 étapes, la première étant identique à celle de la production en erlenmeyers. Les culots bactériens obtenus à partir de 2 erlenmeyers de 2L sont transférés dans un fermenteur de 5L (Infors, Massy, France) contenant 3,5L de milieu de culture (par litre d'eau distillée: 15g de Sea Salt additionné d'un excès de substrat carboné). Le pH est maintenu automatiquement à 7,6 par addition d'une solution de NaOH 2N ou d'une solution de H₂SO₄ 2N. Pour certaines souches quelques gouttes d'antimousse (Pluronic PE 6100) sont ajoutées pour éviter la formation d'une émulsion. Après 3,5 jours, les cellules sont récupérées par centrifugation (8000g pendant 20min), lavées deux fois avec de l'eau de mer diluée, suivi d'un lavage avec un mélange eau de mer diluée/hexane (9/1, v/v) en cas d'utilisation d'un substrat de nature lipidique, puis le culot bactérien est lyophilisé avant analyse.

Le protocole pour la production dans un fermenteur de 20L est identique à celui utilisé pour les fermenteurs de 5L avec 7 erlenmeyers de 2L et 14L de milieu de culture dans le fermenteur.

Extraction et purification des PHAs

Les cellules lyophilisées sont réduites en poudre dans un mortier et extraites avec du chloroforme (15 mL pour 1 g de Masse de Cellules Sèches MCS) pendant 4h à 50°C. Un volume d'eau est ajouté, le mélange est agité puis centrifugé pour séparer les deux phases des débris cellulaires. La phase organique est alors récupérée, évaporée et le solide obtenu

est conservé pour les analyses. La purification du PHA est réalisée par trois précipitations successives d'une solution concentrée de PHA dans du chloroforme dans 10 volumes de méthanol froid.

Caractérisations

Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ¹H)

Les analyses RMN ¹H sont réalisées à 25°C sur des échantillons de PHA dissous dans du chloroforme deutéré sur un spectromètre Bruker 400 DRX opérant à 400MHz. Les déplacements chimiques sont reportés en ppm relativement au signal du 3,3,3,4-tétraméthyl silane.

Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Pour déterminer leur composition monomérique, 7mg de PHA dissous dans 1,5mL de chloroforme sont méthanolysés en présence de 1,5mL d'une solution de MeOH/HCl (17/2, v/v) à 100°C pendant 4h. La phase organique est ensuite lavée par 1mL d'eau puis séchée sur MgSO₄. La silylation des esters méthyliques est réalisée en ajoutant 100 µL de BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) et 100 µL de pyridine à l'échantillon méthylé. La solution est chauffée à 70°C pendant 1h puis évaporée à sec. L'échantillon est alors dissous dans 600µL de dichlorométhane et injecté en CG/SM.

Pour localiser la position des insaturations sur les chaînes latérales, 7mg de PHA sont dissous dans 500µL d'hexane auxquels sont ajoutés 100µL de disulfure de diméthyle (DMDS) et 20µL d'une solution d'I₂ (60g/L dans Et₂O). Le mélange est agité puis laissé à 50°C pendant 48h. 200µL d'hexane et 200µL d'une solution de Na₂SO₃ (5% dans l'eau) sont ajoutés. La phase organique est récupérée et la phase aqueuse est extraite par 200µL d'hexane. Les phases organiques sont rassemblées et évaporées. Le produit obtenu est alors dissous dans 1,5mL de chloroforme puis méthanolysé en présence de 1,5mL d'une solution de MeOH/HCl

17/2 (v/v) à 100°C pendant 4h suivie d'une séparation de phases réalisée par ajout d'1mL d'eau. La phase organique est prélevée, séchée sur MgSO₄ avant d'être évaporée à une goutte sous flux d'azote. L'échantillon est alors dissous dans 600µL de dichlorométhane et injecté en CG/SM.

L'analyse des monomères dérivés se fait par CG/SM sur un chromatographe Agilent Technologies 6990N couplé à un spectromètre quadripolaire Agilent 5975 inert XL, équipé d'une colonne capillaire de silice HP5-MS (30m x 0,25mm, 0,25µm d'épaisseur de film). Un volume de 1µL est injecté (split ratio 100 :1) à 250°C avec de l'hélium comme gaz vecteur et le programme de température suivant : 60°C pendant 1 min, puis rampe de 4°C.min⁻¹ jusqu'à 140°C, puis 15°C.min⁻¹ jusqu'à 280°C et 5min à 280°C. Le potentiel d'ionisation pour l'impact électronique est de 70eV.

Analyse Enthalpique Différentielle (AED)

La calorimétrie différentielle à balayage est réalisée sur un TA Instrument DSC Q200. Les échantillons de l'ordre de 5 à 10 mg sont encapsulés entre un pan et un lid en aluminium et chauffés de -70°C à 200°C à 10°C.min⁻¹ sous un flux d'azote. La température de fusion T_F et l'enthalpie de fusion sont prises de l'endotherme de fusion et la température de transition vitreuse T_v est prise au point d'inflexion du changement de capacité calorifique.

Chromatographie à Perméation de Gel couplée à un détecteur à diffusion de lumière laser multi-angle (CPG/DDL)

Les masses molaires sont déterminées par chromatographie à perméation de gel sur un système composé d'un Module HPLC 2695 Alliance de chez Waters, de trois colonnes Ultra Styragel (HR2, HR4, HR6) placées en série, d'un réfractomètre différentiel 2414 (Waters) et d'un détecteur à diffusion de lumière multi-angles laser miniDawn Treos (Wyatt Technology Corporation). Le tétrahydrofurane (THF) est utilisé comme phase mobile à un

débit de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Pour l'analyse, $100\mu\text{L}$ d'échantillons dissous dans le THF à raison de $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sont préalablement filtrés sur des filtres en PTFE de $0,45\mu\text{m}$ puis injectés. La valeur de l'indice de réfraction spécifique dn/dc a été déterminée à $0,065 \pm 0,002\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les PHAmcl dans le THF à 25°C (Simon-Colin 2008c).

5. Références bibliographiques

- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y. and Foglia, T. A., *Journal of Polymers and the Environment* **2004** 12 (3): 105-112.
- Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y. and Foglia, T. A., *Biomacromolecules* **2005** 6 (4): 2106-2112.
- Bluhm, T. L., Hamer, G. K., Marchessault, R. H., Fyfe, C. A. and Veregin, R. P., *Macromolecules* **1986** 19 (11): 2871-2876.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. and Genser, K. F., *Journal of Biotechnology* **1998** 65 (2-3): 127-161.
- Follonier, S., Henes, B., Panke, S. and Zinn, M., *Biotechnology and Bioengineering* **2012** 109 (2): 451-461.
- Hartmann, R., Hany, R., Pletscher, E., Ritter, A., Witholt, B. and Zinn, M., *Biotechnology and Bioengineering* **2006** 93 (4): 737-746.
- Huijberts, G. N. M., Eggink, G., Dewaard, P., Huisman, G. W. and Witholt, B., *Applied and Environmental Microbiology* **1992** 58 (2): 536-544.
- Huisman, G. W., Deleeuw, O., Eggink, G. and Witholt, B., *Applied and Environmental Microbiology* **1989** 55 (8): 1949-1954.
- Jacquel, N., Lo, C. W., Wei, Y. H., Wu, H. S. and Wang, S. S., *Biochemical Engineering Journal* **2008** 39 (1): 15-27.
- Lee, E. Y., Kang, S. H. and Choi, C. Y., *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1995** 79 (4): 328-334.
- Lee, S. Y., Choi, J. I. and Wong, H. H., *International Journal of Biological Macromolecules* **1999** 25 (1-3): 31-36.
- Lemoigne, M., *Bulletins de la Société de Chimie Biologique* **1926** 8: 770-782.
- Lemoigne, M., *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* **1927** 41: 148-165.
- Meyer, A., *Praktikum der botanischen bakterienkunde. Jena* **1903**.
- Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R. and Roy, I., *Materials Science & Engineering R-Reports* **2011** 72 (3): 29-47.
- Raguenes, G., Moppert, X., Richert, L., Ratiskol, J., Payri, C., Costa, B. and Guezennec, J., *Current Microbiology* **2004** 49 (3): 145-151.
- Simon-Colin, C., Alain, K., Colin, S., Cozien, J., Costa, B., Guezennec, J. G. and Raguenes, G. H. C., *Journal of Applied Microbiology* **2008a** 104 (2): 581-586.
- Simon-Colin, C., Alain, K., Raguenes, G., Schmitt, S., Kervarec, N., Gouin, C., Crassous, P., Costa, E. and Guezennec, J. G., *Bioresource Technology* **2009** 100 (23): 6033-6039.

- Simon-Colin, C., Raguenes, G., Costa, B. and Guezennec, J., *Reactive & Functional Polymers* **2008b** 68 (11): 1534-1541.
- Simon-Colin, C., Raguenes, G., Cozien, J. and Guezennec, J. G., *Journal of Applied Microbiology* **2008c** 104 (5): 1425-1432.
- Simon-Colin, C., Raguenes, G., Crassous, P., Moppert, X. and Guezennec, J., *International Journal of Biological Macromolecules* **2008d** 43 (2): 176-181.
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D. and Foglia, T. A., *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001** 56 (5-6): 664-669.
- Thakor, N., Trivedi, U. and Patel, K. C., *Bioresource Technology* **2005** 96 (17): 1843-1850.
- Tsuge, T., *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2002** 94 (6): 579-584.
- Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, I., Bucke, C. and Roy, I., *Journal of Biotechnology* **2007** 132 (3): 251-258.
- Wampfler, B., Ramsauer, T., Rezzonico, S., Hischier, R., Kohling, R., Thony-Meyer, L. and Zinn, M., *Biomacromolecules* **2010** 11 (10): 2716-2723.
- Yasothea, K., Aroua, M. K., Ramachandran, K. B. and Tan, I. K. P., *Biochemical Engineering Journal* **2006** 30 (3): 260-268

Chapitre 3:

Préparation d'oligomères de PHAs fonctionnalisés

Chapitre 3: Préparation d'oligomères de PHAs fonctionnalisés

1.	Introduction.....	125
2.	Oligoesters de PHAscl possédant une fonction alcyne terminale.....	126
	2.1. Résumé	126
	2.2. Article 1: Functionalized oligoesters from poly(3-hydroxyalkanoate)s containing reactive end group for click chemistry: Application to novel copolymer synthesis with poly(2-methyl-2-oxazoline)	128
	2.2.1. Abstract.....	128
	2.2.2. Introduction.....	129
	2.2.3. Experimental Section.....	130
	2.2.4. Results and Discussion	133
	2.2.4.1. Influence of the solvent reaction for the preparation of alkyne terminated PHBHV oligomers.	133
	2.2.4.2. Influence of the Catalyst Amount.....	138
	2.2.4.3. Transesterification of Different Polyesters.....	139
	2.2.4.4. Click chemistry reactions.....	140
	2.2.4.5. Conclusion	144
	2.2.4.6. Acknowledgment	144
	2.2.4.7. References.....	144
	2.3. Influence de la nature du polyester.....	147
	2.4. Comparaison du chauffage micro-onde et du chauffage conventionnel	149
3.	Applications du procédé d'alcoolyse.....	150
	3.1. En présence d'alcool allylique.....	150
	3.2. Formation d'oligoesters de PHBHV par hydrolyse	153
4.	Conclusion	156
5.	Partie expérimentale.....	158
6.	Références bibliographiques.....	159

1. Introduction

Les PHAs obtenus après biosynthèse sont biodégradables, biocompatibles et ont déjà montré leur potentialité dans des applications biomédicales. Leur nature hydrophobe constitue cependant une limite dans le cadre particulier de l'adhésion cellulaire. Pour cette raison, nous avons envisagé de coupler les PHAs avec des polymères plus hydrophiles.

Le couplage entre deux polymères peut être réalisé d'une part par des réactions simples comme l'estérification et d'autre part par des réactions de chimie click (1,3-cycloaddition dipolaire catalysée par le cuivre (I) de Huisgen). Pour cela nous avons d'abord préparé des oligomères de PHAs à architectures contrôlées possédant soit des fonctions acides carboxyliques réactives soit des fonctions alcynes ou alcènes. Puis des réactions de couplage ont été réalisées en utilisant des petites molécules à base de glucose ou des polymères de poly(2-méthyl-2-oxazoline) (POXZ) portant une fonction azoture. La POXZ a été préparée par Gisèle Volet (SPC, ICMPE), par polymérisation cationique par ouverture de cycle du monomère 2-méthyl-2-oxazoline amorcé par du iodométhane. Le groupement azoture terminal est amené par l'azoture de sodium utilisé pour arrêter la polymérisation (**Schéma 1**). La POXZ est un polymère hydrophile d'une grande stabilité en milieu physiologique et est vue comme une alternative au PEG (Adams 2007 ; Viegas 2011).

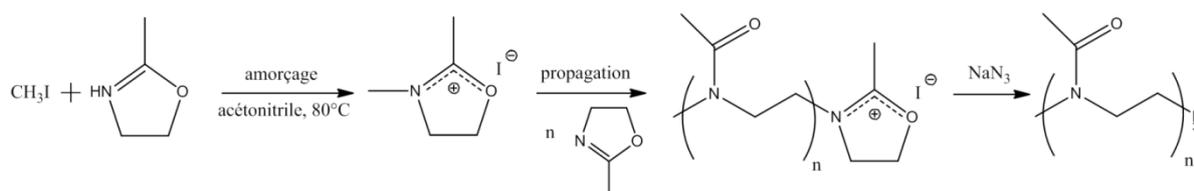


Schéma 1 : Synthèse de l'azoture-POXZ (Volet 2011).

2. Oligoesters de PHAscl possédant une fonction alcyne terminale

2.1. Résumé

L'étude que nous avons réalisée dans l'article « Functionalized Oligoesters from Poly(3-hydroxyalkanoate)s containing Reactive End Group for Click Chemistry: Application to Novel Copolymer Synthesis with Poly(2-methyl-2-oxazoline) » (*Reactive and Functional Polymers*, **2012**, Vol. 72, Issue 2, p 160-167) a permis de mettre au point un protocole en une seule étape permettant la synthèse d'oligomères de PHAs à architecture contrôlée se terminant par une fonction alcyne. Cette synthèse se fait par alcoolyse des fonctions esters des PHAs en présence d'alcool propargylique catalysée par du dilaurate de dibutyl étain (DBTDL). Nous avons montré que la réaction avec l'alcool propargylique menée dans le diglyme menait à la formation de deux populations d'oligomères, des réactions parasites conduisant à des oligomères possédant une fonction acide carboxylique. La présence d'eau, initialement contenue dans le diglyme, induit une réaction d'hydrolyse concurrente à la réaction d'alcoolyse. En réalisant la réaction dans du chloroforme préalablement séché, nous avons pu obtenir des oligomères de PHBHV ayant une masse molaire comprise entre 44500 g.mol⁻¹ et 2800 g.mol⁻¹ de façon contrôlée en ajustant à la fois le temps de réaction et la quantité de catalyseur.

Ce protocole a aussi été testé sur des PHAmcl, le poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyhexanoate) PHOHHx et le poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxynonénoate) PHOHNe comportant 27% d'insaturations. Il apparait que la réactivité des PHAmcl est plus faible que pour le PHBHV. En effet après 20 h de réaction, la masse molaire du PHBHV diminue de 90400 à 2800 g.mol⁻¹ tandis que les masses molaires du PHOHHx et du PHOHNe diminuent respectivement de 133600 à 5900 g.mol⁻¹ et de 530000 à 17400 g.mol⁻¹. Le pourcentage d'insaturations du PHOHNe reste cependant inchangé après la réaction.

Pour vérifier la réactivité de la fonction alcyne ainsi introduite notamment vis-à-vis de la réaction de chimie click (1,3-cycloaddition dipolaire catalysée par le cuivre (I) de Huisgen),

une molécule de 2-azido-2-déoxy-D-glucose a été greffée en bout de chaîne d'un oligomère fonctionnalisé de PHBHV. Le succès de ce couplage a été mis en évidence par spectroscopie infra-rouge et par RMN du proton.

La réactivité de la fonction alcyne ayant été confirmée, nous avons ensuite élaboré un copolymère avec un bloc PHBHV et un bloc poly(2-méthyl-2-oxazoline) (POXZ) portant une fonction azoture terminale. La réaction de couplage est confirmée par l'analyse RMN et nous obtenons ainsi un copolymère à blocs PHBHV-*b*-POXZ avec des masses molaires de respectivement 1500 et 2800 g.mol⁻¹.

2.2. Article 1: Functionalized oligoesters from poly(3-hydroxyalkanoate)s containing reactive end group for click chemistry: Application to novel copolymer synthesis with poly(2-methyl-2-oxazoline)

Reactive and Functional Polymers **2012** 72 (2): 160-167.

DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2011.12.005

Pierre Lemechko¹, Estelle Renard¹, Gisele Volet¹, Christelle Simon Colin², Jean Guezennec²,
Valerie Langlois*¹

¹Institut de Chimie et des Matériaux de Paris Est ICMPE UMR 7182, Université Paris Est, 2 à 8, rue Henri Dunant 94320 Thiais, France

²Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, BRM/BMM, B.P. 70, 29280 Plouzane, France

2.2.1. Abstract

Well defined poly(3-hydroxyalkanoates) PHAs containing an alkyne end group were prepared in a one step reaction by direct alcoholysis from natural polyesters using propargyl alcohol. The reactions were allowed to proceed with dibutyltin dilaurate as catalyst at different concentrations from 0.5 up to 24% mol/mol of the alcohol. Oligoesters were obtained with molar masses ranging from 44 500 to 2 700 g.mol⁻¹. Analysis of the MALDI-TOF mass spectra of the obtained oligomers has revealed the presence of alkyne group on one side and hydroxyl end group on the other side when the reaction was conducted in dried chloroform. The reaction rate of oligomer formation was depending on the nature of the PHAs and decreased with the length of the side chains. The Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition has been investigated between the alkyne group of PHAs and 2-azido-2-deoxy-D-glucose or azido-poly(2-methyl-2-oxazoline) (N₃-POXZ). The click reaction allowed the preparation of novel diblock copolymer PHA-*b*-POXZ soluble in water.

Keywords: polyesters, poly(3-hydroxyalkanoate), functionalized oligomer, reactive end group, transesterification, click chemistry, poly(2-methyl-2-oxazoline), diblock copolymer

2.2.2. Introduction

Poly(3-hydroxyalkanoate)s PHAs are bacterial polyesters that can be considered as promising biopolymers due to their renewability, biodegradability and biocompatibility [1]. Two types are distinguished, one with short-chain length, or *scl*-PHAs, possessing alkyl side chains having up to two carbons and medium-chain-length PHAs, or *mcl*-PHAs, having at least three carbon atoms on their side chains. Their properties make them good candidates for medical temporary applications [2-3]. Unsaturated PHAs as poly[(3-hydroxyoctanoate)-co-(3-hydroxyundecenoate)] PHOU has the major advantage to be functionalized on its side chains, allowing chemical modifications. A range of functional groups have been introduced such as epoxide [4], carboxylic groups [5-6], chlorine [7], amine groups [8], hydroxyl groups [9-11], and more recently alkyne group [12]. Ritter and co-workers [13] recently prepared by bacterial fermentation an unsaturated PHAs with pendent alkyne end groups. Various methods have also been developed for preparing functionalized PHAs oligomers like acid-catalyzed methanolysis [14-15], thermal treatment [16], and transesterification reaction [17-18]. Telechelic dihydroxylated poly(3-hydroxybutyrate)s were prepared by a transesterification procedure with ethylene glycol and were used as segments in the synthesis of copoly(ester-urethane)s [19]. They were also used to prepare thermoplastic block copolymer by enzymatic catalyzed polycondensation [20]. A hydroxyl-terminated poly(3-hydroxyoctanoate) oligomer obtained by methanolysis in presence of sulfuric acid [21] was required to prepare diblock copolymers by ring-opening polymerization of cyclic monomer as ϵ -caprolactone or lactide. PHAs oligomers with alkyne end group were recently prepared in a two steps procedure [22]. First, oligomers were prepared by thermal treatment and then carboxylic acid end groups were quantitatively coupled with propargylamine. From this starting oligomers, amphiphilic copolymers could be designed. Among amphiphilic and water soluble polymers, polyoxazolines are very attractive for their low toxicity which makes them interesting as biomaterials [23-26] and non ionic surfactants. Recently, novel polyoxazoline copolymers based on vegetable oil were described[27].

The purpose of the present study is to develop a simple and efficient method to prepare functionalized PHAs oligoesters containing alkyne end group in a one step reaction by direct alcoholysis. The preparation of oligomers from polyesters was achieved by direct reaction with propargyl alcohol using dibutyltin dilaurate as catalyst. This reaction was applied to poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyhexanoate) PHOHHx, poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxynonanoate) PHOHNe and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) PHBHV. The reactions are made in different solvents, diglyme or chloroform, in presence of dibutyltin dilaurate as catalyst at different concentrations. The alkyne terminal end group of PHBHV was used to react with 2-azido-2-deoxy-D-glucose or with azido-poly(2-methyl-2-oxazoline) (N₃-POXZ) using the copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition. The identification of the structure was realized by ¹H NMR, ¹³C NMR and MALDI-TOF mass spectrometry to investigate the nature of the functional end groups formed.

2.2.3. Experimental Section

Materials. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBHV) with 6 mol-% of hydroxyvalerate was obtained from ICI. Poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHOHHx) was obtained from EMPA (Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research, Laboratory for Biomaterials, St Gallen, Switzerland). Poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxynonanoate) (PHOHNe) was obtained from Ifremer, France. The monomer 2-methyl-2-oxazoline (Aldrich, purity 99 %) was dried overnight over calcium hydride and purified by distillation under a nitrogen atmosphere. Acetonitrile (SDS, Peypin, France) was distilled over calcium hydride before use, the chloroform used as the reaction solvent was dried over calcium chloride. Diglyme (Acros Organics, 99%), chloroform (SDS, analytical grade), petroleum ether (SDS, analytical grade), diethyl ether (SDS, analytical grade), propargyl alcohol (Aldrich, 99.5%), dibutyltin dilaurate (Aldrich, 95%), 1-iodopropane (Aldrich, 99%) and sodium azide (Aldrich, 99.5%), 2-azido-2-deoxy-D-glucose (Aldrich), copper (I) iodide (Aldrich, 99.5%), N,N,N',N'',N''-pentamethyldiethylenetriamine (Aldrich, 99.5%), were used without

further purification. Silica gel 60 Å was used for column chromatography. The dialysis membranes were purchased from Spectrum Laboratories (regenerated cellulose).

Preparation of Alkyne Terminated *scl*-PHA. The amount of propargyl alcohol was set, for the PHBHV, to 0.4 equivalent of the quantity of monomeric units which is tenfold excess of the required amount for a final length of about 25 monomers (*i.e.* a molar mass of 2 200 g.mol⁻¹). In a typical synthesis of alkyne terminated PHBHV, 250 mg of PHBHV (2.8×10^{-6} mol) were dissolved in 2.5 mL of diglyme in a 3-neck round-bottom flask with a magnetic bar under argon at 120 °C in an oil bath. After cooling at 110°C, to avoid further evaporation of propargyl alcohol (*bp* = 114-115 °C), 67 µL of propargyl alcohol (1.15×10^{-3} mol) and 40.8 µL of dibutyltin dilaurate (6.9×10^{-5} mol, 6 mol-% of propargyl alcohol) were introduced and the mixture was stirred at 110 °C for 6 hours. At the end of the reaction it was quickly cooled at room temperature, 10 mL of chloroform were added and the solution was precipitated in petroleum ether. The solid obtained was dried under vacuum at 80 °C overnight.

Preparation of Alkyne Terminated *mcl*-PHA Oligomers. In a typical synthesis of alkyne terminated PHOHHx, 122 mg of PHO (9.1×10^{-4} mol of PHA) were dissolved in 1.2 mL of chloroform in a seal-capped tube with a magnetic bar at 100 °C in an oil bath. 20 µL of propargyl alcohol (3.4×10^{-4} mol) and 40 µL of dibutyltin dilaurate (0.68×10^{-4} mol, 20 mol% of propargyl alcohol) were introduced and the mixture was stirred at 100 °C for 20 hours. The reaction was stopped by quickly cooling it at room temperature and the mixture was transferred in a dropping-funnel for work-up: the solution was washed twice with distilled water, the product was extracted with chloroform, the organic phase was dried with MgSO₄, filtered and then the solvent was removed by evaporation. The crude product was dissolved in chloroform, filtered through a column (12 cm of silica gel and a 2 cm upper layer of Celite) with CHCl₃/Acetone 98/2 as eluent.

Preparation of azido-poly(2-methyl-2-oxazoline) (N₃-POXZ). The azido-poly(2-methyl-2-oxazoline) (N₃-POXZ) has been prepared following the typical procedure : 2 mL of 2-methyl-2-oxazoline (24×10^{-3} mol) was added in 6 mL of dry acetonitrile, under dry nitrogen.

70 μL (0.72×10^{-3} mol) of 1-iodopropane were added. The reaction mixture was stirred during 18 hours at 80 °C. The polymerization was stopped by adding an excess of sodium azide and kept at 80 °C during 24 h. The polymer was purified by precipitation in diethyl ether, and then dried under vacuum. The azido-POXZ has a M_n (determined by SEC) of $2800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ and a polydispersity of 1.18.

Click reaction of Alkyne Terminated $_{scI}$ PHA with 2-azido-2-deoxy-D-glucose.

100mg of an alkyne terminated PHBHV oligomer ($M_n = 2200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $4.6 \cdot 10^{-2} \times 10^{-3}$ mol) were dissolved in 5mL of DMSO. 29 mg of 2-azido-2-deoxyglucose (0.14 mmol), 9 mg of CuI ($4.7 \cdot 10^{-2}$ mmol) and 10 μL of PMDETA ($4.8 \cdot 10^{-2} \times 10^{-3}$ mol) were added. The solution is stirred for 72 hours at 100°C and then dialyzed against distilled water for 5 days with a 1000 Da membrane. 64 mg of final product are obtained.

Click reaction of Alkyne Terminated $_{scI}$ PHA with poly(2-methyl-2-oxazoline). 100 mg of an alkyne terminated PHBHV oligomer ($M_n = 1500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $6.7 \cdot 10^{-2} \times 10^{-3}$ mol) are dissolved in 5 mL of CH_2Cl_2 . 570 mg of azido-poly(2-methyl-2-oxazoline) ($M_n = 2800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 0.2 mmol), 5 mg of CuI ($2.7 \cdot 10^{-2}$ mmol) and 14 μL of PMDETA ($6.7 \cdot 10^{-2}$ mmol) are added. The solution is stirred for 3 days in an oil bath at 50°C. The solvent is then evaporated, the product obtained solubilized in DMSO, dialyzed against distilled water with a MWCO of 12000-14000Da and then lyophilized.

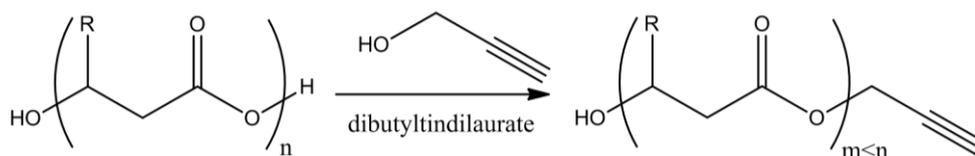
Polymer Characterization. Average molar masses of PHAs were determined by SEC using a Shimadzu LC-10AD pump with two styragel columns connected in series which type is PLgel (Mixed-C, 5 μm) from Polymer Laboratories and a Wyatt Optilab Rex refractive index detector. The system was calibrated by using polystyrene standards of low polydispersity index purchased from Polysciences. The samples were dissolved at a concentration of $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for $_{mcl}$ -PHA and CHCl_3 for $_{scI}$ -PHA. Aliquots of 50 μL of the polymer solution were eluted at a flow rate of $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The POXZ polymer was analyzed with a set of two columns PL-aquagel OH-30 and OH-40 (Polymer Laboratories, Shropshire, UK) in aqueous $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiNO_3 eluent. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded using a Bruker 400MHz

NMR spectrometer. MALDI-TOF mass spectrometry was performed using a Bruker autoflex MALDI-TOF mass spectrometer equipped with a smartbeam[®] laser. At 20 μL of the matrix solution, 2,5-dihydroxybenzoic acid dissolved in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1/1 at $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5 μL of a solution of NaI, $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, were added. 5 μL of the polymer solution in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1/1 were mixed with 25 μL of the matrix solution. A 0.3 μL portion of the final solution was deposited onto the stainless steel sample slide and was allowed to dry in air at room temperature. The MALDI-TOF mass spectra represent averages of 256 consecutive laser shots.

2.2.4. Results and Discussion

2.2.4.1. Influence of the solvent reaction for the preparation of alkyne terminated PHBHV oligomers.

A series of PHBHV oligomers was prepared by direct transesterification reaction with propargyl alcohol in diglyme or chloroform (**Figure 1**). This method has the major advantage to produce oligomers with an alkyne end group with a one step method whereas Babinot [27] described recently the preparation of alkyne oligoesters in a two steps method. The results are summarized in **Table 1**. The molar masses were determined by SEC using polystyrene standards as calibration method. Different reaction times were used to obtain a range of molar masses from 44 500 to 2 800 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Polymer	R=
PHBHV	0.94 CH ₃ , 0.06 CH ₂ CH ₃
PHOHHx	0.15 (CH ₂) ₂ CH ₃ , 0.85 (CH ₂) ₄ CH ₃
PHOHNe	0.69 (CH ₂) ₄ CH ₃ , 0.19 (CH ₂) ₄ CH=CH ₂ , 0.03 (CH ₂) ₄ CH ₃ , 0.08 (CH ₂) ₄ CH=H ₂

Figure 1: Transesterification reaction of poly(3-hydroxyalkanoate)s with propargyl alcohol.

Table 1: Molar mass of alkyne terminated PHBHV oligomers after reaction with propargyl alcohol ($n_{\text{alcohol}} = 0.4n_{\text{Monomeric Unit}}$).

Polymer	Solvent	T	n_{catalyst}	Time	Yield	$M_n^{\text{a)}}$	PDI	$M_n^{\text{b)}}$
PHBHV	Diglyme	110	4	4	74	18 300	1.9	16 600
PHBHV	Diglyme	110	8	8	92	8 900	1.8	12 000
PHBHV	Diglyme	110	24	24	57	2 700	1.8	4 090
PHBHV	CHCl ₃	100	1	1	86	81 800	2.3	-
PHBHV	CHCl ₃	100	1	20	82	38 500	2.0	-
PHBHV	CHCl ₃	100	4	4	80	44 500	2.2	-
PHBHV	CHCl ₃	100	4	20	83	9 980	1.9	-
PHBHV	CHCl ₃	100	8	8	78	20 400	2.0	17 200
PHBHV	CHCl ₃	100	20	2	88	14 000	1.9	11 900
PHBHV	CHCl ₃	100	20	20	69	2 800	1.5	2 100

^{a)}Determined by SEC in CHCl₃ (polystyrene standards). ^{b)}Determined by NMR.

On the MALDI-TOF spectrum (**Figure 2a**) of an alkyne terminated PHBHV obtained in diglyme, sodium-cationized carboxylic acid terminated PHBHV noted $P_{m,n}^{\text{I}}$, with m the number of hydroxybutyric monomers and n the number of hydroxyvaleric monomers are clearly identified among the signals of alkyne terminated PHBHV, noted $P_{m,n}$. A high content of water in diglyme ($0.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ determined by Karl Fischer Titration) seemed sufficient to lead to a competitive hydrolysis reaction thus explaining the formation of two kinds of oligomers, the

carboxylic terminated oligomers and the alkyne terminated oligomers. To prevent the formation of carboxylic end group, the reaction with propargyl alcohol was then carried out in chloroform, dried overnight on CaCl_2 , in seal-capped tubes at 100°C in an oil bath. On the MALDI-TOF spectrum of an alkyne terminated PHBHV (**Figure 2b**), the signals corresponding to the sodium-cationized alkyne terminated PHBHV are clearly visible and no signal corresponding to the carboxylic acid terminated PHBHV is observed. The chemical structures of the functionalized PHBHV oligomers were also confirmed by NMR ^1H (**Figure 3**) with the appearance of new signals at 4.65 ppm (**c**, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) and 2.45 ppm (**a**, $\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$). The presence of **a** was validated by COSY NMR (spectrum not shown) which attested the overlapping of its signal with the CH_2 polymer backbone protons **2,2'**. A correlation mark is also observed between the proton γ and δ which one is situated in the signals of **4** and **4'** at 1.26 ppm. The CH-OH end group noted γ , has a resonance at 4.18 ppm, while the CH of the backbone, noted **3,3'** has a resonance at 5.25 ppm. On the basis of the integrations of signals **3-3'** and γ , the number-average molar mass can be calculated (**Table 1**). The integrations of the signal at 4.65 ppm of the methylene group **c**, in alpha of the alkyne bond, and the signal at 4.18 ppm characteristic of the CH-OH end group γ presented a ratio of 2 indicating that all polymer chains had an alkyne function on one end and a hydroxyl group on the other end. The ^{13}C NMR signals attribution was made with the DEPT135 NMR (**Figure 3**). The signal of the ester group of the natural PHBHV backbone, noted **1**, is located at 169.7 ppm. The $\text{COOCH}_2\text{CH(R)OH}$ signal at 170.0 ppm, noted α , not detected in the natural PHBHV, was here clearly distinguished. The signal corresponding to the $\text{COOCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, noted **1'**, was found at 172.4 ppm. The presence of the signals at 52.2, 75.5 and 77.3 respectively attributed to the carbons **c**, **b** and **a** attested of the presence of the alkyne end group. It was found that the transesterification of PHBHV with propargyl alcohol in CHCl_3 is better than in diglyme as the content of water can be easily lowered enough so that no side-products can be detected nor on NMR spectrum neither on MALDI-TOF spectrum.

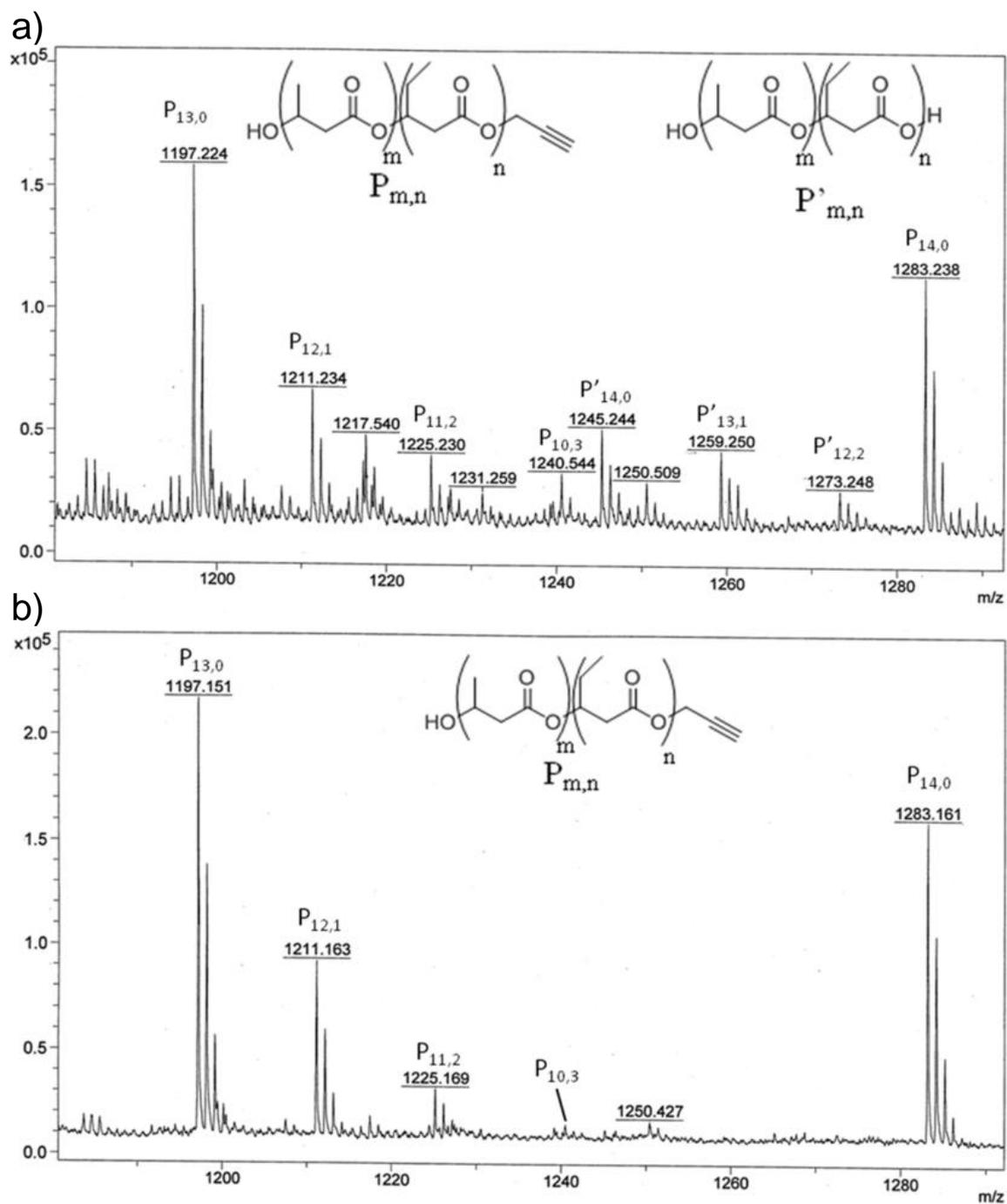


Figure 2: MALDI-TOF MS spectrum of an alkyne terminated PHBV oligomer obtained using **a)** diglyme and **b)** dried chloroform as solvent.

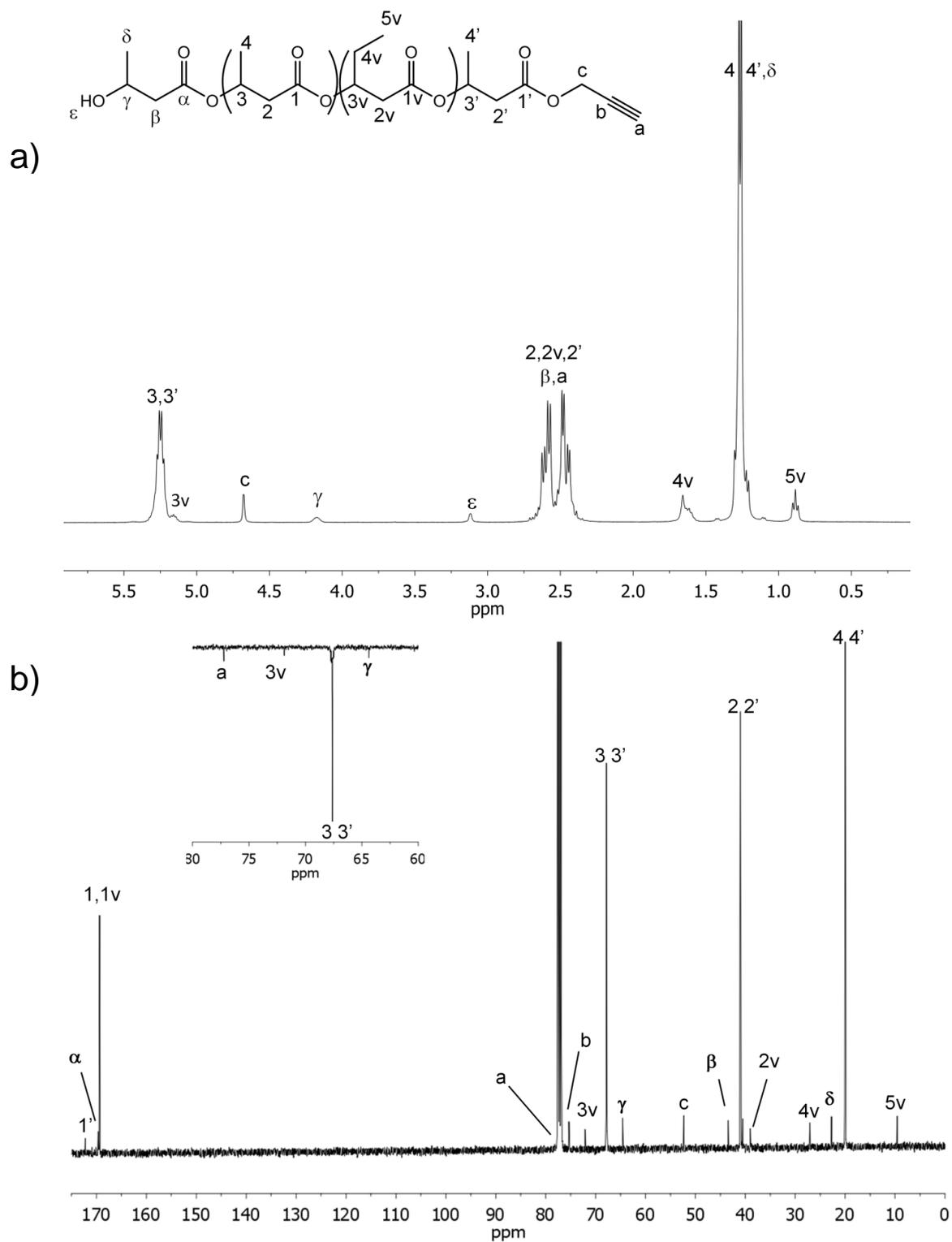


Figure 3: a) ^1H , b) ^{13}C and dept135 NMR spectra in CDCl_3 of an alkyne terminated PHBV oligomer ($M_n = 2\ 100\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) obtained using chloroform as solvent.

2.2.4.2. Influence of the Catalyst Amount

A serie of reactions was realized in dried chloroform to study the influence of the amount of catalyst on the reaction rate of transesterification (**Table 1**). The amount of propargyl alcohol was kept to 0.4 equivalent of the quantity of monomeric units. The use of 1 mol% of catalyst only gave oligomers with a molar mass of 38 500 g.mol⁻¹ after 20 hours of reaction whereas functionalized oligomers with a molar mass of 14 000 g.mol⁻¹ are obtained with 20 mol% of catalyst after only 2 hours of reaction. The molar mass of oligomers decreased to 2 800 g.mol⁻¹ after 20 hours of reaction at 20 mol% (**Figure 4**). A decrease of the polydispersity index was also observed when smaller molar masses were obtained because of the purification step by precipitation.

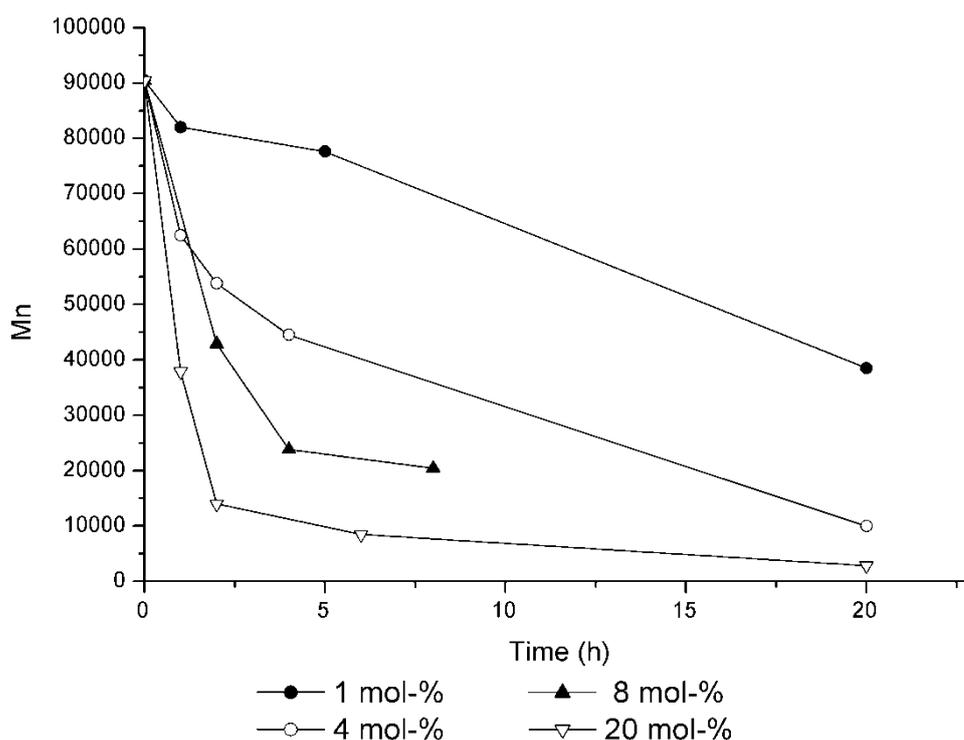


Figure 4: Influence of the catalyst amount for PHBV transesterification with propargyl alcohol.

2.2.4.3. Transesterification of Different Polyesters

This reaction was also applied to poly(3-hydroxyoctanoate-co-hydroxyhexanoate) PHOHHx and poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxynonanoate) PHOHNe. The amount of propargyl alcohol was kept to 0.4 equivalent of the quantity of monomeric units. The amount of catalyst was 1 mol% per hour of reaction as it is expected to be the best compromise between a sufficient reaction rate and control of molar mass for the PHBHV. PHBHV oligomers were easily purified after the reaction by precipitation in petroleum ether but the PHOHHx and the PHOHNe are more difficult to precipitate and therefore need to be purified by column chromatography to get rid of the catalyst. The functionalized oligoesters were obtained with an average yield superior to 75% after purification. The resulting evolutions of the molar mass of these polymers (**Figure 5**) revealed that the polyesters exhibited different reactivities. For the PHOHHx and PHOHNe the reactivity was much lower than the reactivity of PHBHV which is probably due to steric influence of the pendant side chains. The proportion of unsaturated monomers of the PHOHNe was kept unchanged at 26% after reaction with propargyl alcohol. This particular oligomer presents an alkyne end group as well as double bonds in the side chains. This will be very interesting for further chemical modifications by click chemistry.

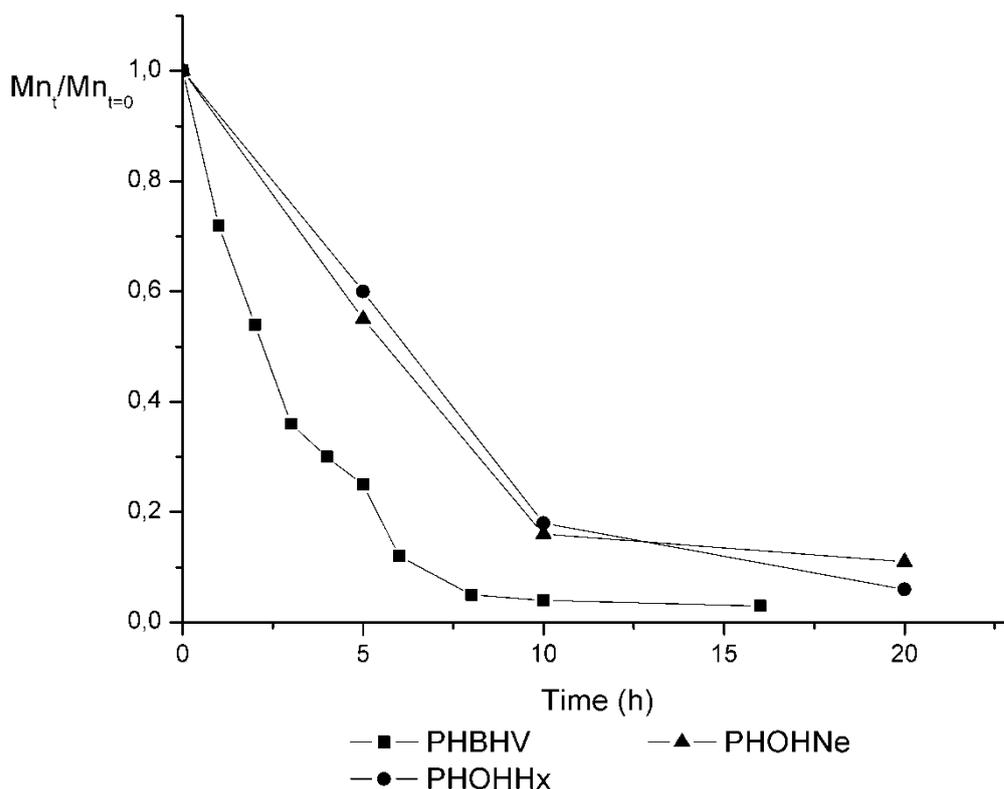


Figure 5: Evolution of $Mn_t/Mn_{t=0}$ of several polymers during reaction with propargyl alcohol at 100°C in chloroform with 1 mol-%.h⁻¹ of catalyst.

2.2.4.4. Click chemistry reactions

The rapid one step synthesis of low molar masses PHBHV containing an alkyne end group was undertaken with success using propargyl alcohol. The alkyne end group was used to react with the azide-terminated glucose or azide-terminated polyoxazoline by using the copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition to obtain amphiphilic copolymers.

Coupling of 2-azido-2-deoxy-D-glucose was accomplished using CuAAC in DMSO at 100°C with copper (I) as copper source and PMEDTA as base (**Figure 6**). The resulting copolymer was purified by dialysis against water in order to remove unreacted 2-azido-2-deoxy-D-glucose. The success of the reaction was confirmed by FTIR with the disappearance of the azide signal at 2105 cm⁻¹ and by ¹H NMR. The spectrum of α -hydroxy- ω -glucose-poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) is given in **Figure 7**. The absence of the signal of **c** at

4.65 ppm along with the appearance of signals between 3 and 4.4 ppm corresponding to the glucose show that all alkyne function have reacted to form the aimed product.

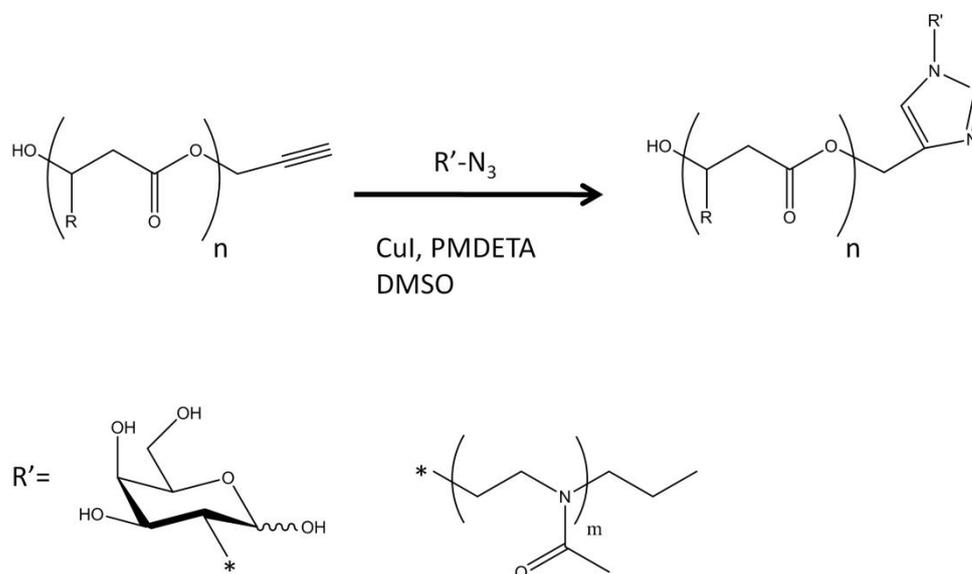


Figure 6: Synthesis of α -hydroxy- ω -glucose-poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate)-*b*-poly(2-methyl-2-oxazoline).

The azido-terminated poly(2-methyl-2-oxazoline) was obtained by cationic ring opening polymerization (CROP)[28-29]. This method of polymerization allowed the preparation of well-defined polymer with narrow molecular weight distribution ($I_p < 1.2$). This is also a versatile method to fix specific function at the end of the macromolecular chain as azide function. In a previous work [29], a chemical transformation by the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of azido-POXZ and different terminal alkynes on small molecules were used to attach successfully different functions (acrylate, epoxide or carboxylic acid) at the end of the macromolecular chain. In this work the cycloaddition has been made in organic medium between the alkyne end group of PHBHV ($M_n=1500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and the azido-POXZ ($M_n=2800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Copolymer was dialyzed to remove the unreacted POXZ. The product obtained was analyzed by ^1H NMR (**Figure 8**).

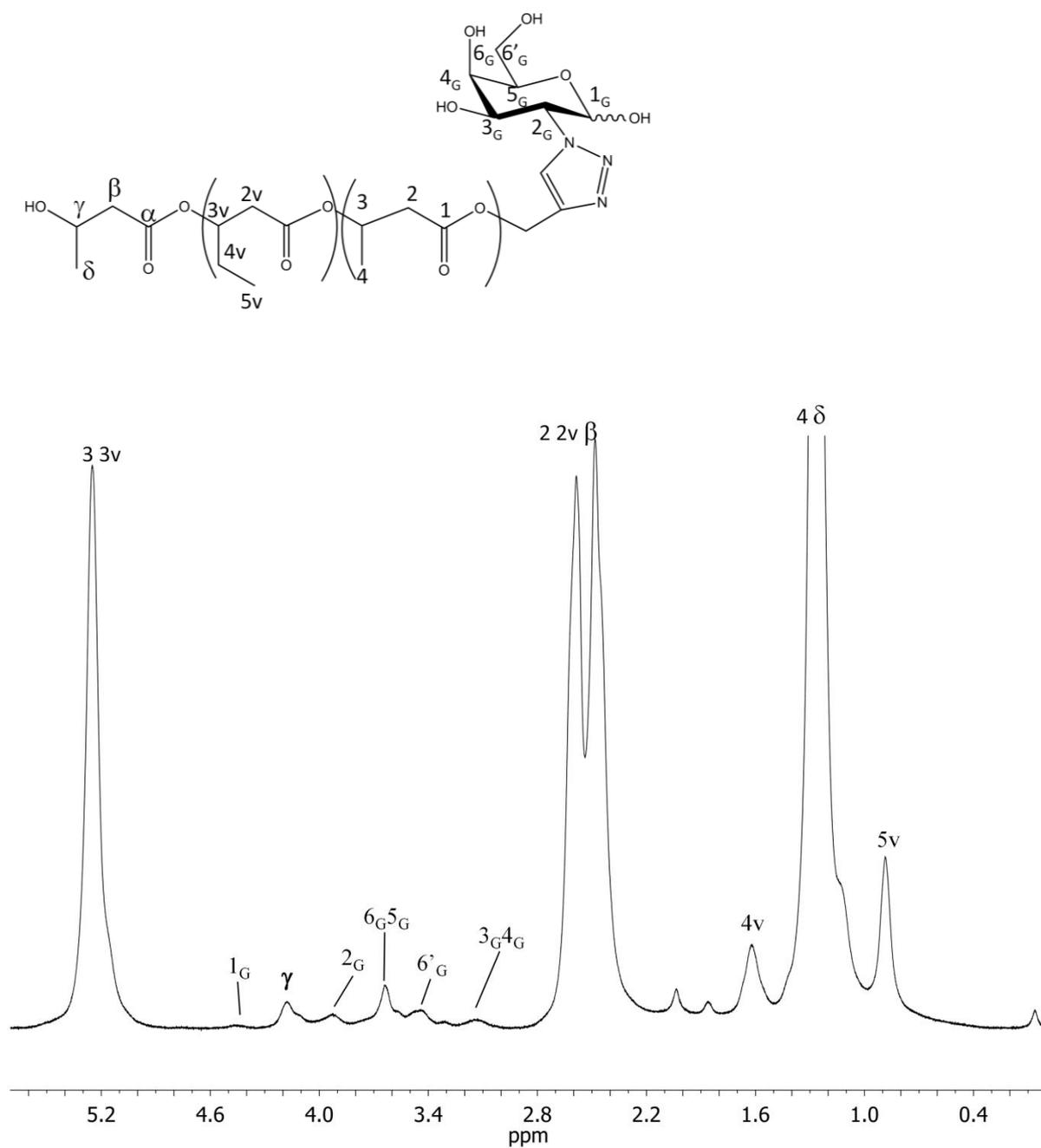


Figure 7: ¹H NMR spectrum in CDCl₃ of α-hydroxy-ω-glucose-poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate).

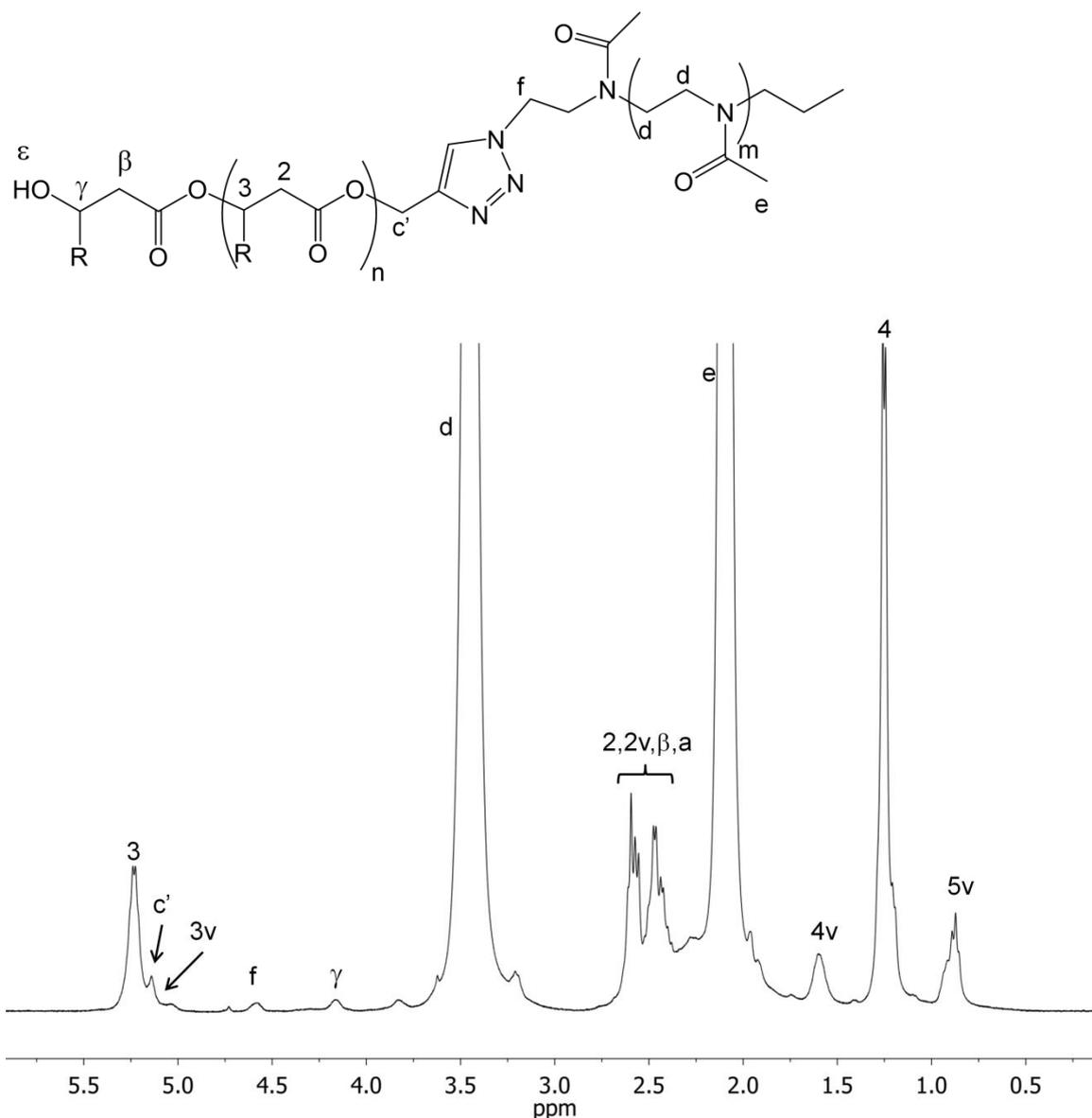


Figure 8: ^1H NMR spectrum of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-*b*-poly(2-methyl-2-oxazoline).

The presence of the peaks at 3.4 and 2.1 attested of the presence of POXZ. Effective grafting was attested by the shifting of the signal **c**: it becomes more deblinded (from 4.6 to 5.1 ppm) in α of triazole ring than in α of triple bond. We can also notice the appearance of signals **f** corresponding to the POXZ methylene protons in alpha of triazole ring. As expected, the molar mass of the PHBHV after reaction was $1450 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ as calculated from the integrations of the signals of γ and the backbone protons **3** and **3v**. The behavior of the diblock copolymer

P(HBHV-*b*-POXZ) presented an original property because it was spontaneously soluble in water. It was the first report on a soluble copolymer based on *scl*-PHA and showed the particular interest of POXZ in the design of novel water soluble and biodegradable copolymer.

2.2.4.5. Conclusion

In a view to prepare novel functionalized oligoesters which can be further used in click chemistry, oligoesters bearing an alkyne end group were prepared in a rapid one step reaction using propargyl alcohol in presence of dibutyltin dilaurate. The molar mass of the functionalized polymers obtained can be controlled by adjusting the reaction conditions. Alcoholysis was successfully realized on *scl*- and *mcl*- PHAs, with a reaction rate depending on the length of the side chains. The alkyne end groups reacted with azide groups of 2-azido-2-deoxy-D-glucose and POXZ. The di-block copolymer P(HBHV-*b*-POXZ) is a novel copolymer based on biodegradable polyester and totally soluble in water. Efforts are now focused on studying the amphiphilic properties of these copolymers, especially the influence of both PHAs and POXZ chains length, as well their aggregation in water.

2.2.4.6. Acknowledgment

The authors would like to thank IFREMER and CNRS for financial support and Dr Martine Tessier (UPMC, Paris) for MALDI TOF analysis and helpful discussions.

2.2.4.7. References

- [1] R. W. Lenz, R. H. Marchessault, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1-8.
- [2] G. Q. Chen *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 2434-2446.
- [3] E. Renard, V. Langlois, P. Guerin, *Corros. Eng., Sci. Technol.* 4 (2007) 300-311.
- [4] M. M. Bear, M. A. Leboucher-Durand, V. Langlois, R. W. Lenz, S. Goodwin, P. Guerin, *React. Funct. Polym.* 34 (1997) 65-77.

- [5] N. Kurth, E. Renard, F. Brachet, D. Robic, P. Guerin, R. Bourbouze, *Polymer* 43 (2002) 1095-1101.
- [6] D. J. Stigers, G. N. Tew, *Biomacromolecules* 4 (2003) 193-195.
- [7] A. H. Arkin, B. Hazer, M. Borcakli, *Macromolecules* 33 (2000) 3219-3223.
- [8] J. Sparks, C. Scholz, *Biomacromolecules* 9 (2008) 2091-2096.
- [9] M. S. Eroglu, B. Hazer, T. Ozturk, T. Caykara, *J. Appl. Polym. Sci.* 97 (2005) 2132-2139.
- [10] M. Y. Lee, W. H. Park, R. W. Lenz, *Polymer* 41 (2000) 1703-1709.
- [11] E. Renard, A. Poux, L. Timbart, V. Langlois, P. Guerin, *Biomacromolecules* 6 (2005) 891-896.
- [12] J. Babinot, E. Renard, V. Langlois, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 619-624.
- [13] O. Jazkewitsch, A. Mondrzyk, R. Staffel, H. Ritter, *Macromolecules* 44 (2011) 1365-1371
- [14] R. A. Gross, S. P. Mc Carthy, M. S. Reeve, U.S. Patent (1995) 5439985
- [15] R. H. Marchessault, G. Yu, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 40 (1999) 527-528.
- [16] S. Nguyen, G. Yu, R. H. Marchessault, *Biomacromolecules* 3 (2002) 219-224.
- [17] T. Hirt, P. Neuenschwander, U. Suter, *Macromol. Chem. Phys.* 197 (1996) 1609-1614.
- [18] A. P. Andrade, B. Witholt, R. Hany, T. Egli, Z. Li, *Macromolecules* 35 (2002) 684-689.
- [19] A. P. Andrade, P. Neuenschwander, R. Hany, T. Egli, B. Witholt, Z. Li, *Macromolecules* 35 (2002) 4946-4950.
- [20] S. Dai, L. Xue, M. Zinn, Z. Li, *Biomacromolecules* 10 (2009) 3176-3181
- [21] L. Timbart, E. Renard, M. Tessier, V. Langlois, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1255-1265.
- [22] J. Babinot, E. Renard, V. Langlois, *Macromol. Chem. and Phys.* 211 (2010) 619-624
- [23] R. Hany, C. Bohlen, T. Geiger, R. Hartmann, J. Kawada, M. Schmid, M. Zinn, Marchessault R. H. *Macromolecules* 37 (2004), 385-389.
- [24] W.H. Velandar, R.D. Mardurawe, A. Subramanian, G. Kumar, G. Sinai-Zingle, J.S. Riffle, *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992) 1024-1030.
- [25] P. Broz, S. Benito, C. Saw, P. Burger, H. Heider, M. Pfisterer, S. Marsch, W. Meir, P. Hunziker, *J. Controlled Release* 102 (2005) 475-488
- [26] N. Adams, U. Schubert, *Adv. Drug Delivery Rev.* 59 (2007) 1504-1520

[27] C. Giardi, V. Lapinte, C. Charnay, J. Robin, *React. Funct. Polym.* 69 (2009) 643-649.

[28] G. Volet, C. Amiel, L. Auvray, *Macromolecules* 36 (2003) 3327-3336.

[29] G. Volet, T.X. Lav, J. Babinot, C. Amiel, *Macromol. Chem. and Phys* 212 (2011) 118-124.

2.3. Influence de la nature du polyester

Pour compléter l'étude précédente, nous avons testé la réaction sur d'autres types de polyesters: du PHBHV comportant 81% de 3HV, du PHBHHx et du PLA. Les masses molaires et indices de polymolécularité des polymères utilisés sont donnés dans le **tableau 2**. Les réactions sont réalisées par chauffage conventionnel dans un bain d'huile à 100°C dans un tube hermétiquement fermé. Les polymères sont dissous dans du chloroforme séché sur CaCl₂ puis 0,4 équivalents d'alcool propargylique pour 1 équivalent d'unités monomères et 1 mol% de DBTDL par heure de réaction sont ajoutés.

Tableau 2: Caractérisations des polymères étudiés.

Polymères	Mn ^{a)} (g.mol ⁻¹)	Ip	T _F (°C)
PHBHV (19/81)	573 000	1,7	96
PHBHHx (91/9)	206 000	1,6	135
PLA	87 200	1,9	-

^{a)} Déterminé par SEC par rapport à des standards poly(styrène) dans le CHCl₃ pour les PHAscl et le PLA et dans le THF pour les PHAmcl.

L'évolution des masses molaires par rapport aux masses molaires initiales est reportée sur la **figure 9**. Les courbes du PHBHV (19/81), du PHBHHx (91/9) et du PLA montrent une diminution très rapide de Mn/Mn₀ en 5h. Puis la diminution des masses molaires ralentit. La diminution des masses molaires de ces PHAs est donc plus rapide que dans le cas du PHBHV (94/6) et des PHAmcl où le palier est atteint en 10h. Le PLA est le polymère qui présente la plus grande réactivité, sa masse molaire diminuant le plus rapidement.

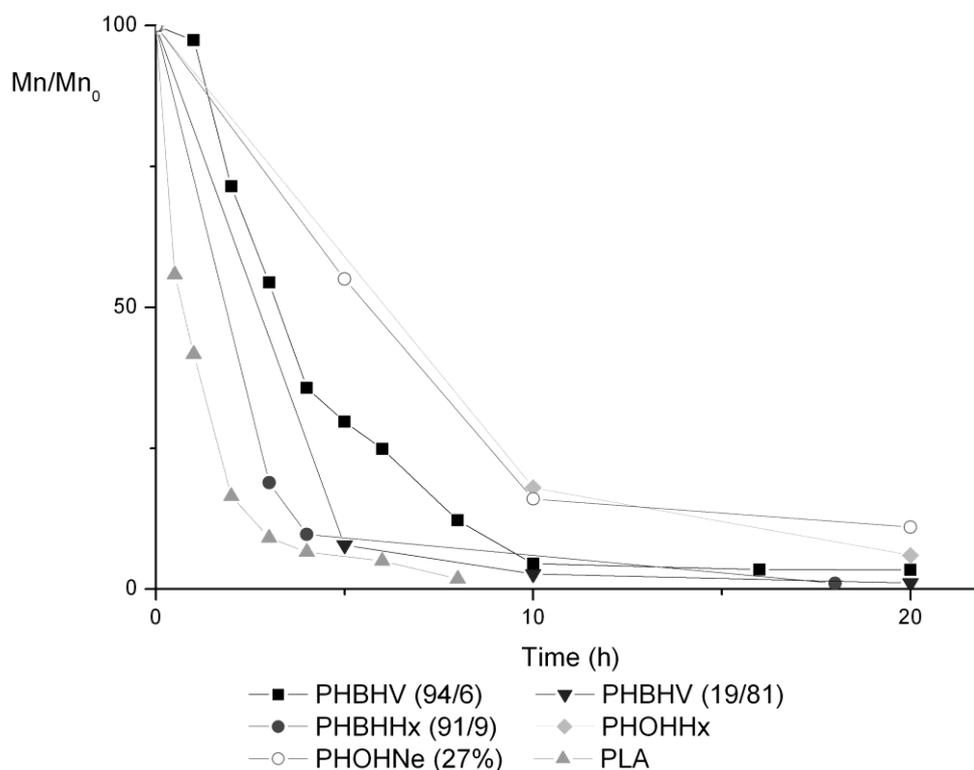


Figure 9: Evolution de Mn/Mn_0 de différents polymères en présence d'alcool propargylique dans le chloroforme (100°C, chauffage conventionnel).

La diminution de la réactivité des PHAmcl par rapport aux PHAscl peut s'expliquer par une augmentation de l'encombrement stérique causée par les longues chaînes latérales, gênant la réaction d'alcoolyse. En ce qui concerne les PHAscl, la réaction est plus rapide lorsque la proportion en 3HV du PHBHV augmente. La réaction est aussi plus rapide pour le PHBHHx que pour le PHBHHx (91/9). Cette différence pourrait s'expliquer par une différence de solubilité des PHAscl. En effet, d'après Terada et al. (Terada 1999) la cristallinité des PHAs est un frein à leur solubilisation complète pour des températures inférieures à $0,9T_F$. Le PHBHV (19/81) et le PHBHHx sont donc mieux solubilisés dans le chloroforme à 100°C que le PHBHV (94/6), d'où une réaction plus rapide. Les chaînes latérales du PHBHHx augmentent donc sa solubilité mais elles ne sont pas assez longues pour induire une gêne stérique suffisante pour entraver la réaction d'alcoolyse.

2.4. Comparaison du chauffage micro-onde et du chauffage conventionnel

Pour réduire le temps de réaction, un dispositif de chauffage par micro-ondes a été utilisé. L'avantage d'un tel dispositif est de permettre d'atteindre très rapidement des températures plus élevées, supérieures à la température d'ébullition, sans risque dus à la surpression.

Tableau 3: Réactions de transestérification du PHBHV par l'alcool propargylique (Alc. Prop.) catalysées par du DBTDL à 20 %mol par rapport à l'alcool, par chauffage conventionnel et micro-ondes.

T (°C)	[Alc. Prop.]/[UM ^a]	t (h)	Mn ^b (g.mol ⁻¹)	Rdt (%)
100 ^a	0,4	30	900	44
100 ^a	0,4	30	1200	25
160 ^a	0,4	0,5	2600	70
160 ^a	2	0,5	500	30
160 ^a	2	0,33	600	46
160 ^a	2	0,16	1000	40

^a) UM: Unité Monomère. ^b) Déterminées par RMN ¹H. ^c) Chauffage conventionnel ^d) Chauffage par micro-ondes.

La **figure 10** montre les profils de température et de puissance émise typiques lors d'une réaction sous activation micro-ondes. L'appareil émet une forte puissance, plus de 850W, dans les premières secondes pour atteindre la température de consigne le plus rapidement puis maintient la température constante en émettant très faiblement, environ 20W, tout au long de la réaction. Les masses molaires du **tableau 3** sont calculées à partir des spectres RMN ¹H. Les résultats du **tableau 3** montrent que pour obtenir des oligomères d'environ 1000 g.mol⁻¹ par activation micro-ondes, il est nécessaire d'augmenter la quantité d'alcool propargylique de 0.4 à 2 équivalents par rapport à la quantité d'unités monomères.

Dans ces conditions, pour préparer l'oligomère de 1000 g.mol^{-1} , 10 minutes de réaction suffisent. Indépendamment des conditions de réaction, les rendements sont faibles, inférieurs à 50%, quand la masse molaire finale est d'environ 1000 g.mol^{-1} les petites masses étant éliminées lors de l'étape de précipitation. Le chauffage par micro-onde se révèle un procédé efficace permettant d'amener un mélange réactionnel à de hautes températures sans risques dus à la surpression.

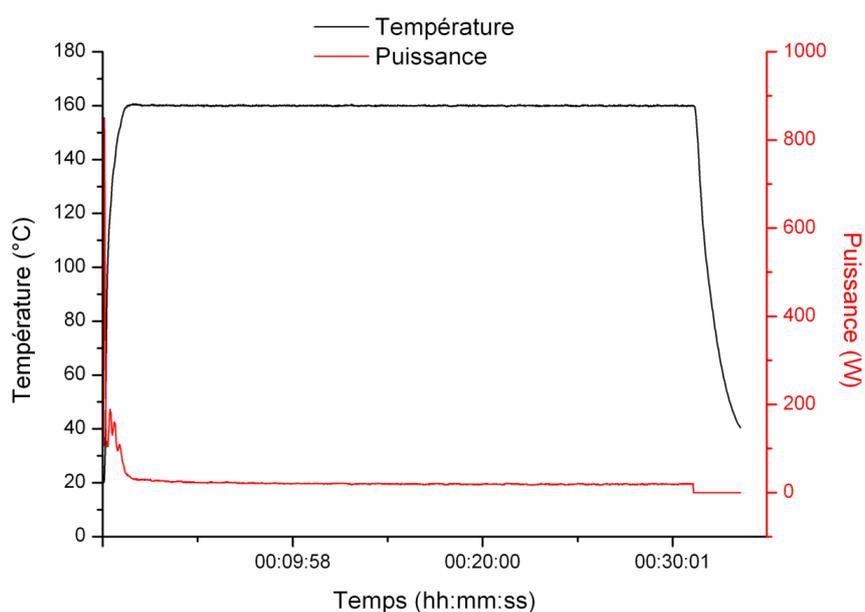


Figure 10: Profils de la température du milieu réactionnel et de la puissance émise par le micro-onde au cours de la réaction de transestérification du PHBHV en présence d'alcool propargylique pendant 30 mn à 160°C.

3. Applications du procédé d'alcoolyse

3.1. En présence d'alcool allylique

La réaction de transestérification a été aussi réalisée en présence d'alcool allylique sur le PHBHV (94/6), le PHOHHx et le PLA dans du chloroforme sous pression à 100°C par chauffage conventionnel (**Schéma 2**). En effet, l'introduction d'une double liaison réactive terminale pourrait être utile pour une autre réaction de chimie click, l'addition thiol-ène.

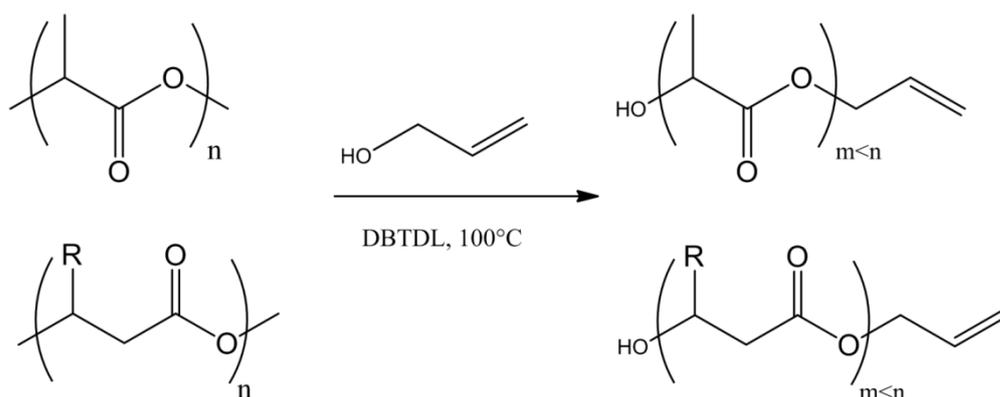


Schéma 2: Transestérification de polyesters par l'alcool allylique (100°C , chauffage conventionnel).

Sur la **figure 11** est présenté un agrandissement du spectre COSY du PHBHV (94/6) après transestérification par l'alcool allylique. Sur ce spectre les signaux des protons **a**₁, **a**₂, **b** et **c** de la fonction allyle terminale sont visibles ainsi que leurs corrélations. Le signal attribué à **b** à 5,9 ppm corrèle bien avec les deux protons **a**₁ et **a**₂ à 5,3 ppm environ mais aussi avec **c** à 4,6 ppm. Le déplacement des protons **c** à 4,6 ppm montre que ces protons sont en alpha d'une fonction ester, leur déplacement étant de 4,1 ppm sur l'alcool allylique. Les intégrations des signaux de **c**, **b** et **a** sont respectivement de 2, 1 et 1, indiquant que la double liaison est intacte et que les oligomères présentent une fonction alcool terminale et une fonction allyle à l'autre extrémité.

Dans le **tableau 4** sont regroupées les masses molaires obtenues après transestérification avec de l'alcool allylique et de l'alcool propargylique de trois polymères, le PHOHHx, le PHBHV et le PLA. Il apparaît que la réaction d'alcoolyse du PLA est aussi rapide avec l'alcool allylique qu'avec l'alcool propargylique. En revanche pour les PHAs, la réaction se révèle plus rapide avec l'alcool allylique qu'avec l'alcool propargylique.

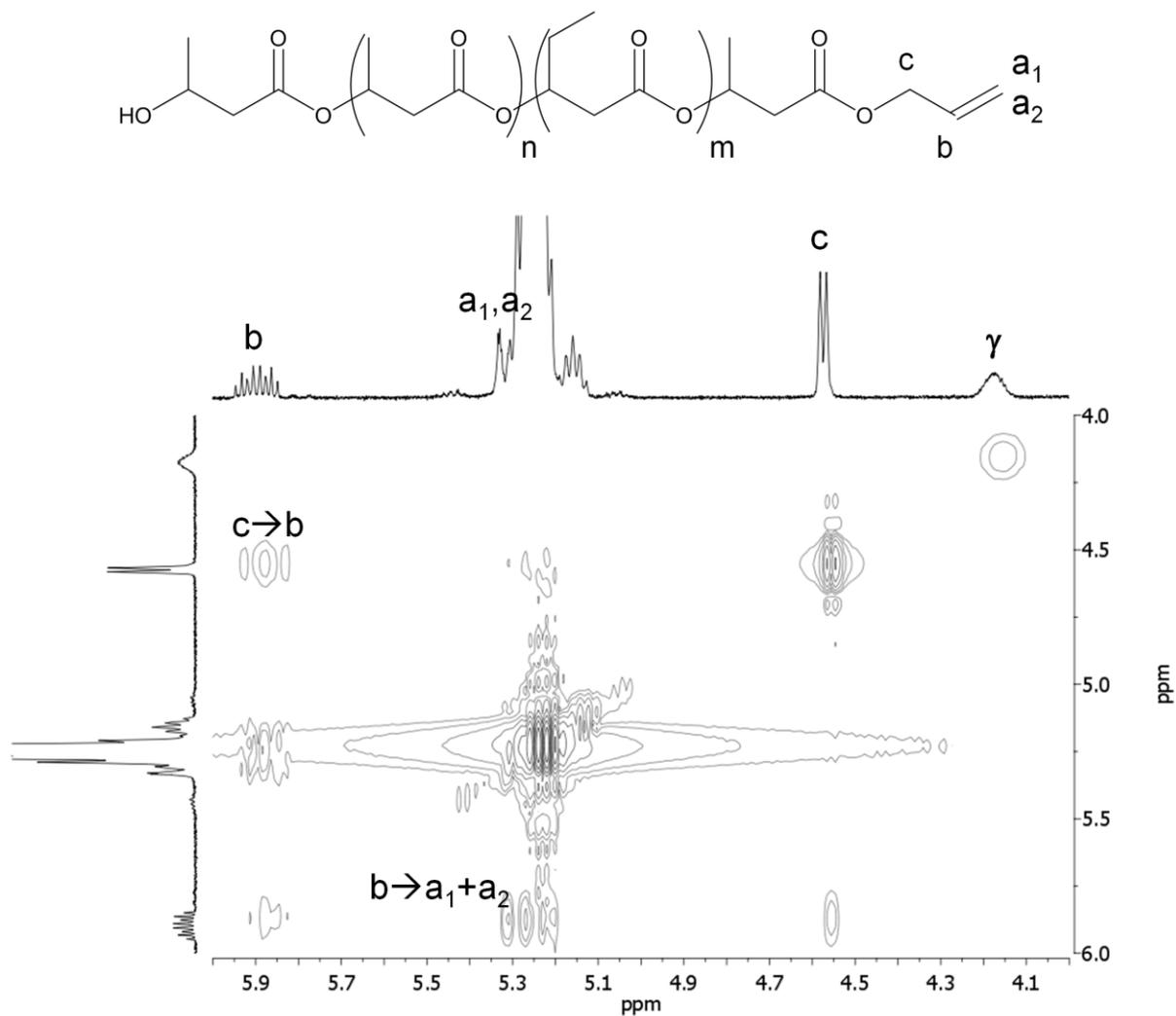


Figure 11: Spectre COSY du PHBV ($M_n=3800 \text{ g.mol}^{-1}$) après réaction avec l'alcool allylique.

Tableau 4: Comparaison entre les masses molaires obtenues après transestérification avec de l'alcool allylique et de l'alcool propargylique à 100°C .

Polymères	$M_{n_{\text{initiale}}}$ (g.mol^{-1})	t (h)	n_{cat} (%mol)	Rdt (%)	$M_{n_{\text{allyl}}}$ ^{a)} (g.mol^{-1})	$M_{n_{\text{propargyl}}}$ ^{a)} (g.mol^{-1})
PHOHHx (85/15)	133 600	20	20	85	3 600	5 900
PHBV (94/6)	90 400	6	20	69	3 800	6 200
PLA	87 200	4	4	73	4 000	3 800

^{a)} Déterminée par $^1\text{H NMR}$.

3.2. Formation d'oligoesters de PHBHV par hydrolyse

La préparation d'oligomères de PHAs par simple hydrolyse et chauffage conventionnel n'est pas aussi simple et la formation de produits secondaires est souvent observée (Timbart 2009).

Nous avons donc testé cette réaction d'hydrolyse en présence du même catalyseur que précédemment (DBTDL) et par activation micro-ondes. Afin d'avoir des temps de réactions courts, les expériences ont été réalisées dans le chloroforme par chauffage micro-onde à une puissance constante de 100W. Les résultats après purification sont présentés dans le **tableau 5**. Comme l'illustre la **figure 12**, la température au cours de ces expériences se stabilise rapidement entre 160 et 165°C.

Tableau 5: Hydrolyse du PHBHV (88/12) à 160°C par micro-ondes à 100W avec $n_{(H_2O)} = 20$ eq. d'unités monomères et 1 %mol/ $n_{(H_2O)}$ de DBTDL.

t (min)	Rdt (%)	Mn (g.mol ⁻¹) ^{a)}	Mn (g.mol ⁻¹) ^{b)}	Ip ^{b)}
0	-	-	88700	2,4
5	85	19800	26250	1,8
10	76	2450	2600	1,8
10	66	3950	4650	1,9
15	74	4150	4800	1,7
20	72	2100	2250	1,8
20	71	3600	4200	1,8
30	34	1100	1200	1,5
50	10	900	930	1,2

^{a)} Déterminées par RMN ¹H. ^{b)} Déterminées par SEC.

La quantité d'eau a été augmentée à environ 20 équivalents (1 ml pour 250 mg de PHBHV dissous dans 2,5 mL de chloroforme) car aucune réaction n'a été observée avec 1

équivalent (50 μL). Ceci est probablement dû au fait qu'à 160°C une majorité de l'eau liquide initiale se retrouve sous forme de vapeur dans la partie haute du tube et ne peut donc plus réagir avec le polymère en solution. En effet, la pression de vapeur saturante de l'eau à $T=160^\circ\text{C}$, p_{sat} , peut être estimée grâce à la formule de Clapeyron (**Equation 1**).

$$\ln\left(\frac{p_{\text{sat}}}{p_0}\right) = \frac{ML_v}{R}\left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T}\right)$$

Equation 1: Formule de Clapeyron avec T_0 une température d'ébullition à une pression p_0 (373 K à 1013 mbar), M , la masse molaire de l'eau (18 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), L_v la chaleur latente de vaporisation supposée indépendante de la température ($2,26\cdot 10^9 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$), R la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) et T la température de la vapeur (160°C).

En assimilant la vapeur d'eau à un gaz parfait dans un volume de 7,5 mL (tube de 10 mL moins les 2,5 mL de chloroforme), la quantité d'eau correspondante à cette pression est ainsi estimée à 23 μL soit $1,3 \cdot 10^{-3}$ mol, ce qui n'est pas négligeable comparé aux 50 μL correspondant à un équivalent d'eau par rapport à la quantité d'unités monomères. C'est pourquoi il est nécessaire d'augmenter le volume initial d'eau pour qu'une quantité suffisante reste à l'état liquide à 160°C pour réagir avec le polymère.

Les résultats du **tableau 5** montrent que les masses molaires obtenues sont entre 5000 et 2000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ avec des indices de polymolécularité similaires de 1,8 en moyenne pour des temps de réaction entre 10 et 20 min. Des oligomères de petites tailles peuvent donc être obtenus rapidement. Le spectre RMN ^1H d'un oligomère (**Figure 13**) confirme la structure attendue des oligomères. Le signal de **3'** à 4,17 ppm est celui du proton en alpha de la fonction hydroxyle terminale. Avec l'intégration de ce signal et celle des signaux des protons **3** et **3v**, il est possible de calculer la masse molaire. Cependant le contrôle de la masse molaire finale avec le temps de réaction n'est pas possible. Ceci peut être dû à plusieurs phénomènes. D'une part, le mélange réactionnel à l'intérieur du tube est diphasique et il est impossible de vérifier visuellement si l'agitation est suffisante. D'autre part, la température est aussi moins contrôlable lorsque le mode Puissance Constante est utilisé comme on peut

l'observer sur la **figure 12**. Au-delà de 20 min de réaction, les masses obtenues sont de l'ordre de 1000 g.mol^{-1} mais le rendement chute de façon drastique. La chute de rendement est due au fait que les petits oligomères sont éliminés lors de la purification.

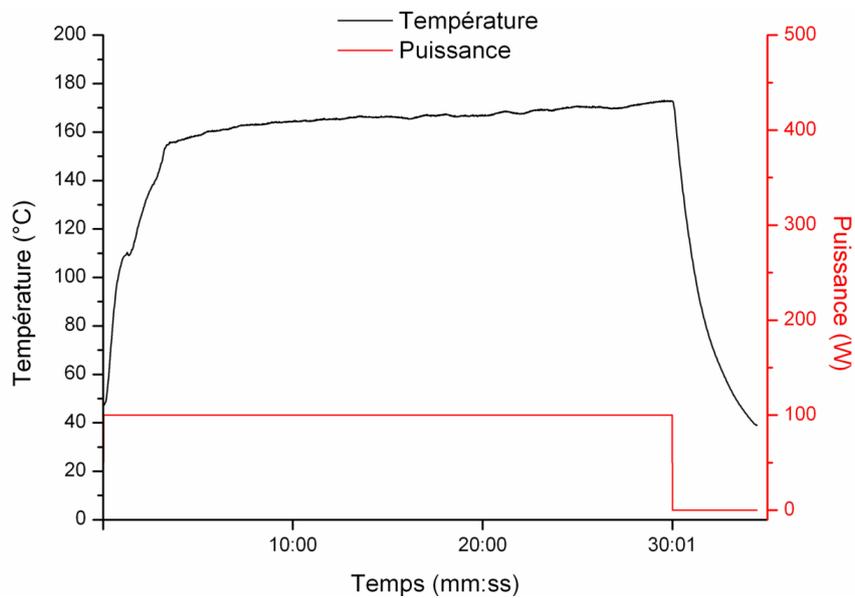


Figure 12: Profil de température et de puissance micro-onde pour l'hydrolyse du PHBV pendant 30 min à 100W.

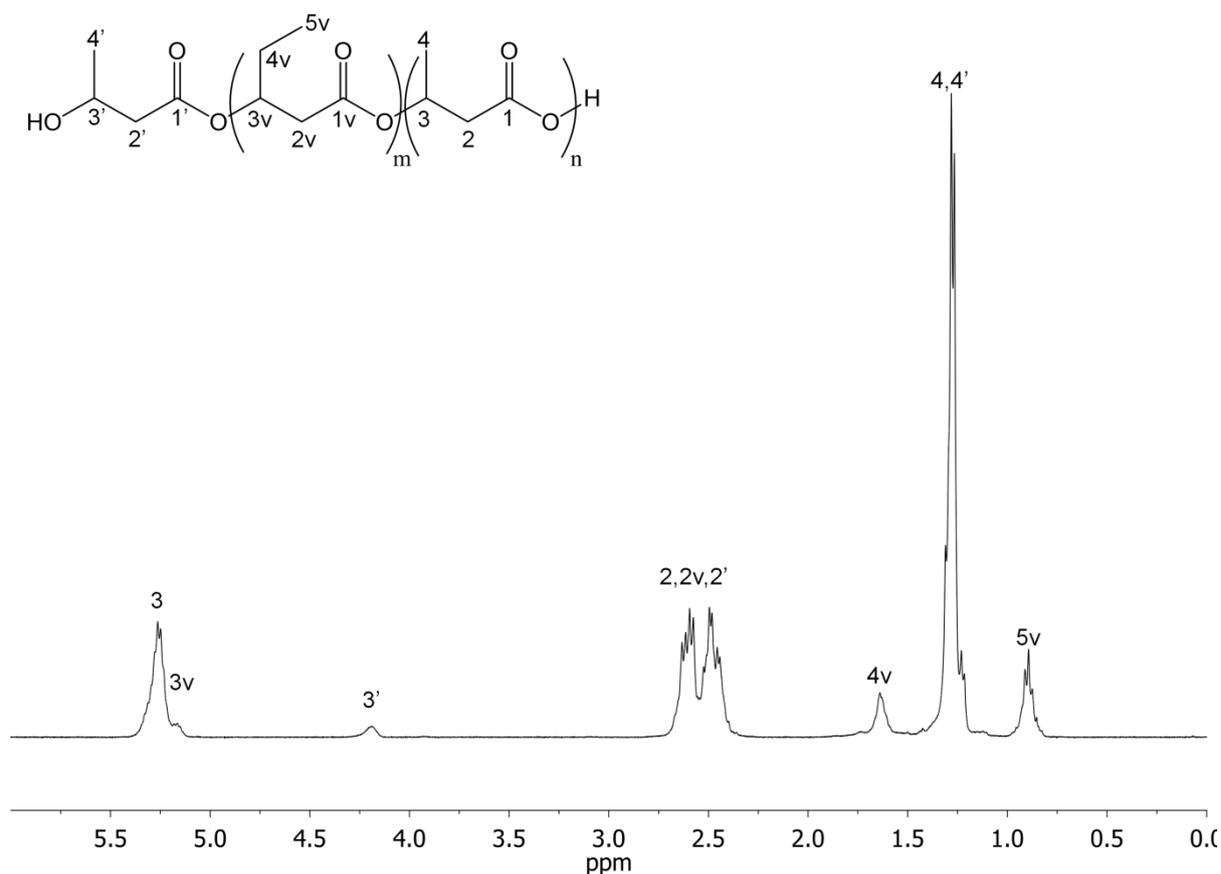


Figure 13: Spectre RMN ^1H du PHBHV hydrolysé ($M_n=1100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) pendant 30 min à 160 °C par chauffage micro-ondes.

4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié la réaction d'alcoolyse des PHAs et plus particulièrement celle du PHBHV par l'alcool propargylique catalysée par du dilaurate de dibutyl étain. Nous avons ensuite déterminé des conditions, en variant le temps de réaction et la quantité de catalyseur, permettant d'obtenir des oligomères de PHBHV fonctionnalisés par une fonction alcyne terminale et de longueurs contrôlées (de 500 à plus de 20000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Nous avons ensuite montré que ce protocole était applicable à d'autres PHAs, PHBHV de compositions différentes, PHBHHx, PHAmcl saturé et insaturé ainsi qu'au PLA. Des différences de réactivité ont toutefois été observées, les PHAmcl étant les moins réactifs en raison de l'encombrement stérique dû aux longues chaînes latérales.

L'utilisation d'un appareil de chauffage par micro-ondes a permis d'atteindre des températures de réaction plus élevées, 160°C au lieu de 100°C, réduisant de façon importante le temps de réaction. A 160°C des oligomères de PHBHV de 2600 g.mol⁻¹ ont pu être synthétisés en 30 min de réaction tandis qu'à 100°C, la synthèse d'oligomères de 2100 g.mol⁻¹ nécessite 20h de réaction. De plus, en augmentant la quantité d'alcool propargylique de 0.4 à 2 équivalents, il suffit de 10 min pour obtenir des oligomères de 1000 g.mol⁻¹.

Enfin ce protocole a permis de synthétiser des oligomères fonctionnalisés par une double liaison terminale par réaction avec de l'alcool allylique ainsi que des oligomères terminés par une fonction acide carboxylique par simple hydrolyse.

Les oligomères fonctionnalisés préparés dans ce chapitre ont été utilisés pour concevoir des copolymères PHBHV-*b*-POXZ. La grande réactivité de la fonction alcyne lors de la réaction de Huisgen a permis de coupler ces deux blocs aux propriétés bien différentes. Ces résultats préliminaires de couplage ouvrent la voie à la préparation des copolymères amphiphiles à base de polysaccharides qui vont être l'objet du prochain chapitre.

5. Partie expérimentale

Les expériences utilisant un chauffage micro-onde ont été réalisées sur un appareil Anton Paar monomode 300. La température interne est mesurée par un détecteur à fibre optique immergé dans le mélange réactionnel. L'appareil peut être en mode Température Contrôlée dans lequel la puissance du rayonnement micro-onde émis est régulée de façon à obtenir une température stable égale à la température de consigne ou en mode Puissance Constante dans lequel un rayonnement de puissance constante est émis en continu. En fin de réaction, un système de refroidissement par air comprimé permet de rapidement abaisser la température du mélange réactionnel à la température ambiante.

Transestérification du PHBHV par l'alcool propargylique, chauffée par micro-onde. Par exemple, 250 mg de PHBHV ($2,85 \cdot 10^{-3}$ mol d'unités monomères) sont dissous dans 2,5 mL de chloroforme séché sur CaCl_2 . 330 μL d'alcool propargylique ($5,67 \cdot 10^{-3}$ mol) et 676 μL de dilaurate de dibutyl étain (DBTDL) ($1,14 \cdot 10^{-3}$ mol, 20 %mol par rapport à l'alcool propargylique) sont ensuite ajoutés puis le mélange est chauffé par irradiation micro-onde à 160°C. A la fin de la réaction, le mélange est directement précipité dans de l'éther de pétrole. Le précipité est récupéré par filtration puis séché une nuit sous vide à 80°C.

Hydrolyse du PHBHV chauffée par micro-onde. Pour l'hydrolyse du PHBHV, typiquement, 250 mg de polymère ($2,85 \cdot 10^{-3}$ mol d'unités monomères) sont dissous dans 2,5 mL de chloroforme. Puis 330 μL de DBTDL ($5,57 \cdot 10^{-4}$ mol, 1 %mol par rapport à l'eau) et 1 mL ($55,55 \cdot 10^{-3}$ mol) d'eau distillée sont ajoutés. Le mélange réactionnel est ensuite chauffé par irradiation micro-onde à 160°C. A la fin de la réaction, le mélange est récupéré, lavé deux fois avec de l'eau puis la phase organique est séchée sur MgSO_4 , concentrée par évaporateur rotatif et précipitée dans de l'éther de pétrole. Le précipité est récupéré par filtration avant d'être séché une nuit sous vide à 80°C.

6. Références bibliographiques

- Adams, N. and Schubert, U. S., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007** 59 (15): 1504-1520.
- Terada, M. and Marchessault, R. H., *International Journal of Biological Macromolecules* **1999** 25 (1-3): 207-215.
- Timbart, L., *Thesis, University of Paris Val-de-Marne*, **2005**.
- Viegas, T. X., Bentley, M. D., Harris, J. M., Fang, Z. F., Yoon, K., Dizman, B., Weimer, R., Mero, A., Pasut, G. and Veronese, F. M., *Bioconjugate Chemistry* **2011** 22 (5): 976-986.
- Volet, G., Lav, T.-X., Babinot, J. and Amiel, C., *Macromolecular Chemistry and Physics* **2011** 212 (2): 118-124.

**Chapitre 4:
Préparation de
copolymères greffés à
base de PHAs et de
polysaccharides**

Chapitre 4: Préparation de copolymères greffés à base de PHAs et de polysaccharides

1. Introduction.....	165
2. Elaboration de copolymères dextrane-g-PHA: comparaison du greffage par estérification directe et chimie click.....	166
2.1. Résumé	166
2.2. Article 2: Synthesis of Dextran-graft-PHBHV amphiphilic copolymer using click chemistry approach.....	168
2.2.1. Abstract.....	168
2.2.2. Introduction.....	169
2.2.3. Experimental section	170
2.2.4. Results and Discussion	173
2.2.4.1. Synthesis of graft copolymers dextran-g-poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	173
2.2.4.2. Properties of Dextran-g-PHBHV copolymers	183
2.2.5. Conclusion.....	187
2.2.6. Acknowledgments.....	188
2.2.7. References	188
2.3. Synthèse de dextrane-g-PHAmcl.....	190
3. Synthèse de copolymères greffés amphiphiles à partir d'exopolysaccharides et de PHAs	192
4. Conclusion	197
5. Références bibliographiques.....	198

1. Introduction

L'utilisation récente de la chimie click dans le domaine des polymères a permis la synthèse de nouvelles architectures macromoléculaires difficilement accessibles par d'autres stratégies de synthèse. Cette chimie a en particulier permis la synthèse de copolymères par couplage polymère-polymère par réaction thiol-ène ou par cycloaddition de Huisgen. La réaction de couplage a été ici réalisée par cycloaddition de Huisgen par réaction entre les fonctions azotures portées par le polysaccharide et les fonctions alcynes terminales portées par les PHAs. Les greffons de PHAs sont alors reliés au squelette polysaccharide par un cycle triazole.

Dans un premier temps, les fonctions azotures ont été introduites sur le polysaccharide en deux étapes: tout d'abord une tosylation des alcools secondaires suivie d'une substitution nucléophile en présence d'azoture de sodium. Les greffons PHAs porteurs d'une fonction alcyne ont été préparés par alcoololyse directe avec de l'alcool propargylique comme présenté dans le chapitre précédent. Pour élargir la gamme de copolymères greffés, nous avons utilisé différents polysaccharides:

- Un dextrane: homopolymère de glucose faiblement branché et déjà utilisé dans le domaine médical, comme substitut de plasma sanguin par exemple.
- Deux exopolysaccharides (EPS) produits par des bactéries marines. Les EPS sont des polysaccharides sécrétés par certaines bactéries en présence de glucose. De nombreuses structures sont accessibles suivant la souche bactérienne. Leur intérêt est double: facilité de production et forte activité biologique potentielle.

D'autre part, nous avons utilisé des greffons de PHAscl (PHBHV) et de PHAmcl.

Les réactions de chimie click nécessitent toutefois plusieurs étapes pour préparer le polysaccharide portant des fonctions azotures et les oligomères de PHAs porteurs d'une fonction alcyne. C'est la raison pour laquelle nous avons également préparé des copolymères greffés par estérification directe entre les fonctions hydroxyles des polysaccharides et les

fonctions chlorures d'acides introduites sur les extrémités terminales des oligomères de PHAs.

Pour évaluer les propriétés des copolymères amphiphiles ainsi préparés, nous avons testé leur capacité à s'auto-assembler en solution aqueuse.

2. Elaboration de copolymères dextrane-g-PHA: comparaison du greffage par estérification directe et chimie click

2.1. Résumé

Dans cet article, des copolymères dextrane-g-PHBHV ont été préparés par estérification. Pour cela, des oligomères de PHBV de 6800 et 1300 g.mol⁻¹ sont obtenus par traitement thermique et la fonction acide carboxylique terminale a été activée par réaction avec du chlorure de thionyle. Les oligomères de PHBV sont alors greffés dans différentes conditions par estérification sur les fonctions hydroxyles d'un dextrane de 6500 g.mol⁻¹. Après purification, le greffage est mis en évidence par IRTF par la présence de signaux des groupements caractéristiques des deux polymères et permet d'estimer un très faible taux de greffage mais néanmoins suffisant pour rendre le dextrane insoluble dans l'eau.

Pour la synthèse des copolymères par chimie click, des oligomères de PHBV de 900 à 6200 g.mol⁻¹ portant une triple liaison terminale ont été préparés par la méthode développée au chapitre précédent. Les fonctions azotures ont été introduites sur le dextrane en deux étapes: tosylation des alcools secondaires puis une substitution nucléophile par de l'azoture de sodium. La tosylation se fait dans du diméthylacétamide auquel est ajouté du chlorure de lithium et en présence de triéthylamine. Différents ratios molaires, concentrations et temps de réaction sont étudiés. Des degrés de substitution des motifs glucosidiques (DS_{Tos}) de 1,3 à 2,9 ont été déterminés par RMN ¹H. Deux dextranses tosylés, avec un DS_{Tos} de 1,7 et un DS_{Tos} de 2,9, sont ensuite fonctionnalisés avec des azotures. Pour les deux produits, le degré de

substitution en azotures est de 1 et les DS_{Tos} résiduels de 0,7 et 1,9. Les oligomères de PHBHV sont alors greffés sur les dextranses par la formation d'un cycle triazole. L'analyse par RMN des copolymères ainsi obtenus montre que les fonctions alcynes ont toutes réagi. Il est alors possible, connaissant les proportions initiales de PHBHV et de dextrane de déterminer le degré de substitution en PHA (DS_{PHA}) qui va de 0,03 à 0,19.

Les copolymères obtenus par estérification ne sont solubles que dans le DMSO en raison de leur faible taux de greffage. Ceux obtenus par chimie click sont, eux, solubles dans le chloroforme alors que les dextranses précurseurs portant des tosyles et des azotures étaient insolubles. L'angle de contact de l'eau sur la surface de films de copolymères par chimie click, riches en PHBHV, est de 80° environ. Les films de copolymères obtenus par estérification, en revanche, sont beaucoup plus hydrophiles avec des angles de contact d'environ 20° . Les copolymères obtenus par estérification forment des nanoparticules après dispersion dans l'eau, analysées par DDL, avec des tailles de particules de 294 à 341 nm et des indices de polydispersité de 0,157 à 0,382. La mesure du potentiel zeta de ces particules donne une valeur de -22,3 mV proche des -20,7 mV du dextrane ce qui est attendu pour une structure de type cœur-couronne avec une couronne dextrane. Pour les copolymères obtenus par chimie click, seul le copolymère synthétisé à partir d'un dextrane avec un DS_N de 1 et un DS_{Tos} de 0,7 et un PHBHV de $900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ forme des nano-particules par émulsion-évaporation. Leur taille, mesurée par DDL, est de 160 nm et leur indice de polydispersité de 0,140. Le potentiel zeta mesuré est de -33,6 mV entre celui du PHBHV à -50,5 mV et celui du dextrane non modifié, cette différence pouvant être expliquée par la présence des tosyles résiduels sur le dextrane.

2.2. Article 2: Synthesis of Dextran-graft-PHBHV amphiphilic copolymer using click chemistry approach

Reactive and Functional Polymers **2012** 72 (8): 487-494.

DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2012.04.008

Pierre Lemechko¹, Estelle Renard¹, Gisele Volet¹, Christelle Simon Colin², Jean Guezennec²,
Valerie Langlois*¹

¹ Institut de Chimie et des Matériaux de Paris Est ICMPE UMR 7182, Université Paris Est, 2 à 8, rue Henri Dunant
94320 Thiais, France

² Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, BRM/BMM, B.P. 70, 29280 Plouzane, France

2.2.1. Abstract

Dextran-graft-PHBHV copolymers were prepared using click-chemistry. Well defined and functional dextran backbones containing azide groups had been prepared by tosylation and subsequent nucleophilic displacement reaction with sodium azide ($DS_{N_3} = 1$). Well defined PHBHV oligomers containing an alkyne end group were prepared in a one step reaction by direct alcoholysis from natural polyesters using propargyl alcohol with dibutyltin dilaurate as catalyst. Oligoesters were obtained with molar masses ranging from 900 to 6200 g. mol⁻¹. The Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition allowed the preparation of graft copolymers with a content of PHBHV up to $DS_{PHBHV} = 0.19$. The presence of PHBHV on the dextran backbone led to the formation of stable nanoparticles (160 nm) without surfactant by an emulsion-solvent evaporation method.

Keywords: polyesters, poly(3-hydroxyalkanoate), functionalized oligomer, reactive end group, transesterification, click chemistry, poly(2-methyl-2-oxazoline), diblock copolymer.

2.2.2. Introduction

Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) are a class of natural biodegradable polyesters accumulated by many bacteria as carbon and energy supply when an essential nutrient is limited [1,2]. Using various substrates, a wide variety of PHAs are synthesized, differing notably by the length of their side chains [3]. Two types are distinguished, one with short chain length, or *scl*-PHAs, possessing alkyl side chains having up to two carbon atoms ; medium chain length PHAs, or *mcl*-PHAs, having at least three carbon atoms on their side chains. The length of side chains leads the physical properties of PHAs, crystalline, rigid and brittle for *scl*-PHAs, semi-crystalline, soft and elastomeric for the *mcl*-PHAs. Thanks to their biocompatibility, PHAs are good candidates for biomedical applications including biomedical devices, tissue engineering or biodegradable drug carriers [4-6]. Nanoparticles prepared from PHAs are getting much attention because it provides a safe and biodegradable surface. The surface modification with nontoxic and blood compatible material is essential in order to avoid recognition by macrophages to prolonge blood circulation time.

It would be a significant breakthrough to prepare hybrid graft copolymers of polysaccharides and PHAs to combine the advantageous properties of both polymers. One major advantage of polysaccharides is their biodegradable character and their natural molecular recognition since they have specific receptors in certain cells. Particularly dextran, consisting of mainly $\alpha(1-6)$ linked D-glucose units, represents a valuable biopolymer that is widespread in medicine and pharmacy (blood plasma substitute, coating material to prevent protein opsonisation...)[7]. Several polysaccharides graft copolymers have been already reported with potential applications as surfactants, controlled released systems and biomaterials [8, 9]. Typical approach for preparing polysaccharide graft copolymers consisted in polymerizing monomers from reactive functions carried by the polysaccharide backbone by a "grafting from" approach or grafting preformed polymer chains by a "grafting onto" method. Polyesters such as poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone) were already grafted onto polysaccharide backbone using the hydroxyl groups of the polysaccharide as initiator for the ring opening polymerization of the corresponding lactones or lactide [10-15]. PHA grafting

onto cellulose was previously described by direct esterification without catalyst [16]. In order to tailor the properties of natural-based polymers, “click” chemistry offers a straightforward and efficient way to avoid multiple reaction and purification steps. Because of its high selectivity, reliability and tolerance to a broad range of functional groups and reaction conditions, “click” chemistry especially the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction is a powerful tool to prepare copolymers [17-19]. However, a major challenge in the modification of polysaccharides is the difficulty of introducing the azide or alkyne functionalities necessary for the subsequent CuAAC reaction. It is known that tosylate moieties of cellulose can be substituted by SN reactions but the tosyl dextran contains only secondary tosylate functions. Heinze et al. showed that it was not possible to substitute the tosylate moieties completely [8]. Alkyne or azide moieties were introduced on dextrane backbone to further obtain aminoalkyl, hydroxyalkyl, carboxyalkyl, thioalkyl derivatives [20]. or polyethyleneglycol–modified dextrans derivatives by reaction with the corresponding azide- or alkyne- derivatives [21,22].

In this context, the present paper is concerned with the unprecedented synthesis of dextran-g- PHBHV by click chemistry. To achieve this goal, tosylation of dextran and the subsequent modification by nucleophilic displacement reaction with azide were performed. The azide moieties were further modified by CuAAC reaction with the alkyne end groups of PHBHV oligomers. These oligomers were obtained by direct alcoholysis in presence of propargyl alcohol. The properties of these copolymers were compared with copolymers obtained by direct esterification. Nanoparticles were prepared and characterized by dynamic light scattering.

2.2.3. Experimental section

Materials. Dextran T10 ($M_n = 6500 \text{ g.mol}^{-1}$, $I_p = 1.47$) was purchased from Pharmacia Biotech and dried overnight under vacuum at 100°C before use. LiCl was purchased from Sigma-Aldrich. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) PHBHV with 12% of HV was purchased from Goodfellow and was purified by precipitation into ethanol to get rid of

plasticizers before use. Dimethylacetamide (DMAc) (analytical grade), dimethylsulfoxide (DMSO) (analytical grade), chloroform (analytical grade), petroleum ether (analytical grade), CH_2Cl_2 (analytical grade), 2-propanol (analytical grade) were purchased from SDS and used without further purification but the chloroform which was dried on CaCl_2 . Anhydrous DMSO (99.99%), Et_3N (99%), para-toluenesulfonyl chloride, sodium azide (99.9%), propargyl alcohol (99%), dibutyltin dilaurate (95%), chlorobenzene (99.5%), SOCl_2 , copper (I) iodide 99.5%, N,N,N',N'',N'''-pentamethyldiethylenetriamine 99% (PMDETA), pyridine were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. Dialysis membranes (regenerated cellulose) were purchased from Spectrum Laboratories.

Preparation of chloride terminated PHBHV oligomers. 20 g of PHBHV were heated in an oven at 190°C for a chosen reaction time. Then the sample was cooled and the oligomers were purified by dissolution in dichloromethane, precipitation in ethanol, filtration and vacuum-drying at 80°C overnight. 1 g of PHBHV oligomer ($M_n = 6800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $1.47 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$) was dissolved in 20 mL of hot chlorobenzene under argon. 21 μL of SOCl_2 ($2.88 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$) was then added and the solution was allowed to react 1h at 100°C under argon. The solution was then evaporated in a rotary evaporator. The product was analyzed by FTIR and used immediately.

Preparation of graft copolymers by esterification (copolymers 1-4). Typically, 1 g of dextran ($1.85 \cdot 10^{-2} \text{ mol}$ of hydroxyl) and 1 g of chloride terminated PHBHV oligomers ($M_n = 6800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $1.47 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$) were dissolved in 10 mL of hot anhydrous DMSO with 40 μL of pyridine. The mixture was allowed to react at 100°C for 3h. The solution was precipitated in ethanol and filtered. The solid product was then stirred 1 hour in CHCl_3 and the solution was refluxed at 60°C . The solution was filtered two times to remove unreacted PHBHV that is soluble in CHCl_3 .

Synthesis of tosyl dextran. Typically, 2 g of dextran were solubilized under argon in 50 mL DMAc at 80°C with 1.2 g ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) of LiCl until a clear solution appears. The solution was cooled in an ice bath, 10.24 mL of Et_3N in DMAc (10 mL) and subsequently 7.04 g of *p*-

TsCl in 10 mL of DMAC were added dropwise to the mixture. The solution was allowed to react at ambient temperature under stirring for 24h. The product was isolated by precipitation in 500 mL of cold water, washed two times with 100 mL water and 2-propanol, respectively, and dried at 60°C under vacuum.

Synthesis of deoxy-azido tosyl dextran. Typically, 3.35 g ($5.15 \cdot 10^{-2}$ mol) of NaN_3 were added to a solution of 2 g of tosyl dextran with a $\text{DS}_{\text{Tos}}=2.9$ ($1.03 \cdot 10^{-2}$ mol of tosyl groups) in 20 mL DMSO and the solution was allowed to react for 48h. The product was isolated by precipitation in 100 mL of 2-propanol followed by centrifugation and washed two times with 20 mL of 2-propanol. The product was then dried at 60°C under vacuum.

Preparation of alkyne terminated PHBHV oligomers. 250 mg of PHBHV ($2.8 \cdot 10^{-6}$ mol) were dissolved in 2.5 mL of dried chloroform in a seal-capped tube with a magnetic bar at 100 °C in an oil bath. 67 μL of propargyl alcohol ($1.15 \cdot 10^{-3}$ mol) and 68 μL of dibutyltin dilaurate ($1.15 \cdot 10^{-4}$ mol) were introduced and the mixture was stirred at 100°C for 10 hours. At the end of the reaction, 5 mL of chloroform were added and the solution was precipitated in petroleum ether. The solid obtained was dried under vacuum at 80 °C overnight.

Preparation of graft copolymers by CuAAC reaction (copolymers 5-9). 150 mg of deoxy-azido tosyl dextran ($\text{DS}_{\text{N}_3}=1.0$, $\text{DS}_{\text{Tos}}=0.7$, $5.29 \cdot 10^{-4}$ mol of azide functions) and 150 mg of PHBHV alkyne oligomers ($M_n = 900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $1.67 \cdot 10^{-4}$ mol) were dissolved in 5 mL of hot DMSO. 32 mg of CuI ($1.68 \cdot 10^{-4}$ mol) and 35 μL of PMDETA ($1.68 \cdot 10^{-4}$ mol) were added and the mixture was stirred at 100°C for 72h. The product was purified by dialyzing against distilled water for 1 week with a MWCO of 1000 Da and then lyophilized. The dialysis solution was changed once a day.

Nanoparticles preparation. The particles of copolymers synthesized by CuAAC and esterification reactions were obtained by two different procedures. For the first ones, 10 mg of the product were dissolved in 1 mL of CH_2Cl_2 and added to 10 mL of milliQ water under high magnetic stirring. The emulsion is then quickly sonicated with a sonic probe Bioblock

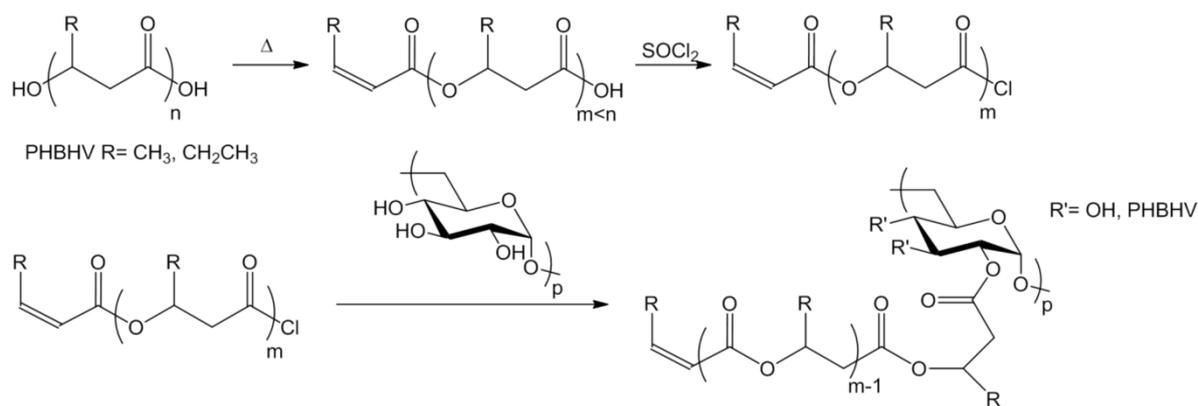
Scientific Vibracell 75043 (750W with amplitude of 25%) for 2 min with 1 sec pulses. The CH_2Cl_2 was then removed by rotary evaporation and the total volume adjusted at 10 mL. The copolymers obtained by esterification were suspended in water at 1 mg/mL, manually shaken and filtered on 0.8 μm before analysis. Samples for zeta potential were prepared in a 10^{-3} mol.L $^{-1}$ NaCl solution.

Characterization. NMR spectra were recorded using a Bruker 400MHz NMR spectrometer. FTIR spectra were recorded on a Bruker Tensor 27 spectrometer with 32 scans equipped with an ATR apparatus. The particles sizes and zeta potentials were determined on a Malvern zetasizer Nano ZS using a laser beam at 633nm and a scattering angle of 173°. The equilibrium water contact angle was measured by a contact angle measurement system Krüss EasyDrop DSA15S at room temperature.

2.2.4. Results and Discussion

2.2.4.1. Synthesis of graft copolymers dextran-g-poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

Graft copolymers dextran-g-poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), Dextran-g-PHBHV, were prepared via two “grafting onto” methods. In the first one, the copolymers were prepared by direct esterification between chloride terminated PHBHV oligomers and dextran (**Scheme 1**). In the second method, PHBHV oligoesters containing an alkyne end group were grafted onto functionalized dextrane via a click chemistry reaction (**Scheme 2**). Various methods were developed to prepare PHBHV oligoesters like acid catalyzed methanolysis [23-25], transesterification reaction [26-27] and thermal treatments [28-29]. The end groups were dependent on the chosen method.



Scheme 1: Reaction scheme of the preparation of dextran-g-PHBHV by esterification.

Thermal treatments were allowed to proceed for 1-3 hours to produce well-defined PHBHV oligomers with molar masses from 6800 to 1300 g. mol⁻¹. PHBHV oligomers had a carboxylic end group at one side and an unsaturated group on the other side resulting from a cis-elimination. Then, the formation of chloride oligomers was made with thionyl chloride in chlorobenzene. The reaction was followed by FTIR. The most prominent marker band for PHBHV was the ester carbonyl band near 1730 cm⁻¹. After 2 hours of reaction with thionyl chloride a band at 1800 cm⁻¹ had appeared attesting the presence of an acid chloride group (**Figure 1a**). Direct grafting by esterification was realized by mixing chloride oligoester and dextran in different conditions (**Table 1**). FTIR spectra of dextran before and after grafting are shown in **Figure 1(b,c)**. The band at 1644 cm⁻¹ was attributed to the absorption band of hydroxyl group of dextran. An absorption band at 1730 cm⁻¹ assigned to the carbonyl band of polyester was detected after grafting attesting the presence of PHBHV. To compare the characteristic of the grafting the ratio $A_{1730/1644}$ of the FTIR absorbance of the C=O at 1730 cm⁻¹ to the absorbance at 1644 cm⁻¹ was considered.

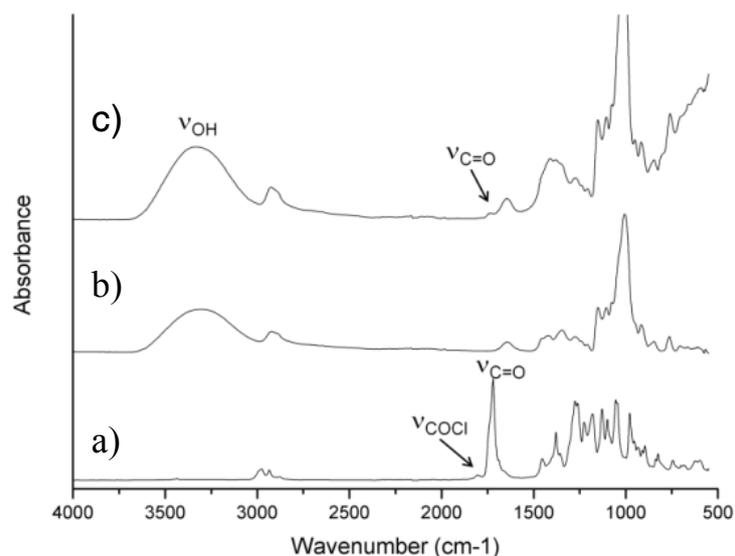


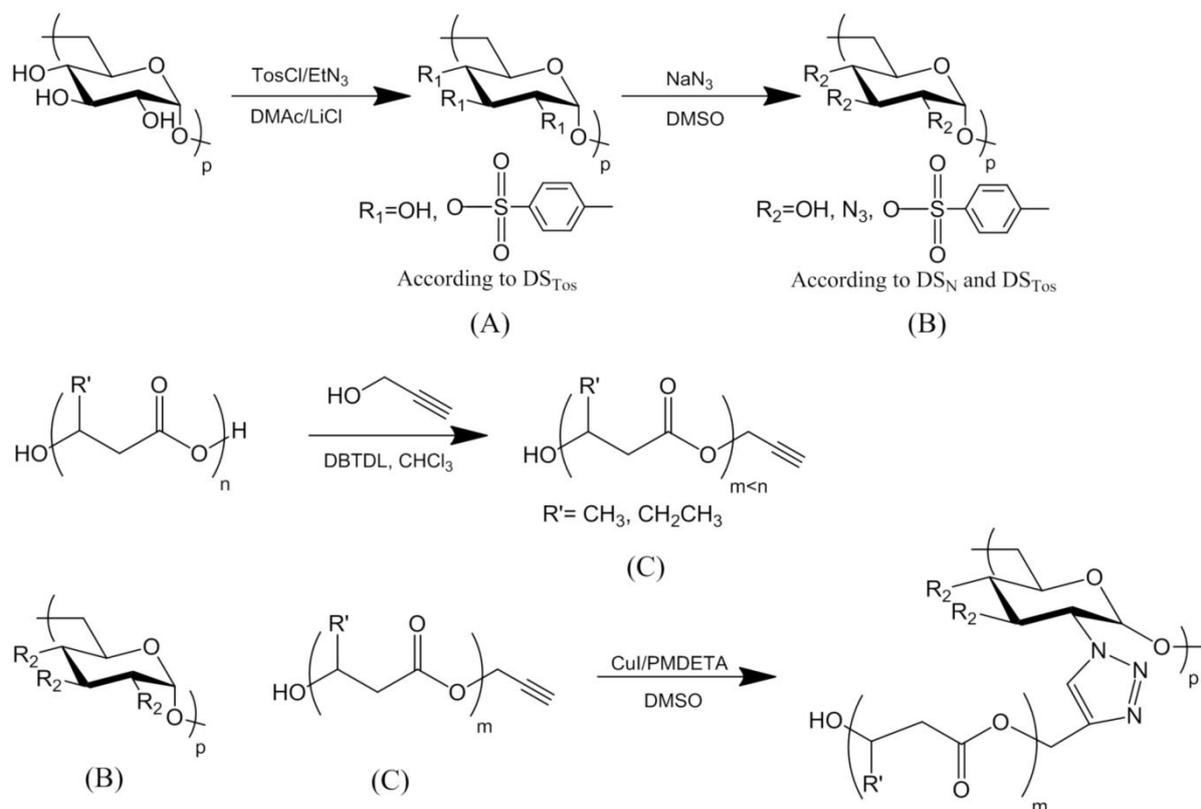
Figure 1: FT-IR spectra of (a) chloride terminated PHBHV oligomer (b) dextran and (c) dextran-g-PHBHV prepared by esterification.

Table 1: Conditions for and results of esterification of dextran ($M_n = 6500 \text{ g.mol}^{-1}$) and chloride terminated PHBHV at 100°C for 3h.

Sample	$M_{n\text{PHBHV}} \text{ (g.mol}^{-1}\text{)}$	PHBHV/Dex (w/w)	Solvent	A_{1730}/A_{1644}
1	1300	1/1	DMSO	0.21
2	6800	1/1	DMSO	0.22
3	6800	5/1	DMSO	0.23
4	6800	1/1	-	0.25

For the copolymers obtained by esterification in DMSO, increasing the initial ratio of PHBHV to dextran from 1:1 to 5:1 did not increase the FTIR signals ratio which was around 0.23, indicating that no more PHBHV were grafted. The same ratios were achieved when the grafting was conducted in bulk but the obtained products were yellowish which might be the sign of a possible degradation of the dextran backbone. Whatever the molar mass of the oligoesters, the ratio determined by FTIR was nearly the same. Considering that the absorbance at 1730 cm^{-1} was characteristic of the ester groups of the polymer due to the

length of oligoester chains but also to the grafting density, we can conclude that the degree of grafting was more important when the molar mass of the oligoesters was lower due to the reactivity of the chloride end group.



Scheme 2: Reaction scheme of the synthesis of dextran-g-PHBHV by CuAAC click reaction.

Graft copolymers were also prepared by click chemistry. The alkyne end group of PHBHV was used to react with deoxy-azido tosyl dextran using the copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition. Firstly, oligoesters with an alkyne end group were prepared in a one step reaction by direct alcoholysis in chloroform, in presence of propargyl alcohol and using dibutyltin dilaurate as catalyst. Different reaction times were used to obtain a range of molar masses from 6200 to 900 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ as previously described [30]. The chemical structures of the functionalized PHBHV oligomers were also confirmed by ^1H NMR (**Figure 2**) with the

appearance of a new signal at 4.65 ppm (**k**, OCH_2CCH). The CH-OH end group noted **i**, had a resonance at 4.18 ppm, while the CH of the backbone, noted **c** had a resonance at 5.25 ppm.

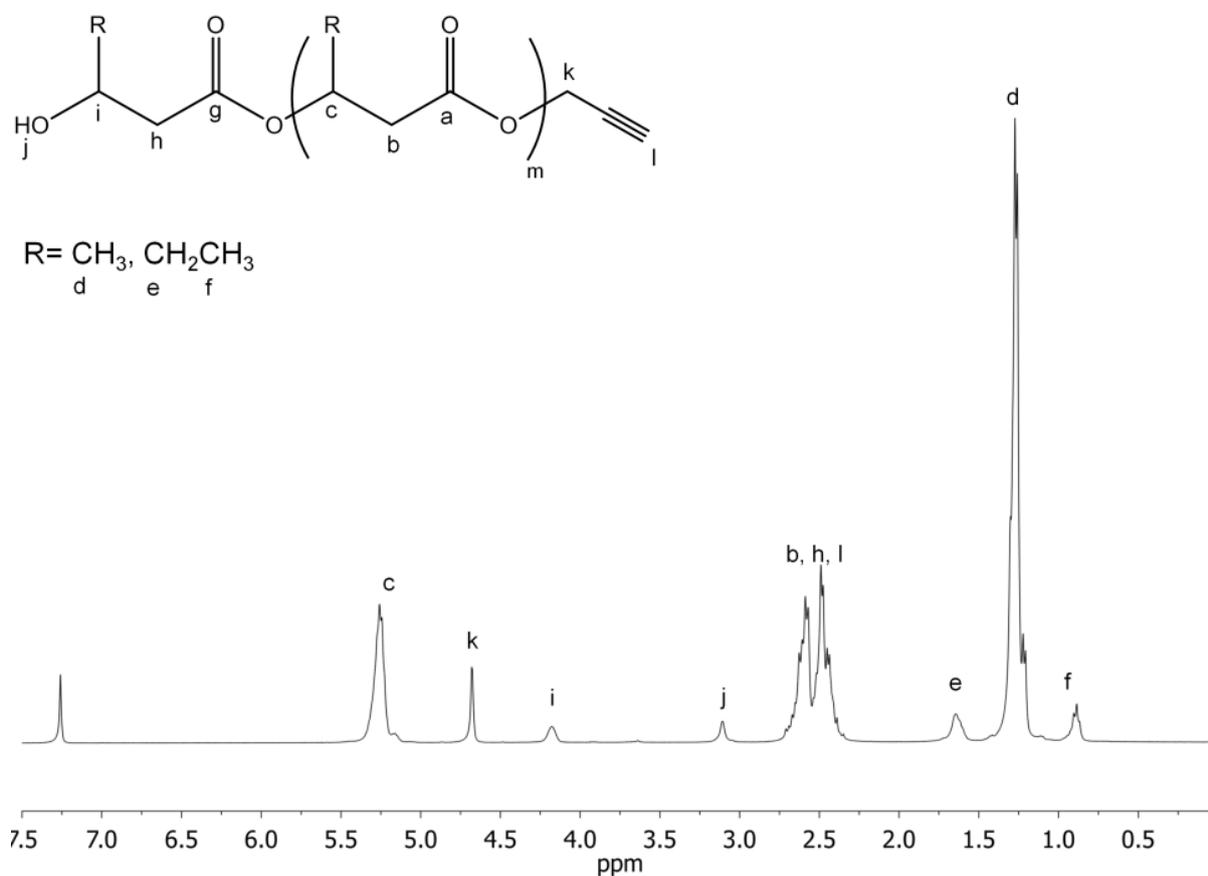


Figure 2: ^1H NMR spectrum in CDCl_3 of an alkyne terminated PHBV oligomer ($M_n = 900 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

The azide functionalization strategy of dextrane was based on two steps (**Scheme 2**). First the starting dextran dissolved in DMAc/LiCl was allowed to react at ambient temperature with *para*-toluenesulfonic acid chloride in the presence of triethylamine [8]. A typical ^1H NMR spectrum of **Intermediate (A)** including the peak assignment is shown in **Figure 3**. We noticed the appearance of new peaks for aromatic (**8,9**) and methyl groups (**11**) of tosylate groups. The DS_{Tos} values of the products were calculated by means of ^1H NMR spectra using the following equation:

$$DS_{\text{Tos}} = \frac{I_{8.0-7.0\text{ppm}}}{I_{5.9-3.9\text{ppm}}}$$

where $I_{8.0-7.0\text{ ppm}}$ was the integration of the four aromatic protons of the tosyl moieties (**8,9**) and $I_{5.9-3.9\text{ ppm}}$ was the integration of the anomeric proton, residual hydroxyl and tosyl substituted glucosidic protons.

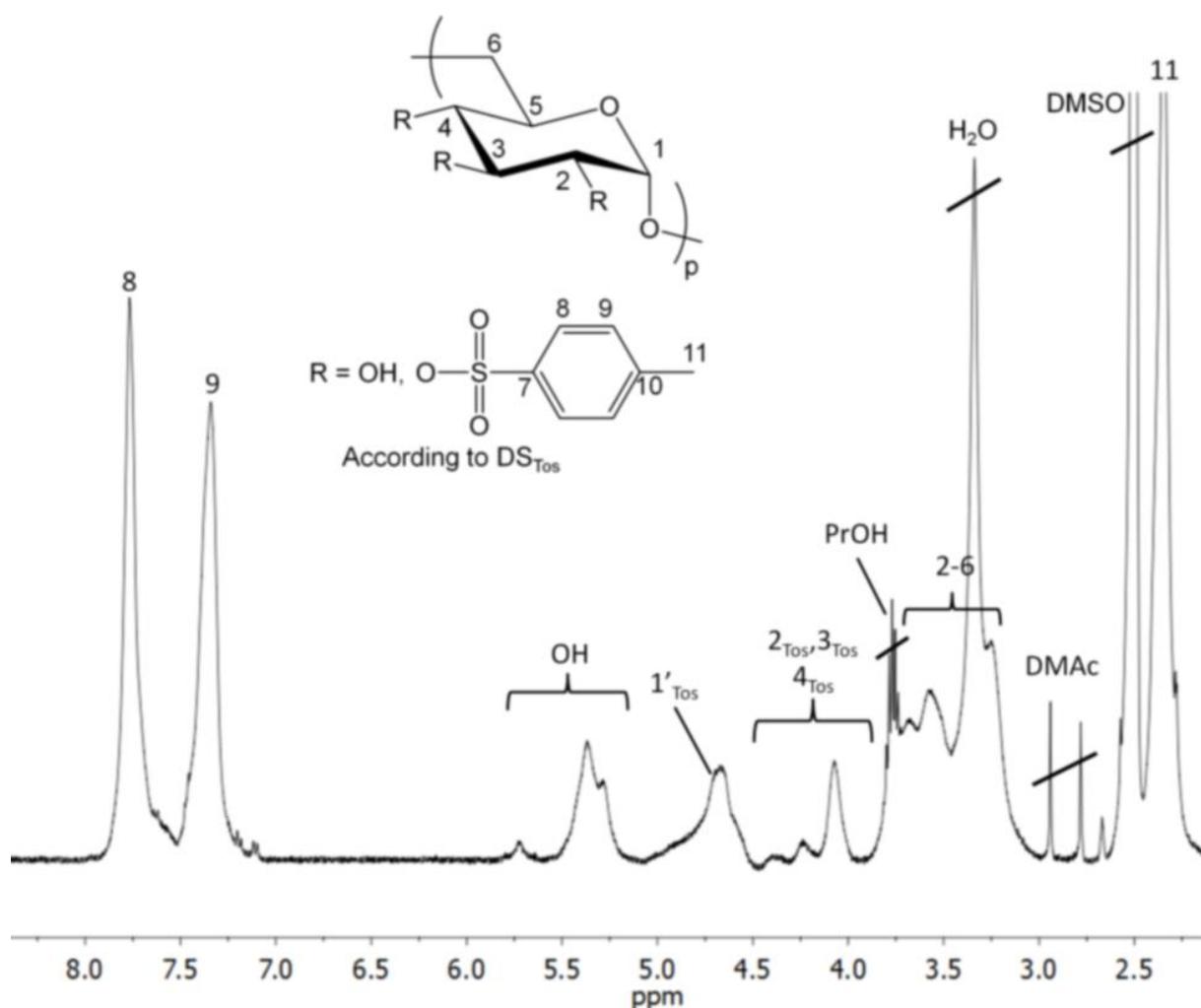


Figure 3: ¹H NMR spectrum of tosyl dextran (intermediate (A)) in DMSO-*d*₆. 1'_{Tos} means tosyl at a neighboring atom. Degree of substitution of tosyl groups DS_{Tos} = 1.7.

Surprisingly, the tosylation of dextran did not occur in DMF/LiCl under our conditions. The degree of substitution of tosyl moieties DS_{Tos}, calculated from the ¹H NMR spectra, was

controlled by the molar ratio of anhydroglucose units (AGU) to tosyl chloride, the reaction time and by the concentration of dextran (**Table 2**). The reaction was shown to lead to higher DS_{Tos} , from 1.3 to 1.7, when increasing the molar ratio of AGU to tosyl chloride from 1:3 to 1:5 with a 24 h reaction time. Increasing the time of reaction from 24 h to 65 h, with a molar ratio of 1:5, allowed to achieve a near-complete tosylation with a DS_{Tos} of 2.9 instead of only 1.7.

Table 2: Conditions for and results of tosylation of dextran ($M_n = 6500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) with *p*-toluenesulfonyl chloride in the presence of triethylamine.

Molar ratio ^{a)}	Solvent	[Dextran] ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	t (h)	DS_{Tos}
1 : 3 : 6	DMF/LiCl	40	65	0.01
1 : 5 : 10	DMF/LiCl	40	65	0.02
1 : 3 : 6	DMAc/LiCl	40	24	1.3
1 : 5 : 10	DMAc/LiCl	40	24	1.7
1 : 5 : 10	DMAc/LiCl	33.3	65	2.3
1 : 5 : 10	DMAc/LiCl	40	65	2.9

^{a)}Molar ratio of alcohol : tosyl chloride : Et_3N .

The tosyl dextran dissolved in DMSO was allowed to react with an excess of NaN_3 at 100°C for 44 h to substitute the tosylate moieties (**Table 3**). Intermediate (**B**) showed typical signal of the N_3 moiety at about 2100 cm^{-1} in the FTIR spectrum (**Figure 4A**).

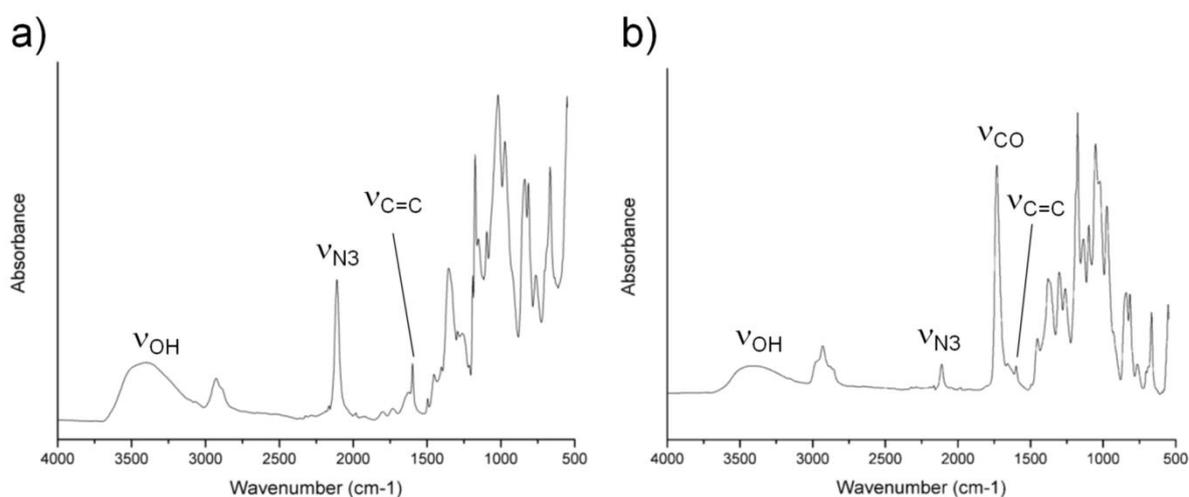


Figure 4: a) FTIR of deoxy-azido tosyl dextran (Intermediate (B)) with a degree of substitution of tosyl groups $DS_{Tos} = 0.7$ and of deoxy-azido groups $DS_{N_3} = 1.0$. b) FTIR of deoxy-azido tosyl dextran grafted with PHBHV by CuAAC reaction (copolymer 5).

Table 3: Conditions for and results of azidation of tosyl dextran with NaN_3 in DMSO.

DS_{Tos}	T (°C)	t (h)	Molar ratio ^{a)}	DS_{N_3}	ΣDS
1.7	100	44	1 : 5	1.0	1.7
2.9	100	44	1 : 5	1.0	2.9

^{a)}Molar ratio of tosyl groups : sodium azide.

For both samples with initial DS_{Tos} of 1.7 and 2.9, the resulting degree of substitution of N_3 is 1.0 in agreement with the results obtained by Heinze et al [8]. The DS_{N_3} were calculated from the 1H NMR spectra as the difference between the DS_{Tos} before and after the reaction using the same equation as above. NMR investigations (**Figure 5**) confirmed the structure of intermediate B. We observed the typical signals of polymer backbone, the tosylate moieties. The signals at 96 and 98 ppm were attributed to the C1 when influenced by a tosylate at C2 or an azide function at C2 respectively.

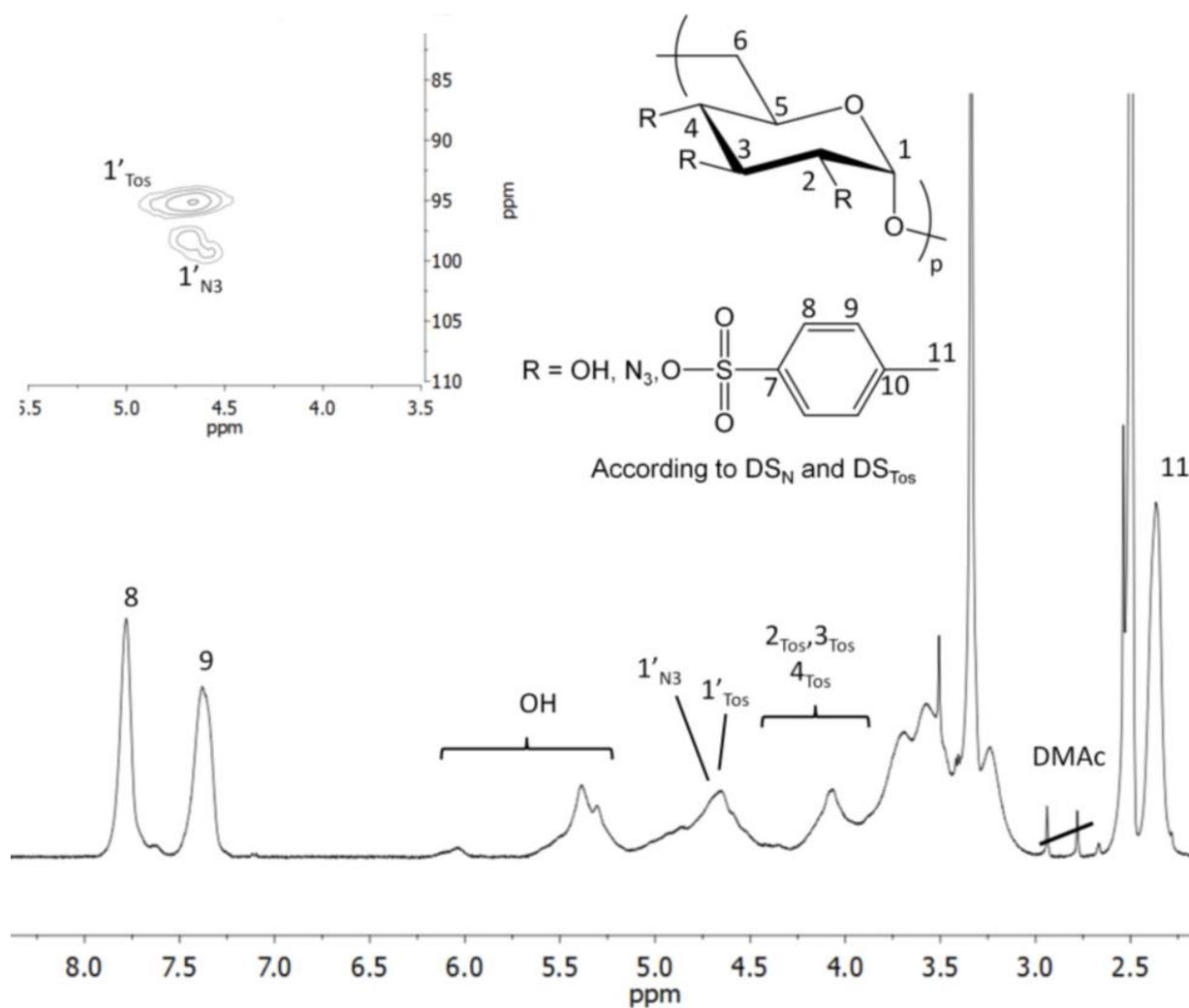


Figure 5: NMR spectra of deoxy-azido tosyl dextran (intermediate (B)) in DMSO- d_6 . 1' means substituted at a neighboring atom. Degree of substitution of tosyl groups $DS_{Tos} = 0.7$, of deoxy-azido groups $DS_N = 1.0$.

Then dextran samples bearing tosyl and azido moieties were reacted at 100°C in DMSO for 48 h with alkyne terminated oligomers of PHBV of different lengths (**Table 4**) in presence of CuI and PMDETA which is typical of the CuAAC reaction. The weight ratio between PHBV and dextran was kept at 1:1. The resulting copolymers were purified by dialysis against water.

Table 4: Conditions for and results of reactions of deoxy-azido tosyl dextran ($M_n = 6500 \text{ g.mol}^{-1}$) and alkyne terminated PHBHV oligomers at a mass ratio of 1/1 with CuI and PMDETA in DMSO at 100°C for 48h.

Sample	DS_N/DS_{Tos} ^{a)}	$M_{n_{PHBHV}}$ ^{a)}	PHBHV/Dextran (mol/mol)	A_{1730}/A_{1644} ^{b)}	DS_{PHBHV} ^{b)}
5	1.0/0.7	900	7.4/1	11.8	0.19
6	1.0/0.7	6000	1.1/1	12.3	0.03
7	1.0/1.9	1000	6.6/1	12.3	0.17
8	1.0/1.9	1400	4.6/1	14.0	0.12
9	1.0/1.9	6200	1.0/1	11.7	0.03

^{a)} Determined by ^1H NMR. ^{b)} Determined by FTIR.

The success of the reaction was confirmed by the disappearance on NMR spectra of the signal at 4.7 ppm characteristic of the CH_2 in alpha of the alkyne bond of the PHBHV oligomers (**Figure 6**). It can be assumed from the NMR analysis that all alkyne functions had reacted with azide functions which were in large excess. The signal of the CH_2 (\mathbf{k}') in alpha of the triazole ring was found at 5.1 ppm. Thus the degree of substitution of PHBHV (DS_{PHBHV}) grafted onto the dextran backbone could be calculated from the initial molar ratio with the following equation and were found to range from 0.03 to 0.19 (**Table 4**).

$$DS_{PHBHV} = \frac{n_{PHBHV}}{n_{Dext} \cdot DP_{nDext} \cdot DS_N}$$

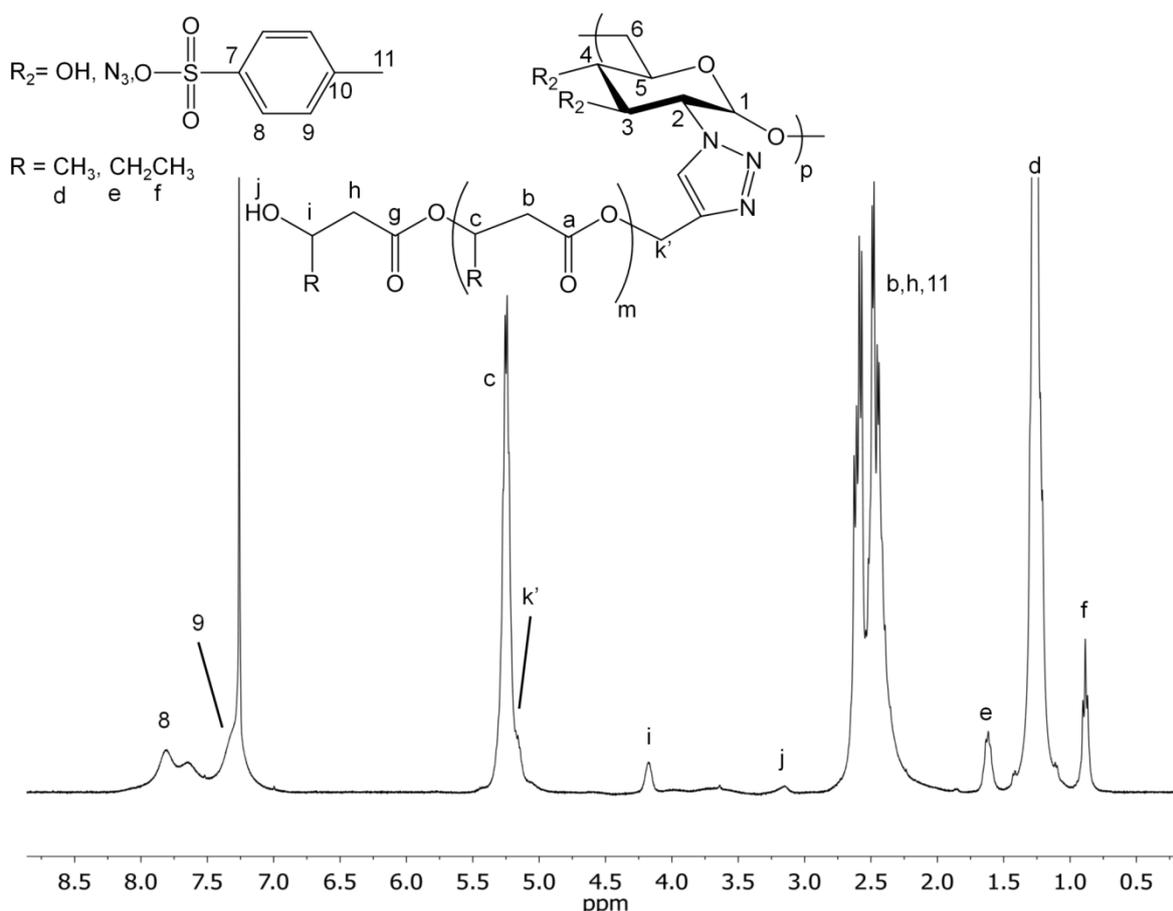


Figure 6: ^1H NMR spectrum in CDCl_3 of deoxy-azido tosyl dextran grafted with PHBV by CuAAC reaction (copolymer 5).

By comparison of the ratio $A_{1730/1644}$, determined by FTIR and previously defined, grafting reaction was more efficient when the reaction proceeded by click chemistry rather than direct esterification (**Figure 4B**). FTIR ratio was above 11.8, whereas it was near 0.20 by using direct esterification. By using click chemistry reactions, the presence of PHBV was also visible on the NMR spectrum. Consequently the properties of the copolymers obtained by these two ways were different due to the proportion of PHBV grafted.

2.2.4.2. Properties of Dextran-g-PHBHV copolymers

Thermogravimetric analyses of graft copolymers were performed to evaluate the effect of the presence of PHBV grafts on the course of degradation (**Figure 7**). Dextran was

thermally stable up to 280°C and showed partial degradation until 300°C. The presence of PHBHV did not affect the thermal stability of graft copolymers **1-4** obtained by esterification. The content of PHBHV was too low to have an influence on the thermal properties of the dextran. For the copolymers **5-9** obtained by click chemistry the PHBHV content was more important and the degradation started at 200°C, before the degradation of PHBHV. This was due to the intermediate deoxy-azido tosyl dextran that was more sensitive to thermal degradation than initial dextran. In this case, the presence of the PHBHV grafts enhanced the thermal resistance. Thus, all grafted copolymers were thermally stable until 200°C.

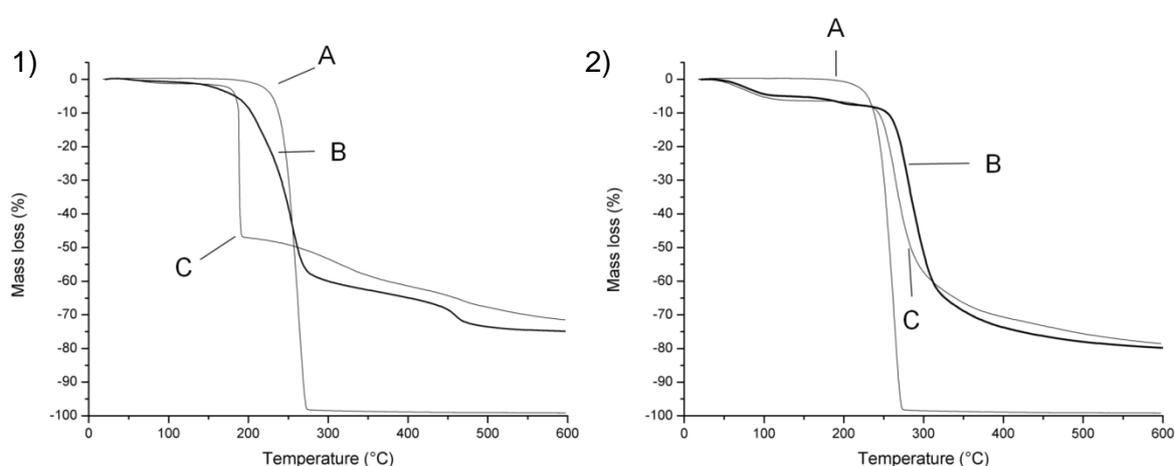


Figure 7: Thermograms of a PHBHV oligomer ($M_n = 900\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (**1A**), deoxy-azido tosyl dextran grafted with PHBHV, copolymer 5, (**1B**) and deoxy-azido tosyl dextran (**1C**), Thermograms of a PHBHV oligomer ($M_n = 6800\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (**2A**), dextran-g-PHBHV, copolymer 2 (**2B**) and dextran (**2C**).

The intermediates B, deoxy-azido tosyl dextran samples, were well soluble in DMSO, THF and acetone independently of the DS values and insoluble in chloroform. After PHBHV grafting by click chemistry the dextran-g-PHBHV copolymers (**5-9**) were soluble in chloroform that is a good solvent of PHBHV. Nevertheless, when the content of PHBHV was less important, in the case of grafting by esterification, the copolymers (**1-4**) were only soluble in DMSO. The content of PHBHV was not high enough to change the polarity of the graft copolymers.

Amphiphilic copolymers can be used to prepare nanoparticles in water from self assembling of hydrophobic domains inside the core and a more hydrophilic shell. Dextran-g-PHBHV copolymers were able to self-assemble and the sizes of the particles formed were analyzed by DLS. Although some aggregates of micrometric size remained and the samples had to be filtered on a 0.8 μm cellulose acetate filter to allow DLS measures of good quality, tests of mass recovery after filtration reveal that more than 85% of the initial mass was retrieved after filtration. Copolymers **1-4** gave particles with an average size between 294 and 341 nm (**Table 5, Figure 8**). Nanoparticles from copolymers obtained by esterification were prepared by direct dispersion in water without using surfactant. When the content of PHBHV grafting is more important the nanoparticles were prepared by an emulsification–solvent evaporation process. Copolymer **5** can self-assemble in stable nanoparticles with a diameter of 160 nm and a low PDI of 0.140, without the use of surfactant (**Figure 8**). The presence of dextran at the nanoparticles surface was also investigated by zeta potential measurements. PHBHV nanoparticles exhibited a negative surface charge, as indicated by their high negative zeta potential (-50.5 mV). Similar values have already been found with other polyesters [31,32] and have been attributed to the presence of carboxyl end groups located near the surface. The zeta potential of copolymers was related to the dextran content in the copolymer. Dextran alone also presents a negative zeta potential value of -20.7 mV, which is usual for polysaccharides [33]. When the dextran content increased in the copolymers, the zeta potential of the nanoparticles increased, probably because the dextran coating shielded the strong negative surface charge of the PHBHV core. For sample **2**, the zeta potential of -22.3 mV, was found to be close to the one of dextran thus indicating that the dextran layer was sufficient to mask the PHBHV surface charges.

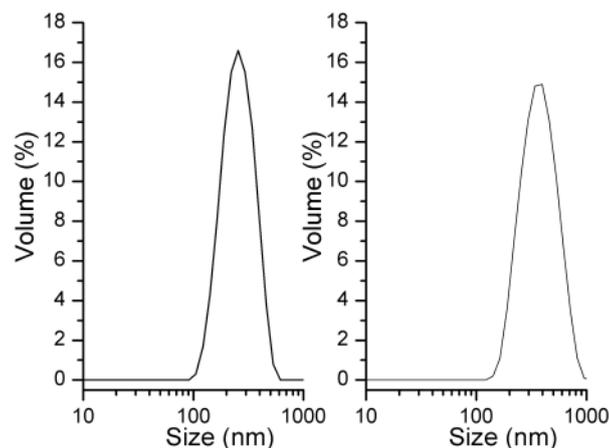


Figure 8: Particle size distribution analyzed by dynamic light scattering (DLS) of a) deoxy-azido tosyl dextran-*g*-PHBHV (copolymer 5) obtained by click reaction and b) dextran-*g*-PHBHV obtained by esterification (copolymer 2).

In order to precise the influence of the PHBHV grafts on the physical properties of dextran, films were prepared by solvent evaporation and contact angle measurements were performed to estimate the change of hydrophilicity of the grafted dextran compared to the native dextran. The water contact angle of dextran was not measurable because of its hydrophilic behavior whereas the contact angle was about 90° for the dextran-*g*-PHBHV copolymers. This great difference was due to the influence of the hydrophobic PHBHV. In contrast, when the proportion of PHBHV grafts was less important, the contact angle was about 20°, that is an intermediate value between the contact angles of PHBHV (92°) and dextran. These materials could be good candidates as biocompatible and hydrophilic but non soluble coatings. By varying the proportion of PHBHV grafts, it is possible to obtain tailor made copolymers with different hydrophilic/hydrophobic balance.

Table 5: Properties of graft copolymers.

Reaction	Sample	Mn _{PHA} (g.mol ⁻¹)	Contact angle ^{a)} (°)	Solubility in CHCl ₃	Diameter ^{b)} (nm)	PDI ^{b)}
Esterification	1	1300	22	-	313	0.406
	2	6500	21	-	294	0.330
	3	6500	21	-	341	0.157
	4	6500	23	-	335	0.382
Click chemistry	5	900	68	+	160	0.140
	6	6000	87	+	nd	nd
	7	1000	90	+	nd	nd
	8	1400	90	+	nd	nd
	9	6200	88	+	nd	nd

^{a)}Determined by water contact angle measurements on films. ^{b)}Determined by DLS on nanoparticles

2.2.5. Conclusion

Two strategies have been used to prepare biodegradable grafted copolymers combining a dextran backbone together with PHBHV grafts. These synthesis procedures allowed the preparation of various grafted copolymers differing by structural parameters: the number of PHBHV side chains attached to the dextran backbone and the length of the PHBHV grafts. Varying these two structural parameters the graft copolymers have different properties. Click chemistry approach appeared as an efficient method to increase the proportion of PHBHV grafts and the presence of reactive groups, e.g, tosylate moieties could be interesting

to bind bioactive molecules to develop novel heterofunctional nanoparticles. The versatility of PHAs and derivatives is a major motivation for developing new polyester-based frameworks and biocompatible scaffolds in the biomedical area.

2.2.6. Acknowledgments

The authors would like to thank CNRS and IFREMER for financial support.

2.2.7. References

- [1] H. M. Muller, D. Seebach, *Angew. Chem., Int. Ed.* 32 (1993) 477-502.
- [2] A. Steinbuchel, H. E. Valentin, *Fems Microbiology Letters* 128 (1995) 219-228.
- [3] S. Y. Lee, *Biotechnology and Bioengineering* 49 (1996) 1-14.
- [4] G. Q. Chen, *Chemical Society Reviews* 38 (2009) 2434-2446.
- [5] G. Q. Chen, Q. Wu, *Biomaterials* 26 (2005) 6565-6578.
- [6] R. Rai, T. Keshavarz, J. A. Roether, A. R. Boccaccini, I. Roy, *Materials Science & Engineering R-Reports* 72 (2011) 29-47.
- [7] R. Mehvar, *J. Controlled Release* 69 (2000) 1-25.
- [8] T. Heinze, N. Michealis, S. Hornig, *Eur. Polym. J.* 43 (2007) 697-703.
- [9] S. Dimitriu, *Polysaccharides in medical applications*. New York: Marcel Dekker.
- [10] E. Ostmark, D. Nyström, E. Malmström, *Macromolecules* 41 (2008) 4405-4415.
- [11] C. Nouvel, C. Frochot, V. Sadter, P. Dubois, E. Dellacherie, J.L. Six, *Macromolecules* 37 (2004) 4981-4988.
- [12] I. Colinet, V. Dulong, T. Hamaide, D. Le Cerf, L. Picton, *Carbohydr. Polym.* 75 (2009) 454-462.
- [13] Y. Liu, F. Tian, K.A. Hu, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 845-851.
- [14] F. Palumbo, G. Pitarresi, D. Mandracchia, G. Tripodo, G. Giammona, *Carbohydr. Res.* 66 (2006) 379-385.
- [15] C. Schatz, S. Lecommandoux, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 1664-1684.

- [16] X. Samain, V. Langlois, E. Renard, G. Lorang, *J. Appl. Polym. Sci.* 121 (2011) 1183-1192.
- [17] V. Rostovtsev, L. Green, V. Fokin, K. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* 41 (2002) 2596-2599.
- [18] W. Binder, R. Sachsenhofer, *Macromol. Rapid Commun.* 28 (2007) 15-54.
- [19] W. Binder, R. Sachsenhofer, *Macromol. Rapid Commun.* 29 (2008) 952-981.
- [20] M. N. Tahir, N. Lammerhardt, P. Mischnick, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 154-164.
- [21] S. C. Abeylath, M. M. Amiji, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 6167-6173.
- [22] N. Pahimanolis, A. H. Vesterinen, J. Rich, J. Seppala, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 78-82.
- [23] R. Gross, S. Mc Carthy, M. Reeve, U.S. Patent (1995) 5439985.
- [24] G. Yu, R. H. Marchessault, *Polymer* 41 (2000) 1087-1098.
- [25] L. Timbart, E. Renard, M. Tessier, V. Langlois, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1255-1265.
- [26] T. Hirt, P. Neuenschwander, U. Suter, *Macromol. Chem. Phys.* 197 (1996) 1609-1614.
- [27] A. Andrade, B. Witholt, R. Hany, T. Egli, Z. Li, *Macromolecules* 35 (2002) 684-689.
- [28] S. Nguyen, G. Yu, R. H. Marchessault, *Biomacromolecules* 3 (2002) 219-224.
- [29] J. Ramier, D. Grande, V. Langlois, E. Renard, *Polym. Degrad. Stab.* 97 (2012) 322-328.
- [30] P. Lemechko, E. Renard, G. Volet, C. Simon Colin, J. Guezennec, V. Langlois, *React. Funct. Polym.* 72 (2012) 160-167.
- [31] C. Rouzes, M. Leonard, A. Durand, E. Dellacherie, *Colloids Surf., B* 32 (2003) 125-135.
- [32] C. Lemarchand, P. Couvreur, M. Besnard, D. Costantini, R. Gref, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1284-1292.
- [33] V. Wintgens, T. T. Nielsen, K.L. Larsen, C. Amiel, *Macromol. Biosci.* 11 (2011) 1254-1263.

2.3. Synthèse de dextrane-g-PHAMcl

Dans l'article précédent, une méthode de greffage du dextrane par des oligomères de PHBHV a été mise au point. Nous avons alors étendu ce protocole au greffage de PHAMcl sur le dextrane. Le PHAMcl utilisé a été produit par la souche *Pseudomonas guezenei* cultivée sur de l'huile de Coprah. Sa composition est indiquée dans le **schéma 3**.

Le PHAMcl est traité thermiquement pour obtenir un oligomère de 4500 g.mol^{-1} . Puis la fonction acide carboxylique terminale est activée avec du chlorure de thionyle pour former le chlorure d'acide. L'estérification avec le dextrane a lieu dans le DMSO anhydre dans lequel les deux polymères sont solubles. L'oligomère de PHAMcl étant un liquide visqueux à température ambiante, la dialyse a été préférée à la précipitation pour éliminer le DMSO. Le mélange réactionnel est donc dialysé avec une membrane en cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 1000 Da contre de l'eau distillée. Après lyophilisation, le solide récupéré est alors agité dans du chloroforme chaud (environ 50°C) puis filtré pour éliminer le PHA non greffé. Le rapport entre l'intensité de la bande à 1730 cm^{-1} du PHA et celle de la bande à 1644 cm^{-1} du dextrane est de 0,51 (**Figure 9**). Cette valeur est plus élevée que celles mesurées pour les copolymères préparés à partir de PHBHV qui sont d'environ 0,22. Ce taux de greffage légèrement supérieur pourrait s'expliquer par une solubilité du PHAMcl dans le DMSO bien supérieure à celle du PHBHV.

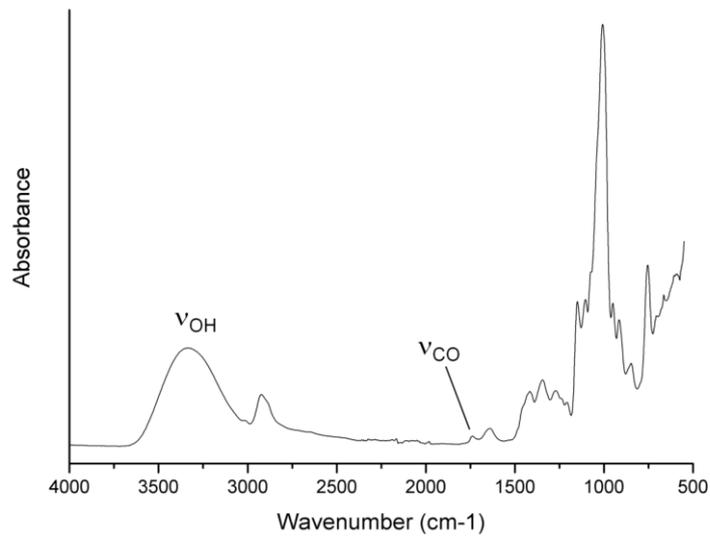


Figure 9: Spectre IRTF du copolymère dextrane-g-PHAMcl obtenu par estérification.

Comme pour les copolymères à base de PHBHV, ce copolymère est capable de s'auto-associer dans l'eau pour former des nano-particules. Une taille de 138 nm et un indice de polydispersité de 0.231 sont obtenus par analyse en DDL (**Figure 10**). La taille observée en DDL est sensiblement inférieure aux tailles observées pour les copolymères de PHBHV qui sont plutôt supérieures à 300 nm.

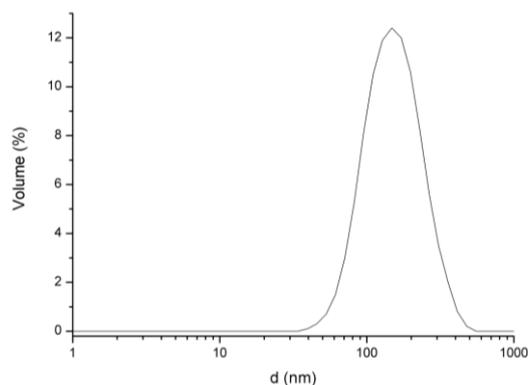


Figure 10: Distribution de la taille des particules formées par le copolymère dextrane-g-PHAMcl analysées en DDL.

Le protocole d'estérification semble bien adapté aux PHAmcl et il sera ensuite utilisé pour l'estérification des exopolysaccharides.

3. Synthèse de copolymères greffés amphiphiles à partir d'exopolysaccharides et de PHAs

L'un des buts de ces travaux était de pouvoir utiliser cette méthode pour préparer des copolymères à partir d'exopolysaccharides (EPS) marins. Ces EPS sont des polysaccharides sécrétés par certains micro-organismes et entrent dans la composition des biofilms. Ceux sécrétés par des souches bactériennes marines constituent l'un des axes de recherche du Laboratoire de Biotechnologie et Molécules Marines de l'IFREMER. L'un de ces EPS prometteurs est le HE800 dont la structure déterminée par Rougeaud et al. (Rougeaud 1999) est proche de celle de l'acide hyaluronique. Cet EPS est sécrété par *Vibrio diabolicus*, une bactérie isolée d'un site hydrothermal. Un deuxième EPS, l'EPS GG, fourni par le LBMM et est un don du Pr. G. Geesey de l'Université du Montana (USA), a également été utilisé. Cet EPS est un polysaccharide neutre de structure similaire à celle du dextrane.

Nous venons de voir que le protocole de synthèse de dextrane-g-PHA développé sur le PHBHV est aussi adapté aux PHAmcl. Nous avons donc appliqué ce protocole d'estérification pour la synthèse des quatre copolymères HE800-g-PHBHV, HE800-g-PHAmcl, GG-g-PHBHB et GG-g-PHAmcl. La capacité d'auto-association dans l'eau de ces copolymères a ensuite été analysée par DDL.

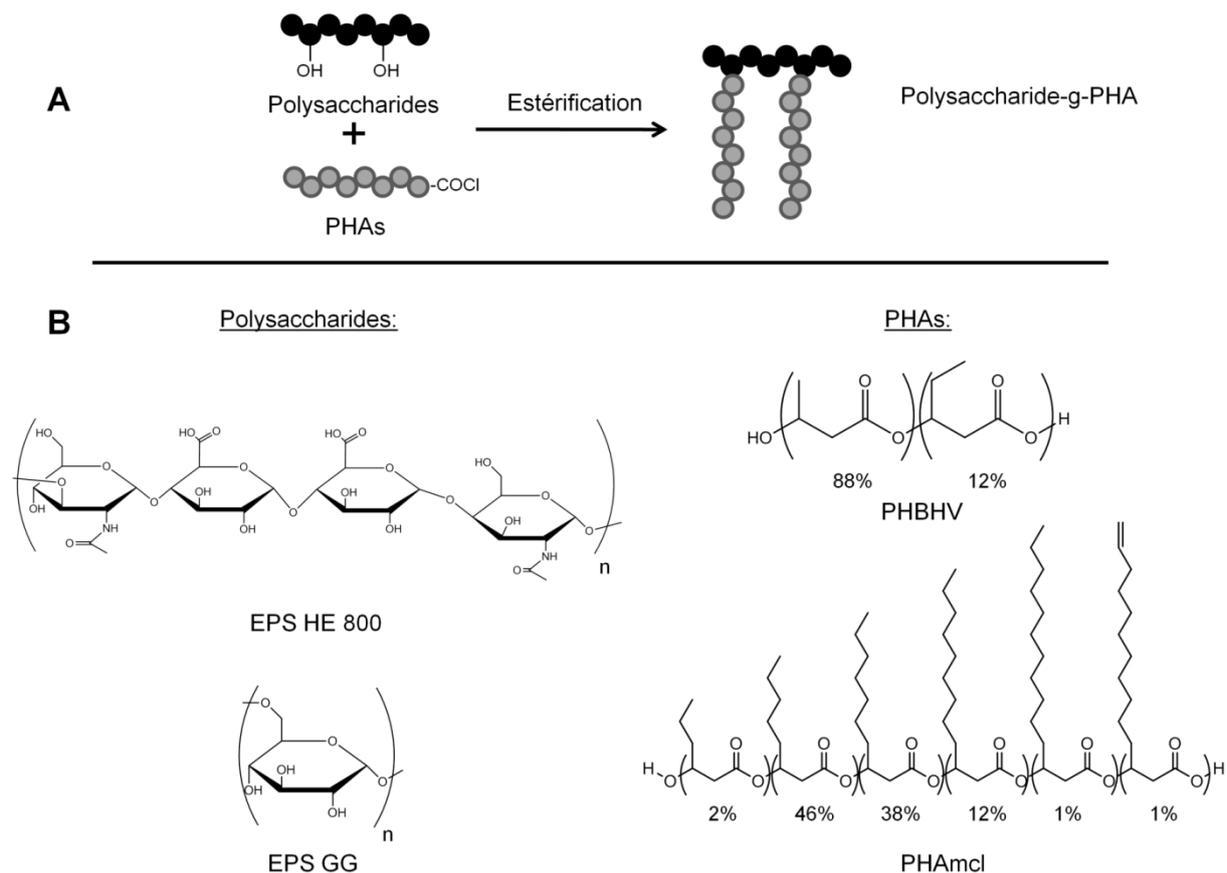


Schéma 3: A. Stratégie de synthèse des polysaccharide-g-PHA. B. Structures des polysaccharides et des PHAs utilisés.

Deux types de PHAs, un PHBHV (88/12) et un PHAmcl avec des chaînes latérales alkyles de 3 à 11 carbones, ont été greffés par estérification sur deux exopolysaccharides, l'EPS GG et l'EPS HE800 dont les structures sont présentées sur le **schéma 3**.

Les analyses IRTF des produits confirment le greffage (**Figure 11**). Pour l'EPS GG qui a une structure similaire au dextrane, les spectres IRTF sont semblables à ceux obtenus pour le dextrane. La bande à 1730 cm^{-1} caractéristique des fonctions ester des PHAs est clairement visible. Le rapport des bandes à 1730 et 1644 cm^{-1} est de 0,28 avec le PHBHV et 0,37 avec le PHAmcl. Comme pour les copolymères à base de dextrane, il apparait que le PHAmcl se greffe un peu plus facilement que le PHBHV.

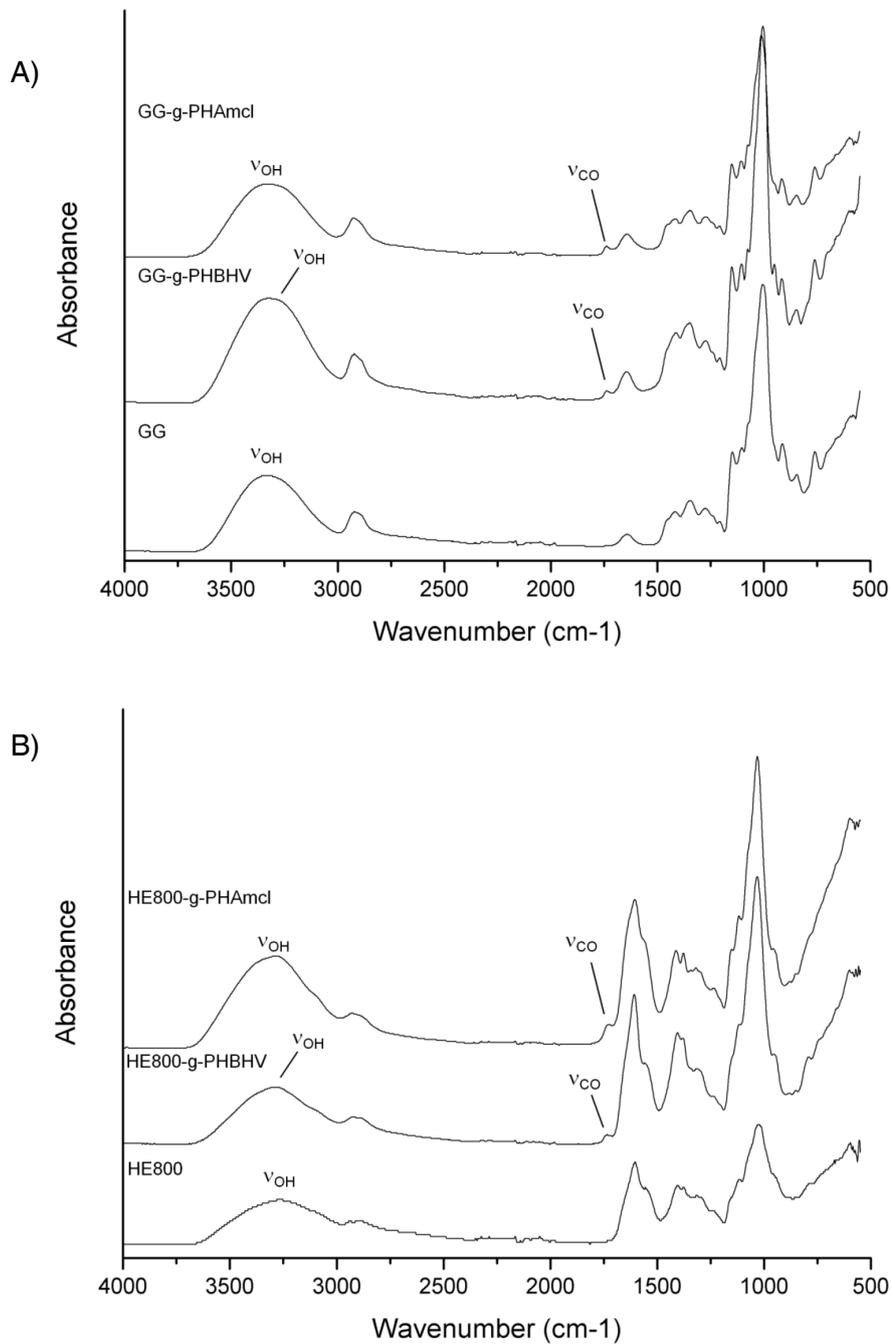


Figure 11: A) IRTF de l'EPS GG et des copolymères GG-g-PHBHV et GG-g-PHAmcl.
 B) IRTF de l'EPS HE800 et des copolymères HE800-g-PHBHV et HE800-g-PHAmcl.

Pour l'EPS HE800, le spectre IRTF du polysaccharide est différent de celui de l'EPS GG, dû à sa composition osidique proche de celle de l'acide hyaluronique, mais la bande à 1730 cm⁻¹ est là aussi bien visible. Il est possible de calculer le rapport entre l'intensité de la bande à 1730 cm⁻¹ correspondant aux esters des PHAs et celle de la bande à 1604 cm⁻¹

correspondant aux carbonyles de HE800. Ces rapports sont de 0,037 pour le copolymère à base de PHBHV et 0,099 pour celui à base de PHAmcl. Le rapport de bande plus élevé en faveur du PHAmcl se retrouve ici aussi avec ce polysaccharide.

Tableau 6: Préparation de différents copolymères EPS-g-PHA par estérification. La masse molaire (M_n) est déterminée par CES et le diamètre (d) et l'indice de polydispersité (IPD) des particules par DDL.

PHA	M_n (g.mol ⁻¹)	EPS	M_n (g.mol ⁻¹)	d (nm)	IPD
PHBHV	6500	GG	>2M	125	0,351
PHBHV	6500	HE800	3450	180	0,327
PHAmcl	4500	GG	>2M	123	0,136
PHAmcl	4500	HE800	3450	83	0,265

Comme pour les copolymères obtenus à partir du dextrane, ceux-ci sont insolubles dans l'eau et forment des nano-particules. Les analyses par DDL de ces particules nous donnent des diamètres de 83 à 180 nm avec des index de polydispersité compris entre 0,136 et 0,351 (**Tableau 6**). Les courbes de répartition obtenues par DDL (**Figure 12**) illustrent les dispersions calculées. Dans le cas des copolymères à base de GG, on voit que le choix du PHA n'influe pas sur la taille des particules tandis que pour le HE800, comme pour le dextrane, les copolymères de PHAmcl forment des nanoparticules plus petites.

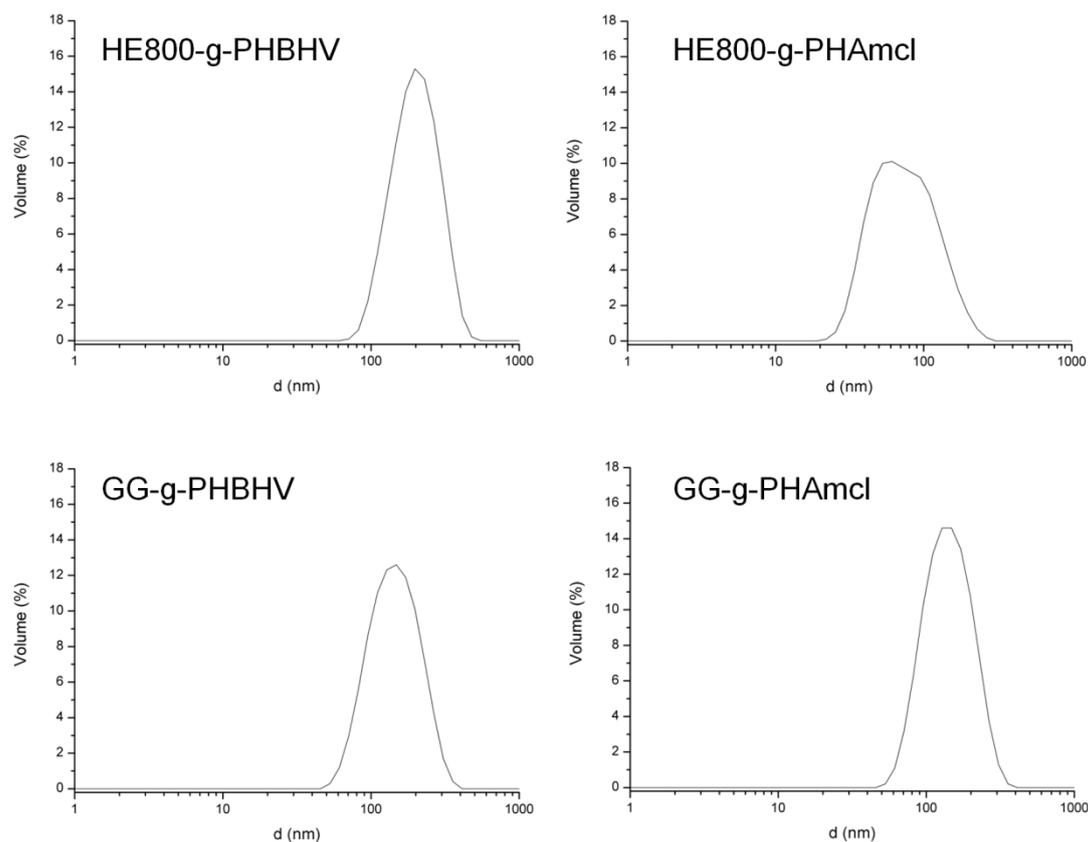


Figure 12: Distributions de la taille des particules formées par les copolymères EPS-*g*-PHA analysées en DDL.

L'adaptabilité du protocole d'estérification du dextrane par des oligomères de PHBV mis au point a été montrée d'abord en greffant un oligomère de PHAmcl sur du dextrane puis en greffant ces oligomères de PHAs sur deux EPS marins. Ces quatre copolymères originaux, entièrement biosourcés, biocompatibles et ayant des propriétés biologiques potentielles intéressantes, notamment le HE800, s'auto-associent dans l'eau et forment des nanoparticules.

4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié la synthèse de copolymères greffés amphiphiles à base de squelettes polysaccharides hydrophiles et de greffons PHAs hydrophobes. Nous avons d'abord étudié deux voies de synthèse pour préparer des copolymères de dextran-g-PHBHV.

La première voie de synthèse est le couplage par chimie click entre des greffons PHBV portant une fonction alcyne terminale et des dextrans modifiés avec des fonctions azotures latérales. La préparation des dextrans modifiés a été faite en deux étapes. Une étape de tosylation des alcools secondaires du dextrane suivie d'une étape de substitution nucléophile des groupements tosyles par de l'azide de sodium. Plusieurs conditions de réaction ont été utilisées pour la première étape et ont permis d'obtenir des dextrans tosylés avec des degrés de substitution allant de 1,3 à 2,9. Pour l'étape d'azidation, deux dextrans tosylés ont été utilisés et nous avons obtenu des degrés de substitution en azide de 1,0 et en tosyles résiduels de 0,7 et 1,9. A partir de ces dextrans et d'oligomères de PHBV portant une fonction alcyne terminale, plusieurs copolymères ont pu être synthétisés par réaction de Huisgen. L'analyse par RMN a montré que toutes les fonctions alcynes ont réagi ce qui nous a permis de calculer des degrés de substitution en PHBV des dextrans allant de 0,3 à 0,19.

Des copolymères ont aussi pu être obtenus par estérification directe entre la fonction chlorure d'acide terminale d'oligomères de PHBV et les alcools secondaires du dextrane. Les oligomères de PHBV sont obtenus par traitement thermique puis fonctionnalisés par du chlorure de thionyle. L'estérification est réalisée en solution dans le DMSO anhydre ou en masse. La présence de PHBV greffé est mise en évidence par spectroscopie infra-rouge, par la présence de la bande à 1730 cm^{-1} . Les degrés de substitution en PHBV de ces copolymères n'ont pu être déterminés mais semblent très faibles au vu des spectres infra-rouge. Toutefois ils sont suffisants pour changer les propriétés du dextrane. En effet celui-ci devient insoluble dans l'eau et peut être dispersé sous forme de nano-particules d'environ 300

nm. De plus ces copolymères forment des films hydrophiles, avec des angles de contact avec l'eau autour de 20°, sans se solubiliser.

L'adaptabilité du protocole d'estérification du dextrane par des oligomères de PHBHV mis au point a été montrée d'abord en greffant un oligomère de PHAmcl sur du dextrane puis en greffant des oligomères de PHBHV et de PHAmcl sur deux EPS marins, le HE800 et le GG. Ces quatre copolymères originaux, entièrement biosourcés, biocompatibles et ayant des propriétés biologiques potentielles intéressantes, notamment le HE800, s'auto-associent dans l'eau et forment des nanoparticules.

Le copolymère HE800-*g*-PHBHV a été choisi pour élaborer un nouveau matériau comme support de prolifération de cellules pour la régénération de tissu osseux. Il sera utilisé comme dépôt sur des fibres de PHBHV afin d'en rendre la surface hydrophile pour favoriser l'adhésion cellulaire. Les greffons de PHBHV devraient permettre d'améliorer la compatibilité entre le polysaccharide et les fibres de polyester pour une meilleure adsorption. Cette étude sera l'objet du chapitre suivant.

5. Références bibliographiques

Rougeaux, H., Kervarec, N., Pichon, R. and Guezennec, J., *Carbohydrate Research* **1999** 322 (1-2): 40-45.

Chapitre 5:

Préparation d'un support de croissance cellulaire

Chapitre 5: Préparation d'un support de croissance cellulaire

1. Introduction.....	203
2. Elaboration d'une structure tridimensionnelle à base d'exopolysaccharide-g-poly(3-hydroxyalcanoate): influence de l'EPS sur l'adhésion cellulaire.....	204
2.1. Résumé	204
2.2. Article 3: Designing Exopolysaccharide-graft-Poly(3-hydroxyalkanoate) Copolymers for Electrospun Scaffolds	206
2.2.1. Abstract	206
2.2.2. Introduction.....	207
2.2.3. Materials and Methods	209
2.2.4. Results and discussion.....	213
2.2.4.1. Synthesis of graft copolymer HE800-g-PHBHV.....	213
2.2.4.2. Scaffold preparation.....	215
2.2.4.3. Adhesion and Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells	218
2.2.5. Conclusion.....	221
2.2.6. Acknowledgements.....	222
2.2.7. References	222
3. Conclusion	224

1. Introduction

L'objectif de ce chapitre est de réaliser un biomatériau à partir de PHAs pouvant être utilisé dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Notre choix s'est porté sur la réalisation d'une architecture tridimensionnelle par électrospinning. Cette technique permet d'obtenir un réseau de fibres enchevêtrées de diamètre allant de quelques microns à la centaine de nanomètres suivant les conditions. Des réseaux de fibres de PHBHV par électrospinning ont déjà été étudiés dans la littérature. Ces matériaux possèdent des propriétés mécaniques intéressantes pour servir de support de croissance cellulaire et plusieurs types de cellules ont été cultivés. Toutefois, leur forte hydrophobicité impacte les capacités d'adhésion des cellules.

Nous proposons donc de pallier à cette limitation en introduisant un polysaccharide hydrophile, le HE800, à la surface des fibres. Pour cela nous utiliserons la technique de l'électrospraying afin de déposer la couche hydrophile sur les fibres de PHBHV au moment de leur formation par électrospinning. La mise au point du procédé d'électrospinning/électrospraying a été réalisé par Julien Ramier à l'ICMPE (Thiais, France). Afin d'améliorer la compatibilité entre les deux polymères et ralentir la solubilisation de la couche de polysaccharide, nous utiliserons un copolymère HE800-g-PHBHV préparé dans le chapitre précédent. Enfin nous évaluerons les propriétés apportées par le polysaccharide en utilisant le matériau comme support de croissance de cellules souches mésenchymateuses humaines. Ces cellules souches sont multipotentes et peuvent par la suite se différencier en ostéoblastes (tissu osseux), chondrocytes (cartilage), fibroblastes (tissu conjonctif), myocytes (fibres musculaire)... Ces cultures cellulaires ont été faites au Laboratoire Croissance, Réparation et Régénération Tissulaire (CRRET, UPEC, Créteil, France).

2. Elaboration d'une structure tridimensionnelle à base d'exopolysaccharide-g-poly(3-hydroxyalcanoate): influence de l'EPS sur l'adhésion cellulaire

2.1. Résumé

La synthèse du copolymère HE800-g-PHBHV a été faite par estérification d'après la méthode développée au chapitre 4.

Trois mats ont été préparés par électrospinning. Le mat témoin par électrospinning de PHBHV. Un mat par électrospinning de PHBHV et électrospraying simultané de HE800 et le dernier par électrospinning de PHBHV et électrospraying simultané de HE800-g-PHBHV. Les fibres de quelques micromètres de diamètre pour les trois mats sont bien orientées. Le dépôt de HE800 ou de copolymère est uniformément réparti sur les fibres. L'électrospraying de HE800 ou de copolymère diminue fortement l'hydrophobicité du matériau car l'angle de contact mesuré avec de l'eau diminue de 126 à 76°. Après 3 jours d'immersion dans l'eau, les photos de microscopie électronique à balayage montrent que dans le cas du mat contenant le HE800, le dépôt sprayé s'est solubilisé tandis que dans le cas du copolymère une partie est restée adsorbée à la surface des fibres sous la forme de granules en raison de l'insolubilité du copolymère.

Afin de démontrer la biocompatibilité de ces matériaux et leur capacité à servir de support de croissance cellulaire, des tests d'adhésion et de prolifération cellulaire ont été réalisés avec des cellules souches mésenchymateuses humaines. Les tests d'adhésion cellulaires sur le mat de PHBHV et le mat de PHBHV avec copolymère ont montré que l'ajout du copolymère à base de polysaccharide permettait l'adhésion au bout d'une heure d'environ 38000 cellules, presque autant que les 40000 sur le polystyrène traité pour la culture cellulaire. Au contraire, sur le mat de PHBHV, seules 25000 cellules ont adhéré. Cette préférence des cellules pour le matériau plus hydrophile est nettement visible sur les images de microscopie où les cellules présentent une morphologie plate et étendue sur le mat

contenant le copolymère et beaucoup plus sphérique et ramassée sur le mat de PHBHV. Les cellules prolifèrent ensuite normalement pendant 6 jours et les images de microscopie montrent des cellules s'étendant le long des fibres et s'interconnectant entre elles.

2.2. Article 3: Designing Exopolysaccharide-graft-Poly(3-hydroxyalkanoate) Copolymers for Electrospun Scaffolds

Pierre Lemechko¹, Julien Ramier¹, Davy Louis Versace¹, Jean Guezennec³, Christelle Simon-Colin³, Patricia Albanese², Estelle Renard¹, Valerie Langlois*¹

¹ Institut de Chimie et des Matériaux de Paris Est ICMPE UMR 7182, Université Paris Est Créteil, 2 à 8, rue Henri Dunant 94320 Thiais, France.

² EAC CNRS 7149, CRRET, Université Paris Est Créteil, 61 av. Gal de Gaulle, 94000 Creteil

³ Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, RBE/BRM/BMM, B.P. 70, 29280 Plouzane, France.

2.2.1. Abstract

Poly(3-hydroxyalkanoate)s PHAs have been demonstrated to be a family of biopolyester with good biodegradability and biocompatibility. A glycosaminoglycan-like marine exopolysaccharide EPS HE800 was here incorporated to enhance cell adhesion. Novel graft copolymer HE800-g-PHA were prepared to improve the compatibility between hydrophobic PHA and hydrophilic HE800. The carboxylic end groups of PHA oligomers were activated with acyl chloride functions, allowing coupling to hydroxyl groups of HE800. Fibrous scaffolds were prepared by a modified electrospinning system which combined simultaneously PHA electrospinning and HE800-g-PHA copolymer electrospaying. Adhesion and growth of human mesenchymal stem cells on the HE800-g-PHA scaffolds showed a notable improvement over those on PHAs matrices.

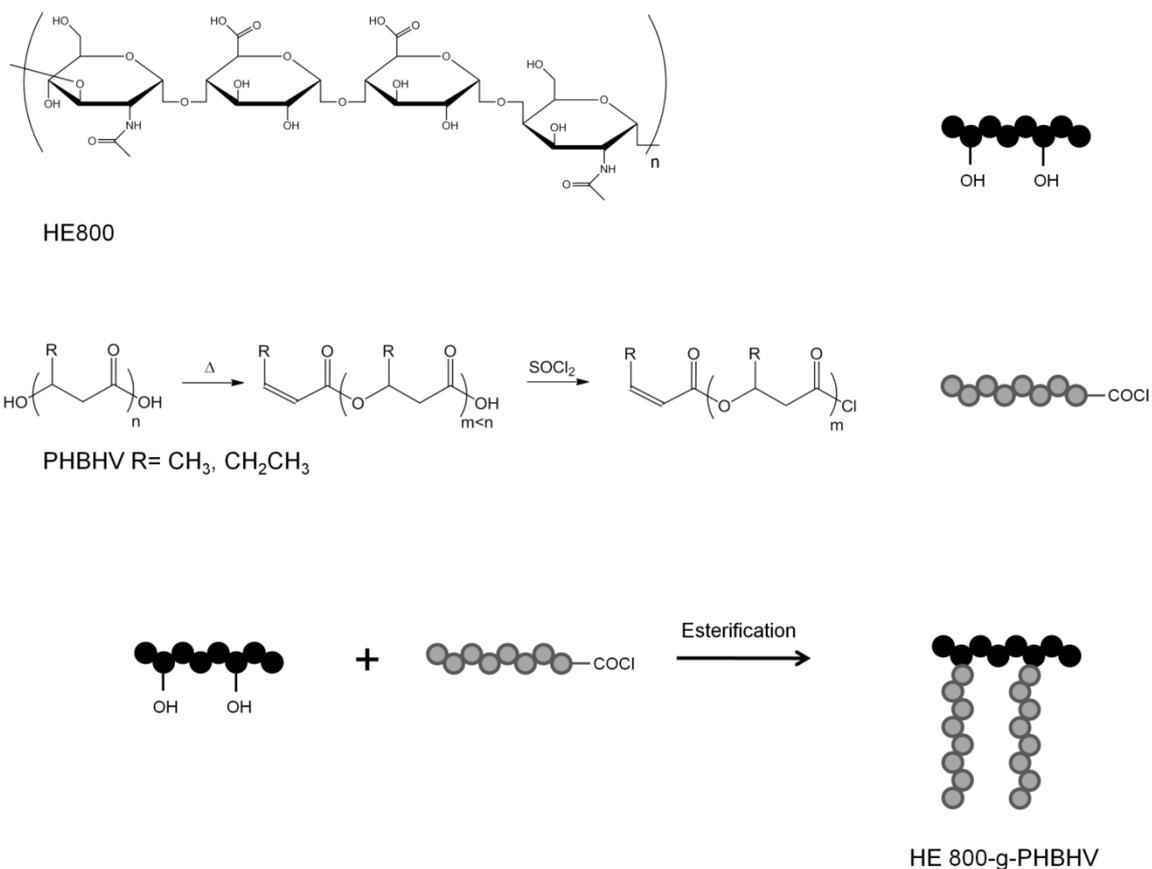
Keywords: polyesters, poly(3-hydroxyalkanoate), PHBHV, graft copolymer, scaffold, cell adhesion

2.2.2. Introduction

Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) are a class of natural biodegradable polyesters accumulated by many bacteria as carbon and energy supply when an essential nutrient is limited [1-2]. Using various substrates, a wide variety of PHAs are synthesized, differing notably by the length of their side chains [3]. Two types are distinguished, short chain length PHAs, or scl-PHAs, possessing alkyl side chains having up to two carbon atoms, for example the widely used poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) PHBHV; medium chain length PHAs, or mcl-PHAs, with at least three carbon atoms on their side chains. The length of side chains leads the physical properties of PHAs, crystalline, rigid and brittle for scl-PHAs, semi-crystalline, soft and elastomeric for the mcl-PHAs. Thanks to their biocompatibility, PHAs proved to be good candidates for biomedical applications including biomedical devices, biodegradable drug carriers or tissue engineering (TE) [4-6]. Fibrous scaffolds obtained from electrospun biodegradable PHAs have attracted widespread attention because of their nanostructure morphology which can mimic the extracellular matrix component (ECM) [7-8]. Despite its many attributes, the intrinsic hydrophobic properties of PHAs restrict their applications as cell-colonizing materials [9]. One approach to improve its biological properties can be made through blending PHA with hydrophilic polymers and compounds [10,11]. Among polymers used in TE, polysaccharides have been widely studied due to their biodegradability, biocompatibility and capacity to mimic the extracellular matrix [12-17]. Here we proposed to test a marine exopolysaccharide (EPS), HE800 which is a hyaluronane-like polysaccharide, secreted from marine bacteria *Vibrio diabolicus* originating from deep sea hydrothermal vents. Its large scale production is therefore convenient, low cost, reproducible and free of non-conventional transmissible agent. HE800 is a non-sulfated linear polysaccharide. Its repeating unit is a tetrasaccharide composed of two glucuronic acid units, one N-acetyl-glucosamine and one N-acetylgalactosamine (see **Scheme 1**) [18-19]. The presence of carboxylate groups on HE800 make this polysaccharide promising candidates to enhance interactions with proteins such as growth factors and cytokines. In a previous study, fibers of HE800 were used to fill critical size defects in rat calvaria and showed strong bone

healing effect after three weeks [20]. HE800 also induced the attachment of chondrocytes on a Si-hydroxypropylmethylcellulose-based hydrogel [19].

In this context and as a preliminary study to further TE applications, we tested the ability to support cell proliferation of a scaffold based on PHBHV and HE800. To achieve this goal, we first prepared a graft copolymer HE800-*g*-PHA to improve the compatibility between hydrophobic PHBHV and hydrophilic HE800. In the grafting onto method, the carboxylic functions of PHBHV were activated with acyl chloride functions, allowing coupling to hydroxyl groups of HE800. The chosen method for the preparation of the scaffold is a modified electrospinning system which combined both electrospinning and electro spraying processes (**Scheme 2**) previously described by Ekaputra et al. [21]. PHA was electrospun and the HE800-*g*-PHBHV was simultaneously electro sprayed onto the PHBHV fibers. Furthermore, we studied the ability of the scaffold based on the electrospun PHBHV, PHBHV_{e-spun}, fibers combined to electro sprayed HE800-*g*-PHA, HE800-*g*-PHBHV_{e-sprayed}, to support human mesenchymal stem cells (hMSC) adhesion and proliferation.



Scheme 1: Preparation of the copolymer HE800-g-PHBHV.

2.2.3. Materials and Methods

Materials

PHBV with 12% of hydroxyvalerate was purchased from Goodfellow and was purified by precipitation in ethanol. The exo-polysaccharide HE800 (Mn of 3450 g.mol⁻¹), obtained from LBMM of Ifremer (France) was dried overnight under vacuum at 100°C before use. DMF (analytical grade), chloroform (analytical grade), dichloromethane (analytical grade) and ethanol (analytical grade) were purchased from SDS and used without further purification. Chlorobenzene (99.5%), thionyle chloride, anhydrous dimethylsulfoxyde (DMSO) (99.99%), hexamethyldisilazane (HMDS) and glutaraldehyde were purchased from Sigma-Aldrich. Dialysis membranes (regenerated cellulose) were purchased from Spectrum Laboratories

(MWCO 1000 Da). Human Mesenchymal Stem Cell (hMSC) were purchased from ABCell-Bio (France), alpha Minimum Essential Medium (α MEM), Foetal Bovine Serum (FBS) and penicillin-streptomycin were purchased from Gibco (Invitrogen, USA).

Preparation of the HE800-graft-PHBHV copolymer

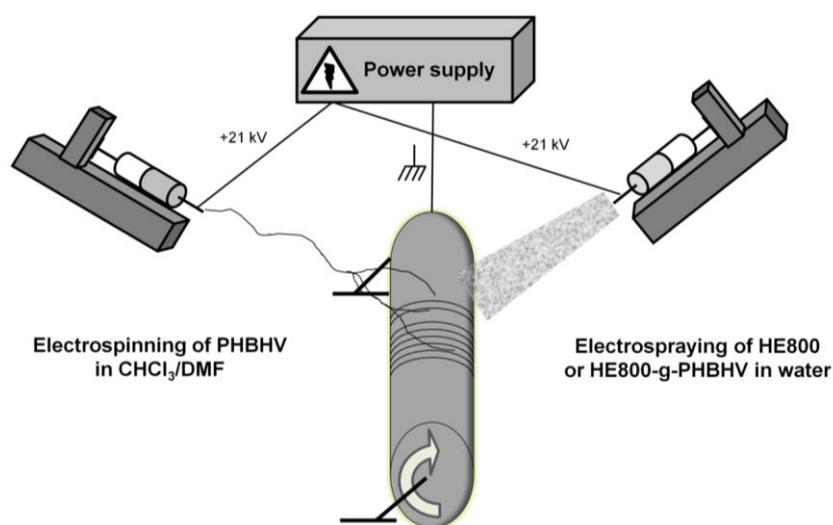
2 g of PHBHV were heated in an oven at 190°C for 4 hours. Then the sample was cooled and the oligomers were purified by dissolution in dichloromethane, precipitation in ethanol, filtration and vacuum-drying at 80°C overnight. 0.5 g of PHBHV oligomer ($M_n = 4800$ g.mol⁻¹, $1 \cdot 10^{-4}$ mol) was dissolved in 10 mL of chlorobenzene under argon. 10 μ L of SOCl₂ ($1.44 \cdot 10^{-4}$ mol) was then added and the solution was allowed to react 1h at 100°C under argon. 0.5 g of chloride terminated PHBHV oligomers and 0.5 g of HE800, dried overnight under vacuum at 50°C, were dissolved in 10 mL of anhydrous DMSO. The mixture was allowed to react at 100°C for 3h. The solution was dialyzed against distilled water for 3 days with a 1000 MWCO membrane to remove DMSO. The insoluble suspension was retrieved by lyophilization. The solid product was then stirred 1 hour in CHCl₃ and the solution was refluxed at 60°C. The solution was filtered two times to remove unreacted PHBHV that was soluble in CHCl₃.

Fabrication of scaffolds

Solution preparation. PHBHV was dissolved in CHCl₃/DMF 80/20 (25 % w/v). For the electrospaying process, a 10 % (w/v) solution of HE800 or a 10 % (w/v) dispersion of HE800-g-PHBHV in water were used.

Electrospinning process. The electrospinning apparatus is composed of a high voltage source (Linari, Italy), two syringes with a stainless steel needle of 10 G, two syringe pumps, RAZEL Scientific Instruments, USA, for electrospinning system, and AI-1000, World Precision Instruments, UK, for electrospaying system, and a grounded aluminium collecting drum

connected to a high speed motor. Aligned fibers were spun and deposited on a collector rotating at a speed of 2500 rpm. A voltage in the range of 25 kV was applied to the needles and the syringe pump was set at a flow rate of 3 mL.h⁻¹ for the electrospinning and 2.5 mL.h⁻¹ for the electrospaying. The collecting drum was maintained at a distance of 25 cm and 8 cm, for respectively the PHBHV electrospinning and the HE800-g-PHBHV electrospaying, from the tip of the needle and the process was conducted at ambient temperature. Mat **A** was obtained by PHBHV electrospinning. Mats **B** and **C** were obtained by simultaneously PHBHV electrospinning and electrospaying of respectively a 10% solution of HE800 in water (mat **B**) and a dispersion of HE800-g-PHBHV copolymer in water (mat **C**). The distance of the electrospaying needle from the collector was set so as no repulsion between the two jets occurred.



Scheme 2: Schematic illustration of the co-electrospinning-electrospaying process.

Characterizations

Characterization of materials. FTIR analysis were acquired with a Bruker Tensor 27 spectrometer with an ATR apparatus. The particles sizes were determined on a Malvern zetasizer Nano ZS using a laser beam at 633nm and a scattering angle of 173°. The

copolymer was suspended in water at $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in a vial, manually shaken and filtered on $0.8\mu\text{m}$ before analysis. Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses were performed on a LEO 1530 microscope using low accelerating voltage (1 kV). Prior to analyses, the samples were coated with a 3 nm layer of palladium/platinum alloy in a Cressington 208 HR sputter-coater. The equilibrium water contact angles were measured by a contact angle measurement system Krüss EasyDrop DSA15S at room temperature. Scaffolds ($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) were immersed in 10 mL vials with 5 mL of mQ water. The vials were closed and stirred for 3 days with an orbital shaker at 400 rpm. The samples were then dried for 24h under vacuum at 50°C .

Cell adhesion and proliferation. hMSC were cultured in αMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin solution in a 175 cm^2 cell culture flask. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . Amplifications of hMSC were performed until confluence for 14 days and the culture medium was changed twice per week. Each of the fibrous scaffolds was sterilized under UV light, carefully loaded on a cell-crown mold (Scaffdex, Finland) and placed in 24-well plate. The specimens were washed with phosphate buffered saline (PBS) and subsequently immersed in the culture medium overnight before cell seeding. Cells were grown to confluence, detached by trypsin, counted by trypan blue assay, seeded on the scaffolds at a density of 40 000 cells/well for adhesion study and 20 000 cells/well for proliferation study and placed in incubator with the optimal conditions for cell growth. Third passage hMSC were used in this study.

The cell adhesion and proliferation on electrospun scaffolds and Tissue Cultured Plates (TCP) were monitored after 1h for adhesion and 1, 3 and 6 days of cell culture for proliferation by MTS assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt). The mechanism behind this assay is the reduction of yellow tetrazolium salt in MTS to form purple formazan crystals by the dehydrogenase enzymes secreted by mitochondria of metabolically active cells. The formazan dye shows absorbance at 492 nm and the amount of crystals formed is directly proportional to the number of cells. The process consists in removing the cell medium and the unattached cells, then samples are incubated with 20% MTS reagent in a RPMI 1640medium (Roswell Park

Memorial Institute) for a period of 2 h at 37 °C. Absorbance of the obtained dye was measured at 492 nm using a spectrophotometric plate reader (Infinite 1000, Tecan, North Carolina, USA).

The morphological investigations of in vitro cultured hMSC on the scaffolds were performed after 1 hour, 3 days and 6 days of culture by SEM analysis. The scaffolds were rinsed with PBS and fixed in 3% glutaraldehyde (in PBS) at 500 μ l/well for 30 minutes. After cell fixation the scaffold were rinsed with DI water and dehydrated with upgrading concentrations of ethanol (50%, 70%, 90%, 100%) for 10 min each. The specimens were then dried in 100% hexamethyldisilazane (HMDS; Sigma, USA). The HMDS was air-dried by keeping the samples in a fume hood. Finally, the scaffolds were coated with a 4 nm layer of palladium/platinum alloy in a Cressington 208 HR sputter-coater and observed under LEO 1530 Scanning Electron Microscope using an accelerating voltage of 1 keV to analyze the hMSC morphology.

2.2.4. Results and discussion

2.2.4.1. Synthesis of graft copolymer HE800-g-PHBHV

Graft copolymer HE800-g-PHBHV was prepared by esterification between chloride terminated PHBV oligomers and hydroxyl functions of the polysaccharide HE800 (**Scheme 1**). Briefly, oligomers of PHBV were prepared by thermal treatment at 190°C to produce well-defined PHBV oligomers with molar masses of 4800 g. mol⁻¹ [22,23]. Oligomers presented unsaturated and carboxylic acid chain ends, respectively. FTIR spectra of HE800 before and after grafting are shown in **Figure 1**. The peak at 1750 cm⁻¹ is attributed to the absorption band of carboxyl groups of HE800. The most prominent FTIR marker band for PHBV was the ester carbonyl band near 1730 cm⁻¹. After 2 hours of reaction with thionyl chloride a band at 1800 cm⁻¹ had appeared attesting the presence of an acid chloride group. After functionalization, graft copolymer HE800-g-PHBHV was obtained by direct esterification between chloride terminated oligoester and hydroxyl groups of HE800. An absorption band at

1730 cm^{-1} assigned to the carbonyl band of polyester was detected after grafting attesting the presence of PHBHV in the copolymer. Because of its amphiphilic character, the graft copolymer was able to form nanoparticles spontaneously in the absence of any surfactant (**Figure 2**) with a mean diameter of 180 nm. The hydrophilic exopolysaccharide HE800 preferentially migrated to the surface to form the shell of the particles and stabilized the particles.

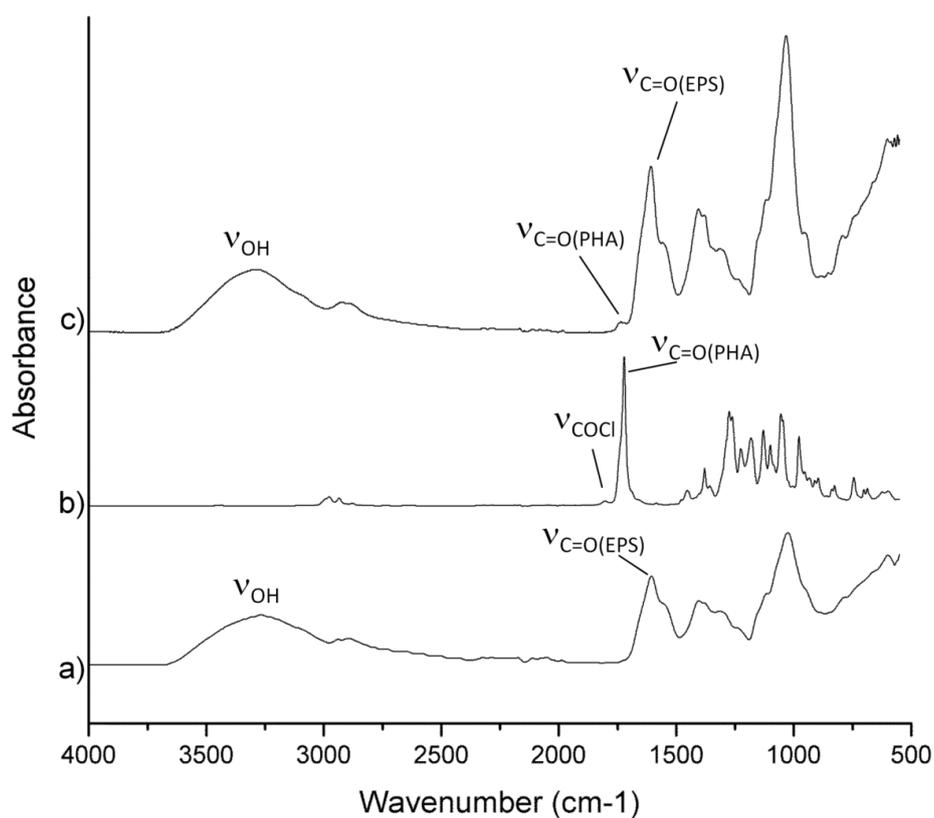


Figure 1: FTIR spectra of **a)** EPS HE800, **b)** chloride terminated oligomer and **c)** graft copolymer HE800-g-PHBHV.

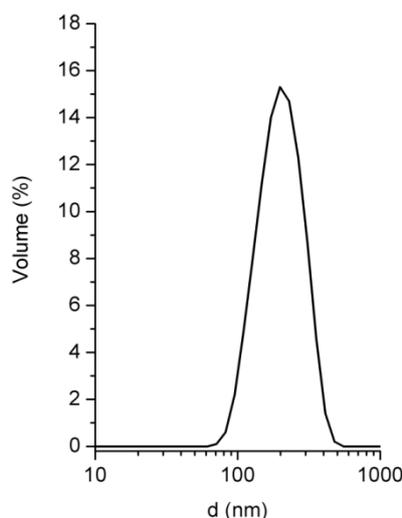


Figure 2: Particle size distribution analyzed by dynamic light scattering (DLS) of graft copolymer HE800-*g*-PHBHV

2.2.4.2. Scaffold preparation

PHBHV was solubilized in a CHCl_3/DMF solution as it is known that DMF increased the conductivity of the solution thus promoting the formation of beadless smooth fibers [24]. PHBHV was electrospun to be used as a reference ($\text{PHBHV}_{\text{e-spun}}$). The modified electrospinning system which combined both electrospinning and electro spraying processes allowed the fabrication of scaffolds composed of electrospun PHBHV and electro sprayed HE800 ($\text{PHBHV}_{\text{e-spun}}/\text{HE800}_{\text{e-sprayed}}$) and ($\text{PHBHV}_{\text{e-spun}}/\text{HE800-}g\text{-PHBHV}_{\text{e-sprayed}}$).

PHBHV oriented micro-fibers have a uniform structure (**Figure 3**). When HE800 was electro sprayed over the PHBHV fibers, we observed that the resulting fibers seemed to be stuck together at fibers junctions. The presence of electro sprayed HE800 resulted in a less homogeneous structure with small beads due to the hydrophilic nature of the polysaccharide that was deposited on the hydrophobic PHBHV. Nevertheless the presence of amphiphilic graft copolymer HE800-*g*-PHBHV electro sprayed improved the compatibility between PHBHV and EPS and lead to the formation of more homogeneous fibers.

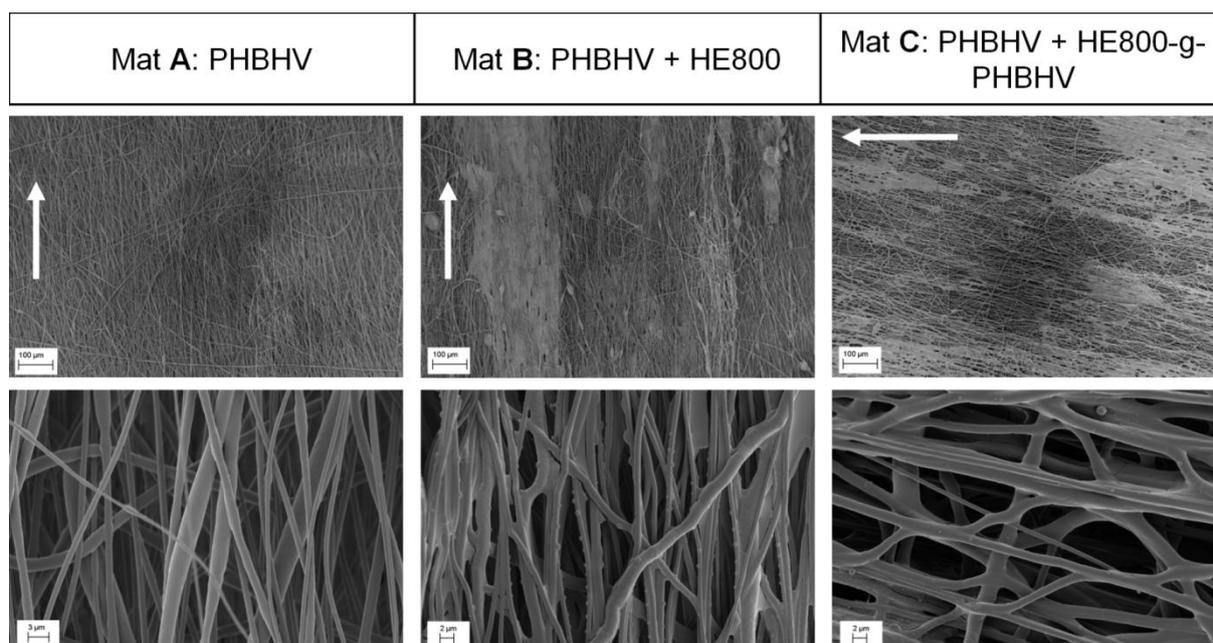


Figure 3: SEM micrographs of the scaffolds **A)** PHBHV_{e-spun}, **B)** PHBHV_{e-spun}/HE800_{e-sprayed}, **C)** PHBHV_{e-spun}/HE800-g-PHBHV_{e-sprayed}

In order to determine the influence of the HE800 on the physical properties of hydrophobic PHBHV, contact angle measurements were performed. The values of water contact angles of the different mats, before and after three days of immersion in water are reported in **Table 1**. PHBHV scaffolds were found to be highly hydrophobic with a contact angle of 126° although PHBHV film elaborated by the solvent casting method exhibited a contact angle of 87°. The apparent higher hydrophobicity of the PHBHV scaffold compared to PHBHV film is explained by the surface roughness induced by the fibers which introduced multiple contact points with the water surface [25]. However, the mats **B** and **C** were less hydrophobic, with a contact angle of 76° due to the presence of hydrophilic HE800. After 3 days in water, the contact angle of these mats rose from 76 to 82° and 88° respectively. The increase of the hydrophobic character was attributed to the loss of the deposit of HE800 or HE800-g-PHBHV. However after 3 days in water, the mat **B** was found to be slightly more hydrophobic. This difference was thought to be caused by the fact that the copolymer was not hydrosoluble and had a greater affinity with the PHBHV fibers thus being less likely to come off

the fiber than the hydrosoluble HE800. To investigate this difference SEM images after 3 days in water have been realized and are displayed in the **Figure 4**. The fibers of the mat **B** appeared to be naked compared to the initial images before immersion, with few residual HE800 where the fibers are touching each other. On the contrary the fibers of mat **C** appeared to be covered with granules. These granules are probably made of remaining copolymer HE800-*g*-PHBHV. This topography should be interesting because it has been reported frequently that roughness of the surface influence cell adhesion and cell proliferation [26].

Table 1: Water contact angles of scaffolds before and after 3 days of immersion in water.

Mats	Initial contact angle (°)	Contact angle after 3 days (°)
PHBHV	126	124
PHBHV _{e-spun} /HE800 _{e-sprayed}	76	88
PHBHV _{e-spun} /HE800- <i>g</i> -PHBHV _{e-sprayed}	76	82

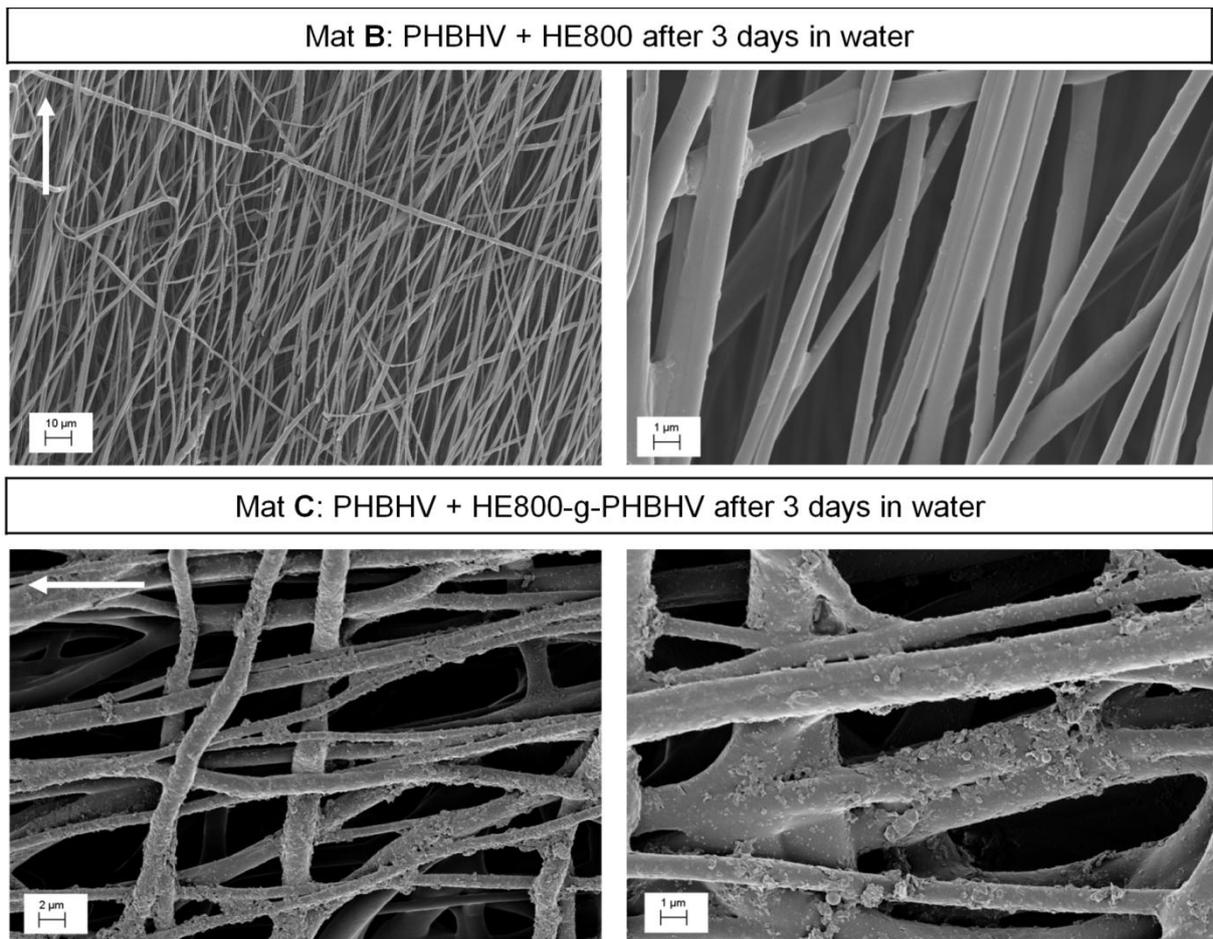


Figure 4: SEM micrographs of scaffolds after 3 days of immersion in water **A)** PHBHV_{e-spun}/HE800_{e-sprayed} **B)** PHBHV_{e-spun}/HE800-g-PHBHV_{e-sprayed}

2.2.4.3. Adhesion and Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells

The suitabilities of the scaffolds to support cell adhesion were investigated by seeding human mesenchymal stem cells onto their surfaces (hMSCs). For comparison purposes, the same analysis was performed on cells cultured on tissue culture polystyrene (TCP). These tests investigated the influence of the presence of the hydrophilic HE800 on the human mesenchymal stem cells (hMSCs) ability to adhere to the PHBHV surface. The wells containing the materials were seeded with the medium saturated with hMSC and after 1 h the medium was removed, taking away the cells which had not adhered to the surface of the materials. The numbers of cells on the surfaces were then evaluated by MTS assay and reported in the **Figure 5**. It can be noticed that the more hydrophobic mat **A** made of only

PHBHV_{e-spun} hindered cell adhesion as the cell number was only 66% of the one found for the TCP. It is consistent with previous results that had shown that high hydrophobic surfaces on PHBHV films might hinder the adhesion of cells [10-11]. On the contrary, the mat **C** seemed to support cell adhesion as well as TCP.

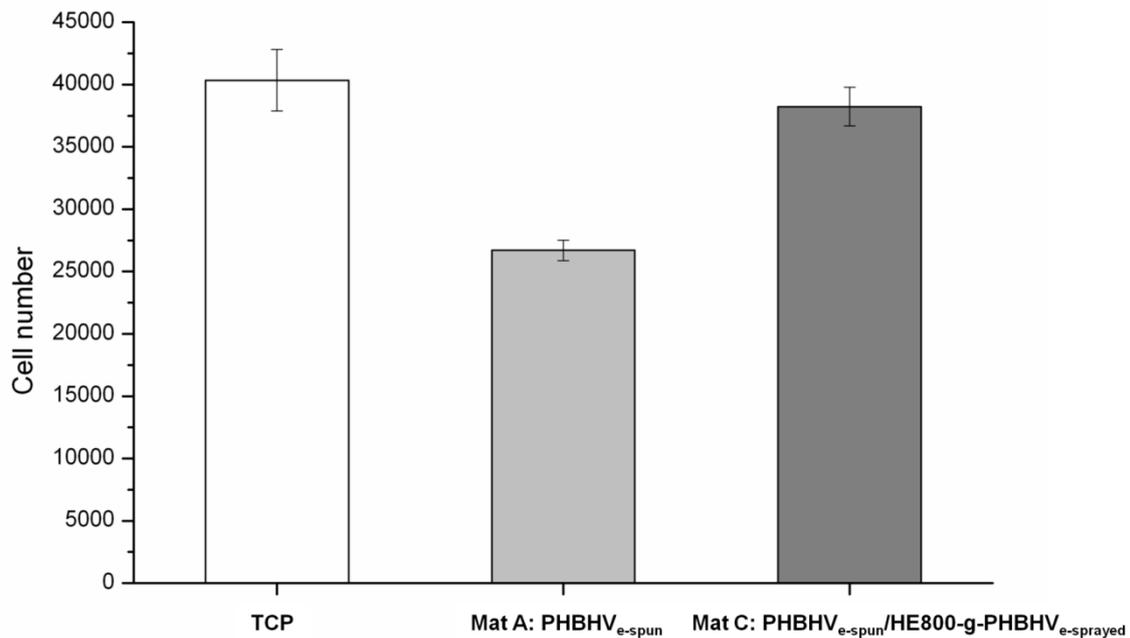


Figure 5: hMSC adhesion ability after 1h on PHBHV_{e-spun} and PHBHV_{e-spun}/HE800-g-PHBHV_{e-sprayed} fibers grown in α MEM medium compared to cell adhesion on TCP.

Cells cultured on the PHBHV_{e-spun} mesh exhibited a more rounded morphology (**Figure 6**). This was in contrast to the culture on PHBHV_{e-spun}/HE800-g-PHBHV_{e-sprayed} mesh whereby a flatter and more spread morphology was dominant. In this case the spreading of the cells was certainly promoted by the GAG-like structure of the polysaccharide [19]. It has been previously reported that hyaluronan oligomers promotes cell adhesion and mobility by interacting specifically with the RHAMM cell receptor and the CD44 cell receptor, which binds to a 6–10 sugar sequence of hyaluronan [27-28]. HE800 being structurally similar to

hyaluronan seemed to be recognized as such by cells. It can be concluded that the mats exhibited no toxicity and that the deposits of the polysaccharide had an impact on the cell adhesion. After 6 days, the cells displayed a flattened morphology and extended themselves to contact with each other through cellular extensions along the fibers. On the mat **A**, the direction of extension of the cells was mainly unidirectional along the fibers on which are attached the cells, whereas on the mat **C** cells started to spread in all directions and were connecting several parallel fibers together. The overall surface covered by cells on mat **C** also appeared to be larger which might be due to both the bioactive effect of the polysaccharide and the larger number of cells which have initially adhered.

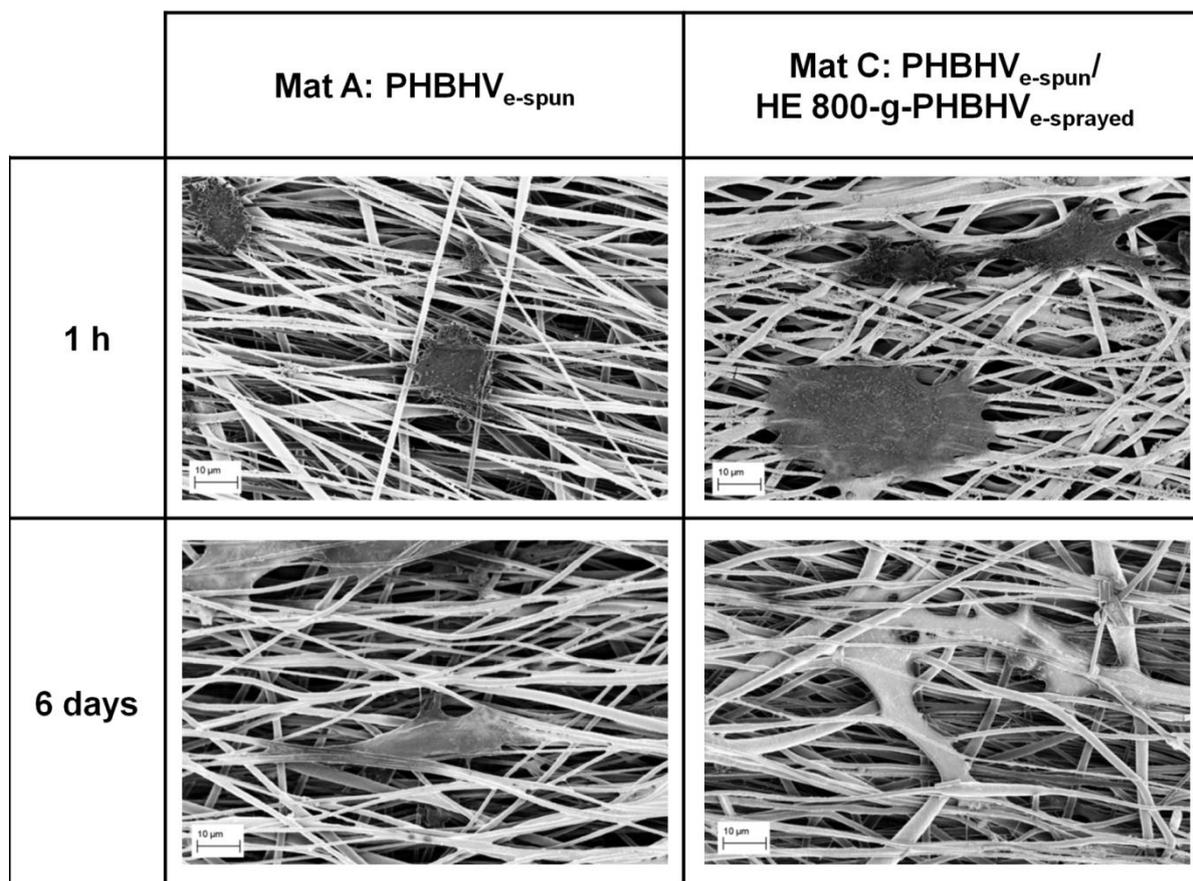


Figure 6: SEM images of hMSC after 1h and 6 days of growth in α MEM on PHBHV and PHBHV/HE800-g-PHBHV microfibers.

The abilities of the scaffolds to support the proliferation of hMSC were determined by MTS assay on days 1, 3 and 6 with 20 000 cells initially seeded (**Figure 7**). A similar growth rate was observed between the TCP, the PHBHV_{e-spun} and the PHBHV_{e-spun}/HE800-*g*-PHBHV_{e-sprayed} scaffolds and at day 6, the number of cell measured on the PHBHV_{e-spun}/HE800-*g*-PHBHV_{e-sprayed} scaffold was significantly higher than on the PHBHV_{e-spun} scaffold. The biocompatibility of this exopolysaccharide-based deposit on the PHBHV fibers was thus demonstrated. Besides, it seems the polysaccharide can also bring an enhancing effect on the growth rate but it became significant only on longer term growth.

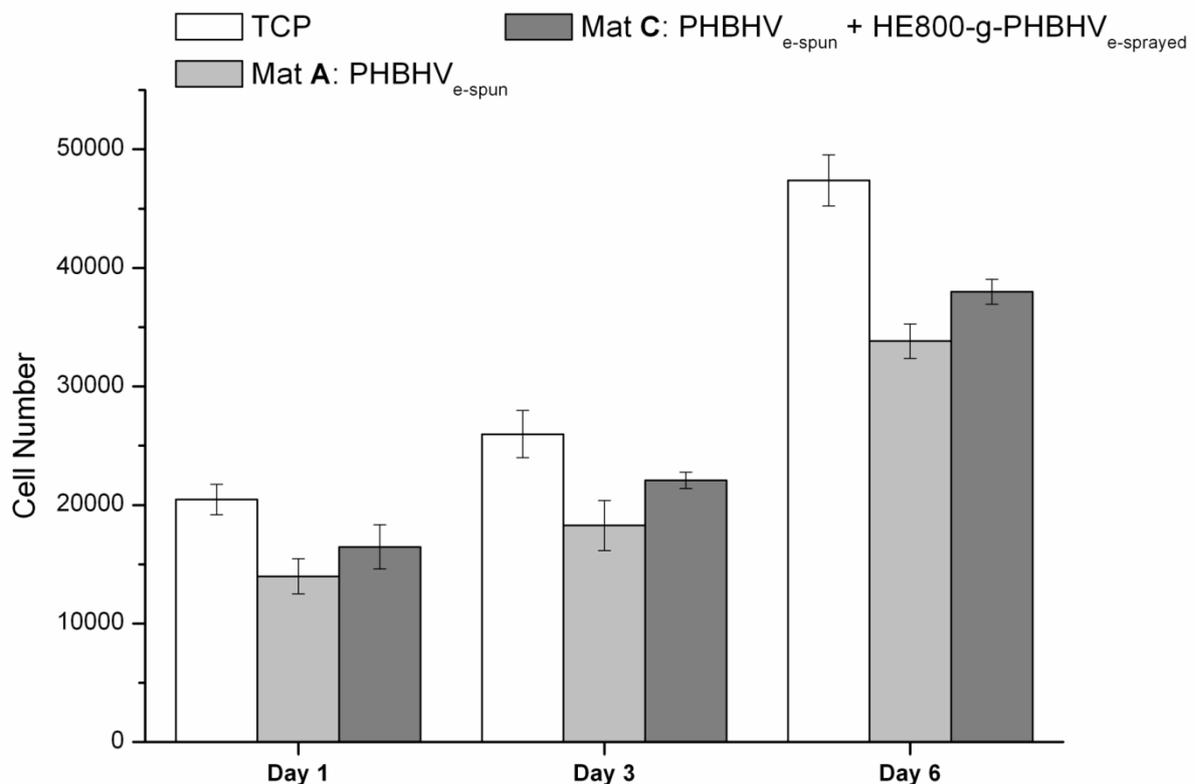


Figure 7: hMSC proliferations on PHBHV_{e-spun} and PHBHV_{e-spun}/HE800-*g*-PHBHV_{e-sprayed} fibers grown in α MEM medium compared to cell proliferation on TCP.

2.2.5. Conclusion

The exopolysaccharide HE800 was associated with PHBHV to enhance the biological properties of PHBHV scaffold. Amphiphilic graft copolymer HE800-*g*-PHBHV was obtained by

esterification between HE800 and functionalized PHBHV oligomers. When electrospayed over electrospun PHBHV scaffold, the graft copolymer HE800-*g*-PHBHV outperformed its PHBHV counterpart by demonstrating improved wettability and cell adhesion as demonstrated by the culture of hMSC. With such customized surface chemistry, this scaffold may be useful for tissue engineering. As polysaccharides such as heparin sulfates are clearly involved in activation of growth factors implicated in differentiation, the impact of these new scaffolds on the differentiation potential of mesenchymal stem cell would be of interest to investigate further.

2.2.6. Acknowledgements

We acknowledge the IFREMER and the CNRS for their financial support. The authors are gratefully thankful to Professor I. Rashkov and Professor N. Manolova, Laboratory of Bioactive Polymers, Institute of Polymers, Bulgarian Academy of Sciences, for technical assistance concerning electrospinning-electrospraying process and helpful discussions.

2.2.7. References

- [1] H. M. Muller, D. Seebach, *Angew. Chem., Int. Ed.* 32 (1993) 477-502.
- [2] A. Steinbuchel, H. E. Valentin, *FEMS Microbiol. Lett.* 128 (1995) 219-228.
- [3] S. Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996) 1-14.
- [4] G. Q. Chen, Q. Wu, *Biomaterials* 26 (2005) 6565-6578.
- [5] G. Q. Chen, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 2434-2446.
- [6] R. Rai, T. Keshavarz, J. A. Roether, A. R. Boccaccini, I. Roy, *Mater. Sci. Eng. R. Reports* 72 (2011) 29-47.
- [7] H. Fong, I. Chun, D. H. Reneker, *Polymer* 40 (1999) 4585-4592.
- [8] Y. Dzenis, *Science* 304 (2004) 1917.
- [9] X. Yang, K. Zhao, G. Q. Chen, *Biomaterials* 23 (2002) 1391-1397.

- [10] G. Peschel, H. M. Dahse, A. Konrad, G. D. Wieland, P. J. Mueller, D. P. Martin, M. Roth, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 85A (2008) 1072-1081.
- [11] R. Rai, A. R. Boccaccini, J. C. Knowles, N. Mordon, V. Salih, I. C. Locke, M. Moshrefi-Torbati, T. Keshavarz, I. Roy, *J. Appl. Polym. Sci.* 122 (2011) 3606-3612.
- [12] Z. Li, H. Ramay, K. Hauch, D. Xiao, M. Zhang, *Biomaterials* 26 (2005) 3919-3928.
- [13] A. Di Martino, M. Sittinger, M. Risbud, *Biomaterials* 26 (2005) 5983-5990.
- [14] M. Ignatova, N. Manolova, N. Markova, I. Rashkov, *Macromol. Biosci.* 9(2009)102-108.
- [15] R. Barbucci, S. Lamponi, A. Borzacchiello, L. Ambrosio, M. Fini, P. Torricelli, R. Giardino, *Biomaterials* 23 (2002) 4503-4513.
- [16] H. S. Yoo, E. A. Lee, J. J. Yoon, T. G. Park, *Biomaterials* 26 (2005) 1925-1933.
- [17] J. Kim, I. S. Kim, T. H. Cho, K. B. Lee, S. J. Hwang, G. Tae, I. Noh, S. H. Lee, Y. Park, K. Sun, *Biomaterials* 28 (2007) 1830-1837.
- [18] H. Rougeaux, N. Kervarec, R. Pichon, J. Guezennec, *Carbohydr. Res.* 322 (1999) 40-45.
- [19] E. Rederstorff, P. Weiss, S. Sourice, P. Pilet, F. Xie, C. Siquin, S. Collic-Jouault, J. Guicheux, S. Laïb, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2119-2130.
- [20] P. Zanchetta, N. Lagarde, J. Guezennec, *Calcif. Tissue Int.* 72 (2003) 74-78.
- [21] A. K. Ekaputra, G. D. Prestwich, S. M. Cool, D. W. Hutmacher, *Biomaterials* 32 (2011) 8108-8117.
- [22] X. Samain, V. Langlois, E. Renard, G. Lorang, *J. Appl. Polym. Sci.* 121 (2011) 1183-1192.
- [23] P. Lemechko, E. Renard, J. Guezennec, C. Simon Colin, V. Langlois, *React. Func.* Accepted manuscript.
- [24] K. H. Lee, H. Y. Kim, M. S. Khil, Y. M. Ra, D. R. Lee, *Polymer* 44 (2003) 1287-1294.
- [25] K. Sombatmankhong, O. Suwanton, S. Waleetorncheepsawat, P. Supaphol, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 44 (2006) 2923-2933.
- [26] R. Ravichandran, J.R. Venugopal, S. Sundarajan, S. Mukherjee, S. Ramakrishna, *Biomaterials* 33 (2012) 846-855.
- [27] M. Morra, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1205-1211.
- [28] C. Underhill, *J. Cell Sci.* 103 (1992) 293-297.

3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons utilisé un copolymère greffé HE800-*g*-PHBHV préparé à l'aide de la méthode développée au chapitre précédent pour réaliser un matériau pour la régénération tissulaire. Ce matériau a été réalisé en combinant deux techniques: l'électrospinning et l'électrospraying. L'électrospinning permet de réaliser une architecture tridimensionnelle formée par des fibres de PHBHV. L'utilisation simultanée de l'électrospraying a permis de recouvrir ces fibres de copolymère. Le matériau obtenu est ainsi plus hydrophile ce qui est souhaité pour une meilleure adhésion des cellules. De plus, l'insolubilité dans l'eau du copolymère électrosprayed lui permet d'adhérer plus longtemps aux fibres plongées dans un milieu aqueux que le simple polysaccharide.

La biocompatibilité et les propriétés d'adhésion et de prolifération cellulaires ont été confirmées par des cultures de cellules souches mésenchymateuses humaines. Le nombre de cellules qui adhèrent sur les fibres avec le copolymère est 46% supérieur au nombre de cellules adhérentes aux fibres de PHBHV. Le matériau n'a pas d'impact sur la prolifération des cellules par rapport au contrôle. L'influence du HE800 sur la différenciation de ces cellules souches fera l'objet d'études ultérieures.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion Générale et Perspectives

Les PHAs sont à l'aube de leur ère, avec la création de plusieurs usines dans le monde ayant pour but de produire des PHAscl par dizaines de milliers de tonnes par an. Alors que leur exploitation industrielle stagnait depuis les premières productions commerciales dans les années 70, l'explosion des biotechnologies dans les années 2000 a permis un second départ. Les coûts de production ont suffisamment baissé pour que des applications à grande échelle soient envisagées. Toutefois leurs prix restent élevés comparativement à des polymères synthétiques plus classiques et les applications à haute valeur ajoutée, comme le biomédical, seront probablement les premiers débouchés. Pour cela, la recherche de souches bactériennes, sauvages ou recombinantes, capables de produire en grande quantité des PHAs de composition contrôlée est un enjeu toujours fort. L'étude de la diversité des microorganismes producteurs de PHAs et de leurs métabolismes sont une des clés qui permettront d'optimiser les procédés industriels. Leur utilisation dans des domaines à forte valeur ajoutée comme le biomédical nécessite le développement d'un catalogue de modifications chimiques permettant de leur conférer les propriétés voulues en fonction des applications visées. Enfin, une fois le produit à base de PHA élaboré son efficacité doit être évaluée. Nous avons pu, à notre échelle, au cours de cette thèse, contribuer au corpus de connaissances sur les PHAs.

Le début de cette thèse a été consacré à la biosynthèse de plusieurs types de PHAs par des souches bactériennes marines peu étudiées. Nous avons ainsi produit des PHAs de tout type, à courtes chaînes latérales, à moyennes chaînes latérales, saturées et insaturées. Nous avons montré que la quantité d'insaturations pouvait être facilement contrôlée lors de la production de PHAmcl insaturé par *Pseudomonas guzei* en jouant sur la proportion en octanoate de sodium et en acide 10-undécénoïque du substrat. La proportion de monomères insaturés est égale à la proportion molaire d'acide 10-undécénoïque du mélange ce qui nous a permis d'obtenir des polymères comportant de 5 à 27% d'insaturations. Une particularité

supplémentaire des PHAs produits par cette souche est leur masse molaire très élevée ($M_w=500\,000\text{ g.mol}^{-1}$). Nous avons vu aussi que la souche *Pseudomonas guzezei* biovar. *tikehau* était la plus intéressante en terme de rendements pour la production de PHAmcl saturé. Dans le cas des PHAscl nous avons mis en évidence qu'une des deux souches utilisées, *Paracoccus zeaxanthinifaciens* subsp. *payriae*, permettait elle aussi de contrôler précisément la proportion entre les deux monomères en fonction du substrat. Le rapport molaire entre les monomères 3-hydroxybutyrate et 3-hydroxyvalérate est égal au rapport molaire entre le glucose et l'acide valérique utilisés comme substrat.

Visant des applications biomédicales, nous avons décidé de synthétiser des copolymères amphiphiles, en utilisant le caractère hydrophobe des PHAs déjà bien connus à l'ICMPE. L'étude des exo-polysaccharides bactériens étant un des axes de recherche du LBMM (IFREMER, Brest, France), utiliser deux de ces polymères, le HE800 et le GG, comme partie hydrophile nous a semblé intéressant d'autant que ceux-ci peuvent présenter des effets bioactifs. Dans un premier temps, nous avons mis au point un nouveau protocole permettant de préparer en une étape des oligomères de PHAs à architecture contrôlée ayant une fonction terminale alcyne, alcène ou acide carboxylique. Plusieurs paramètres de réaction ont été étudiés comme la température, la quantité de catalyseur, la nature du polyester et le mode de chauffage, conventionnel ou micro-ondes, afin d'optimiser la réaction. Ainsi, des oligomères de PHBHV de 1000 g.mol^{-1} et portant une fonction alcyne terminale ont été obtenus en 10 minutes à 160°C sous micro-ondes. Puis, dans un deuxième temps, nous avons synthétisé des copolymères polysaccharide-*g*-PHA. Deux stratégies ont été étudiées et mises au point sur le dextrane, un polysaccharide commercial largement utilisé dans le domaine biomédical. La stratégie de couplage par chimie click a permis la synthèse de copolymères dextrane-*g*-PHBHV en faisant varier la longueur (de 900 à 6200 g.mol^{-1}) et le nombre de chaînes pendantes de PHBHV (de 0,3 à 0,19 chaînes de PHBHV par motif glucose du dextrane) tout en maintenant le rapport massique PHBHV/dextrane égal à 1. Le copolymère avec les chaînes de PHBHV les plus courtes s'est révélé capable de s'auto-assembler dans l'eau sous forme de nanoparticules de 160 nm. La deuxième stratégie a été de greffer des oligomères de

PHBHV par estérification de leur fonction acide carboxylique terminale sur les fonctions alcools du dextrane. Le taux de greffage est beaucoup plus faible dans ce cas mais suffisant pour rendre le produit insoluble dans l'eau. En effet on observe la formation de nanoparticules dans l'eau. Cette dernière stratégie a été utilisée pour réaliser divers copolymères à base de plusieurs types de PHAs et de polysaccharides.

Enfin, nous avons réalisé un matériau à base de fibres de PHBHV recouvertes de copolymère HE800-*g*-PHBHV pour de la régénération tissulaire. Nous avons utilisé la combinaison de deux techniques, l'électrospinning, de plus en plus utilisée depuis une dizaine d'années pour l'élaboration de biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire, et l'électrospraying. Nous avons montré par des cultures de cellules souches humaines que ce matériau était biocompatible et possédait de meilleures propriétés d'adhésion cellulaire qu'un réseau de fibres de PHBHV.

A partir de ces résultats, nous pouvons envisager plusieurs axes de recherche qu'il serait intéressant d'approfondir.

Elargir la gamme de fonctions réactives qu'on peut introduire sur des PHAs en position terminale par transestérification et notamment des fonctions utilisées en chimie click comme par exemples des cyclooctynes pour une addition azide-alcyne sans cuivre, un cyclopentadiényle ou un maléimide pour des réactions de Diels-Alder. On aurait alors accès à des oligomères de PHAs de longueur contrôlée et portant la fonction choisie en bout de chaîne utilisable ensuite pour la formation de copolymères diblocs ou à greffons PHAs.

De nombreux copolymères à base de PHAs sont encore à synthétiser en faisant varier leurs structures, multiblocs, greffés, en étoile... Les polysaccharides sont une grande famille de polymères dans laquelle piocher pour les copolymériser à des PHAs. Des oligosaccharides peuvent être fonctionnalisés par amination réductive, par exemple par de la cystéamine puis être greffés sur les insaturations d'un PHAmcl par addition thiol-ène.

Elaboration de nouveaux biopolyesters bactériens fonctionnalisés pour des applications dans le domaine biomédical

Les poly(3-hydroxyalcanoate)s ou PHAs sont des biopolyesters linéaires biodégradables et biocompatibles synthétisés par des microorganismes bactériens en tant que réserve de carbone et d'énergie. Ils sont synthétisés par des bactéries à partir de ressources renouvelables et la diversité de leurs structures possibles se traduit par un large éventail de polymères ayant des propriétés mécaniques très différentes.

Nous avons tout d'abord testé les capacités de production de PHAs de nouvelles souches bactériennes marines provenant de tapis microbiens de Polynésie française, en utilisant, entre autres, des substrats naturels comme l'huile de coprah, le glucose et l'acide oléique. Nous avons notamment montré que la souche *Pseudomonas guezennei* est capable de produire des PHAs avec des taux d'insaturation contrôlés et de masse molaire très élevée. Puis, des oligomères de PHAs fonctionnalisés de structures contrôlées portant des fonctions terminales alcynes ou alcènes ont été préparés par transestérification. Ces oligomères ont ensuite été utilisés pour l'élaboration par chimie click de copolymères amphiphiles greffés EPS-*g*-PHA avec des exopolysaccharides (EPS) bactériens. Enfin la dernière partie de ces travaux a consisté en la réalisation d'un support de croissance pour le développement de cellules souches pour l'ingénierie tissulaire combinant les propriétés mécaniques des PHAs et les propriétés hydrophiles et bioactives des EPS.

Mots clés: poly(3-hydroxyalcanoate), polyester bactérien, copolymère amphiphile, polysaccharide, exopolysaccharide, chimie click, oligoester fonctionnalisé

Elaboration of new functionalized bacterial biopolyesters for biomedical applications

Poly(3-hydroxyalkanoate)s, or PHAs, are linear biodegradable and biocompatible biopolyesters synthesized by bacterial microorganisms as energy and carbon supply. They are synthesized by bacteria from renewable resources and the diversity of the achievable structures leads to a large range of mechanical properties.

First, we studied the PHAs production ability of several new marine bacteria strains, isolated from microbial mats from French Polynesia, using, among others, natural substrates such as coprah oil, glucose and oleic acid. We showed particularly that the strain *Pseudomonas guezennei* was able to produce PHAs with controlled amounts of insaturations and high molar masses. Then, we prepared functionalized PHAs oligomers with controlled structure and bearing a terminal alkyne or alkene function. Following that, these oligomers were used to elaborate amphiphilic by click chemistry graft copolymers EPS-*g*-PHA with bacterial exopolysaccharide (EPS). Finally, the last part of this work was the making of a scaffold for stem cell culture for tissue engineering which combined the mechanical properties of PHAs and the hydrophilicity and bioactive properties of EPS.

Keywords: poly(3-hydroxyalkanoate), bacterial polyester, amphiphilic copolymer, polysaccharide, exopolysaccharide, click chemistry, functionalized oligoesters