



HAL
open science

Mise en œuvre d'un système de confinement et de délivrance moléculaire pour la production in situ de glucose au sein d'un hydrogel conçu pour l'ingénierie tissulaire

Julie Boisselier

► To cite this version:

Julie Boisselier. Mise en œuvre d'un système de confinement et de délivrance moléculaire pour la production in situ de glucose au sein d'un hydrogel conçu pour l'ingénierie tissulaire. *Biomatériaux*. Université de Cergy Pontoise, 2016. Français. NNT : 2016CERG0830 . tel-01468451

HAL Id: tel-01468451

<https://theses.hal.science/tel-01468451>

Submitted on 15 Feb 2017

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.



Ecole doctorale Sciences et Ingénierie
De l'Université Paris Seine

Thèse de doctorat

Présentée par

Julie BOISSELIER

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris Seine

Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biomatériaux

Mise en œuvre d'un système de confinement et de délivrance moléculaire pour la production *in situ* de glucose au sein d'un hydrogel conçu pour l'ingénierie tissulaire

Préparée au sein de l'Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule (EA 1391)

Soutenance publique prévue le 9 novembre 2016

Membres du jury :

Nicolas BLANCHEMAIN	Maître de conférences, Université Lille 2	Rapporteur
Jean COUDANE	Professeur, Université Montpellier 1	Rapporteur
Paul VAN TASSEL	Professeur, Université Yale	Examineur
Emmanuel PAUTHE	Professeur, Université Paris Seine	Directeur de thèse
Adeline GAND	Maître de conférences, Université Paris Seine	Co-encadrante

REMERCIEMENTS

La thèse n'est pas qu'une expérience scientifique, elle est avant tout une expérience humaine faite de nombreuses rencontres ayant contribué au bon déroulement et à la réussite de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci au Pr Paul Van Tassel d'avoir accepté de présider ce jury. Merci au Pr Jean Coudane et au Dr Nicolas Blanchemain d'avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux de thèse. Merci pour votre rapidité et votre efficacité mais surtout pour vos conseils.

Je remercie ensuite le Pr Emmanuel Pauthe, mon directeur de thèse, et le Dr Adeline Gand, ma co-cadrante de thèse. Merci pour votre confiance et votre soutien dès les premiers instants. Notre trio aura été efficace, malgré le peu de temps que nous avons. Il fallait que je soutienne avant le début de mon congés maternité et nous l'avons fait, un grand merci à vous deux. Nos discussions et blagues en tout genre dans le laboratoire me manqueront.

Je remercie également le Pr Véronique Larreta-Garde pour son aide et pour les discussions enrichissantes et scientifiques (ou non !) que nous avons pu avoir autour d'un café.

Je remercie les membres du laboratoire ERRMECe pour leur accueil et leur gentillesse, avec un remerciement tout particulier pour Lamia, notre petit ange du laboratoire qui prend soin de nous et sur qui nous pouvons tout le temps compter.

Je remercie les thésards et pour certains docteurs pour les moments de bonne humeur passés avec eux. Merci particulièrement à Audrey, Mathieu et Thomas, mes loulous qui m'ont soutenu, aidé et beaucoup fait rire avec leurs blagues et surtout bêtises en tout genre. Ces moments m'ont manqué pendant ma période de rédaction ...

Je remercie ma petite Marie ou plutôt ma Tac. Merci pour tous ces moments de partage et de confidences que nous avons partagé dans ce petit bureau toutes les deux. Ils ont été l'initiateur d'une très belle et sincère amitié. Ces trois années de thèse à rire et se soutenir mutuellement n'auraient pas été les mêmes sans toi. Cette n'aurait pas eu la même saveur sans tous nos cafés de commérage. Je te souhaite du bonheur et de la réussite car tu le mérites.

... Tic & Tac ...

A mes parents et mes grands-parents. Merci d'être toujours présents pour moi depuis ma tendre enfance et de m'avoir permis de faire ce que je souhaitais. Si je suis arrivée là où j'en suis, c'est grâce à vous. Je ne vous remercierai jamais assez. Je suis si fière de vous avoir près de moi.

A Jérôme, l'homme de ma vie. Merci de m'avoir soutenu au quotidien. Je sais que ça n'a pas été facile pour toi mais tu as toujours été là pour moi, pour nous. Tu as accepté toutes les contraintes que je t'imposais, sans dire mot. Je ne te serai jamais assez reconnaissante pour ce que tu as fait. Je n'aurais jamais tenu ces trois années de thèse sans ton soutien et ton amour, amour qui s'est concrétisé par l'arrivée tant attendue de notre petite Clémence. Grâce à toi, je suis une femme heureuse et comblée.

... Je vous aime ...

RESUME

En ingénierie tissulaire, la survie *in vivo* de cellules souches implantées au sein d'un biomatériau est limitée par les conditions d'un environnement ischémique qui se caractérise par un déficit en oxygène et en nutriments. Récemment, dans le cadre d'un projet de recherche dédié au développement d'un hydrogel composite à base de fibrine, biomatériau conçu pour améliorer la survie de cellules souches post-implantation, il a été mis en évidence la nécessité de contrôler dans le temps et l'espace la disponibilité du glucose au sein de ce matériau. Cet apport *in situ* de glucose est réalisé par dégradation contrôlée de l'amidon, un polymère de glucose. Cette production est assurée par action enzymatique d'un catalyseur spécifique de l'hydrolyse de l'amidon, l'amyloglucosidase (AMG).

Toutefois, il convient de maîtriser différents paramètres tels que la fuite de l'AMG en dehors de l'hydrogel ou encore sa perte d'activité au cours du temps. Dans ce contexte, l'encapsulation de l'AMG dans des nanoparticules d'un polymère biodégradable et biocompatible, ici l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), devrait permettre le contrôle des paramètres susmentionnés.

Des nanoparticules de type core-shell contenant l'AMG (NPe) ont été synthétisés par l'adaptation d'un protocole de double émulsion (water-oil-water). Différentes méthodes ont été développées pour déterminer les propriétés physico-chimiques et biochimiques des nanoparticules produites. Le protocole de synthèse a été optimisé afin de produire des nanoparticules reproductibles et stériles utilisables dans des hydrogels implantables *in vivo*.

Le cahier des charges de l'hydrogel enrichi en amidon et en NPe impose un apport continu du glucose pendant 1 mois. La stabilité des nanoparticules a été étudiée en solution et dans les hydrogels. La production de glucose grâce à ces NPe a été investiguée en solution et en hydrogel mettant en avant l'intérêt de ces nanoparticules au sein du dispositif.

Mots clefs

Nanoparticules, PLGA, Double émulsion, Production progressive de glucose, Hydrogel

ABSTRACT

In tissue engineering, the *in vivo* survival of stem cells located within a biomaterial is limited by an ischemic environment characterized by a low supply of oxygen and nutrients. Recent studies on fibrin based hydrogels (designed to improve stem cells survival after implantation) have highlighted the need to control the spatiotemporal availability of glucose within a biomaterial scaffold. Glucose release occurs through the degradation of starch, a glucose polymer, at a rate controlled by the action of the enzyme amyloglucosidase (AMG), a specific catalyst for the hydrolysis of starch.

In order to eventually be of clinical impact, critical parameters must be tuned, such as the AMG leakage outside the hydrogel and its loss of activity over time. In this context, AMG encapsulation within nanoparticles of a biodegradable and biocompatible polymer, here poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), is a promising means toward controlling the above parameters.

The AMG-containing core-shell type nanoparticles (NPe) were synthesized by an adaptation of the double emulsion technique (water-oil-water). Different methods have been developed to determine the physicochemical and biochemical properties of the resulting nanoparticles. The synthesis was optimized to produce sterile and reproducible nanoparticles appropriate for *in vivo* implantable hydrogels.

Nanoparticle stability and glucose release were investigated in solution and in hydrogels. A key specification of the hydrogel system, enriched in starch and NPe, is the continuous supply of glucose over 1 month. Glucose production was observed to meet this specification, highlighting the potential advantages of this approach.

Keywords

Nanoparticles, PLGA, Double emulsion, Progressive production of glucose, Hydrogel

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
RESUME	7
ABSTRACT	9
TABLE DES MATIERES	11
ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION GENERALE	19
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
I. Les dispositifs composites pour l'ingénierie tissulaire.....	29
I.1. Les biomatériaux proactifs	29
I.1.1. La biofonctionnalisation par modification du biomatériau.....	30
a. Les modifications structurales.....	30
b. Les modifications physico-chimiques et biologiques	33
I.1.2. Les hydrogels comme support de bioactivité.....	36
a. Les hydrogels à base de polysaccharides	36
b. Les hydrogels de protéines.....	38
I.2. Le rôle et le contrôle de la délivrance moléculaire	42
I.2.1. Le greffage	42
I.2.2. L'encapsulation.....	43
I.3. Les nano et microparticules pour la délivrance	45
I.3.1. Les micelles.....	45
I.3.2. Les liposomes	47
I.3.3. Les nano et microgels.....	48
I.3.4. Les sphères et capsules de polymères de taille nano- et micrométrique.....	49
II. Les polymères biodégradables et biocompatibles comme support d'encapsulation	51

II.1.	Systèmes à base de polymères naturels	52
II.1.1.	Les nano et microparticules à base de protéines.....	52
II.1.2.	Les nano et microparticules à base de chitosan et de dextrane	54
II.2.	Système à base de polymères synthétiques hydrolysables	56
II.2.1.	La polycaprolactone	56
II.2.2.	L'acide polylactique	58
II.2.3.	L'acide poly(lactique-co-glycolique)	60
III.	Stratégies mises au point pour la survie des cellules au sein d'un hydrogel	62
III.1.	Rôle de l'oxygène et des nutriments.....	63
III.2.	Importance du glucose	65
III.3.	Apport de glucose <i>in situ</i>	68
III.3.1.	Les polymères de glucose comme réservoir de glucose	68
a.	Le glycogène	68
b.	L'amidon	70
c.	Choix du polymère de glucose et utilisation	72
III.3.2.	Hydrolyse enzymatique de l'amidon.....	74
a.	Les α -amylases et les β -amylases.....	75
b.	Les isoamylases et les pullulanases	76
c.	Les amyloglucosidases.....	78
CHAPITRE 2 :	MATERIELS ET METHODES.....	81
I.	Matériel biologique et chimique.....	83
I.1.	Protéines	83
I.1.1.	L'amyloglucosidase.....	83
I.1.2.	Le fibrinogène.....	83
I.1.3.	La thrombine	84
I.2.	Polymères.....	84
I.2.1.	L'acide poly(lactique-co-glycolique)	84

I.2.2.	L'alcool polyvinylique	84
I.2.3.	L'amidon	84
II.	Synthèse des nanoparticules	85
II.1.	Protocole de synthèse des nanoparticules	85
II.1.1.	Rendement de synthèse.....	85
II.1.2.	Détermination de la quantité d'AMG encapsulée dans les nanoparticules.....	86
a.	Méthode directe.....	86
b.	Méthode indirecte.....	89
II.2.	Modification des paramètres expérimentaux.....	92
II.2.1.	Modification du temps de sonication.....	92
II.2.2.	Modification du temps de centrifugation	92
II.3.	Nanoparticules stériles.....	92
II.3.1.	Protocole de préparation	92
II.3.2.	Tests de stérilité	93
III.	Caractérisation physico-chimique et biochimique des nanoparticules.....	93
III.1.	Analyse de la morphologie des nanoparticules	93
III.2.	Mesure de la taille et de l'indice de polydispersité.....	94
III.3.	Mesure de la charge	94
III.4.	Répartition de l'AMG dans les nanoparticules.....	95
IV.	Préparation et caractérisation des hydrogels	95
IV.1.	Protocole de préparation des hydrogels.....	95
IV.2.	Détermination des propriétés viscoélastiques.....	96
IV.3.	Structure interne de l'hydrogel	97
IV.4.	Fuite des précurseurs et produit d'hydrolyse de l'amidon	97
V.	Stabilité des nanoparticules en solution et en hydrogels	100
V.1.	Suivi du comportement en solution	100
V.1.1.	Evolution de la morphologie	100
V.1.2.	Analyse de la taille des nanoparticules	100

V.1.3.	Répartition des nanoparticules en solution	100
V.2.	Suivi du comportement au sein d'hydrogels.....	101
V.2.1.	Répartition des nanoparticules au sein d'hydrogels	101
V.2.2.	Suivi de la morphologie des nanoparticules contenues dans les hydrogels	102
VI.	Production de glucose par l'AMG libre ou encapsulée	102
VI.1.	Influence de différents paramètres expérimentaux sur l'activité de l'AMG.....	102
VI.1.1.	Influence de la sonication.....	102
VI.1.2.	Mesure de l'activité résiduelle de l'AMG à 37°C.....	102
VI.2.	Suivi de la production de glucose par l'AMG libre ou encapsulée en solution.....	103
VI.3.	Suivi de l'activité de l'AMG libre ou encapsulée au sein d'hydrogels à base de fibrine	103
CHAPITRE 3 :	RESULTATS ET DISCUSSION	105
Préambule		107
I.	Développement des nanoparticules.....	109
I.1.	Synthèse des nanoparticules.....	109
I.1.1.	Préparation des nanoparticules par la technique de double émulsion	109
a.	Dispersion de l'AMG en solution organique.....	110
b.	Dispersion de gouttelettes de PLGA contenant l'AMG dans une solution aqueuse.....	110
c.	Rigidification de la coque de PLGA.....	111
I.1.2.	Rendement de synthèse.....	112
I.1.3.	Détermination de la quantité d'AMG encapsulée dans les nanoparticules de PLGA .	113
a.	Détermination du taux d'encapsulation par méthode directe	113
b.	Détermination du taux d'encapsulation par méthode indirecte	115
I.2.	Caractérisation physico-chimique et biochimique des nanoparticules	121
I.2.1.	Analyse de la morphologie et mise en évidence du système cœur-coquille	121
I.2.2.	Détermination de la taille et de l'indice de polydispersité	125
I.2.3.	Etude de la charge des nanoparticules	130
I.2.4.	Répartition de l'AMG au sein des nanoparticules.....	131

I.3.	Optimisation des nanoparticules produites par la technique de double émulsion.....	134
I.3.1.	Influence des paramètres expérimentaux sur les caractéristiques physico-chimiques et le rendement de synthèse des nanoparticules	135
a.	Modification du temps de sonication.....	135
b.	Modification du temps de centrifugation	137
I.3.2.	Préparation de nanoparticules stériles	139
a.	Protocole de synthèse.....	139
b.	Tests de stérilité	139
II.	Stabilité et activité des nanoparticules de PLGA en solution et au sein d'un hydrogel	141
II.1.	L'hydrogel de fibrine-amidon	141
II.1.1.	Préparation et manipulation des hydrogels.....	142
II.1.2.	Propriétés mécaniques et structure des hydrogels.....	143
II.1.3.	Fuite des précurseurs et produit d'hydrolyse de l'amidon au sein d'hydrogels à base de fibrine	147
a.	Etude de la fuite du glucose	147
b.	Etude de la fuite de l'AMG	149
c.	Suivi de la fuite des nanoparticules.....	150
II.2.	Etude de la stabilité des nanoparticules	152
II.2.1.	Suivi du comportement des nanoparticules en solution	152
a.	Evolution de la morphologie des nanoparticules en solution.....	153
b.	Evolution de la taille et de la répartition des nanoparticules en solution	154
II.2.2.	Etude du comportement des nanoparticules contenues dans des hydrogels.....	157
a.	Suivi de l'organisation des nanoparticules au sein d'hydrogels.....	158
b.	Suivi de la morphologie des nanoparticules contenues dans des hydrogels	161
II.3.	Production de glucose par l'AMG libre ou encapsulée	164
II.3.1.	Influence des conditions expérimentales sur l'activité de l'AMG	164
a.	Influence des étapes de sonication sur l'activité de l'AMG	164
b.	Détermination de l'activité résiduelle de l'AMG au cours du temps	165

II.3.2.	Suivi de la production de glucose par l'AMG libre ou encapsulée en solution	167
II.3.3.	Suivi de l'activité de l'AMG libre ou encapsulée au sein d'hydrogels à base de fibrine	171
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		177
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		187
ANNEXES.....		205

ABREVIATIONS

AMG	Amyloglucosidase
AMG*	AMG marquée à l'AlexaFluor568 NHS Ester
DCM	Dichlorométhane
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
EE	Taux d'encapsulation
ELS	Electrophorèse laser Doppler
FDA	Food and drug administration
hCSMs	Cellules souches mésenchymateuses humaines
HFb	Fibrinogène humain
HTb	Thrombine humaine
MEB	Microscopie électronique à balayage
NP/NPe	Nanoparticules vides ou contenant de l'AMG
NP ^{diφ} /NPe ^{diφ}	NP ou NPe marquées au 9,10-diphénylanthracène
NPe*	NP contenant de l'AMG*
NPs	Nanoparticules
PDI	Indice de polydispersité
PGA	Acide polyglycolique
PLA	Acide polylactique
PLGA	Acide poly(lactique-co-glycolique)
PVA	Alcool polyvinylique
TCA	Acide trichloroacétique

INTRODUCTION GENERALE

Les stratégies actuelles en médecine réparatrice et régénératrice visent à proposer des dispositifs capables de remplacer ou d'augmenter une fonction existante. Pour ce faire, depuis quelques dizaines d'années, le concept d'ingénierie tissulaire s'est fortement développé. L'ingénierie tissulaire se caractérise comme étant une approche dans laquelle il s'agit de comprendre et maîtriser les relations entre les structures et les fonctions des tissus *via* le développement de substituts pouvant contribuer à restaurer et à améliorer les fonctions de ces derniers. Ainsi, le substitut "biomatériau" est avant tout un matériau "support" qui doit servir de matrice pour permettre aux cellules de tissus spécifiques de se développer et générer un tissu néoformé. Ce substitut peut être composite et de fait constitué de plusieurs éléments : une partie "matériau" (capable de servir d'échafaudage) et des éléments "nutritifs" (capables de contribuer au développement des cellules). La combinaison de ces éléments doit contribuer au développement des cellules, qu'elles soient en simple contact et/ou au sein du dispositif. Ces biomatériaux composites de nouvelle génération doivent donc posséder différentes caractéristiques, telles que des propriétés évidentes de biocompatibilité, mais ils doivent également être capables de favoriser des propriétés dynamiques et d'interactions avec le milieu cellulaire environnant. L'un des challenges en science des biomatériaux est donc la mise en place d'un échange dynamique et proactif entre le biomatériau et les cellules. Ce dialogue doit satisfaire aux exigences de la survie cellulaire, de l'attachement à la prolifération, en passant par l'étalement, la migration, etc.

Au sein de ces dispositifs proactifs, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) représentent un outil prometteur pour l'ingénierie tissulaire. En effet, du fait de leur caractère multipotent, les CSMs possèdent la capacité de se différencier en différents types cellulaires suivant leur environnement (ostéocytes, chondrocytes, myotubes, adipocytes ...)¹. Cette capacité joue alors un rôle central dans de nombreuses applications en ingénierie tissulaire, permettant ainsi l'utilisation de ces cellules dans un contexte clinique. Elles permettent la reconstruction de différents types de tissus tels que du cartilage, du myocarde ou encore un réseau neuronal. De plus, les CSMs sont facilement isolables de la moelle osseuse, du placenta ou encore du tissu adipeux. Elles peuvent présenter également la capacité de migrer vers une zone d'inflammation afin d'exercer un effet immunosuppresseur et anti-inflammatoire². Au regard de ces différentes capacités, les CSMs représentent donc un outil de plus en plus sollicité en ingénierie tissulaire.

Les capacités d'adhérer, de s'étaler et de proliférer au sein d'un biomatériau de type hydrogel de fibrine ont été démontrées avec des CSMs humaines (hCSMs). Il a dès lors été possible d'envisager pour la reconstruction osseuse d'encapsuler ces cellules et de les implanter dans un défaut osseux³. Une preuve de concept de leur intérêt en ingénierie tissulaire a été démontrée dans un défaut osseux chez le gros animal⁴. Pour cela, des CSMs de moelle osseuse ont été prélevées chez le

mouton, amplifiées puis incorporées dans des billes de corail. Ce corail enrichi a ensuite été implanté dans un défaut, de quelques millimètres à quelques dizaines de millimètres, effectué chez un modèle ovin. La formation osseuse ainsi que la cicatrisation du tissu osseux ont été observées chez le mouton 16 semaines post-implantation. Cependant, l'efficacité thérapeutique obtenue pour le corail enrichi en CSMs reste inférieure à la technique de référence utilisée en ingénierie tissulaire osseuse, l'autogreffe.

Du fait de cette moindre efficacité, l'utilisation *in vivo* des CSMs en ingénierie tissulaire osseuse est restreinte, en partie due à la diminution de la survie de ces cellules après implantation. En effet, le développement et l'implantation de matériaux cellularisés sont limités du fait de la faible capacité de ces cellules à résister à la mort cellulaire, induisant une diminution de l'efficacité de l'implant cellularisé. L'une des explications possibles à cette mort cellulaire massive est l'environnement rencontré par les cellules après l'implantation. Effectivement, les CSMs encapsulées dans le matériau se retrouvent dans un environnement ischémique, dépourvu en oxygène et en nutriments, et où le manque en ces éléments essentiels affecte de manière significative les mécanismes de survie des CSMs, conduisant à la mort de celles-ci. Maîtriser leur survie ainsi que leur différenciation au sein d'un dispositif proactif devient donc un challenge.

Comment augmenter la survie des CSMs après implantation *in vivo* ?

L'une des approches a d'abord été d'étudier le comportement cellulaire en conditions hypoxiques et en présence d'un nutriment, le glucose. Les hCSMs, cultivées en conditions quasi-anoxiques, ont présenté une mort cellulaire importante, *in vitro* et *in vivo*. Par contre, les hCSMs cultivées dans les mêmes conditions mais en présence de glucose apporté de manière exogène présentaient une amélioration significative de leur survie, aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Cette étude a permis de mettre en évidence que les CSMs placées dans des conditions quasi-anoxiques n'étaient capables de résister à la mort cellulaire qu'en présence de glucose, faisant du glucose un acteur principal dans la survie des CSMs après implantation⁵.

Comment développer un microenvironnement enrichi en glucose ?

Cette problématique est le cœur d'un projet de recherche financé par l'ANR et accompagné en maturation par la SATT IDF-Innov. En effet, ce projet vise à développer un biomatériau permettant l'amélioration de la survie et de la fonctionnalité de hCSMs transplantées dans des défauts osseux dont le volume est de pertinence clinique. Un biomatériau créant un environnement propice à la survie des CSMs et permettant l'apport continu de glucose a donc été imaginé. Pour cela, un hydrogel de fibrine a été utilisé comme support pour les hCSMs et a été supplémenté en glucose, servant de fuel principal pour les cellules. Cependant, des modèles mathématiques ont été mis au

point, mettant en évidence une fuite importante et rapide du glucose hors du matériau, le rendant indisponible pour les CSMs.

Comment éviter la fuite du glucose ?

Afin de retenir le glucose le plus longtemps possible, un agent viscosigène a été introduit dans la formulation du matériau : l'amidon. Des modèles mathématiques ont permis de mettre en évidence qu'en présence d'amidon, la fuite du glucose est retardée. De plus, l'amidon est un biopolymère ramifié de glucose. Par hydrolyse de ses liaisons glucosidiques, il peut donc également servir de réservoir pour la production *in situ* de glucose. En effet, l'utilisation d'enzymes capables d'hydrolyser l'amidon par ses extrémités non réductrices, telles que l'amyloglucosidase (AMG), permettrait la production contrôlée de glucose directement à l'intérieur de l'hydrogel. La combinaison d'amidon (pour augmenter la viscosité interne de l'hydrogel de fibrine et comme réservoir de glucose) et d'AMG (enzyme permettant l'hydrolyse de l'amidon et la production de glucose) dans un hydrogel de fibrine conduirait à la formation d'un système de délivrance de glucose pour les hCSMs et permettrait ainsi une amélioration de leur survie et un maintien de leur fonctionnalité.

L'efficacité des différents matériaux a donc tout d'abord été testée *in vitro*. Pour cela, des hCSMs ont été encapsulées dans soit un hydrogel de fibrine, soit un hydrogel de fibrine contenant du glucose dans le milieu de culture, soit un hydrogel fibrine-amidon-AMG. Ces différents matériaux ont été placés dans une station hypoxique pendant 14 jours. Après ce temps d'incubation, l'utilisation d'un hydrogel de fibrine seul a conduit à une mort cellulaire prématurée, observée dès les premiers jours de culture. L'apport de glucose de manière exogène permet une augmentation de la survie des hCSMs par rapport à l'hydrogel de fibrine seul, correspondant à un taux de survie de 40% par rapport au jour 1. Par contre, l'apport de glucose *in situ* par hydrolyse de l'amidon par l'AMG permet une augmentation de 50% du nombre de cellules vivantes par rapport à la condition d'apport de glucose exogène. L'utilisation d'un système d'apport de glucose basé sur l'hydrolyse de l'amidon par l'AMG permet donc une augmentation de la survie des hCSMs.

L'efficacité de ce système a ensuite été testée *in vivo*. Les hCSMs contenues dans un hydrogel de fibrine ou dans un hydrogel de fibrine-amidon-AMG ont été implantés en site ectopique chez la souris. A 14 jours post-implantation, aucune cellule vivante n'a été retrouvée dans l'hydrogel de fibrine. Cependant, de nombreuses cellules vivantes ont été retrouvées dans les implants de fibrine-amidon-AMG. Ce résultat indique donc que la combinaison d'amidon et d'AMG dans un hydrogel de fibrine enrichi en hCSMs permet une amélioration *in vivo* de la survie des cellules encapsulées. Cependant, la formation osseuse a été testée à 60 jours post-implantation par analyses histologiques et aucune formation osseuse n'a été observée.

Comment améliorer ce système de production de glucose pour favoriser la formation osseuse ?

A la suite de ces résultats, différents problèmes ont été relevés. De l'amidon est toujours présent dans les matériaux après 2 mois, provoquant un encombrement stérique et empêchant donc la formation osseuse. Un des aspects du projet SATT Maturation a été l'amélioration de la dégradation de l'amidon dans l'hydrogel par l'utilisation d'enzymes permettant une meilleure solubilisation de l'amidon. Le deuxième problème a été détecté grâce à des modélisations mathématiques. Elles ont mis en évidence que l'AMG diffuse hors de l'hydrogel de fibrine-amidon dans les premiers jours d'incubation, conduisant ainsi à une diminution de sa biodisponibilité au sein du composite. La solution envisagée a donc été d'encapsuler l'AMG dans des nanoparticules biocompatibles et biodégradables, afin d'augmenter la bioactivité et la biodisponibilité de l'AMG dans ce système de production de glucose. En effet, son encapsulation au sein de nanoparticules permettrait de contrôler son relargage dans l'hydrogel et donc la production de glucose.

Les nanoparticules biodégradables et biocompatibles représentent un outil intéressant pour la délivrance de molécules bioactives telles que l'AMG. De nombreux polymères, naturels ou synthétiques, peuvent être utilisés pour l'encapsulation de molécules bioactives. L'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) est un copolymère biodégradable et biocompatible approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) dont les propriétés peuvent être modulées par modification du ratio des deux polymères qui le constituent. Pour ses nombreux avantages, le PLGA a ainsi été choisi comme support polymérique pour l'encapsulation de l'AMG.

L'objectif de ces travaux de thèse a donc été d'essayer d'améliorer le système de production de glucose par l'encapsulation de l'AMG dans des nanoparticules. Dans cette logique, ces travaux s'organisent donc suivant deux axes principaux :

- développer et caractériser des nanoparticules de PLGA contenant l'AMG
- étudier leur comportement d'un point de vue de leur stabilité et de leur capacité à générer du glucose en solution et au sein d'hydrogels

Ce manuscrit de thèse s'articule en trois chapitres.

- ✓ Le premier chapitre correspond à un état de l'art présentant les choix possibles de bioactivation d'un biomatériau et notamment la bioactivation par encapsulation de molécules bioactives dans différents systèmes particuliers produits à partir de différents

polymères. Elle présente également la stratégie mise au point et les différents choix possibles pour développer un biomatériau proactif pouvant permettre l'amélioration de la survie de cellules implantées *in vivo*.

- ✓ Le deuxième chapitre présente les méthodes expérimentales utilisées lors de ces travaux, notamment la préparation des nanoparticules et des hydrogels, ainsi que les différentes techniques physico-chimiques et biochimiques utilisées pour les étudier.

- ✓ Le troisième chapitre expose les résultats obtenus lors de ces travaux de thèse ainsi qu'une discussion de ces résultats, organisés suivant les deux axes présentés précédemment. La première partie concerne le développement de l'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules de PLGA. Le protocole de synthèse de ces nanoparticules, la détermination de leurs caractéristiques physico-chimiques et biochimiques ainsi que l'optimisation de certains paramètres y sont décrits. La deuxième partie présente quant à elle l'étude du comportement des nanoparticules produites. La stabilité et l'activité de ces nanoparticules en solution et dans un hydrogel y sont présentées.

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les dispositifs composites pour l'ingénierie tissulaire

I.1. Les biomatériaux proactifs

Les biomatériaux pour la santé représentent un domaine de recherche à l'interface de différentes disciplines, telles que la biologie, la chimie, la physique, ou encore l'électronique ou la robotique (en particulier avec l'émergence des systèmes embarqués). Ce secteur est donc en pleine mutation et en constante évolution. Clairement, du fait de leur diversité, les biomatériaux restent difficiles à définir et doivent être abordés avec de nouveaux paradigmes. Lors des conférences de consensus de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux, une définition des biomatériaux a été proposée : un biomatériau est un « *matériau non vivant, utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou assistance) fonctionnelle* » (D.F. Williams "Definition in biomaterials", Amsterdam 1987).

Au-delà des mots utilisés dans cette définition, mots qui sous entendent une neutralité et une conception « non vivante » du dispositif, il est important de prendre en compte la réalité : ces matériaux sont avant tout en contact avec des tissus et/ou des fluides vivants. Cette notion de contact, qui semble évidente dans le cas de biomatériaux implantés, doit être étendue à tous contacts qui s'effectuent à la surface ou à l'extérieur du corps. En lien direct avec cet aspect de contact, la notion de biocompatibilité est essentielle dans le domaine des biomatériaux. Elle peut être qualifiée soit de « biocompatibilité négative », associée aux propriétés que le matériau ne doit pas avoir (pas de réaction inflammatoire, pas de toxicité ...), soit de « biocompatibilité positive ou élargie », correspondant au fait d'utiliser la réponse de l'hôte de manière appropriée dans le cadre d'une application donnée. La « biocompatibilité élargie » est de plus en plus associée à la notion de bioactivité. Cela correspond à la volonté de développer un biomatériau qui ne soit pas nécessairement inerte mais qui ait la capacité d'interagir avec son environnement. C'est par exemple le cas des sutures résorbables dans lesquelles la réaction inflammatoire participe à la résorption du matériau⁶.

La capacité d'un biomatériau à interagir avec son environnement direct dépend donc essentiellement des propriétés intrinsèques de ce matériau. En effet, sa structure et sa composition chimique sont des éléments qui vont directement influencer la réponse du milieu environnant le biomatériau. Différents types de biomatériaux existent :

- les métaux et alliages métalliques
- les céramiques
- les polymères
- les matériaux d'origine naturelle

Ces différents matériaux possèdent différentes propriétés de bioactivité, se caractérisant par une interaction cellule-matériau. Pour créer un environnement optimisé et favoriser l'adhérence cellulaire, il existe différents moyens pour modifier la bioactivité du matériau.

I.1.1. La biofonctionnalisation par modification du biomatériau

L'amélioration de la bioactivité d'un matériau peut s'effectuer par des **modifications structurales** ou des **modifications physico-chimiques et biologiques**.

a. Les modifications structurales

Différents types de modifications de la structure d'un matériau ou de sa surface existent ; **la rugosité**, **la porosité** et **la rigidité** en sont des exemples.

- **La rugosité :**

La rugosité, caractéristique de surface, correspond à la présence d'aspérité (surface rugueuse) ou à leur absence (surface lisse) à la surface du matériau. Une différence de rugosité peut être obtenue par enlèvement ou par ajout de matière sur le matériau. Ainsi, le polissage⁷, le sablage⁸, les méthodes de microfabrication et de lithographie⁹ sont des techniques qui peuvent être utilisées pour rendre lisse ou rugueuse la surface d'un échantillon. La modulation de la rugosité de surface permet ensuite de modifier les interactions cellules-matériau et d'améliorer l'adhérence cellulaire à la surface de ce matériau. L'augmentation de la rugosité permet par exemple d'augmenter le nombre de cavités présentes à la surface d'un matériau, conduisant à une adsorption des protéines présentes dans le sérum du milieu de culture et favorisant l'adhérence de cellules de moelle osseuse humaines¹⁰. Il a également été observé que plus la rugosité est importante, plus le nombre d'irrégularités augmente, et plus la surface effective augmente. L'augmentation de ces

caractéristiques a conduit à l'accroissement du nombre de différentes bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ou encore *Pseudomonas aeruginosa*) sur des surfaces rugueuses, comparées à des surfaces plus lisses (**Figure 1**)^{11,12}.

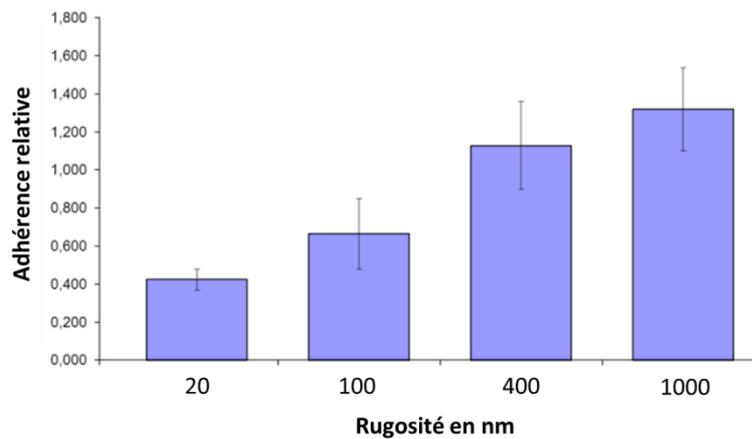


Figure 1 : Adhérence relative de bactéries (*Escherichia coli*) sur des surfaces métalliques possédant différentes rugosités¹².

- **La porosité :**

La porosité est une caractéristique qui peut être présente à la surface et/ou dans la structure interne d'un matériau. Pour créer de la porosité, différentes techniques peuvent être utilisées dont l'utilisation d'un agent porogène lors de la préparation du matériau¹³, l'incorporation de particules par la suite dissoutes¹⁴ ou encore par coulage d'un gel à partir d'un moule de polymères¹⁵. La présence de pores va permettre de modifier la structure du matériau et d'induire des modifications de comportements cellulaires. La culture de cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 sur des supports de polymères poreux (70%, 82%, 86% et 90% de porosité) a par exemple été étudiée. Le matériau comprenant 70% de porosité n'a pas permis l'adhésion et la croissance cellulaire. Cependant, une forte adhérence cellulaire a été observée dans les trois autres cas de porosité avec un maximum d'efficacité pour le matériau contenant 82% de porosité¹⁶. Dans une autre étude, l'importance de plusieurs tailles de pores a été mise en évidence sur des matériaux comprenant une couche macroporeuse (pores de 1 à 7 μm) et une couche mésoporeuse (pores d'environ 10 nm). Il a été observé un effet synergique des deux couches poreuses sur la prolifération de cellules d'ostéosarcome humain SaOS-2 (**Figure 2**) et sur la minéralisation¹⁷. La présence d'une porosité est donc importante pour l'adhérence et la croissance cellulaire mais il est important de trouver un juste équilibre dans la taille, la quantité et la différence d'échelle des pores présents dans le matériau.

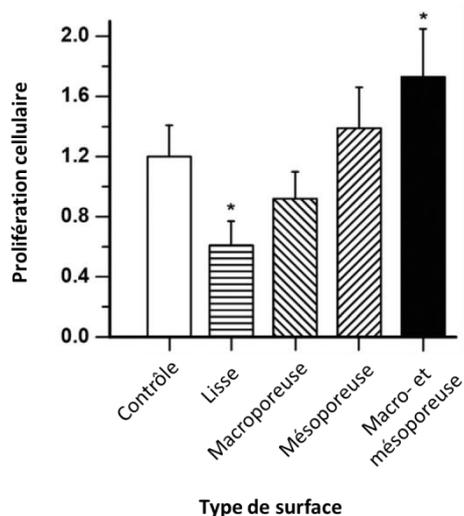


Figure 2 : Effet de la taille des pores et de leur effet synergique sur la prolifération cellulaire d'ostéosarcome humain SaOS-2¹⁷.

- **La rigidité :**

La rigidité d'un matériau est également une caractéristique importante concernant l'adhérence cellulaire. Elle peut être notamment modifiée par création de liaisons covalentes au sein du matériau, avec une réticulation chimique¹⁸ ou enzymatique¹⁹. Une expérience a été menée sur le guidage cellulaire par modification de la rigidité d'un gel de polyacrylamide. Pour cela, des fibroblastes NIH/3T3 ont été placés sur une surface de polyacrylamide comprenant deux zones distinctes de rigidité : une zone dite « molle » et une zone dite « dure ». La migration des cellules d'une zone à une autre a ensuite été observée : les cellules placées sur la zone « molle » migrent vers la zone « dure » alors que les cellules placées sur la zone « dure » contournent la zone « molle » et suivent la frontière séparant les deux zones en restant sur la zone « dure »²⁰. Par ailleurs, la rigidité du matériau doit être en accord avec le type cellulaire utilisé et l'application choisie. Par exemple, des cellules souches résidant dans le foie (RLSC) ont étéensemencées sur des matériaux gélifiés ayant un module de Young de 0,4 kPa, correspondant à la rigidité interne d'un foie normal, ou de 80 kPa, correspondant à la rigidité d'un foie atteint de fibrose et de cirrhose. Après seulement 24h de culture, les RLSC cultivées sur le gel à 0,4 kPa mettaient en évidence une différenciation homogène et une importante prolifération cellulaire. Les RLSC cultivées sur le gel à 80 kPa se maintenaient quant à elles à un stade indifférencié (**Figure 3**)²¹.

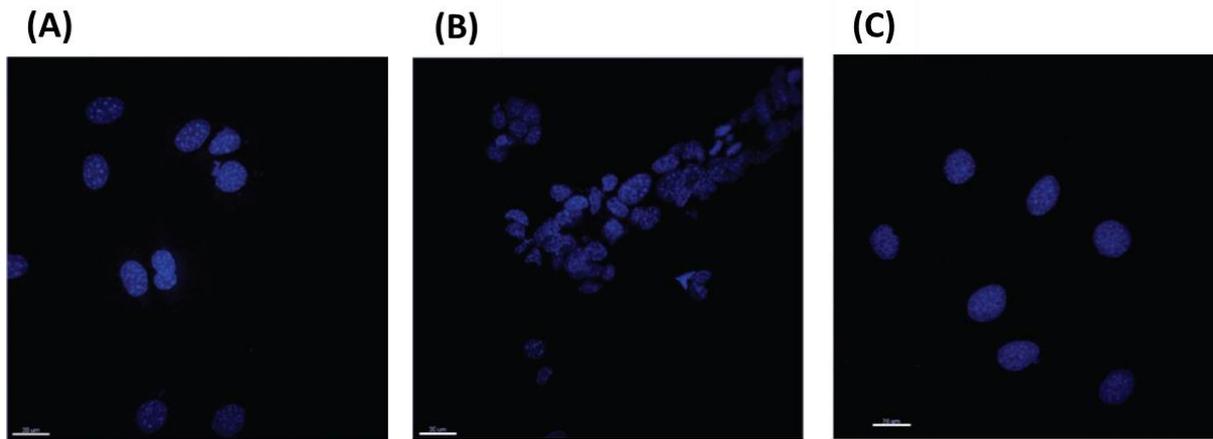


Figure 3 : Culture de cellules souches résidant dans le foie (A) sur une surface contrôlée, ou un matériau gélifié possédant une rigidité de (B) de 0,4 kPa ou (C) de 80 kPa. Le noyau des cellules est marqué au DAPI (bleu)²¹.

b. Les modifications physico-chimiques et biologiques

Il est possible de moduler ou d'activer la bioactivité d'un matériau en modifiant ses propriétés physico-chimiques. L'induction de la bioactivité par modification physico-chimique et biologiques peut s'effectuer de deux manières : par **adsorption physique** (sans formation de liaisons covalentes mais en jouant sur les liaisons faibles) ou par **voie chimique** (avec la création de liaisons covalentes, liaisons stables et fortes).

- **Modification par voie physique :**

L'adsorption physique est un phénomène qui permet la modification des propriétés physico-chimiques à l'interface du matériau, *via* la mise en place de liens non covalents entre des molécules spécifiques et la surface du matériau. Ce recouvrement se fait par l'établissement de différentes interactions entre les molécules et le matériau, liaisons ou interactions de type forces électrostatiques, forces polaires, interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes ...

Ce type de modification peut s'effectuer par un recouvrement de la surface du matériau par un système de monocouche²² ou de multicouches²³, ou bien par formation d'un système de couches auto-assemblé et organisés, technique appelée self-assembled monolayer (SAM)²⁴. Ces différents types de modifications physico-chimiques permettent la modulation du comportement cellulaire. En effet, il a été observé que la mise en place d'une couche de fibronectine (protéine d'adhésion essentielle de la matrice extracellulaire) à la surface d'un matériau permet d'augmenter de manière significative l'adhérence et l'étalement de cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 (**Figure 4**)²⁵. Par

ailleurs, la formation de SAMs à la surface de matériaux permet à l'interface une meilleure adsorption de protéines de la matrice extracellulaire (telles que la fibronectine ou la vitronectine), recouvrement conduisant à une amélioration de l'adhérence de cellules endothéliales de la veine de cordon ombilicaux (HUVEC)²⁶.

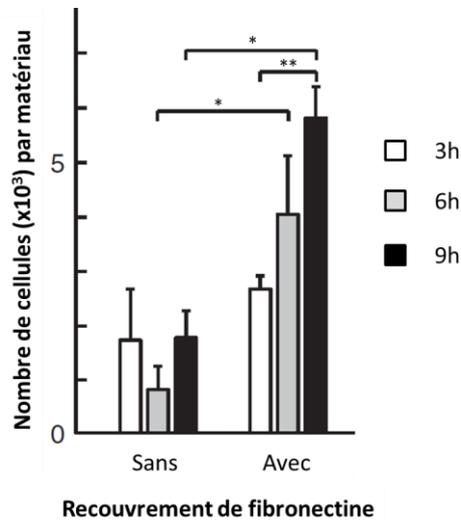


Figure 4 : Nombre de MC3T3-E1 adhérentes après différents temps de culture sur une surface avec ou sans recouvrement de fibronectine²⁵.

- **Modification par voie chimique :**

La modification de la chimie de surface d'un matériau permet de moduler son hydrophobie par la présence de groupements chimiques spécifiques (hydrophiles ou hydrophobes). Ces modifications peuvent permettre par la suite de modifier l'adhérence cellulaire et d'améliorer la réponse biologique du matériau vis-à-vis de son environnement.

Des méthodes utilisées en synthèse organique peuvent être utilisées pour greffer à la surface du matériau des groupements fonctionnels tels que des groupements hydroxyles (par traitement à la soude²⁷) ou silanes (par silanisation²⁸), ou pour modifier des fonctions existantes par oxydation²⁹ ou réduction. Le traitement à la soude a par exemple été utilisé pour diminuer l'hydrophobie de surface d'un maillage de polymères synthétiques. La densité cellulaire de cellules musculaires lisses a ainsi été doublée suite au traitement à la soude. De plus, ces cellules présentaient une morphologie étalée comparée au biomatériau non traité à la soude³⁰. L'oxydation à l'air ou à l'oxygène d'une surface de titane a permis de multiplier par 7 à 10 le nombre d'ostéoblastes de lapin présents à la surface du matériau après seulement 24h de culture³¹ (**Figure 5**).

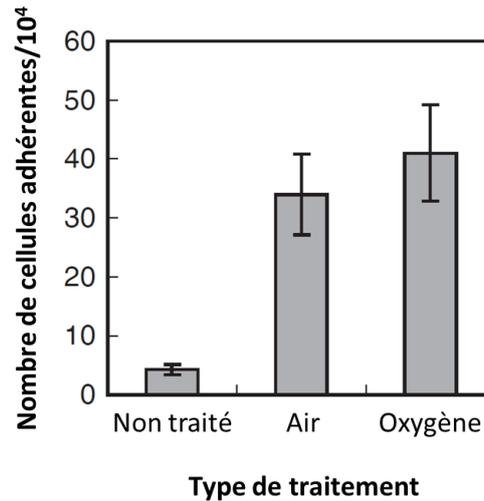


Figure 5 : Nombre d'ostéoblastes adhérents après 24h de culture sur différentes surfaces oxydées ou non à l'air ou à l'oxygène³¹.

Le greffage photo-induit est une autre technique qui permet de modifier chimiquement un matériau à partir de radiations UV³². Du polyuréthane a ainsi été fonctionnalisé avec un polymère synthétique photosensible et hydrophile pour augmenter l'hydrophilie du matériau. Il a été observé qu'en présence des polyuréthanes modifiés, l'attachement cellulaire d'HUVEC est augmenté et leur croissance plus rapide³³.

Le plasma peut également être utilisé et correspond à un état de la matière partiellement ou totalement ionisée. Il interagit avec les surfaces conduisant à la modification de la surface du matériau *via* la formation d'électrons, d'ions, de radicaux. Une surface hydrophobe peut par exemple être rendue hydrophile par un traitement au plasma à oxygène, alors qu'une surface hydrophile peut être rendue hydrophobe par traitement au plasma au tétrafluorure de carbone (CF₄). Un matériau à base de polymères synthétiques a ainsi été traité au plasma à oxygène, permettant d'augmenter de manière significative l'adhérence et la prolifération de cellules nerveuses³⁴. Un autre biomatériau à base de polymère synthétique a quant à lui été traité par ses deux types de plasma. L'étude a montré une meilleure adhérence cellulaire de fibroblastes NIH/3T3 sur le matériau traité au plasma à oxygène comparé à celui traité au plasma au CF₄, résultat lié à la meilleure adsorption de protéines du milieu de culture sur la surface du matériau hydrophile³⁵.

I.1.2. Les hydrogels comme support de bioactivité

En ingénierie tissulaire, l'un des principaux objectifs est de réparer, d'améliorer ou de remplacer des tissus ou une fonction existante. Concevoir des biomatériaux aux propriétés biologiques optimales est l'un des challenges de l'ingénierie tissulaire. Les biomatériaux utilisés doivent donc servir de matrice tridimensionnelle facilitant la réparation tissulaire. Afin de reproduire au mieux la structure et les fonctions de la matrice extracellulaire de nombreux hydrogels ont été mis au point.

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels composés, soit de polymères hydrophiles réticulés par formation de liaisons covalentes (conduisant à des hydrogels dits chimiques), soit de polymères stabilisés par interactions physiques intermoléculaires ou intramoléculaires (formant des hydrogels dits physiques). Les hydrogels absorbent une grande quantité de liquide, ce qui confère à ces matériaux une forte capacité de gonflement, permettant de confiner des biomolécules au sein de leur réseau. Les polymères d'origine naturelle, grâce à leur propriété de biocompatibilité et de biodégradabilité, sont fréquemment utilisés pour générer des hydrogels conçus pour l'ingénierie tissulaire. Parmi ces polymères, il existe les **polysaccharides** et les **protéines**³⁶.

a. Les hydrogels à base de polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères d'oses reliés entre eux par des liaisons glycosidiques. La plupart du temps, ce sont des polymères d'origine naturelle, produits par des plantes ou par des microorganismes, et donc retrouvés en abondance dans la nature. Ils forment l'un des principaux constituants des systèmes biologiques et présentent donc de nombreux avantages pour l'ingénierie tissulaire, notamment leur biocompatibilité. Parmi ces polysaccharides, l'**acide hyaluronique** et le **chitosan** sont fortement sollicités pour former des hydrogels.

- **L'acide hyaluronique :**

L'acide hyaluronique est un polysaccharide de haut poids moléculaire (10^6 Da) composé de disaccharides (N-acétyl-glucosamine et acide glucuronique) liés entre eux par des liaisons glycosidiques β -(1,4) et β -(1,6) (**Figure 6**). Il est un composant essentiel de la matrice extracellulaire et est produit localement par des cellules différenciées, se retrouvant au niveau des tissus conjonctifs mous tels la peau, l'humeur vitrée et le liquide synovial. Les cellules qui le produisent sécrètent également les enzymes qui le dégradent, les hyaluronidases. Il peut également être dégradé par des espèces réactives de l'oxygène. Les produits issus de cette dégradation sont ensuite internalisés et

dégradés par les cellules. Dans le corps humain, l'acide hyaluronique est sous la forme d'une solution visqueuse et est difficile à manipuler. De plus, son temps de vie est de seulement quelques jours^{37,38}.

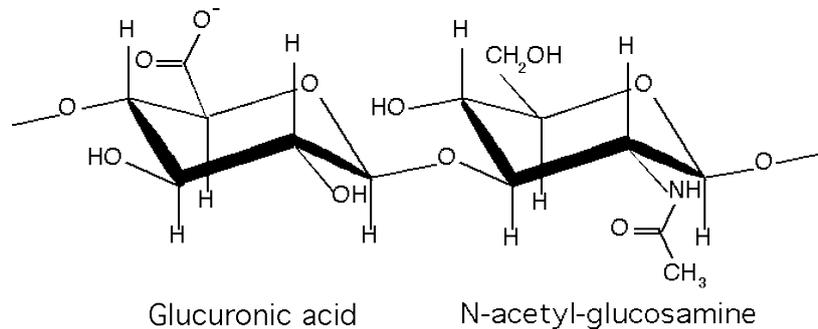


Figure 6 : Structure chimique de l'acide hyaluronique.

Pour préparer des hydrogels à base d'acide hyaluronique, la création de liaisons covalentes est nécessaire pour augmenter sa stabilité et ses propriétés mécaniques. Des hydrogels chimiques sont donc préparés par utilisation d'agents réticulants chimiques tels que le glutaraldéhyde³⁹ ou d'agents de réticulation biologiques tels que la transglutaminase⁴⁰. L'acide hyaluronique peut également être modifié par des groupements photosensibles pour faciliter sa réticulation⁴¹. Les propriétés physiques, de dégradation et de gonflement des hydrogels d'acide hyaluronique sont principalement dépendantes du polymère introduit initialement et du taux de réticulation du matériau^{39,42}. L'augmentation du taux de réticulation a par exemple permis d'augmenter de manière significative le temps de dégradation de l'hydrogel de 1 à 38 jours⁴². Dans une autre étude, l'augmentation du taux de réticulation a permis d'augmenter les propriétés mécaniques d'un hydrogel d'acide hyaluronique, modulant le comportement de cellules progénitrices neuronales. Ainsi, ces cellules se sont soit différenciées en neurones ou en astrocytes (cellules participant à la protection des neurones)⁴³. Les hydrogels d'acide hyaluronique sont utilisés dans différentes applications telles que l'ingénierie tissulaire osseuse⁴⁴, la chirurgie ophtalmique⁴⁵ ou encore pour favoriser la cicatrisation cutanée⁴⁶.

- **Le chitosan :**

Le chitosan est lui un polysaccharide linéaire de glucosamine et de N-acétyl-glucosamine obtenu par N-déacétylation de la chitine extraite du squelette des crustacés (**Figure 7**). Le chitosan est non toxique et peut être digérée par le corps humain, soit par les lysozymes, soit par les chitinases, qui sont présents dans l'intestin humain et dans le sang, ce qui en fait un polymère biodégradable et

biocompatible. Il présente également une faible immunogénicité et une activité bactériostatique (capacité à inhiber la prolifération des bactéries) et antioxydante^{38,47}.

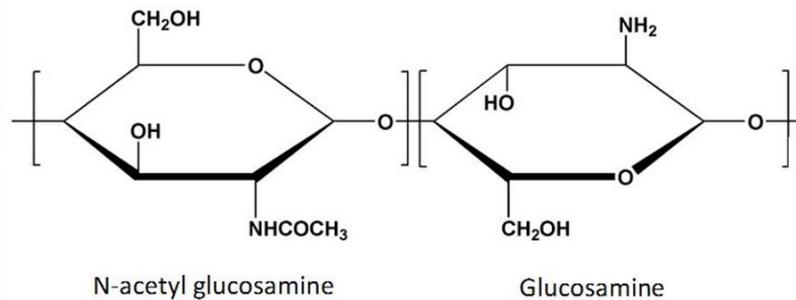


Figure 7 : Structure chimique du chitosan.

Le chitosan est un polymère cationique faiblement soluble en conditions neutres ou basiques (pH > 6,5). Sa dissolution s'effectue donc en condition acide. Une fois le chitosan dissout, il peut être utilisé pour préparer des hydrogels physiques par interactions ioniques ou des hydrogels chimiques, par ajout d'un agent réticulant tel que le glutaraldéhyde ou la génipine, ou encore par photopolymérisation dans le cas de chitosan modifié par des groupement photosensibles^{48,49}.

L'augmentation de la concentration en initiateur de polymérisation a par exemple permis de modifier le temps de dégradation de l'hydrogel de chitosan après incubation du matériau dans une solution de lysozyme. Ainsi, l'utilisation d'une faible concentration en initiateur conduit à la dégradation du matériau en 8 jours, alors que pour une concentration plus élevée, le matériau n'était pas dégradé après 18 jours d'incubation⁵⁰. Par ailleurs, le chitosan est un polymère sensible au pH permettant le gonflement de l'hydrogel à pH acide par la présence de nombreuses charges positives. Ainsi la diminution du pH a conduit au relargage plus rapide de la BSA contenue dans l'hydrogel de chitosan⁵¹. Grâce à ses nombreuses caractéristiques, le chitosan est utilisé en ingénierie tissulaire dont l'ingénierie osseuse⁵², en tant que support de cicatrisation de la peau⁵³ ou pansement antimicrobien⁵⁴.

b. Les hydrogels de protéines

Dans les tissus humains, l'environnement des cellules est la matrice extracellulaire. Ce "gel complexe" est composé entre autre de nombreuses protéines. Afin de mimer au mieux cet environnement, de nombreux hydrogels à base de protéines ont été développés. Les hydrogels de **collagène**, de **gélatine** (sa forme dénaturée) et/ou de **fibrine** en sont des exemples.

- **Le collagène et la gélatine :**

Le collagène est un polymère naturel présent dans de nombreuses matrices extracellulaires, la peau, les os, les tendons ou encore le cartilage des tissus humains. Le collagène est composé de triples hélices droite, elles-mêmes composées d'hélices gauche, permettant au collagène d'être organisé sous forme de fibres (**Figure 8**). Le collagène est naturellement dégradé par des métalloprotéases dont la collagénase, et des sérines protéases^{55,56}.

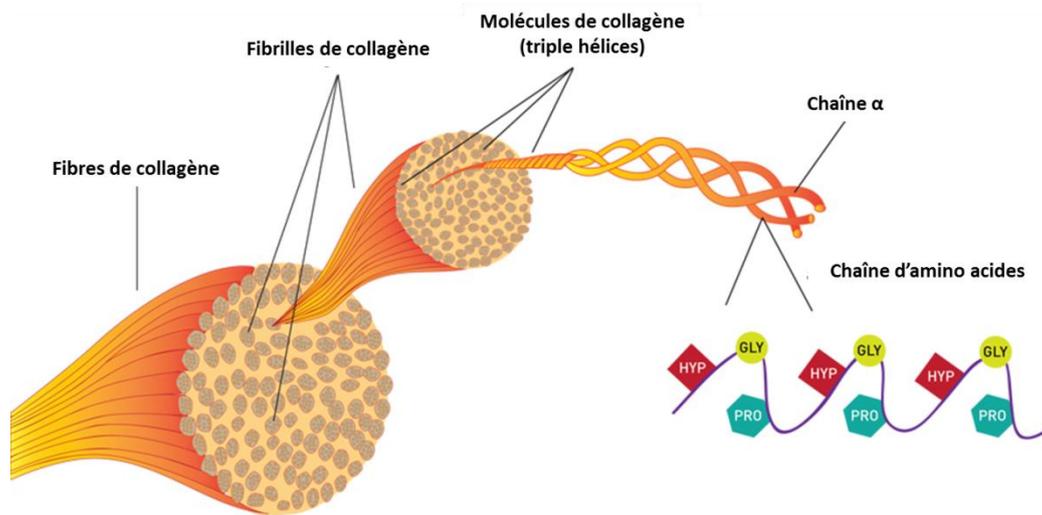


Figure 8 : Représentation schématique de l'assemblage du collagène.

La gélatine est une protéine obtenue par dénaturation thermique ou traitement chimique ou physique du collagène, conduisant à la destruction de la triple hélice du collagène et à un repliement aléatoire correspondant à la gélatine. C'est une macromolécule comportant à la fois des groupes cationiques et anioniques ainsi que des groupements hydrophobes, permettant la création de nombreuses interactions avec les molécules de son environnement. La gélatine est utilisée en ingénierie tissulaire en raison de sa non-toxicité, sa biodégradabilité, sa bioactivité et de son faible coût^{57,58}.

Le collagène et la gélatine peuvent former des hydrogels physiques à des températures en dessous de 30-35°C, par gélification thermique conduisant à un changement conformationnel permettant la formation et la stabilisation des triples hélices^{59,60}. Cependant, dans des conditions physiologiques, la température est trop élevée et rend instable ces réseaux physiques. Pour augmenter leur stabilité et leurs propriétés mécaniques, les hydrogels de collagène et de gélatine sont souvent formés par réticulation chimique *via* l'ajout d'agents de réticulation tels que les carbodiimides, le glutaraldéhyde, la génipine ou la transglutaminase⁶¹⁻⁶⁴. L'utilisation d'hydrogels de gélatine

injectables et réticulés par la transglutaminase a par exemple permis de favoriser la prolifération de fibroblastes. Par la suite, lors de l'étape de réticulation, des protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine et vitronectine) ont pu être greffées au réseau de gélatine augmentant de manière significative l'adhérence et la prolifération cellulaire⁶⁵.

Le collagène étant l'un des composants de la matrice extracellulaire, il est utilisé comme support de culture dans de nombreuses applications et par exemple pour la reconstruction de tissus tels que des vaisseaux sanguins⁶⁶. Cependant, les hydrogels chimiques de collagène se contractent après implantation *in vivo* et sont potentiellement immunogéniques (pas de source de collagène humain). A cause de ces propriétés antigéniques (capacité à interagir avec des antigènes du corps humain), les utilisations des hydrogels de collagène sont finalement limitées. Au contraire, la gélatine ne présente pas cette potentialité immunogénique grâce aux différentes étapes utilisées lors de sa production et de sa stérilisation, et ceci confère un avantage comparé au collagène⁵⁸. Cette différence conduit donc à une plus grande utilisation des hydrogels de gélatine. Ils peuvent ainsi être utilisés pour des applications telles que la régénération de tissus osseux⁶⁷ ou cardiaques⁶⁸, ou encore en tant que substitut cutané⁶⁹.

- **La fibrine :**

La fibrine est un biopolymère issu du fibrinogène, une protéine fibreuse jouant un rôle essentiel dans le maintien de l'hémostase et dans la formation efficace de caillot par formation d'un réseau de fibrine. Le fibrinogène est une protéine circulante (2 à 4 mg/mL dans le plasma) et dimérique dont chaque dimère est composé de trois paires de chaînes polypeptidiques ($A\alpha$, $B\beta$ et γ) reliées entre elles par des ponts disulfures (**Figure 9**)⁷⁰.

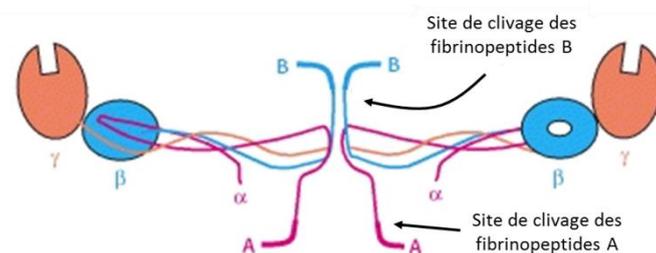


Figure 9 : Représentation schématique de la structure du fibrinogène présentant les sites de clivage par la thrombine.

Lors d'un trauma ou d'un dommage extérieur, la cascade de la coagulation sanguine est initiée dans un ordre précis mettant en jeu une succession d'une dizaine de réactions. Lors de la dernière étape

de la coagulation, la prothrombine est activée générant la thrombine. Cette enzyme reconnaît les fibrinopeptides A et B et les hydrolyse, permettant la formation d'un réseau tridimensionnel de fibrine (**Figure 10**). Cette étape est suivie par la stabilisation de ce caillot par réticulation *via* la transglutaminase, également appelée Facteur XIII. Le réseau de fibrine ainsi formé sert de support temporaire pour la régénération tissulaire et est ensuite dégradé par la plasmine⁷¹.

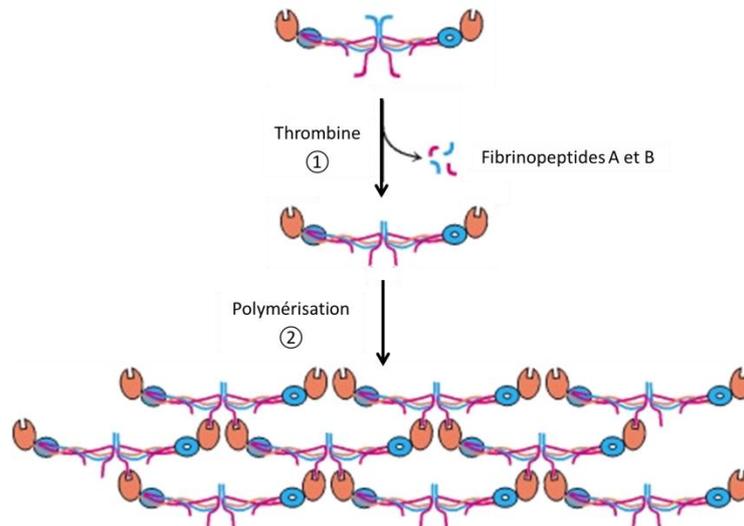


Figure 10 : Représentation schématique de la formation d'un gel de fibrine par clivage des fibrinopeptides par la thrombine permettant la formation d'un réseau tridimensionnel de fibrine.

La formation *in vitro* d'un hydrogel de fibrine s'effectue par conversion du fibrinogène en fibrine par action de la thrombine, de la même manière que lors de la coagulation sanguine. Les propriétés mécaniques des hydrogels de fibrine peuvent être améliorées par réticulation chimique par la transglutaminase^{72,73}.

Le réseau de fibrine présente la capacité de se lier à de nombreuses protéines circulant normalement dans le sang ou étant générées en réponse à un trauma⁷⁴. Cet hydrogel permet ainsi de favoriser l'adhérence et la prolifération de nombreux types cellulaires⁷⁵⁻⁷⁷. L'hydrogel de fibrine contribue par exemple à l'angiogenèse, correspondant à la formation de vaisseaux sanguins⁷⁸. La dégradation *in vivo* de l'hydrogel de fibrine s'effectue en quelques jours. Cette dégradation peut être par exemple contrôlée par ajout d'aprotinine. L'ajout de cette protéine a par exemple permis le maintien en culture de l'hydrogel sur 1 mois⁷⁶.

De par son origine et son implication *in vivo* dans la coagulation sanguine, la fibrine est naturellement utilisée comme agent coagulant sous le nom de colle de fibrine. De nombreuses colles de fibrine sont disponibles sur le marché (Vivostat®, Evicel®, Tissucol®). Ces différents kits peuvent servir de matériau support pour la biologie cellulaire. Différentes formulations de gels de fibrine,

correspondant à différentes concentrations de fibrinogène, ont par exemple été préparées à partir d'un kit Tissucol®. A la concentration optimale de 18 mg/mL en fibrinogène, le gel de fibrine formé a permis de favoriser l'adhérence, l'étalement et la prolifération de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC), ainsi que l'expression de phosphatase alcaline osseuse, un marqueur de formation osseuse³.

L'utilisation de différentes méthodes de biofonctionnalisation de matériau, par modification structurale, physico-chimique ou biologique, offre une large gamme de modifications possibles pour améliorer la bioactivité d'un biomatériau. De plus, l'utilisation d'hydrogel mimant l'environnement cellulaire permet de générer des systèmes proactifs améliorant l'adhérence et la prolifération cellulaire.

I.2. Le rôle et le contrôle de la délivrance moléculaire

Un système de délivrance moléculaire peut être défini comme une formulation ou un dispositif qui permet l'introduction d'un principe actif dans un biomatériau, souvent distribué au sein de l'organisme, afin d'améliorer son efficacité par contrôle de la vitesse et du lieu de libération de la molécule. Le principe actif sera alors délivré à une concentration choisie et sur une durée prédéterminée en fonction de l'application souhaitée. Le principe actif peut être une protéine, un peptide, un gène ou un médicament⁷⁹. Pour créer un système de délivrance moléculaire, différentes techniques peuvent être utilisées. La molécule d'intérêt peut être :

- apportée par la surface du matériau, où elle est en général **greffée** de manière stable et permanente,
- confinée au cœur du matériau, au sein d'une partie « réservoir », où elle est **encapsulée** et d'où elle sera délivrée.

I.2.1. Le greffage

Le greffage covalent d'une molécule biologique permet l'exposition de fonctions de cette biomolécule pour améliorer les interactions biomatériau-environnement et biomatériau-cellules. La création d'une liaison covalente résulte en un recouvrement plus efficace du matériau et une

rétenion de la molécule d'intérêt sur une période plus longue que dans le cas d'une adsorption physique.

L'une des utilisations du greffage de biomolécules à la surface d'un matériau est la vectorisation. La vectorisation est un domaine de la délivrance moléculaire ayant pour objectif d'apporter dans un lieu choisi du corps humain une molécule. Les supports utilisés en vectorisation sont des particules de taille micrométrique ou nanométrique dont la surface est couverte de manière covalente par de nombreuses molécules⁸⁰. Les principaux problèmes dans le développement de biomatériaux pour la vectorisation sont le passage de barrières naturelles ou chimiques du corps humain, telles que la barrière hémato-encéphalique ou l'estomac dû à son pH acide, mais également le ciblage de la zone d'intérêt. En effet, le recours à la vectorisation permet d'améliorer la biodistribution du principe actif, le meilleur ciblage vers les tissus pathologiques et la meilleure protection des tissus sains. La vectorisation peut être utilisée dans le cadre du diagnostic ou de la thérapie. Des nanoparticules PEGylées composées d'un copolymère amphiphile ont par exemple montré leur capacité à pénétrer la barrière hémato-encéphalique chez le rat, aussi bien dans le cas d'un cerveau sain que dans le cerveau d'un rat atteint d'un glioblastome, par administration intraveineuse⁸¹. La vectorisation peut également être utilisée pour le diagnostic et la thérapie : la théranostique. Ainsi, des nanoparticules à base d'oxydes de fer, dont la surface a été recouverte par des groupements folates, ont été développées. Ces nanoparticules ont présentées la capacité à reconnaître les cellules tumorales, puis l'induction d'un champ magnétique permettrait l'augmentation locale de la température, provoquant des dommages irréversibles chez les cellules exposées⁸².

1.2.2. L'encapsulation

La délivrance d'une biomolécule pour bioactiver un matériau peut également s'effectuer par encapsulation. Cela consiste à piéger la molécule d'intérêt au sein du biomatériau. Il peut s'effectuer par diffusion du principe actif du milieu environnant vers l'intérieur du matériau ou bien en même temps que la formation du biomatériau.

Le piégeage de biomolécules au sein d'un biomatériau après synthèse de celui-ci consiste à incuber le biomatériau dans une solution contenant la biomolécule d'intérêt. Le principe actif diffusera à l'intérieur du matériau conduisant à son piégeage. Cette technique est facile à mettre en œuvre et permet de ne pas soumettre la biomolécule aux réactions chimiques permettant la formation du biomatériau, pouvant induire une perte d'activité de cette biomolécule. L'utilisation de biomatériau poreux, tels que les hydrogels permet d'augmenter les zones de réservoir du principe actif⁸³. Par

exemple, le piégeage de gentamicine au sein d'un biomatériau a été effectué par dépôt d'une solution de l'antibiotique sur le matériau puis par lyophilisation du matériau. Le relargage progressif sur un jour de la gentamicine a permis la réduction significative de l'adhérence bactérienne et de la formation de biofilm de *Staphylococcus epidermidis*. De plus, une amélioration de la survie et de la prolifération de cellules de moelle osseuse humaine a été observée sur les matériaux contenant de la gentamicine⁸⁴. De l'argent ou de l'iode, piégés au sein de structure de chitosan par interaction ionique, ont mis en évidence une activité antimicrobienne importante sur *Echerichia coli* sur plusieurs heures, ainsi qu'une faible cytotoxicité du matériau⁸⁵.

Une autre technique consiste à inclure le principe actif dans la solution de précurseurs puis de former le biomatériau. L'encapsulation d'ADN au sein d'un hydrogel de fibrine a par exemple été effectuée avec succès par ajout d'ADN à une solution contenant le fibrinogène et la thrombine. Des fibroblastes NIH/3T3 ont également été encapsulés dans le matériau. Cette solution de précurseurs a ensuite été incubée à 37°C pendant 1h pour permettre la polymérisation de l'hydrogel de fibrine. Un relargage progressif de l'ADN encapsulé a été observé sur 2 semaines et un maintien de l'expression sur 10 jours (**Figure 11**)⁸⁶. L'encapsulation d'argent ou d'huile de théier dans des hydrogels de chitosan a permis de mettre en évidence une activité antimicrobienne, faisant de ces matériaux de bons candidats pour le développement de pansement antimicrobien⁵⁴.

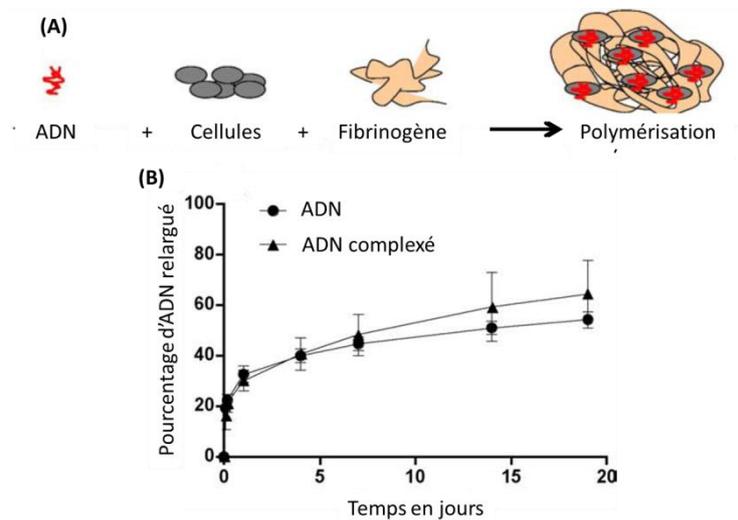


Figure 11 : (A) Représentation schématique du protocole utilisé pour la formation d'un hydrogel de fibrine permettant l'encapsulation d'ADN et de cellules et (B) relargage progressif de l'ADN encapsulé dans ces hydrogels⁸⁶.

L'encapsulation de principe actif au sein de biomatériau ou le greffage de celui-ci à la surface de particules ouvrent donc une nouvelle porte à la modification de la bioactivité d'un matériau. Différents types de particules développées pour la délivrance existent permettant l'encapsulation d'un très grand choix de molécules de nature différente.

I.3. Les nano et microparticules pour la délivrance

Le mot nanoparticule, qui vient du grec « nano » signifiant nain, désigne une échelle de grandeur de l'ordre du milliardième de mètre (10^{-9} m). Conformément à la norme européenne ISO TC 229, une nanoparticule est un objet possédant typiquement mais non exclusivement une ou plusieurs dimensions au-dessous de 100 nm. Ainsi les nanosciences et les nanotechnologies désignent l'étude et le développement de matériaux à l'échelle du nanomètre et du micromètre, là où les propriétés des matériaux diffèrent de celles à plus grande échelle. En effet, une nano ou une microparticule possède un ensemble de caractéristiques qui lui confère des propriétés uniques et particulières notamment d'un point de vue de sa réactivité, sa biocompatibilité ou sa résistance⁸⁷. En fonction de la nature chimique et de leur structure, plusieurs catégories de nano et microparticules utilisées pour la délivrance moléculaire existent et peuvent être catégorisées de la manière suivante : les **micelles**, les **liposomes**, les **nano et microgels**, les **nano et microsphères** et les **nano et microcapsules**.

I.3.1. Les micelles

Les micelles sont des nanoparticules auto-assemblées pouvant avoir des tailles réduites jusqu'à une centaine, voire une dizaine de nm. Elles sont constituées d'une couronne de molécules amphiphiles en équilibre dynamique autour d'un cœur non solide. En solution aqueuse, les molécules amphiphiles s'organisent spontanément en adoptant la conformation structurelle la moins coûteuse en énergie, avec la partie apolaire (souvent une queue aliphatique) orientée vers le cœur, alors que la partie "tête" polaire reste au contact du solvant aqueux. Cette organisation minimise ainsi les interactions de la partie hydrophobe avec l'environnement aqueux. Des micelles avec un cœur hydrophobe en solution aqueuse peuvent alors se former. Dans ce cas, un principe actif hydrophobe peut alors être encapsulé dans le cœur. En revanche, en milieu organique, les molécules amphiphiles adoptent une conformation inverse. En effet, les têtes hydrophiles s'orientent au cœur de la micelle permettant ainsi l'encapsulation d'un principe actif hydrophile. Ces propriétés des micelles en font

des nanoparticules intéressantes du fait de leur facilité de préparation et la possibilité d'incorporer dans le cœur des micelles des molécules aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes (**Figure 12**)⁸⁸. Toutefois, l'encapsulation de molécules hydrophiles impose l'utilisation de la micelle dans un environnement apolaire, ce qui compromet les applications de ces micelles inverses dans les milieux biologiques.

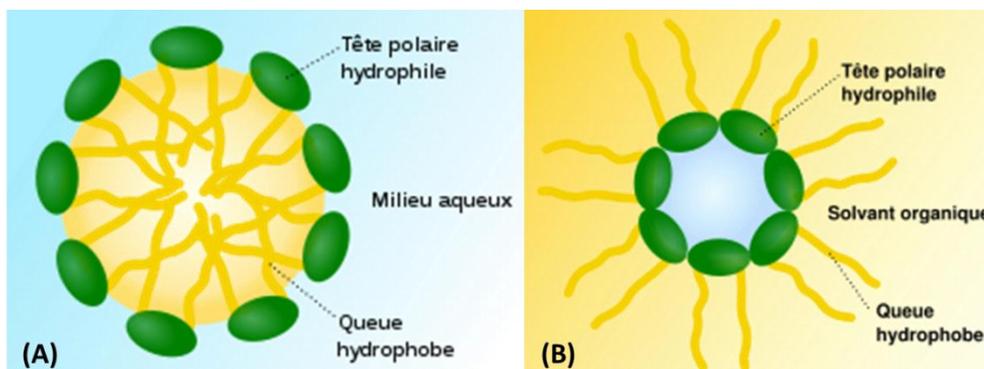


Figure 12 : Représentation schématique (A) d'une micelle avec un cœur hydrophobe et (B) d'une micelle avec un cœur aqueux.

La formation des micelles dépend de la quantité de molécules amphiphiles présentes en solution, et il existe une concentration dite « concentration micellaire critique » (CMC) à partir de laquelle les molécules amphiphiles sont capables de s'auto-organiser en micelles dont la stabilité augmente avec la concentration en molécules amphiphiles. Ce processus est appelé micellisation. En dessous de la CMC en revanche, les micelles sont moins stables et se déstructurent. Cette dépendance à la CMC qui les rend instables à la dilution est aussi l'une des principales limites à l'utilisation *in vivo* des micelles⁸⁹.

Des études montrent que l'organisation particulière de la couronne des micelles les protège de l'opsonisation correspondant à l'attachement des molécules du complément à la surface de la nanoparticule, et ainsi d'augmenter leur temps de demi-vie dans le sang⁹⁰. Cependant, les micelles sont principalement utilisées pour encapsuler des principes actifs hydrophobes, dont la solubilité et l'activité thérapeutique est réduite voire inexistante en milieu aqueux. C'est le cas de la doxorubicine qui peut être encapsulée dans des micelles de Pluronic® et où son encapsulation a permis de diviser par deux l'endocytose de la doxorubicine comparée à la forme libre⁹¹.

1.3.2. Les liposomes

Les liposomes sont des structures de taille micrométrique ou nanométrique constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques. Différents lipides, seuls ou combinés à d'autres lipides, peuvent être utilisés. Les plus couramment utilisés en délivrance moléculaire sont les phospholipides⁹². Le comportement des liposomes dans les systèmes physiques et biologiques est régi par des facteurs tels que la taille et la composition chimique. Par conséquent, on distingue différents types de liposomes : les Small Uni-lamellar Vesicles (SUV) possédant une seule bicouche lipidique et formant de petits liposomes d'environ 20 - 100 nm de diamètre, les Large Unilamellar Vesicles (LUV) qui sont des liposomes à une seule bicouche de taille très hétérogène supérieure à 100 nm et les Multi-Lamellar Vesicles (MLV) qui possèdent deux ou plusieurs bicouches lipidiques séparées entre elles par un milieu aqueux et de taille supérieure à 500 nm pouvant atteindre quelques micromètres (**Figure 13**). Les liposomes peuvent également être classés selon leur composition et leurs applications. Il existe donc les liposomes classiques, les liposomes sensibles à leur environnement physico-chimique (pH, température), les liposomes à longue ou courte durée de circulation, les immuno-liposomes et les liposomes magnétiques⁹³.

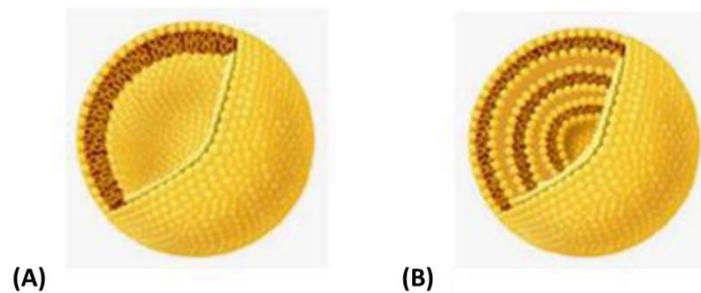


Figure 13 : Exemple de (A) liposome unilamellaire et (B) de liposome multilamellaire⁹³.

De nombreuses techniques de synthèse des liposomes existent⁹³. Généralement, l'encapsulation du principe actif s'effectue en l'ajoutant à une solution contenant les lipides préalablement séchés sous forme de film^{94,95}. Par exemple, dans la méthode d'extrusion à partir d'une membrane de polycarbonate, les lipides sont dissouts dans un solvant organique, tel que le chloroforme, puis séchés pour former un film mince. Le film de lipides séchés est ensuite ajouté à la solution aqueuse contenant le principe actif. Cette solution est soumise aux ultrasons, lyophilisée et subit jusqu'à dix étapes d'extrusion à travers une membrane de polycarbonate comportant une taille de pore de 100 nm afin de produire des liposomes uniformes en taille⁹⁶. Du fait de leur structure organisée en multicouches, avec une alternance de compartiment aqueux et bicouche lipidique, les liposomes ont

la capacité de contenir des molécules à la fois lipophiles et hydrophiles⁹⁷. L'utilisation de liposomes a par exemple permis de mettre en évidence, par encapsulation d'ARN modifié, la contribution d'une molécule d'adhérence cellulaire (L1CAM) sur la prolifération de cellules cancéreuses de la prostate⁹⁸.

Une alternative à l'utilisation des liposomes est la production de nanoparticules solides lipidiques (SLN), un système colloïdal de taille nanométrique. Les SLN ont l'avantage de ne pas contenir de solvants organiques lors de leur processus de fabrication et sont produites par homogénéisation à haute pression, et peut s'effectuer à de hautes ou basses températures⁹⁹. Les SLN permettent l'encapsulation de molécules hydrophobes. Ainsi, de la camptothécine a été encapsulée dans des SLN de nouvelle génération et son relargage *in vitro* a pu être modulé pendant 1 semaine¹⁰⁰.

I.3.3. Les nano et microgels

Les nano et microgels sont des particules polymériques formés d'un réseau de polymères réticulés physiquement ou chimiquement. Les polymères utilisés pour produire des nano et microgels sont le plus souvent hydrophiles et peuvent être d'origine naturelle, tels que les protéines¹⁰¹, ou synthétique, tel que le polyéthylène glycol di-acrylate (PEGDA)¹⁰².

Différentes techniques peuvent être utilisées pour produire des nanogels comme système de délivrance moléculaire. Il existe notamment les méthodes de microfluidique et photolithographie (reproduction d'un masque par irradiation UV de polymères photosensibles). Mais aussi, on pourra citer les techniques basées sur l'émulsion et les techniques de polymérisation radicalaire¹⁰³. Les particules gélifiées peuvent également être produites pour posséder un système cœur-coquille possédant un cœur hydrophile permettant la protection supplémentaire du principe actif encapsulé^{104,105}.

Les nanogels présentent une capacité de gonflement importante dans un solvant donné. Ils peuvent être produits pour répondre à une modification de leur environnement telle qu'une variation du pH, de la température, du solvant, ou l'exposition à des radiations. La réponse à ces stimuli externes induira le gonflement ou la rétractation du réseau de polymères et donc la libération du principe actif encapsulé (**Figure 14**). De la doxorubicine a par exemple été encapsulée dans des microgels de polymères synthétiques sensibles au pH. La modification locale du pH dans l'environnement proche de cellules cancéreuses HeLa a permis la rétractation du microgel, s'accompagnant de la libération de la doxorubicine¹⁰⁶.

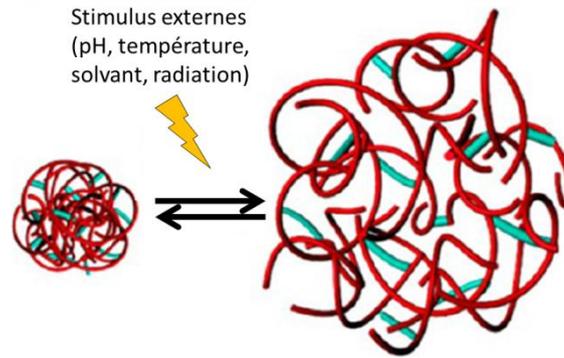


Figure 14 : Représentation schématique du gonflement ou de la rétraction d'une particule gélifiée suite à un stimuli extérieur¹⁰⁷.

1.3.4. Les sphères et capsules de polymères de taille nano- et micrométrique

Les nano et microsphères sont des particules polymériques colloïdales matricielles, c'est-à-dire dont la structure est entièrement solide. Elles peuvent être pleines ou poreuses (Figure 15). Les nano et microsphères pleines sont des structures nano- et micrométriques compactes. La molécule à encapsuler doit être incorporée à l'intérieur de la structure polymérique pendant la fabrication de la nanoparticule et est souvent de nature hydrophobe¹⁰⁸. Contrairement aux nanosphères pleines, les nanosphères poreuses ont une structure de mailles plus ou moins serrées dont l'architecture est également formée d'une matrice polymérique. Dans ce cas, la molécule d'intérêt peut être insérée dans les structures poreuses. Ce type de structure poreuse permet l'incorporation de la molécule dans une nanoparticule préfabriquée¹⁰⁹.

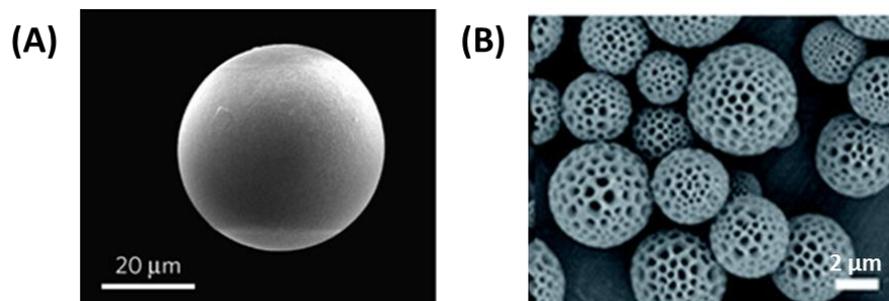


Figure 15 : (A) Microsphère pleine¹⁰⁸ et (B) microsphères poreuses¹⁰⁹ de polymères synthétiques, caractérisées par microscopie électronique à balayage.

Les nano et microcapsules sont des particules colloïdales constituées d'un réservoir liquide ou semi-liquide à température ambiante, contenu à l'intérieur d'une enveloppe solide de nature polymérique. Dans les systèmes capsulaires, les molécules sont généralement incorporées dans le réservoir, mais elles peuvent aussi être introduites dans la paroi polymérique, permettant l'encapsulation de molécules hydrophiles et hydrophobes. Le réservoir des capsules peut être un cœur aqueux ou huileux, permettant d'incorporer aussi bien des molécules hydrophiles qu'hydrophobes en leur cœur. La coque de polymères des nano et microcapsules peut être pleine ou bien poreuse (**Figure 16**)^{110,111}.

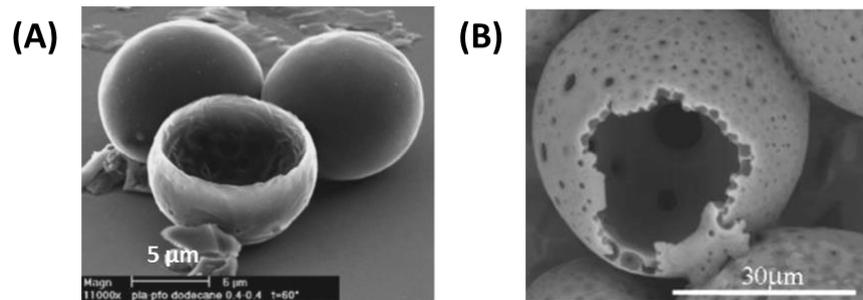


Figure 16 : (A) Microcapsules pleines¹¹⁰ et (B) microcapsules poreuses¹¹² de polymères synthétiques observées en microscopie électronique à balayage.

Ces différents types de particules (sphères et capsules) peuvent être synthétisées à base de polymères synthétiques, tels que l'acide polylactique¹¹³, ou de copolymères, tels que l'acide polylactique-poly(éthylène glycol)-acide polylactique (PLA-PEG-PLA)¹¹⁴ et sont le plus souvent biodégradables et biocompatibles. Ces particules sont principalement produites par des techniques d'émulsion et de nanopréciipitation. Cependant, des étapes supplémentaires sont nécessaires pour l'encapsulation de molécules dans des nano et microcapsules. En effet, dans le cas de l'émulsion, la production de nano et microsphères s'effectuera à l'aide d'une simple émulsion alors que les nano et microcapsules devront être produites par une technique de double émulsion¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Des facteurs de croissance (VEGF et BMP-2) ont par exemple été encapsulés dans différents types de microparticules de polyesters synthétiques (capsules et sphères). Les facteurs de croissance sont soit encapsulés dans la coque de polymères, soit dans le cœur. Ces différentes encapsulations ont permis de moduler le relargage des facteurs de croissance sur 28 jours. Le relargage de ces facteurs de croissance a par ailleurs permis le maintien de la bioactivité des cellules, l'augmentation de la prolifération de cellules épithéliales microvasculaires (MEC) et de la différenciation des cellules souches de moelle osseuse (BMSC). De plus, ces microparticules contenant les facteurs de croissance incluses au sein d'un gel de gélatine ont permis une amélioration de la formation osseuse

accompagnée de la formation de vaisseaux sanguins après implantation du biomatériau chez le rat (Figure 17)¹¹⁹.

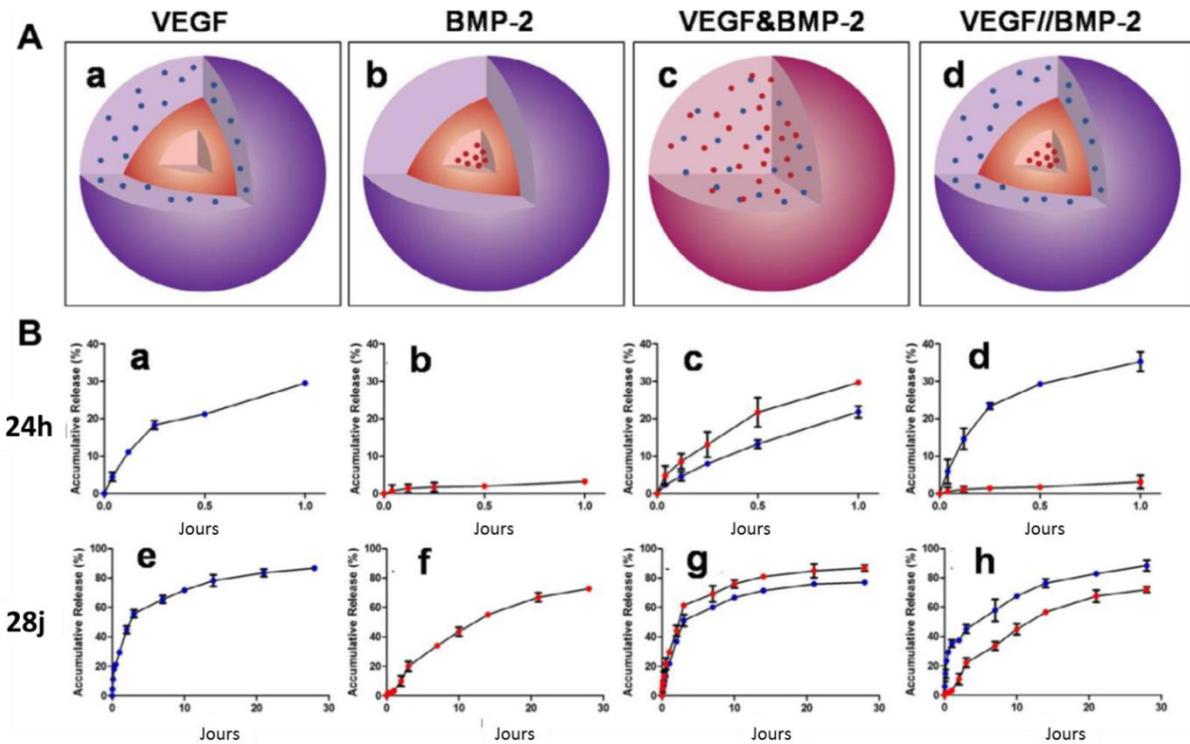


Figure 17 : (A) Représentation schématique de différentes microparticules de polyesters contenant des facteurs de croissance et (B) associées à leur cinétique de relargage de la molécule encapsulée¹¹⁹.

En modulant les propriétés telles que la taille, la porosité de l'enveloppe, la nature hydrophile ou hydrophobe du cœur, la complexité de l'organisation cœur-coquille... un grand nombre de possibilités existe afin de générer différentes particules qui peuvent être utilisées pour encapsuler une grande diversité de principes actifs. Pour produire ces différents types de particules, de nombreux polymères peuvent être utilisés.

II. Les polymères biodégradables et biocompatibles comme support d'encapsulation

Compte tenu de la diversité offerte par la chimie des polymères et des ressources biologiques à disposition, de nombreux polymères synthétiques ou naturels peuvent être utilisés en tant que constituant de particules conçues pour la délivrance moléculaire. Cependant, dans le cadre d'une application *in vivo*, le polymère utilisé doit posséder un certain nombre de caractéristiques. Il doit

être biocompatible, biodégradable et ses produits de dégradation doivent être non toxiques et non immunogènes. La biodégradation des biomatériaux polymériques implique le clivage de liaisons sensibles dans le polymère. Selon leurs origines de production, les polymères peuvent être classés en **polymères dégradables d'origine naturelle** et en **polymères dégradables d'origine synthétique**.

II.1. Systèmes à base de polymères naturels

La majorité des polymères d'origine naturelle offrent de nombreux avantages notamment d'un point de vue biocompatibilité et biodégradabilité. Les **protéines** et les **polysaccharides** peuvent être utilisés pour générer des nanos et microparticules et se comporter comme des polymères qui peuvent être utilisés pour mettre en œuvre des systèmes de délivrance moléculaire.

II.1.1. Les nano et microparticules à base de protéines

Les protéines sont des polymères d'origine naturelle qui ont pour principal avantage leur biodégradabilité et leur faible toxicité. La préparation de nanoparticules à partir de protéines permet d'obtenir des nanoparticules biodégradables et biocompatibles. En raison de ces propriétés uniques, les protéines, telles que la **gélatine**¹²⁰, la **caséine**¹²¹ et l'**albumine**¹²², représentent de bon candidats pour la préparation de particules pour la délivrance moléculaire.

Les nanoparticules à base de protéines peuvent être synthétisées de différentes manières. La coacervation, la désolvatation, la nanoprécipitation, la gélification thermique, l'émulsion et l'auto-assemblage sont les techniques les plus employées pour la préparation de ces nanoparticules^{123,124}. Le durcissement de certaines nanoparticules de protéines se fait ensuite par addition d'un agent de réticulation tel que le glutaraldéhyde ou la transglutaminase¹²⁵. En effet, la stabilité et le contrôle de la forme de ces nanoparticules sont le plus souvent rendus possibles par la génération de liens stables, en général covalents, entre les chaînes des protéines. Sans réticulation, ces nanoparticules sont instables, tendent à s'agréger et sont très facilement dégradées par les protéases du corps humain. En revanche, avec des nanoparticules de gélatine réticulées, un temps de dégradation supérieur à 1 mois a pu être mis en évidence¹²⁶.

Suivant la protéine utilisée, des molécules de types hydrophiles ou hydrophobes peuvent être encapsulées dans les nanoparticules à base de protéines. Par exemple, des molécules hydrophiles sont principalement encapsulées dans les nanoparticules à base de gélatine¹²⁰. En revanche, la caséine, une protéine amphiphile, se retrouve organisée sous forme de micelles, ce qui génère plutôt

un intérieur hydrophobe entouré d'une couche hydrophile qui stabilise la micelle par répulsions stériques et électrostatiques. Selon le système, des molécules hydrophiles et/ou hydrophobes peuvent alors être confinées dans ce type de particules¹²⁷.

American Bioscience a par exemple développé des nanoparticules à base d'albumine appelée nab[®]-technology pour l'encapsulation de molécules lipophiles. La gamme de taille des nanoparticules obtenues se situent entre 100 et 200 nm¹²⁸. Différentes particules à partir de cette protéine sont commercialisées, dont l'Albunex[™] (encapsulation d'un agent de contraste) et l'Abraxane[™] (encapsulation d'un agent chimiothérapeutique, le paclitaxel). Ces dernières, également appelées nab[®]-paclitaxel, ont démontré leur efficacité pour le traitement du cancer du sein métastatique comparée à du paclitaxel non encapsulé. Dans cette étude, une diminution significative du volume de la tumeur a été observée en présence du paclitaxel encapsulé (**Figure 18**). De plus, l'accumulation du paclitaxel dans une tumeur modèle du sein MX-1 était seulement 33% plus élevé pour les nanoparticules comparée à celle du paclitaxel, lorsqu'il est administré à 20 mg/kg d'équivalents de paclitaxel. Par contre, lorsqu'il est administré à leurs doses maximales tolérées respectives (30 mg/kg pour le nab[®]-paclitaxel, 13,4 mg/kg pour le paclitaxel), une importante amélioration de la réponse anti-tumorale chez les souris traitées avec nab[®]-paclitaxel a été observée, et des rémissions complètes ont même été atteintes¹²⁹.

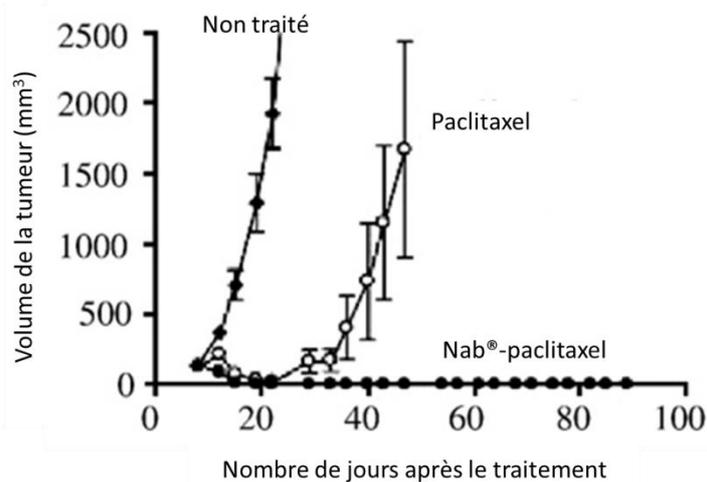


Figure 18 : Evolution du volume de la tumeur dans le cas de cancer du sein chez la souris en fonction de différents traitements¹²⁹.

II.1.2. Les nano et microparticules à base de chitosan et de dextrane

Les polysaccharides sont de longues molécules composées d'oses reliés entre eux par des liaisons glycosidiques. Le chitosan, l'alginate, l'héparine, l'acide hyaluronique, le pullulane et le dextrane sont des exemples de polysaccharides. Ce sont des polymères naturels formant l'un des principaux constituants des systèmes biologiques tels que le glycocalyx et certaines matrices extracellulaires. Les polysaccharides utilisés pour la préparation de nanoparticules sont classés en fonction de leurs charges. Il y a des polymères cationiques tels que le chitosan, des polymères anioniques tels que l'alginate, l'héparine, et l'acide hyaluronique et des polymères non ioniques tels que le pullulane et le dextrane. Cependant, les polysaccharides les plus utilisés pour la délivrance moléculaires sont le **chitosan** et le **dextrane**^{130,131}.

Le chitosan est un copolymère linéaire flexible de glucopyranoses, non toxique et qui peut être digérée par le corps humain. Il existe différentes techniques pour produire des nanoparticules à base de chitosan, dont la gélation ionotropique, la microémulsion, l'émulsion suivi d'une évaporation de solvant et l'auto-assemblage. Une étape de réticulation peut ensuite être nécessaire pour stabiliser les nanoparticules produites et ainsi augmenter leur temps de dégradation¹³²⁻¹³⁴. Par exemple, des nanoparticules de chitosan, ayant subi une étape de réticulation au glutaraldéhyde, n'ont pas présentées de signe de dégradation sur une période de 3 mois après implantation *in vivo* chez le rat¹³⁵.

De nombreuses molécules, aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes, peuvent être encapsulées dans des nanoparticules de chitosan. L'encapsulation d'un antioxydant tel que la quercétine au sein de nanoparticules de chitosan a permis de mettre en évidence un effet plus durable de l'activité antioxydante comparée à la forme libre de la quercétine¹³⁶. L'encapsulation d'insuline dans des nanoparticules à base de chitosan a permis d'augmenter l'absorption intestinale de l'insuline après une administration par voie orale. En effet, l'effet hypoglycémiant et le niveau d'insulinémie ont été significativement augmentés comparés aux résultats obtenus à partir d'une solution d'insuline¹³⁷. Le chitosan a également été utilisé pour encapsuler de la Cyclosporine A (CyA) dans le cadre du traitement local de la muqueuse oculaire. Les expériences *in vivo* ont permis de montrer que l'utilisation des nanoparticules à base de chitosan contenant de la CyA augmente le taux de CyA dans la zone d'intérêt mais également qu'elles ne compromettent pas les structures oculaires¹³⁸.

Le dextrane est un polymère de glucose, produit par des bactéries, et est constitué principalement de liaisons glycosidiques α -(1,6) linéaire avec un certain degré de ramification par l'intermédiaire de

liaisons glycosidiques α -(1,2), α -(1,3), ou α -(1,4). Ce polymère est hydrophile du fait de la présence d'un grand nombre de groupements hydroxyles. Il est biodégradable et biocompatible car l'organisme de l'être humain possède une dextranase, présente dans la rate, les reins et le foie, enzyme responsable de la dégradation complète du dextrane produisant du glucose¹³⁹.

L'une des principales méthodes utilisée pour préparer les nanoparticules de dextrane est l'émulsion, permettant l'encapsulation de molécules hydrophiles et hydrophobes. De plus, la synthèse des nanoparticules est suivie d'une étape de réticulation, augmentant le temps de dégradation des particules produites (plusieurs semaines)¹⁴⁰. Ainsi, du sulfate de vincristine, molécule hydrophobe utilisée dans le traitement de leucémies ou de cancers, a été encapsulé dans des nanoparticules de dextrane par une technique de simple émulsion. L'utilisation de ces nanoparticules a permis d'obtenir un relargage progressif sur 72h de la vincristine encapsulée comparé à une solution de biomolécule seule. De plus, leur utilisation au sein d'un gel a permis de multiplier par 10 ce temps de relargage comparé aux nanoparticules seules (**Figure 19**)¹⁴¹.

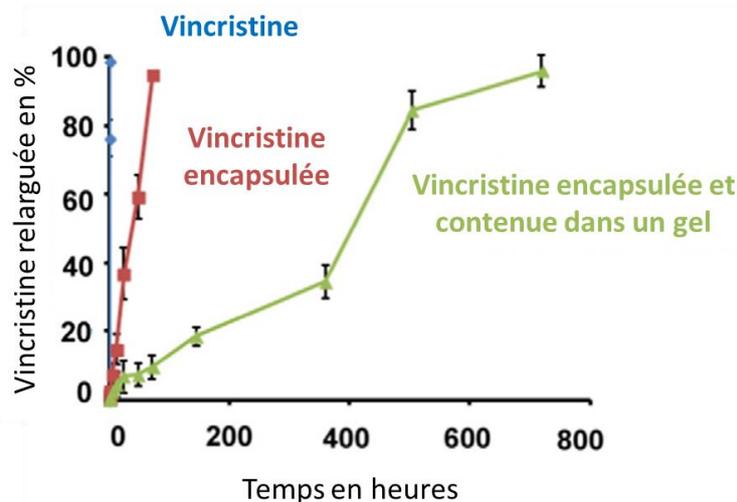


Figure 19 : Cinétique de relargage de vincristine encapsulée dans des nanoparticules de dextrane¹⁴¹.

Il est possible de travailler directement à partir de microparticules de dextrane produites industriellement de type Sephadex[®]. Dans ce cas, le principe actif est introduit dans les microparticules par diffusion de celui-ci à l'intérieur de ces particules. Ainsi, le vaccin du tétanos a été encapsulé dans des microsphères de dextrane de type Sephadex puis injecté par voie nasale à des rats. L'étude a montré que le principe actif a été introduit efficacement dans les microsphères sans changement de structure et sans perte d'activité du vaccin, et qu'un plus grand nombre d'antigènes a été retrouvé chez les rats immunisés avec les microsphères de dextrane contenant le vaccin comparé à la formulation du vaccin seul¹⁴².

L'utilisation de polymères d'origine naturelle tels que les protéines ou les polysaccharides offre un large choix de support pour l'encapsulation dans des nanoparticules de différents types de principes actifs. Le principal avantage de leur utilisation est leur biodégradation par les protéases sécrétées par le corps humain. Cependant, la concentration en protéase diffère d'un individu à un autre rendant plus aléatoire la biodégradation, le relargage du principe actif et donc son efficacité au niveau local.

II.2. Système à base de polymères synthétiques hydrolysables

Les polymères synthétiques hydrolysables sont des polymères dont les unités sont liées par des liaisons chimiques hydrolytiquement labiles. Les groupes fonctionnels sensibles à l'hydrolyse comprennent les esters, les anhydrides, les orthoesters, les carbonates, les amides, les uréthanes...¹⁴³. Différentes voies de synthèse sont utilisées pour développer des polymères sensibles à l'hydrolyse dans le cadre d'applications biomédicales. Les étapes de polymérisation par condensation et par addition comprenant la polymérisation par ouverture de cycles sont les plus utilisées. La polymérisation par ouverture de cycle (ROP) est une voie de polymérisation largement utilisée pour développer des polymères sensibles à l'hydrolyse, y compris les polyesters aliphatiques^{144,145}. Parmi le large choix de polymères sensibles à l'hydrolyse, les plus largement utilisés pour la production de nano et microparticules sont les polyesters dégradables synthétiques tels que **la poly(caprolactone) (PCL)**, **l'acide polylactique (PLA)**, et **le poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA)**^{146,147}.

II.2.1. La polycaprolactone

La polycaprolactone (PCL) est un polyester approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) (**Figure 20**). La PCL est un polymère semi-cristallin avec une température de transition vitreuse comprise entre -65 et -60°C et un point de fusion compris entre 55 et 65°C, dépendants de sa nature cristalline. Sa cristallinité tend à décroître quand son poids moléculaire augmente. La PCL est soluble dans des solvants organiques tels que le chloroforme et le dichlorométhane mais est insoluble dans les alcools et l'eau^{148,149}.

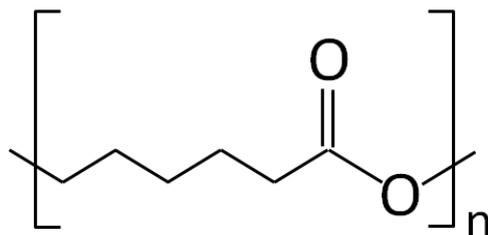


Figure 20 : Structure chimique de la polycaprolactone.

La PCL est un polymère biodégradable. En effet, elle peut être dégradée par des organismes vivants tels que les bactéries et les champignons, par production de PCL dépolymérase, ce qui en fait un candidat de choix pour générer des matériaux biodégradables par l'environnement naturel. Elle peut également être dégradée par des enzymes pancréatiques du corps humain (lipases ou serine protéases). En absence de ces enzymes, la PCL se dégrade par hydrolyse de ses liaisons esters, conduisant à un temps de dégradation de plusieurs années. La dégradation *in vitro* et *in vivo* de la PCL s'effectue en deux étapes et est autocatalysée. La première étape est caractérisée par la faible dégradation du polymère et une forte perte de masse molaire et de viscosité de celui-ci dû à l'hydrolyse aléatoire de sa chaîne. La seconde étape commence lorsque le polymère atteint une masse inférieure à 3000 g/mol conduisant à la dégradation intracellulaire de la PCL par les macrophages notamment et à la dégradation complète du polymère¹⁵⁰⁻¹⁵⁴.

Ses différentes caractéristiques physico-chimiques et notamment son temps de dégradation en font un bon support pour la délivrance moléculaire à très long terme. La simple émulsion et la double émulsion suivies d'une évaporation du solvant, la nanoprécipitation, la technique de séchage par pulvérisation (spray-drying) et l'extrusion à l'état fondu (hot melt extrusion) sont les techniques les plus utilisées pour produire des nanoparticules de PCL. A partir de ces techniques, des molécules hydrophiles et également hydrophobes peuvent être encapsulées¹⁵².

L'encapsulation de principes actifs dans des nanoparticules de PCL ont trouvé différentes applications dans le domaine du biomédical. Elles permettent par exemple d'encapsuler de la quercétine, molécule utilisée dans le traitement de l'arthrite. Son encapsulation a permis de confirmer la biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* de ces nanoparticules et également que ces nanoparticules permettent un relargage progressif de la quercétine sur 1 mois¹⁵⁵. Des agents antimicrobiens tels que la doxycycline peuvent également être encapsulés dans des microparticules de PCL, et le relargage *in vitro* de l'antibactérien a été observé sur 76h¹⁵⁶. Les nanoparticules de PCL ont également été utilisées pour encapsuler de l'amyline pour permettre la régulation de la glycémie, conjointement à l'insuline. *In vitro*, les nanoparticules produites ont présenté un relargage progressif

de l'amyline sur 10 jours. *In vivo*, par administration sous-cutanée chez la souris, elles ont permis de réduire la glycémie de manière significative sur une durée de 36h, démontrant ainsi leur efficacité et leur bioactivité¹⁵⁷.

II.2.2. L'acide polylactique

L'acide polylactique (PLA) est un polymère approuvé par la FDA. Le PLA est un polyester thermoplastique et biodégradable (**Figure 21**). Les propriétés du PLA sont principalement dues à sa forme énantiomérique. Effectivement, l'acide lactique (ou lactide), monomère de base utilisé pour la synthèse du PLA, est une molécule chirale avec deux énantiomères possibles, D et L. Par conséquent, le PLA existe sous les formes suivantes : l'acide poly(L-lactique) (PLLA), l'acide poly(D-lactique) (PDLA), et un mélange des deux, l'acide poly(D, L-lactique) (PDLLA). Le PLA contenant plus de 90% de racémique L aura tendance à être cristallin, tandis que le PDLLA est un polymère amorphe en raison des positions aléatoires de ses isomères des deux monomères dans la chaîne polymère. Les PLA ont une température de transition vitreuse (T_g) et une température de fusion (T_m) comprises respectivement entre 50 et 65°C et 175 et 180°C, sachant qu'une teneur plus élevée en racémique L contribuera à l'augmentation des valeurs de la température de transition vitreuse. Le PLA est soluble dans des solvants chlorés tels que le chloroforme et le dichlorométhane et est insoluble en solvant aqueux^{158,159}.

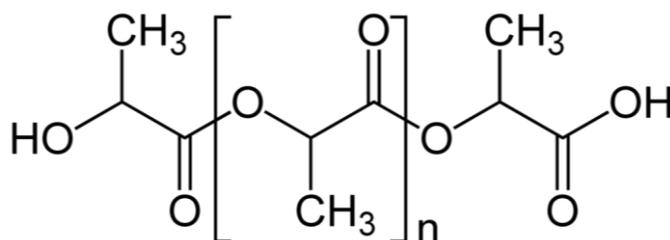


Figure 21 : Structure chimique de l'acide polylactique, avec n le nombre d'unité d'acide lactique.

La dégradation du PLA est similaire à celle du PCL. En effet, le PLA peut être dégradé par les sérines protéases. En milieu aqueux, l'eau diffuse à travers le matériau ce qui conduit à son hydrolyse et une perte progressive de ses propriétés mécaniques. Puis l'acidification locale due à la production d'acide lactique permet la dégradation complète du PLA. Les unités d'acide lactique ou petites chaînes de

PLA peuvent ensuite être internalisées et métabolisées. La dégradation du PLA est dite autocatalysée et sa dégradation complète s'étend sur plusieurs mois voire années. Cependant, plus les nanoparticules seront petites plus leur dégradation sera homogène et rapide. De plus, elles seront internalisées rapidement et se dégraderont donc au sein même de la cellule^{151,160,161}.

La modulation des propriétés physico-chimiques permet de jouer sur la dégradation de ce polymère, qui de fait peut être utilisé de manière intéressante comme support de délivrance de principe actif. De nombreuses techniques peuvent être utilisées pour l'encapsulation dans des nanoparticules de PLA. Les principales techniques sont identiques à celles utilisées pour la préparation de nanoparticules de PCL, à savoir la simple émulsion et la double émulsion suivies d'une évaporation du solvant, la nanoprécipitation et la technique de séchage par pulvérisation (spray-drying). L'encapsulation de molécules hydrophiles et hydrophobes est possible dans des nanoparticules de PLA avec l'incorporation du principe actif dans la phase aqueuse ou organique^{113,162}.

L'encapsulation de molécules à visée thérapeutique est possible dans des nanoparticules de PLA. La quercitrine, qui est un antioxydant, peut être encapsulée dans des nanoparticules de PLA sans perte de son activité antioxydante. De plus, un relargage progressif de la quercitrine a été observé pendant 2 semaines (**Figure 22**)¹⁶³. L'encapsulation d'un anti-ischémique, le cloriclomène qui est un dérivé de la coumarine, au sein de nanoparticules de PLA a permis de mettre en évidence que la forme la plus insoluble dans l'eau a été encapsulée plus efficacement que sa forme plus hydrosoluble avec un meilleur contrôle du relargage du principe actif¹⁶⁴. Le tamoxifène utilisé pour le traitement du cancer du sein a été encapsulé avec succès au sein de nanoparticules de PLA. L'efficacité *in vivo* de cette encapsulation a été prouvée par diminution de la taille de tumeurs chez le rat dans le cas d'utilisation de nanoparticules de tamoxifène (diminution de 20%) comparée à l'utilisation seule de l'agent anti-cancéreux (diminution de 10%) après 40 jours. De plus, l'encapsulation de cet agent a permis de réduire sa toxicité au niveau du foie, des reins et de la rate¹⁶⁵.

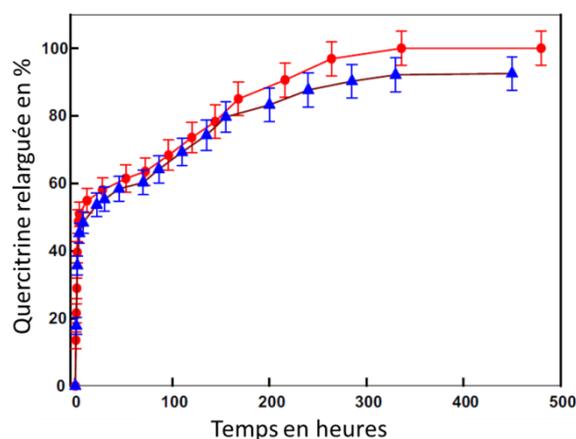


Figure 22 : Profil de relargage de la quercitrine encapsulée dans des nanoparticules de PLA déterminé par deux techniques d'analyse¹⁶³.

II.2.3. L'acide poly(lactique-co-glycolique)

L'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) est un polyester et un copolymère d'acide polylactique (PLA) et d'acide polyglycolique (PGA) (Figure 23). Généralement, PLGA est l'acronyme de l'acide poly(D,L lactique-co-glycolique) où les formes énantiomères D et L du PLA sont en quantité égales. De plus, le PLGA nommé PLGA 50/50 correspond à un PLGA dont le nombre d'unités de PLA est identique au nombre d'unités de PGA. Sa température de transition vitreuse (T_g) est comprise entre 40 et 60°C suivant la composition du PLGA. Le PLGA est donc un polymère amorphe à température physiologique. Il a été reporté que la T_g diminue lorsque la quantité de PLA augmente permettant de diminuer le caractère amorphe du polymère. Tout comme la PCL et le PLA, le PLGA est soluble dans de nombreux solvants organiques tels que le dichlorométhane et le chloroforme permettant la dissolution de principes actifs hydrophobes dans la phase organique contenant le PLGA¹⁶⁶.

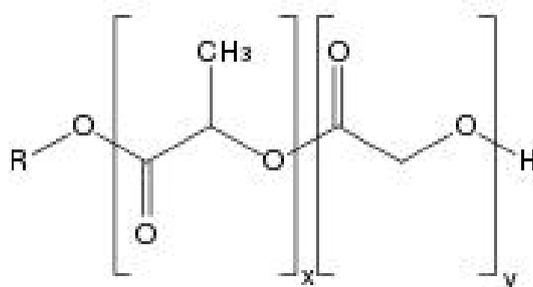


Figure 23 : Structure chimique du PLGA, où x représente le nombre d'unités de PLA et y représente le nombre d'unités de PGA.

La dégradation du PLGA est similaire à la dégradation du PLA d'un point de vue du mécanisme. En effet, la dégradation de support polymérique de grande taille se fera de manière hétérogène alors que la dégradation de petits supports tendra à être homogène, c'est-à-dire avec une vitesse de dégradation identique entre l'intérieur et l'extérieur des nanoparticules. En présence d'eau, cette dégradation est régie par l'hydrolyse des liaisons esters contenues dans le PLGA. De nombreux paramètres peuvent influencer la dégradation du polymère, notamment le ratio PLA/PGA. En effet, la copolymérisation du PLA et du PGA de nature cristalline conduit à la réduction du degré de cristallinité du PLGA et à l'augmentation du taux d'hydrolyse et donc à la diminution du temps de dégradation. La présence des groupements méthyl apportés par le PLA rendent le PLGA plus hydrophobe et donc moins sensible à l'adsorption de l'eau et ainsi, la dégradation du PLGA sera plus lente. De manière générale, plus la quantité de PGA est élevée, plus la dégradation du PLGA sera rapide (**Figure 24**)¹⁶¹.

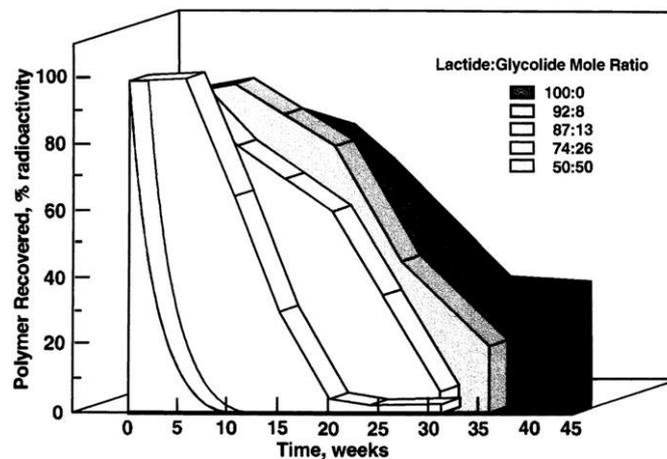


Figure 24 : Résorption *in vivo* chez le rat de microsphères de PLGA radiomarquées mettant en évidence que le taux de dégradation du PLGA augmente lorsque le nombre d'unités de PLA diminue¹⁶¹.

Les techniques de préparation des nanoparticules de PLGA sont similaires aux techniques utilisées pour préparer les nanoparticules de PLA. En effet, les principales techniques utilisées sont des techniques basées sur l'émulsion du polymère et du principe actif en phase organique avec une phase aqueuse (émulsion huile/eau) ou bien une émulsion de la phase organique contenant le polymère avec une phase aqueuse contenant le principe actif (émulsion eau/huile)^{166,167}.

L'un des premiers systèmes de délivrance basé sur le PLGA (le PLGA 75/25) et approuvé par la FDA a été le système appelé Lupron Depot®, utilisé pour le traitement du cancer de la prostate à un stade avancé. Ce système permettait la délivrance d'acétate de leuproline sur une période de 4 mois après

une seule injection du médicament. De nos jours, il est utilisé pour d'autres pathologies avec des durées d'action qui peuvent être modulées en fonction de la dose du principe actif (Lupron.com).

Les principales utilisations des nanoparticules polymériques de PLGA concernent la délivrance moléculaire dans le cadre du traitement du cancer¹⁶⁸. L'encapsulation du chlorambucil en est un exemple. En effet, les nanoparticules de PLGA ont été produites pour délivrer cet agent anti-cancéreux et ont permis de garder l'activité cytotoxique du chlorambucil, mais également de montrer un effet au moins similaire à l'agent anti-cancéreux seul après 72h¹⁶⁹. La délivrance de doxorubicine *via* son encapsulation dans des microparticules de PLGA a permis d'augmenter son activité cytotoxique comparée à l'agent anti-cancéreux utilisé seul après 96h sur des cellules cancéreuses du cerveau¹⁷⁰. LL37, un peptide antimicrobien qui favorise la cicatrisation des plaies et l'angiogenèse, a été encapsulé dans des nanoparticules de PLGA. Son relargage progressif sur deux semaines permet d'augmenter de manière significative la cicatrisation de plaies chez la souris comparée à l'utilisation du peptide seul. Cependant, son activité microbienne sur *E. coli* est équivalente à celle de LL37 libre¹⁷¹.

L'utilisation de polymères sensibles à l'hydrolyse, tels que le PCL, la PLA et le PLGA, permet de moduler le temps de dégradation des nanoparticules produites à partir de ces polymères. La production de copolymères permet d'augmenter le nombre de polymères utilisables et ainsi de modifier les temps de relargage et de dégradation de ces nanoparticules. La PCL, le PLA et le PLGA peuvent être copolymérisés avec des poloxamères ou des groupements PEG pour modifier les propriétés des nanoparticules produites^{172,173}.

III. Stratégies mises au point pour la survie des cellules au sein d'un hydrogel

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) offre des avantages certains du fait de leur capacité à se différencier en de multiples phénotypes. Cependant, leur utilisation au sein de biomatériaux implantés est limitée. En effet, post-implantation, une importante mortalité cellulaire est généralement observée. Ce taux de mortalité élevé peut s'expliquer par l'incapacité des CSMs à survivre dans ces conditions drastiques. En effet, au cœur du composite non vascularisé, les cellules se retrouvent dans un environnement ischémique qui se

caractérisé par un taux d'**oxygène** faible, voire inexistant et des conditions très pauvres et insuffisantes en **nutriments**¹⁷⁴.

III.1. Rôle de l'oxygène et des nutriments

Sur le plan chimique et biochimique, la cellule est principalement constituée d'oxygène, d'hydrogène, de carbone et d'azote, éléments que l'on retrouve dans la majorité des composants organiques. Afin d'assurer leurs fonctions, leur développement et leur prolifération, les cellules ont besoin d'apport continu en nutriments (sources de carbone, d'azote et d'oxygène). Ces approvisionnements sont nécessaires pour optimiser le métabolisme cellulaire, correspondant au siège de milliers de réactions chimiques.

Dans le cadre de la respiration cellulaire, des réactions d'oxydo-réduction s'effectuent fournissant de l'énergie pour le fonctionnement des cellules. Cette respiration nécessite un carburant tel que le glucose, les acides gras ou d'autres molécules organiques, et un comburant, le dioxygène. A l'issue de cette réaction est produit de l'énergie ainsi que du CO₂ et de l'eau. L'oxygène est l'accepteur final d'électrons dans la chaîne de respiration mitochondriale. Les différentes utilisations de l'oxygène au sein de plusieurs processus cellulaires tels que l'adhésion, la prolifération et la différenciation, en font un élément essentiel au fonctionnement des cellules¹⁷⁵.

Chez l'être humain, le taux physiologique d'oxygène est régulé et sa concentration varie suivant la demande des différents tissus. La pression partielle en oxygène (pO₂) de l'air inspiré dans les alvéoles pulmonaires est de 160 mmHg et diminue progressivement jusqu'à quelques dizaines de mmHg au moment où l'oxygène atteint les organes et les tissus (**Figure 25**). Dans certains tissus adultes qui présentent une faible densité vasculaire et dans certaines régions du cerveau, la concentration en oxygène peut diminuer jusqu'à quelques mmHg pour minimiser la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette faible concentration en oxygène est appelée « hypoxie » par rapport à la concentration en oxygène de l'air ambiant, considéré comme « normoxie »¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

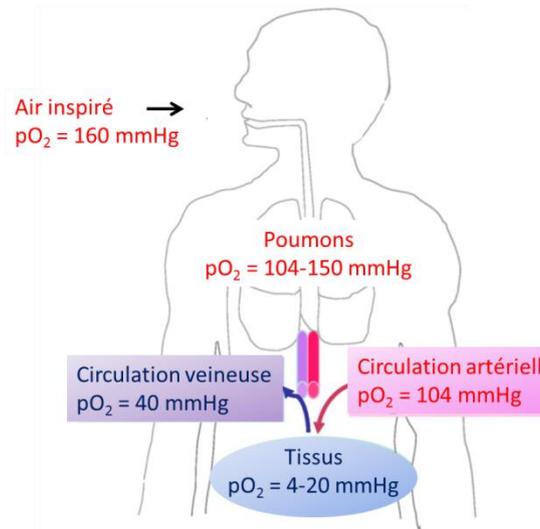


Figure 25 : Pression partielle en oxygène au niveau physiologique¹⁷⁶.

L'hypoxie, qui peut être causée par l'altitude ou par une ischémie dans le cadre de pathologies (cancers, infarctus, accident vasculaire cérébral), peut affecter de nombreux organes dont les poumons, le cerveau et le cœur. Les organes les plus sensibles à l'hypoxie, autre que le cerveau, sont les reins, possédant la plus grande consommation en oxygène par rapport à la masse de tissus¹⁷⁹. Cependant, les effets de l'hypoxie dépendent du type cellulaire, de la durée de l'hypoxie et du degré de privation en oxygène. Il a été démontré que l'hypoxie diminue l'expression des protéines, la prolifération et la viabilité *in vitro* et *in vivo* d'un certain nombre de cellules¹⁸⁰. Les effets globaux de l'hypoxie sont donc néfastes pour les cellules. Malgré cela, certains effets sur certains types cellulaires peuvent être bénéfiques. En effet, les CSMs peuvent être soumises à des conditions hypoxiques ou quasi-anoxiques (pO_2 proche de zéro) lors de thérapies cellulaires. Il a été démontré que l'hypoxie diminue leurs propriétés chimiotactiques (propriété d'une cellule à se déplacer en réponse à un gradient de concentration d'une substance) et proangiogéniques (propriété d'une cellule à sécréter des molécules favorisant la néoformation de vaisseaux sanguins) mais réduit également l'expression de médiateurs inflammatoires, augmentant ainsi l'attrait pour les CSMs dans le domaine de l'ingénierie biomédicale¹⁸¹.

L'oxygène joue donc un rôle majeur dans le fonctionnement cellulaire. Néanmoins, l'oxygène est une molécule faiblement diffusante dont la diffusion depuis les vaisseaux sanguins vers les tissus environnants est limitée à 100 - 200 μm . Cet aspect constitue un obstacle pour l'ingénierie tissulaire, et il est tenu pour responsable de la difficulté à obtenir des biomatériaux fonctionnels pour une application clinique^{182,183}.

III.2. Importance du glucose

De formule brute $C_6H_{12}O_6$, le glucose est un monosaccharide de la famille des glucides. C'est un sucre simple formé d'une seule chaîne contenant 6 carbones. Le glucose est un hexose et plus précisément un aldohexose du fait de la présence d'une fonction aldéhyde (**Figure 26**).

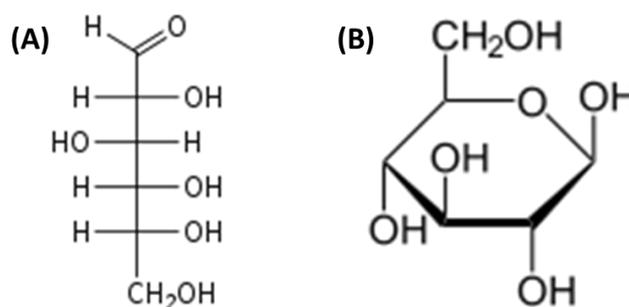


Figure 26 : Structure chimique du glucose représenté (A) en projection de Fisher et (B) en projection de Haworth.

Le rôle principal du glucose est d'être le combustible de la cellule. Ce rôle comme source énergétique essentielle est la raison pour laquelle il occupe une position centrale dans le métabolisme. Le glucose est impliqué principalement dans :

- une forme de stockage sous forme de polysaccharides
- sa dégradation en précurseurs biosynthétiques par la voie des pentoses phosphates
- sa dégradation en pyruvate par la glycolyse

La voie des pentoses phosphates génère du NADPH, la forme oxydée du NADP (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), molécule indispensable aux réactions réductrices de synthèse d'acides gras, acides aminés et nucléotides. Cette voie nécessite de l'énergie qui est produite par la glycolyse. La voie de la glycolyse est employée par tous les tissus pour la dégradation du glucose pour fournir de l'énergie, sous la forme d'ATP (adénosine triphosphate) à partir d'ADP (adénosine diphosphate), ainsi que des intermédiaires pour d'autres voies métaboliques. La glycolyse est au centre du métabolisme des glucides car pratiquement tous les sucres peuvent être convertis en glucose, substrat premier de la glycolyse. La glycolyse est une série de 9 à 10 réactions dont l'un des produits finaux est le pyruvate. Les pyruvates produits à l'issue de la glycolyse seront ensuite dégradés lors du cycle de Krebs au sein de la mitochondrie. La dégradation complète du pyruvate permet donc, grâce à la chaîne respiratoire, la formation d'ATP. Le glucose, grâce à la glycolyse, au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire, permet donc la production d'énergie utilisable par la cellule¹⁸⁴.

En conditions aérobiques (**Figure 27**), le NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide sous forme oxydé) formé lors de la glycolyse est réoxydé en présence d'oxygène, permettant au pyruvate d'être le substrat d'une autre voie métabolique. Dans ces conditions, le métabolisme du glucose permet la production de 38 mol d'ATP à partir de 1 mol de glucose. Lorsque l'apport en oxygène est insuffisant, le métabolisme cellulaire de type aérobique bascule vers un métabolisme anaérobique pour conserver une production d'énergie. Cependant, en absence d'oxygène, le NADH ne peut être réoxydé. Le pyruvate est alors réduit en lactate permettant la formation de NAD^+ . La glycolyse permet donc en conditions anaérobiques la production de 2 mol d'ATP à partir de 1 mol de glucose. Cette glycolyse anaérobique est connue et permet la production d'énergie au sein de tissus n'ayant pas de mitochondrie, tels que les globules rouges, ou dans le cas de cellules dépourvues en apport suffisant en oxygène¹⁷⁹.

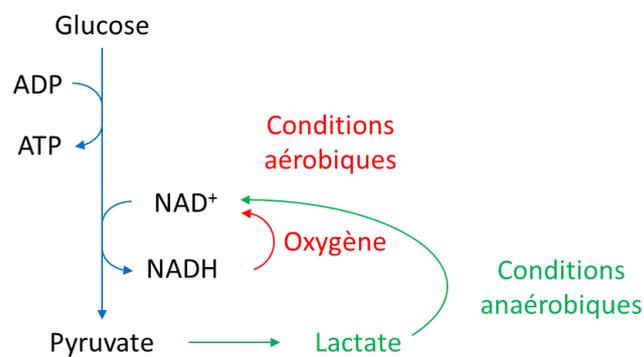


Figure 27 : Représentation simplifiée de la glycolyse en conditions aérobiques et en conditions anaérobiques.

Dans le cadre de la bioingénierie, l'induction d'un métabolisme aérobie vers un métabolisme anaérobie permettrait le maintien de la production d'énergie. Sur des cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM), et en caractérisant leur survie, un modèle *in vitro* d'ischémie a été développé pour obtenir une meilleure compréhension de l'ischémie ; d'un point de vue de l'hypoxie et de la déplétion en nutriments⁵. La survie des hCSMs (**Figure 28.A**) et la quantité d'ATP présentes dans ces cellules (**Figure 28.B**) ont été évaluées en présence ou en absence de glucose pendant 21 jours en condition quasi-anoxique ($p\text{O}_2 < 0,1 \%$). En absence de glucose, le nombre de cellules vivantes et la quantité d'ATP au sein des cellules diminuent drastiquement dès la première semaine de culture. L'apport de glucose à 1 g/L permet d'améliorer la survie des hCSMs et la quantité d'ATP seulement sur les 7 premiers jours de culture. Par contre, en présence de glucose à 5 g/L, le nombre de cellules vivantes et la quantité d'ATP restent stables sur les 3 semaines d'expérience. Dans ce modèle, le glucose joue donc clairement un rôle central dans la survie des

cellules. En effet, seules les cellules cultivées en présence de glucose possédaient la capacité de survivre et de garder leurs fonctionnalités après une hypoxie prolongée.

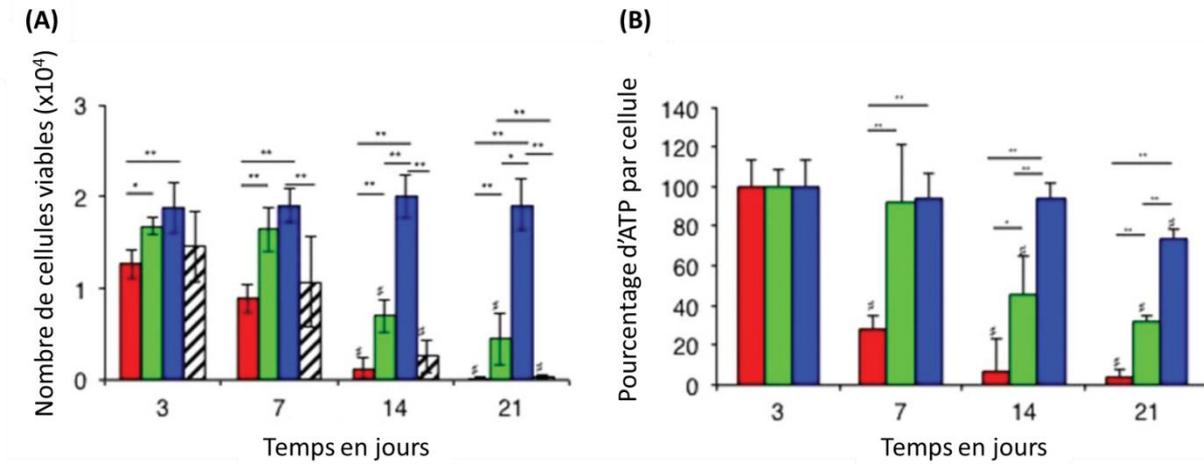


Figure 28 : (A) Quantification de la viabilité cellulaire et (B) du pourcentage d'ATP produit par cellule lorsque les hCSMs sont cultivées en conditions quasi-anoxiques, en absence de glucose (rouge), de 1 g/L (vert) ou de 5 g/L (bleu) de glucose⁵.

Ces résultats ont été validés *in vivo* par implantation des hCSMs dans un modèle ectopique murin. En effet, en absence de glucose, la viabilité cellulaire diminue dès les premiers jours après implantation. La présence de glucose permet l'amélioration de la survie cellulaire. Cependant, à 7 jours post-implantation, la viabilité cellulaire diminue. Ces résultats permettent tout de même de démontrer que l'unique apport de glucose dans un environnement quasi-anoxique permet une augmentation significative du taux de survie des hCSMs implantées (Figure 29)⁵.

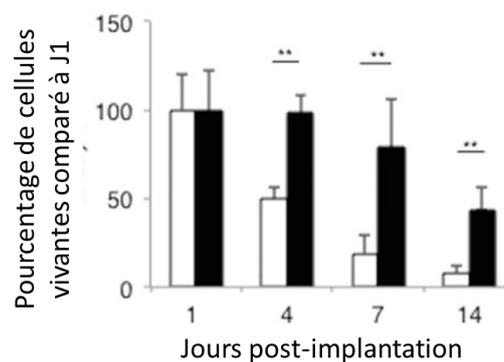


Figure 29 : Quantification de la viabilité cellulaire de hCSMs aux seins de biomatériaux implantés en site ectopique chez la souris en présence (noir) ou en absence (blanc) de glucose à 10 g/L⁵.

Cette étude permet donc d'ouvrir de nouvelles possibilités pour améliorer la survie de cellules au sein de biomatériaux implantés. Cependant, dans ces conditions in vivo, la survie des hCSMs diminue après 14 jours d'implantation, même en présence glucose. Il est fort probable que cette diminution soit due à une déficience dans l'apport continu de glucose au cours du temps dans le biomatériau implanté.

III.3. Apport de glucose *in situ*

Délivrer directement du glucose de manière continue au cœur du biomatériau cellularisé est donc la stratégie idéale pour fournir une source d'énergie pour les cellules et contribuer à améliorer leur survie. Mais, cet apport direct de glucose au sein du matériau est réellement un défi et constitue un véritable verrou. En effet, le glucose est une toute petite molécule, non chargée, et sa diffusion très rapide hors des matériaux rend très difficile une délivrance directe aux cellules au cours du temps.

Dans la nature, différents polymères de glucose sont utilisés pour stocker ce dernier. En effet, dans le règne animal, le glucose est mis en réserve sous forme de **glycogène** et dans le règne végétal, sous forme d'**amidon**. Ces formes polymérisées du glucose sont ensuite dégradées pour produire du glucose qui sera ensuite métabolisé comme principal combustible de la cellule.

III.3.1. Les polymères de glucose comme réservoir de glucose

a. Le glycogène

Le glycogène est un sucre de réserve chez les animaux découvert pour la première fois par Claude Bernard en 1857¹⁸⁵. Les principaux lieux de stockage du glycogène se situent au niveau du foie et des muscles, même si la plupart des autres cellules stockent de faibles quantités de glycogène pour leur propre usage. La fonction du glycogène musculaire est de servir de réserve de carburant pour la synthèse d'ATP lors de la contraction musculaire, alors que celle du glycogène du foie est de maintenir la concentration de glucose dans le sang. Le glycogène peut être extrait par broyage du foie ou des muscles¹⁸⁶.

Le glycogène est un polysaccharide à chaîne ramifiée constitué exclusivement de α -D-glucose. La liaison glycosidique primaire est une liaison α -(1,4). Après une moyenne de huit à dix résidus, il

apparaît une liaison glucosidique α -(1,6) (**Figure 30**). Une seule molécule de glycogène peut atteindre une masse de 10^5 kDa. Les molécules de glycogène existent dans des granules cytoplasmiques qui contiennent également la majorité des enzymes nécessaires à la synthèse, telles que la glycogène synthase et l'amylo- α -(1,4), α -(1,6)-transglucosidase (responsables respectivement de la formation des liaisons glucosidique α -(1,4) et des liaisons glucosidique α -(1,6)), et à la dégradation du glycogène, telles que la glycogène phosphorylase et l'amylo- α -(1,6)-glucosidase (responsables respectivement de l'hydrolyse des liaisons glucosidique α -(1,4) et des liaisons glucosidique α -(1,6))^{184,187}.

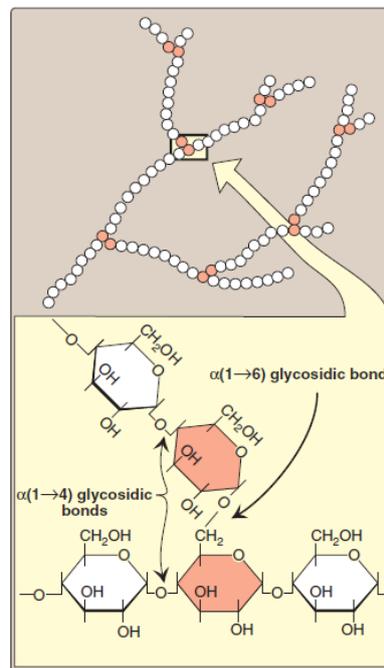


Figure 30 : Structure du glycogène mettant en évidence les liaisons glycosidiques α -(1,4) et α -(1,6)¹⁸⁴.

La biosynthèse et la biodégradation du glycogène permet donc soit de stocker le glucose, soit d'en produire suivant la demande cellulaire. Cette dégradation s'effectue selon deux modes : la réduction des chaînes et le débranchement au niveau des liaisons α -(1,6). La réduction des chaînes s'opère par le clivage successif des liaisons α -(1,4) depuis les extrémités non réductrices du glycogène par la glycogène phosphorylase produisant du glucose-1-phosphate. Celui-ci est converti dans le cytosol en glucose-6-phosphate qui sera par la suite converti en glucose. Le débranchement au niveau des liaisons α -(1,6) s'effectue par l'oligo- α -(1,4)- α -(1,6)-glucan transférase et l'amylo- α -(1,6)-glucosidase^{184,186}.

b. L'amidon

L'amidon est un sucre de réserve chez les végétaux et une importante source glucidique chez l'homme. Il est souvent extrait du maïs, de la pomme de terre, du blé ou du riz et est organisé sous forme de grains visibles par coloration à l'iode. L'amidon est composé de deux types de polymères de glucose liés entre eux par des liaisons α -(1,4) glycosidiques : l'amylose et l'amylopectine (**Figure 31**)^{188,189}.

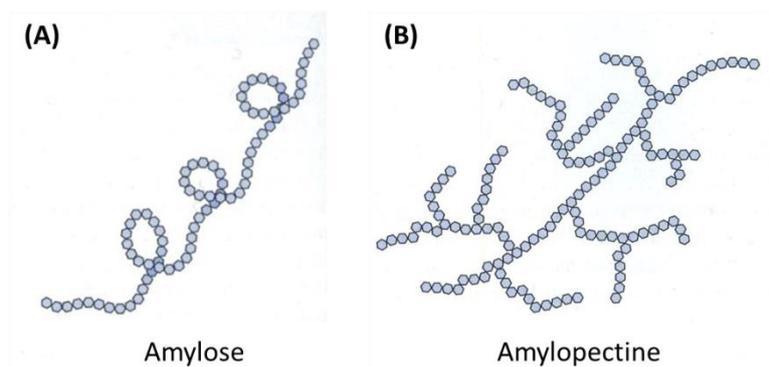


Figure 31 : Représentation schématique de (A) la structure de l'amylose en hélice et (B) la structure de l'amylopectine en arbre. Chaque rond bleu représente schématiquement un résidu glucosidique¹⁸⁸.

L'amylose, composée d'une chaîne linéaire de glucose qui s'organise en hélice, apporte la nature cristalline à l'amidon et représente environ 30% de la masse totale sèche en amidon. Au contraire, l'amylopectine est un polymère branché de glucose représentant 70% de la masse en amidon et apportant une nature amorphe à l'amidon. Ces proportions peuvent varier suivant la provenance de l'amidon. L'amylopectine est constituée d'unités glucosidiques rattachées par des liaisons α -(1,4) qui portent des ramifications reliées les unes aux autres par des liaisons α -(1,6). Elle contient des groupes de résidus de 12 à 20 glucoses formant des clusters. Ces clusters sont reliés entre eux par des chaînes plus longues formées de 40 ou plus d'unités de glucose qui relient deux ou plusieurs clusters. Cette distribution permet l'organisation d'un grain d'amidon de nature semi-cristalline. A l'intérieur du grain, les chaînes courtes formées de liaisons α -(1,4) forment des doubles hélices. Elles s'organisent ensuite ensemble pour former des structures lamellaires cristallines. Les lamelles cristallines sont séparées par des lamelles amorphes contenant des points de branchement donnant des zones semi-cristallines organisées par alternance entre des lamelles cristallines et amorphes. Les grains d'amidon sont eux-mêmes organisés en couches par alternance de zones semi-cristallines et amorphes (**Figure 32**)¹⁸⁹.

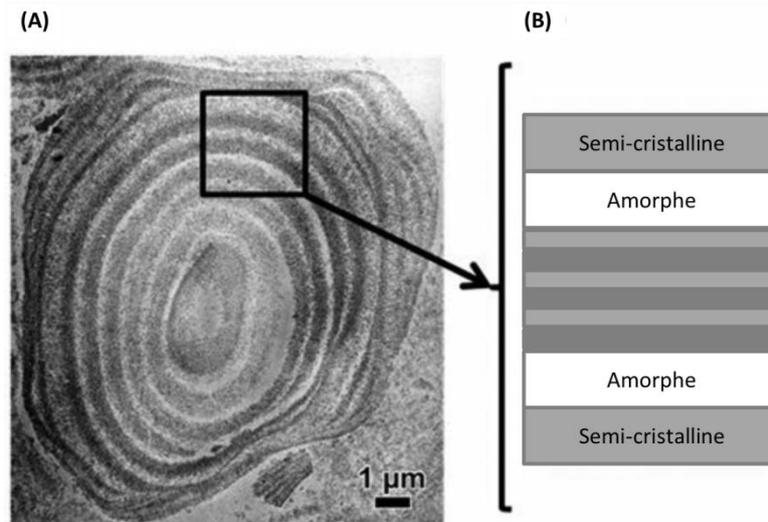


Figure 32 : (A) Section fine d'un grain d'amidon de maïs et (B) représentation schématique de l'alternance de cercles semi-cristallins et amorphes¹⁸⁹.

Cette structure particulière confère aux grains d'amidon des propriétés de biréfringence positive caractérisées en lumière polarisée par le phénomène de croix noire, appelée croix de Malte (Figure 33)¹⁹⁰.

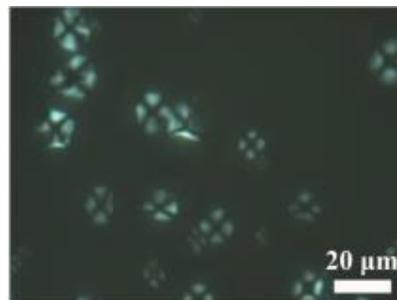


Figure 33 : Grain d'amidon de maïs observé au microscope à lumière polarisée mettant en évidence la croix de Malte¹⁹⁰.

Les structures du glycogène et de l'amidon peuvent paraître très proches. Cependant, le nombre de ramifications diffère entre ces deux polysaccharides. Dans le glycogène, les ramifications sont présentes environ tous les dix résidus glucose tandis que dans l'amidon, elles sont présentes environ tous les trente résidus, différenciant ainsi la structure de ces deux polysaccharides.

Le métabolisme de l'amidon (biosynthèse et biodégradation) implique l'action conjointe et contrôlée de nombreuses enzymes incluant les enzymes synthèses (STS et GBS), les enzymes de branchement (SBE), les enzymes de débranchement telles que les isoamylases (ISA) et les limites dextrinases (LDA),

les α -glucan phosphorylases (PHS), les α -amylases (AMY) et les β -amylases (BAM). Les enzymes synthèses ont pour rôle la formation des liaisons glucosidique α -(1,4), créant la molécule d'amylose, alors que les enzymes de branchement permettent la formation des liaisons glucosidique α -(1,6) créant l'amylopectine (**Figure 34**)¹⁹¹.

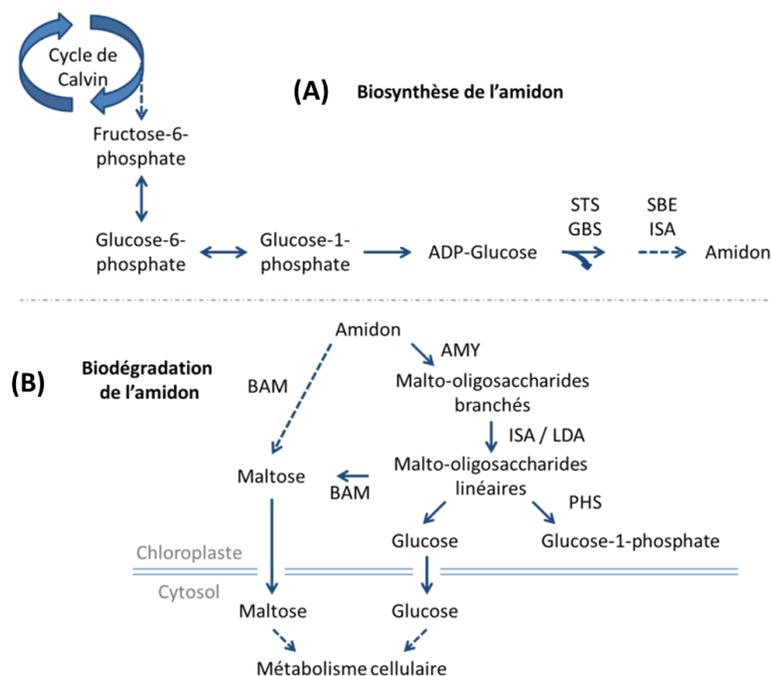


Figure 34 : Représentation schématique et simplifiée de (A) la biosynthèse et de (B) la biodégradation de l'amidon (inspiré de ¹⁹¹).

c. Choix du polymère de glucose et utilisation

Pour obtenir une source et une production de glucose au sein d'un hydrogel, deux polymères de glucose peuvent être utilisés : le glycogène et l'amidon. Tous deux sont biocompatibles et biodégradables du fait de leur rôle important dans le métabolisme cellulaire (eucaryote ou procaryote). La principale différence entre ces deux polysaccharides réside en leur composition en homopolymères. Le glycogène n'est composé que d'amylopectine alors que l'amidon est composé d'amylose et d'amylopectine. L'amylopectine, structure branchée de manière arborescente, contient des zones amorphes correspondant aux points de branchement et des zones semi-cristallines contenant les liaisons glucosidiques α -(1,4). La structure de l'amylopectine est responsable des propriétés de gélatinisation de l'amidon. Au contraire, l'amylose, structure linéaire, s'organise en hélice de 6 à 8 résidus par tour ce qui lui confère des propriétés hydrophiles externes et hydrophobes internes. Cette structure hélicoïdale apportera des propriétés de rétrogradation à l'amidon, alors que le glycogène qui ne contient pas d'amylose, sera dénué de cette propriété. L'amidon est utilisé

fréquemment dans le domaine industriel, notamment dans l'industrie du papier et dans l'agroalimentaire, grâce à ses propriétés épaississantes et de son faible coût car isolé à partir de céréales ou plantes à racines¹⁹².

Bien qu'hydrophile du fait de la présence de nombreux groupements hydroxyles polaires, l'amidon est insoluble dans l'eau froide. En effet, en dessous de 60°C, sa dispersion dans l'eau est réversible et une suspension d'amidon instable et blanche est obtenue, suspension encore appelée lait d'amidon. Il devient soluble après chauffage au-dessus de 60°C environ, température de gélatinisation de l'amidon. Cette température correspond à la température à partir de laquelle la structure granulaire de l'amidon sera modifiée de manière irréversible, conduisant à la perte de la biréfringence et de la solubilisation de l'amidon. Cette température dépend de l'origine de l'amidon et de la teneur en amylose (maïs : 62 à 80°C ; blé : 52 à 85°C ; pomme de terre : 58 à 65°C). A mesure que la température augmente, les grains d'amidon s'hydratent et gonflent, s'accompagnant d'une augmentation de la viscosité de la solution jusqu'à atteindre un pic de viscosité, correspondant au gonflement maximum des grains d'amidon. Une fois les grains gonflés au maximum, ils se déchirent provoquant la libération complète de l'amylose et de l'amylopectine. Cette libération s'accompagne d'une diminution de la viscosité de la solution. Cette solution est appelée empois d'amidon. Lors de la phase de refroidissement, la texture de l'amidon change, la viscosité augmente de nouveau, l'amidon devient opaque et forme un gel. L'amidon tend à retrouver une structure semi-cristalline, structure plus favorable qu'une structure amorphe. Pour cela, les chaînes d'amylose vont se réassocier et former des zones cristallines. Cette réorganisation structurale s'accompagne d'un relargage de l'eau présente, appelé synérèse, permettant une meilleure réorganisation des chaînes d'amylose en structures organisées. Ce phénomène est appelé rétrogradation de l'amidon, aboutissant à un solide ou à une solution suivant la concentration en amidon (**Figure 35**)^{192,193}.

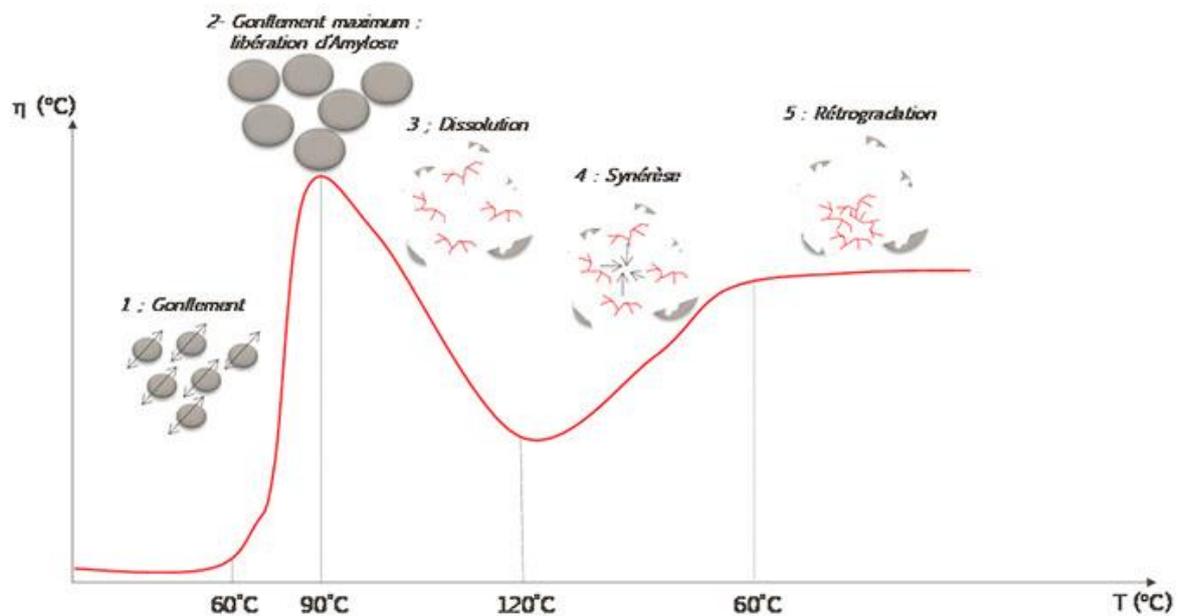


Figure 35 : Représentation schématique des différentes étapes de la solubilisation de l'amidon en solution aqueuse. La température est représentée en abscisse et la viscosité en ordonnée.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour solubiliser des grains d'amidon. Pour exemple, une solution aqueuse d'amidon est mise à chauffer ou bien autoclavée à 121°C pour dépasser la température de gélatinisation. Une autre technique consiste à effectuer un traitement chimique de l'amidon par dissolution dans du NaOH ou du DMSO par exemple¹⁹⁴.

III.3.2. Hydrolyse enzymatique de l'amidon

Dans l'industrie agroalimentaire et notamment dans les glucoseries, l'amidon est utilisé comme substrat initial pour produire du maltose ou du glucose qui servira à la production de sirop de fructose ou de sucre cristallisé. Pour cela, différentes enzymes sont nécessaires avec différentes spécificités :

- des enzymes de dégrossissement hydrolysant les liaisons α -(1,4) de manière aléatoire, telles que les **α -amylases**,
- des enzymes de débranchement hydrolysant les liaisons α -(1,6), telles que les **pullulanases** et les **isoamylases**,
- des enzymes de finition hydrolysant les liaisons α -(1,4) par les extrémités non réductrices, telles que les **amyloglucosidases**.

a. Les α -amylases et les β -amylases

Les amylases sont un groupe d'enzymes qui, par leur action conjointe, permettent de réduire la taille des chaînes d'amidon. C'est pourquoi elles sont souvent utilisées dans les étapes de liquéfaction et de saccharification de l'amidon (processus permettant de transformer des sucres complexes en sucres simples). Les plus utilisées sont les α -amylases et les β -amylases.

Les α -amylases ou endo-amylases (EC. 3.2.1.1) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glucosidique α -(1,4) de manière aléatoire en milieu de chaîne. Cette hydrolyse conduit à la production de dextrans (polyosides contenant des liaisons glucosidiques α -(1,6)) contenant trois ou plus unités de glucose suivant le site de coupure (**Figure 36**). Le pH et la température optimum dépendent de la source de l'enzyme : pour les α -amylases d'origine humaine, le pH et la température optimum sont respectivement de 7 et 37-40°C, pour les α -amylases d'origine bactérienne ou végétale, ils sont de 4-5 et de 50-60°C¹⁹⁵. Les α -amylases sont des métalloenzymes à calcium composées d'environ 520 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 60 kDa. Elles contiennent 3 domaines nommés A, B et C. Le calcium est situé entre les domaines A et B et agit en tant que stabilisateur de la structure. Le site actif de l'enzyme, correspondant au site de liaison du substrat et donc de l'amidon, se situe entre les domaines A et B¹⁹⁶.

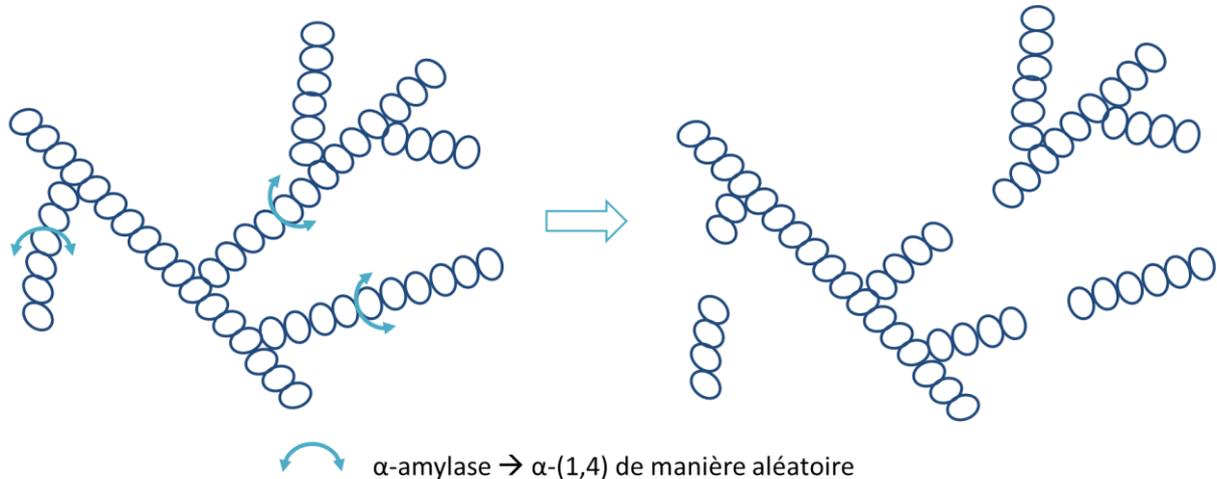


Figure 36 : Représentation schématique de l'action de l' α -amylase sur l'amidon.

Les β -amylases ou exo-amylases (EC 3.2.1.2) sont des enzymes retrouvées dans les graines en germination et les bactéries. Le pH optimal de ces enzymes est compris entre 5 et 6 pour les enzymes d'origine végétale et entre 6 et 7 pour les enzymes d'origine bactérienne, et la température optimale est comprise entre 40 et 55°C. De même que pour l' α -amylase, la β -amylase est une métalloenzyme à calcium de 520 acides aminés environ pour un poids moléculaire d'approximativement 60 kDa. Elle

contient également trois domaines nommés A, B et C. Le site catalytique se situe au centre de l'enzyme, au niveau du domaine A¹⁹⁷. Les β -amylases catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1,4) successivement à partir des extrémités non réductrices de l'amidon, libérant une unité de maltose (correspondant à un diose) (**Figure 37**). Cette hydrolyse conduit à un mélange de maltose et de dextrans résiduelles, correspondant aux zones de ramification. En effet, l'enzyme s'arrête de fonctionner 3 à 4 résidus avant la zone de branchement car elle n'a pas la capacité d'hydrolyser les liaisons glycosidiques α -(1,6). Elles ne peuvent donc qu'hydrolyser les chaînes d'amylose. Au cours de l'hydrolyse, il y a inversion de la position de la fonction hémicétalique libérée et l'anomère β du maltose est alors libéré.

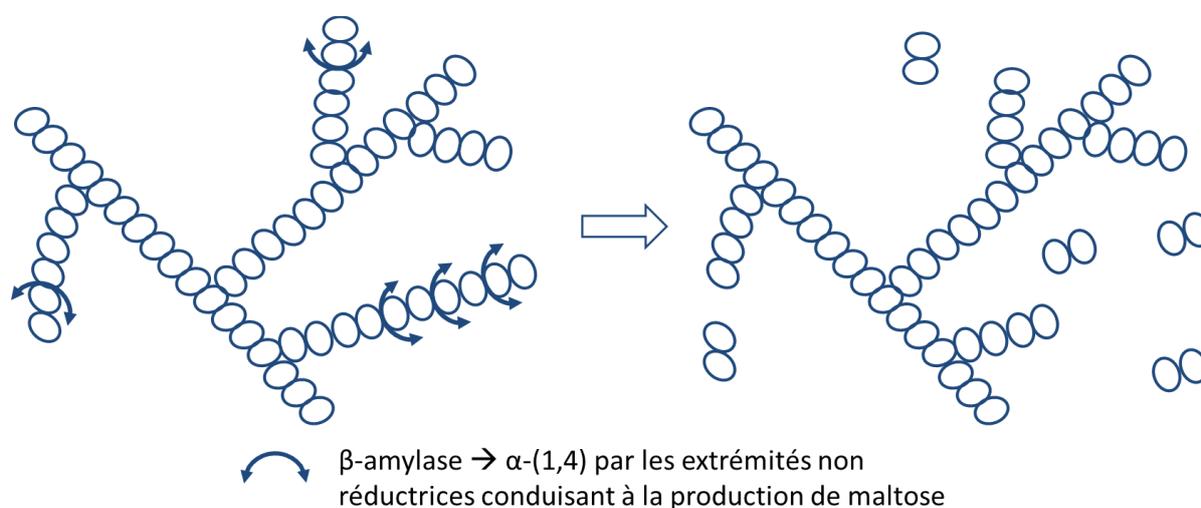


Figure 37 : Représentation schématique de l'action de la β -amylase sur l'amidon.

Ces enzymes permettent la réduction de la taille de l'amidon mais il subsiste, dans le mélange final des produits non hydrolysés tels que des dextrans résiduelles contenant des liaisons glycosidiques α -(1,6).

b. Les isoamylases et les pullulanases

L'amidon contient de l'amylopectine caractérisée par des liaisons glycosidiques α -(1,4) et α -(1,6). Pour avoir une hydrolyse complète de l'amidon, il est nécessaire d'hydrolyser ces liaisons glycosidiques α -(1,6). Des enzymes de débranchement, telles que les isoamylases et les pullulanases sont donc utilisées.

Les isoamylases (EC. 3.2.1.68) sont des enzymes produites chez un grand nombre de micro-organismes. Le pH optimal de ces enzymes se situe vers 5, et la température optimale est comprise entre 40 et 60°C. Les isoamylases sont des métalloenzyme à calcium d'environ 570 acides aminés et de poids moléculaire d'environ 80 kDa. Elles contiennent trois domaines nommés N, A et C. Le domaine A peut être divisé, comme chez les α -amylases et les β -amylases, en domaines A et B. Le site catalytique se situe au centre du domaine A au niveau des acides aminés Asp375, Glu435 et Asp510¹⁹⁸. Les isoamylases catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α -(1,6), permettant la réduction de la chaîne d'amylopectine et de certaines dextrans conduisant à la formation d'un mélange ne contenant que des chaînes linéaires de polysaccharides (**Figure 38**).

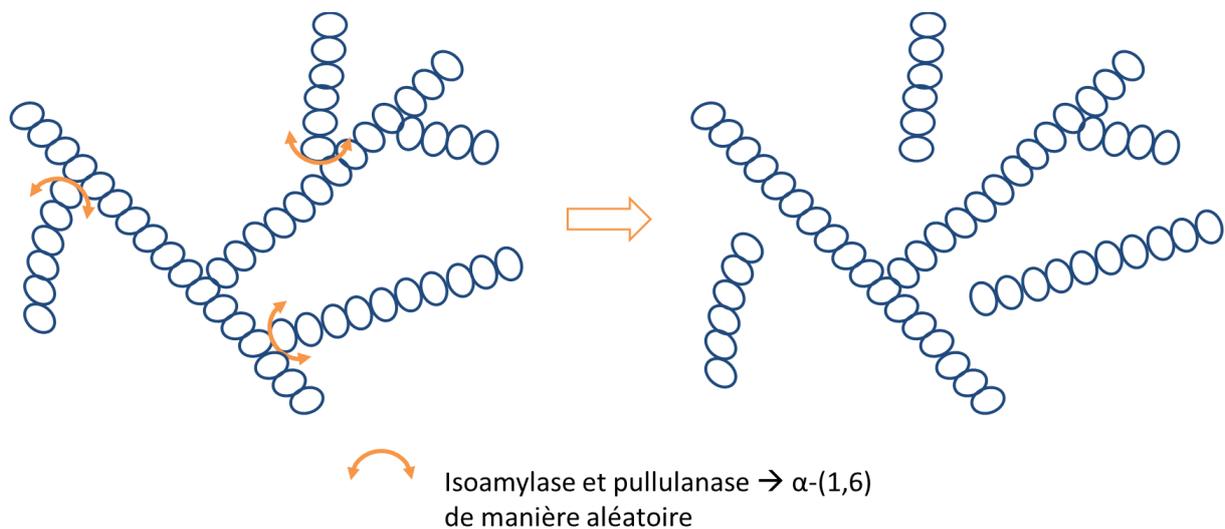


Figure 38 : Représentation schématique de l'action de l'isoamylase et de la pullulanase sur l'amidon.

Les pullulanases (EC. 3.2.1.41) sont, comme les isoamylases, des enzymes capables d'hydrolyser des liaisons glucosidiques α -(1,6), permettant le débranchement de structures telles que l'amylopectine, comme les isoamylases (**Figure 38**). Les pullulanases sont produites puis extraites de chez de nombreux micro-organismes. Le pH et la température optimum sont respectivement compris entre 7 et 9 et entre 45 et 60°C. La pullulanase est formée d'environ 1100 acides aminés. De même que pour l'isoamylase, la pullulanase contient 3 domaines : les domaines N, A et C. Elle contient jusqu'à cinq ions calcium. Le domaine catalytique se situe au niveau des trois ions calcium dans le domaine A¹⁹⁹.

Ces différentes enzymes permettent la production de maltoses ou de dextrans mais, malgré une action commune de ces enzymes, la production de glucose serait aléatoire et ne serait possible que

par les α -amylases. Cependant, dans l'industrie du glucose, il est nécessaire d'hydrolyser de l'amidon conduisant à une production efficace de glucose.

c. Les amyloglucosidases

Les amyloglucosidases (AMG) (EC. 3.2.1.3) sont des enzymes produites chez de nombreux micro-organismes et notamment les champignons. L'AMG extraite d'*Aspergillus niger*, est une enzyme d'environ 620 acides aminés pour un poids moléculaire de 97 kDa. La structure tridimensionnelle de l'AMG présente trois domaines : le domaine N-terminal et le domaine C-terminal liés par un troisième domaine. Le domaine catalytique de l'AMG se situe au niveau de la région N-terminale et contient de nombreuses hélices. Le site de liaison de l'amidon se situe quant à lui au niveau de la région C-terminale et contient de nombreux feuillettes (**Figure 39**). Deux isoformes de l'AMG existent : G1 et G2. L'isoforme G1 se différencie de G2 par la présence du site de liaison à l'amidon, site absent sur G2^{200,201}.

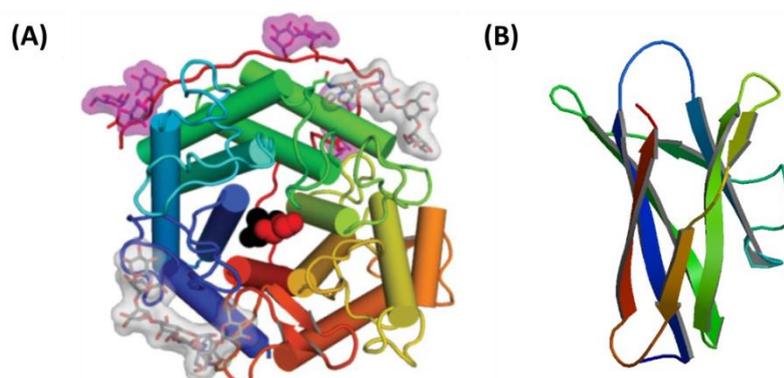


Figure 39 : Structure tridimensionnelle de l'AMG : (A) le domaine catalytique du résidu 30 (bleu) au résidu 487 (rouge) contenant des hélices représentées par des cylindres²⁰⁰ et (B) le domaine de liaison de l'amidon du résidu 509 (bleu) au résidu 616 (rouge) contenant de nombreux feuillettes représentés par des flèches²⁰¹.

L'AMG est une exo-amylase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons glucosidiques α -(1,4) successivement à partir des extrémités non réductrices de l'amidon, libérant une unité de glucose. Cependant, il a été montré que l'AMG avait également une activité d'hydrolyse sur les liaisons glucosidiques α -(1,6), permettant le débranchement de l'amylopectine présente dans l'amidon (**Figure 40**). L'activité sur les liaisons α -(1,6) est très faible comparée à celle sur les liaisons α -(1,4) et ne représente que 0,2% de cette activité. L'AMG a un pic d'activité pour un pH compris entre 3,5 et 5 et une température comprise entre 50 et 60°C^{202,203}. La propriété de double hydrolyse de l'AMG sur

les liaisons glucosidiques α -(1,4) et α -(1,6) en fait une enzyme de choix pour la production de glucose à partir d'amidon.

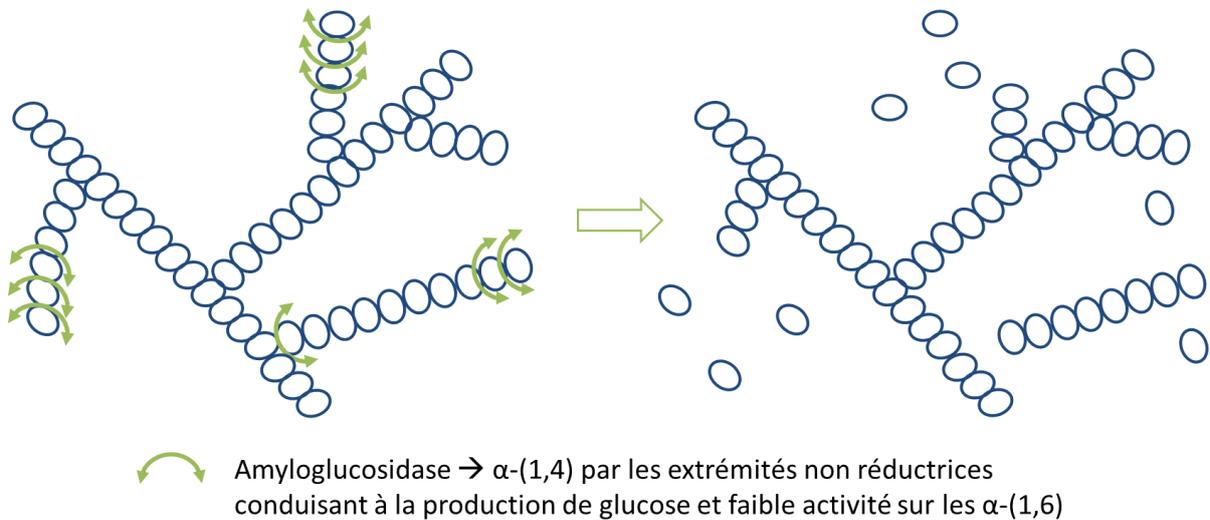


Figure 40 : Représentation schématique de l'action de l'amyloglucosidase sur l'amidon.

De nombreuses enzymes peuvent être utilisées pour hydrolyser les liaisons glucosidiques α -(1,4) et α -(1,6) de l'amidon. Ces enzymes possèdent des mécanismes d'actions différents et sont très largement utilisées pour la conversion enzymatique de l'amidon dans l'industrie du glucose puisqu'elles permettent d'obtenir des dextrans de taille variable et du glucose. Cependant, une seule de ces enzymes est capable de produire spécifiquement du glucose : l'amyloglucosidase par hydrolyse spécifique des liaisons glucosidiques α -(1,4) par les extrémités non réductrice de l'amidon.

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

I. Matériel biologique et chimique

I.1. Protéines

I.1.1. L'amyloglucosidase

L'amyloglucosidase (AMG) (EC 3.2.1.3) est une enzyme de 97 kDa produite chez *Aspergillus niger* et fournie par Sigma (10115). Son activité est d'environ 70 U/mg, dans ses conditions optimales d'activité (pH 4,8 et 60°C). Aucune indication concernant la pureté du produit n'est indiquée par le fournisseur. Il a donc été nécessaire dans un premier temps de déterminer ce paramètre.

Pour cela, 201,2 mg de poudre d'AMG ont été dissouts dans 10 mL d'eau puis dialysés contre 5 L d'eau pendant 2 jours avec un changement d'eau toutes les 12h. La membrane de dialyse utilisée est une membrane avec un seuil de coupure de 6-8 kDa. Après 2 jours de dialyse, la solution d'AMG est récupérée et lyophilisée. La masse obtenue après lyophilisation est de 60,3 mg, indiquant que la masse initiale a été divisée par 3. Le taux de pureté est donc de 30% et la concentration en AMG peut s'exprimer de la manière suivante :

$$\text{Concentration AMG (poudre)} = 3 \times \text{concentration AMG (pure)}$$

Les concentrations et les quantités d'AMG indiquées dans la suite de ce manuscrit tiennent compte du taux de pureté de l'AMG et expriment donc les concentrations et les quantités d'AMG pure.

I.1.2. Le fibrinogène

Le fibrinogène (HFb) utilisé est extrait de plasma humain et fourni par Calbiochem® (341576) sous forme lyophilisée (1 g), stérile et stockée entre 2 et 8°C. Il est dissout en conditions stériles à une concentration de 50 mg/mL dans une solution d'Hepes 10 mM, pH 7,4 (tampon Hepes), sans agitation à 37°C pendant 5h. Le stockage s'effectue à -20°C.

I.1.3. La thrombine

La thrombine (HTb) est extraite de plasma humain et fournie par Calbiochem® (605190) sous forme lyophilisée (1000 U), stérile et stockée à -20°C. Elle est resuspendue en conditions stériles à une concentration de 20 U/mL dans une solution d'Hepes 10 mM, 0,1% BSA, pH 6,5 puis stockée à -20°C.

I.2. Polymères

I.2.1. L'acide poly(lactique-co-glycolique)

L'acide poly(lactique-co-glycolique) PLGA 50/50 utilisé est fourni par Sigma (P2191). Il a un poids moléculaire compris entre 30000 et 60000 g.mol⁻¹. Il est stocké à -20°C et est utilisé sans modification.

I.2.2. L'alcool polyvinylique

L'alcool polyvinylique (PVA) est fourni par Sigma (P8136). Il est dissout à 5% (m/v) dans un tampon Hepes. La solubilisation du PVA s'effectue sous agitation pendant 2h à 90°C dans un bain à huile de silicone, à l'aide d'un montage à reflux. Après dissolution, la solution de PVA est stockée à température ambiante pour une durée maximale de 5 jours.

I.2.3. L'amidon

L'amidon utilisé est un amidon de blé fourni par Sigma (S5127). Il est dissout à 1, 4 ou 8% (m/v) dans un tampon Hepes. La solubilisation de l'amidon s'effectue sous agitation pendant 2h à 90°C dans un bain à huile de silicone, à l'aide d'un montage à reflux. Avant chaque utilisation, la solution d'amidon doit être chauffée sous agitation pendant 2h à 90°C, à l'aide du montage à reflux. La solution d'amidon est stockée à température ambiante pour une durée maximale de 5 jours et peut subir trois cycles de chauffage au maximum.

II. Synthèse des nanoparticules

II.1. Protocole de synthèse des nanoparticules

La technique de double émulsion a été utilisée pour encapsuler l'AMG dans des nanoparticules (NPs) de PLGA. Pour cela 100 mg de PLGA sont dissouts dans 2mL de dichlorométhane à température ambiante pendant 1h dans des tubes en borosilicate. Les tubes sont bouchés afin d'éviter l'évaporation du dichlorométhane (DCM). A cette phase organique est ajoutée une solution aqueuse d'AMG (100 μ L ; 12,6 mg/mL) préparée dans un tampon Hepes pour former des NPs contenant de l'AMG (NPe) ou une solution tampon Hepes pour former des nanoparticules vides (NP).

Une première sonication (sonication 1) de 3 fois 10s à une amplitude de 30% (correspondant à 3 fois 100 Joules) est effectuée dans la glace permettant d'obtenir une première émulsion eau/huile. A cette première émulsion est ajoutée une solution de PVA (4 mL ; 5% (m/v)). Une deuxième sonication (sonication 2) de 3 fois 10s à une amplitude de 30% (correspondant à 3 fois 100 Joules) est effectuée dans la glace et une deuxième émulsion eau/huile/eau est obtenue. Cette émulsion est transférée dans un bécher contenant une solution de PVA (100 mL ; 0,3% (m/v)) et laissée évaporée sous sorbonne, sous agitation à température ambiante pendant 3h afin d'éliminer le dichlorométhane.

Trois étapes de lavage sont ensuite effectuées : les solutions contenant les nanoparticules sont centrifugées pendant 8 min à 12000 rpm à une température de 8°C. Le surnageant de centrifugation est éliminé et le culot de nanoparticules est resuspendu dans 50 mL d'eau. Cette opération est répétée 2 fois.

Après les trois étapes de lavage, les NPs sont resuspendues dans 3 mL d'eau et lyophilisées pendant une nuit. Les nanoparticules sont stockées à -20°C. Avant utilisation, les nanoparticules sont resuspendues à 100 mg/mL dans de l'eau ou une solution d'Hepes 10 mM pH 7,4.

II.1.1. Rendement de synthèse

Le rendement de synthèse est déterminé à l'issue de chaque synthèse. L'étape de lyophilisation permet de connaître la quantité de nanoparticules produites lors de chaque synthèse. A partir des quantités initialement introduites en PLGA et en AMG, le rendement de la synthèse est calculé de la manière suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{quantité de nanoparticules}}{\text{quantité de PLGA introduite} + \text{quantité d'AMG introduite}} \times 100$$

II.1.2. Détermination de la quantité d'AMG encapsulée dans les nanoparticules

a. Méthode directe

- **Dissolution des nanoparticules :**

La dissolution des nanoparticules s'effectue par traitement chimique par ajout de 500 µg de nanoparticules dans 250 µL de NaOH 1 M. La solution est mise sous agitation pendant 1h. 250 µL de HCl 1 M est ensuite ajouté et la solution est mise de nouveau agitée pendant 1h.

- **Dosages protéiques :**

La quantification de l'AMG suite à la dissolution des nanoparticules s'effectue à l'aide de deux techniques : la mesure de l'absorbance à 280 nm et le dosage BCA.

La mesure de l'absorbance à 280 nm est effectuée directement sur la solution de nanoparticules dissoutes dans une cuve en quartz.

Le dosage BCA (kit BCA Sigma) permet la quantification de protéines dans une solution. Il est basé sur la réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^+ par les protéines. L'acide bicinchoninique présent en solution forme un complexe avec les ions Cu^+ formés. La formation de ce complexe est détectée par mesure de l'absorbance à 562 nm.

Ce kit contient une solution d'acide bicinchoninique (B9643) et une solution de sulfate de cuivre II pentahydrate à 4% (C2284), formant la solution de réactifs du kit.

Pour déterminer une quantité de protéines présentes dans un échantillon, une gamme étalon est effectuée à partir d'une solution d'AMG à 2 mg/mL :

Numéro échantillon	1	2	3	4	5	6	7	8
Volume d'AMG à 2 mg/mL (µL)	0	10	20	30	40	50	60	70
Volume de tampon Hepes (µL)	100	90	80	70	60	50	40	30
Concentration en AMG (mg/mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4

Tableau 1 : Préparation de la gamme étalon d'AMG pour effectuer le kit BCA.

La détermination de la quantité de protéines présentes dans un échantillon s'effectue par ajout de 1 mL de solution de réactifs du kit à 50 µL de solution de la gamme étalon. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 min à 37°C. A l'issue de ce temps d'incubation, l'absorbance de ces échantillons est mesurée à l'aide d'un spectromètre UV-Visible à 562 nm.

Une gamme étalon est alors obtenue en traçant l'absorbance à 562 nm en fonction de la quantité d'AMG présente dans l'échantillon de la gamme étalon (**Figure 41**).

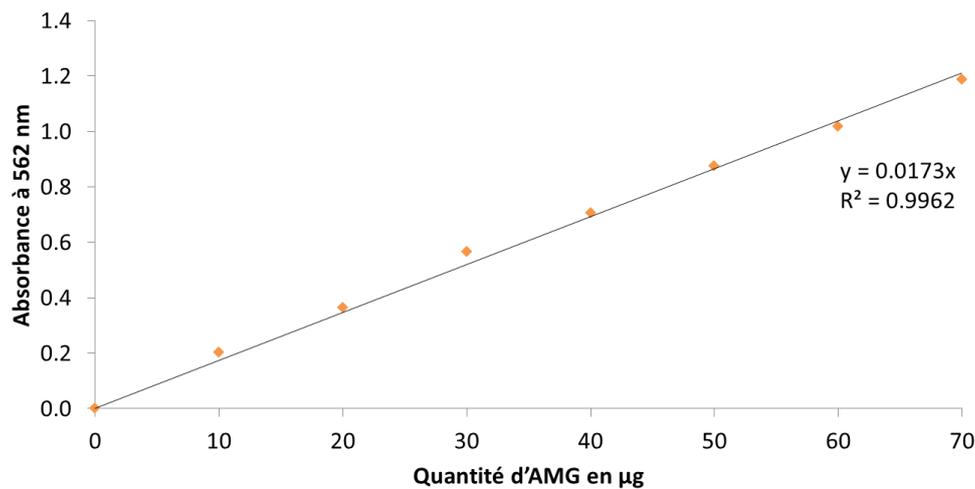


Figure 41 : Gamme étalon permettant le dosage d'AMG en solution. Les valeurs expérimentales obtenues ont été ajustées à l'équation d'une droite et l'équation de cette droite ainsi que son coefficient de détermination R^2 sont affichés.

Le calcul de la quantité d'AMG contenue dans un échantillon inconnu s'effectue à partir de la gamme étalon, par lecture de l'absorbance de l'échantillon inconnu à 562 nm.

Le dosage de la quantité d'AMG contenue dans la solution de NPe dissoutes s'effectue donc par mélange de 50 µL de cette solution avec 1 mL de la solution de réactifs du kit BCA. Les échantillons sont incubés en même temps que ceux de la gamme étalon effectuée sur l'AMG. L'absorbance de ces

échantillons est ensuite mesurée à 562 nm et la quantité d'AMG est déterminée à partir de la gamme étalon.

- **Greffage de l'AlexaFluor568 sur l'AMG :**

Pour déterminer le taux d'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules de PLGA, l'AMG a été marquée par un fluorophore (AMG*) : l'AlexaFluor568 NHS Ester (Invitrogen, A20003). Pour cela, l'AMG a été préparée dans une solution de borate 50 mM pH 8,3 (10 mg d'AMG dans 1 mL). Le ratio introduit est de 0,6 mol AlexaFluor568/mol AMG. Ce mélange est mis sous agitation à l'abri de la lumière pendant 3h. L'AlexaFluor568 n'ayant pas réagi avec l'AMG est éliminée par purification sur une colonne Sephadex G25 équilibrée avec un tampon Hepes. L'AMG* obtenue est lyophilisée et stockée à -20°C. Le rendement de ce greffage est de 92%. Le taux de greffage de l'AlexaFluor568 sur l'AMG a ensuite été déterminé. Pour cela, l'absorbance de solutions d'AMG* à 180 µg/mL et 360 µg/mL a été mesurée à 279 nm et 577 nm. Le taux de greffage est calculé de la manière suivante :

$$\text{Taux de greffage (\%)} = \frac{A_{577} \times \varepsilon_{AMG}}{(A_{279} - (A_{577} \times CF)) \times \varepsilon_{AlexaFluor568}}$$

avec A_{577} et A_{279} : absorbances de l'échantillon à 577 nm et 279 nm

ε_{AMG} : coefficient d'extinction molaire de l'AMG à 280 nm ($1,77 \times 10^5$ L/mol/cm)

CF : facteur correctif fourni par le fournisseur, $CF = 0,46$

ε_{AF568} : coefficient d'extinction molaire de l'AlexaFluor568 à 579 nm (88×10^3 L/mol/cm)

Le taux de greffage de l'AMG* est de 0,33 mol AlexaFluor568/mol d'AMG.

- **Analyse de la fluorescence de l'AMG* après le traitement chimique :**

Une solution d'AMG* à 0,1 mg/mL a été préparée dans un tampon Hepes, dans une solution de NaOH 1 M ou dans une solution de NaOH 1 M et de HCl 1 M. Des spectres d'émission de fluorescence ont été effectués sur ces trois solutions à une longueur d'onde d'excitation de 575 nm.

b. Méthode indirecte

Pour déterminer indirectement le taux d'encapsulation, les surnageants (S1, S2 et S3) issus des étapes de centrifugation lors de la synthèse des NPe sont récupérés. Deux techniques ont été utilisées pour déterminer la quantité d'AMG non encapsulée dans les nanoparticules et contenue dans ces surnageants : une analyse de la fluorescence et une mesure de l'activité de l'AMG non encapsulée.

- **Analyse de la fluorescence des surnageants :**

Des nanoparticules contenant de l'AMG* ont été synthétisées (NPe*). Les surnageants issus de cette synthèse ont été collectés pour être analysés par fluorescence.

Une gamme étalon a tout d'abord été effectuée grâce à des solutions contenant différentes quantités d'AMG* : 0, 1, 3, 6, 9, 18 et 36 µg préparés dans 100 µL échantillon. L'intensité d'émission de fluorescence de ces échantillons a été mesurée à 600 nm ($\lambda_{exc} = 575$ nm), correspondant à la longueur d'onde maximale d'émission de l'AlexaFluor568. L'intensité d'émission de fluorescence a été tracée en fonction de la quantité d'AMG* permettant d'obtenir une droite étalon.

Pour déterminer le taux d'encapsulation de manière indirecte, l'intensité d'émission de fluorescence a été mesurée à 600 nm sur les surnageants de centrifugation S1, S2 et S3 issus du protocole de synthèse des NPe* (V = 100 µL). La quantité d'AMG* présente dans ces surnageants a été déterminée grâce à la gamme étalon. A partir de cette quantité, le taux d'encapsulation (EE) a été calculé de la manière suivante :

$$EE (\%) = \frac{\text{quantité d'AMG introduite} - \text{quantité d'AMG non encapsulée}}{\text{quantité d'AMG introduite}} \times 100$$

- **Mesure de l'activité de l'AMG contenue dans le surnageant S1 :**

L'activité de l'AMG a tout d'abord été déterminée à pH 7,4 et 37°C. Une solution d'AMG à 630 µg/mL a été préparée dans un tampon Hepes. 10 µL de cette solution sont introduits dans 5 mL d'une solution d'amidon 0,5% (m/v) (préparée à partir d'une solution à 1% (m/v)) et incubés à 37°C sous agitation. A t = 0, 3, 6, 9 et 12 min, 1 mL de cette solution est prélevé et 150 µL de TCA (3 N) y sont ajoutés afin de stopper la réaction. Les échantillons obtenus sont centrifugés pendant 10 min à 12000 rpm pour éliminer l'amidon résiduel ainsi que l'AMG précipitée. 500 µL du surnageant sont prélevés et ramenés à pH 7,4 ± 0,4 avec du NaOH 6 M à l'aide d'une microélectrode pH. Si

nécessaire, du HCl 1 M est utilisé. La détermination de la quantité de glucose produite s'effectue à l'aide d'un kit glucose Sigma décrit ci-dessous. Avant lecture de l'absorbance à 540 nm, les échantillons sont centrifugés 5 min à 12000 rpm. La cinétique de production du glucose est ensuite tracée, permettant d'obtenir l'activité de l'AMG.

L'activité de l'AMG contenue dans le surnageant S1 a été déterminée comme décrit précédemment par incubation de 1 mL de surnageant avec 4 mL de solution d'amidon à 0,5% (m/v). La cinétique de production du glucose par l'AMG contenue dans le surnageant a été tracée, permettant d'obtenir l'activité du surnageant. La quantité d'AMG non encapsulée est ensuite calculée permettant d'obtenir le taux d'encapsulation à partir de la formule décrite précédemment.

- **Description du kit glucose :**

Le kit glucose est fourni par Sigma (GAGO-20) et est stocké entre 2 et 8°C. Il est utilisé pour déterminer une quantité de glucose présente dans un échantillon (**Figure 42**). Le fonctionnement de ce kit est basé sur l'oxydation du glucose par la glucose oxydase en présence d'eau et d'oxygène formant de l'acide gluconique et de l'eau oxygénée (H₂O₂). L'eau oxygénée, en présence de peroxydase, conduit à l'oxydation d'o-dianisidine réduite et à un changement de couleur (solution marron). L'ajout d'acide sulfurique permet l'arrêt des réactions enzymatiques et la formation d'une forme plus stable de l'o-dianisidine réduite, induisant un deuxième changement de couleur (solution rose). L'absorbance de l'échantillon est ensuite mesurée à 540 nm.

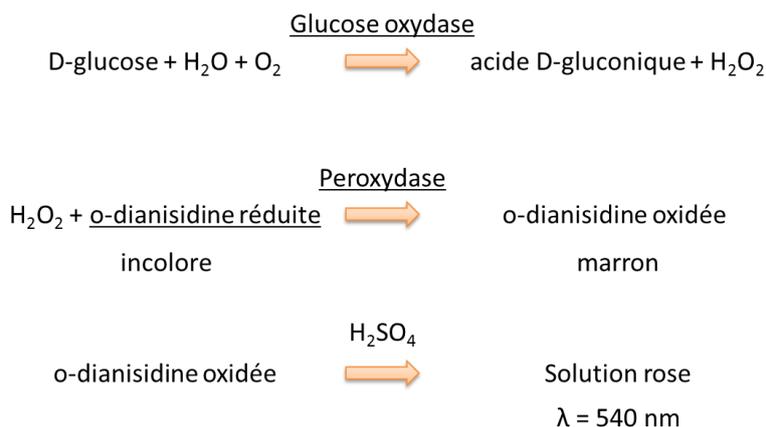


Figure 42 : Fonctionnement du kit glucose fourni par Sigma. La glucose oxydase, la peroxydase et l'o-dianisidine réduite sont fournies dans le kit.

Une gamme étalon est réalisée à partir de la solution de glucose (1mg/mL) fournie :

Numéro échantillon	1	2	3	4	5
Volume de glucose à 1 mg/mL (µL)	1000	980	960	940	920
Volume d'Hepes 10 mM, pH 7,4 (µL)	0	20	40	60	80
Concentration de glucose (µg/mL)	0	20	40	60	80

Tableau 2 : Préparation des échantillons de la gamme étalon pour le dosage du glucose produit.

La détermination de la quantité de glucose dans un échantillon s'effectue par ajout de 400 µL de réactifs du kit à 200 µL de solution échantillon. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 min à 37°C. A l'issue de ce temps d'incubation, 400 µL d'acide sulfurique (12 N) sont ajoutés dans chaque échantillon. L'absorbance de ces échantillons est mesurée à l'aide d'un spectromètre UV-Visible à 540 nm.

Une gamme étalon est alors obtenue en traçant l'absorbance à 540 nm en fonction de la quantité de glucose présente dans l'échantillon de la gamme étalon (**Figure 43**).

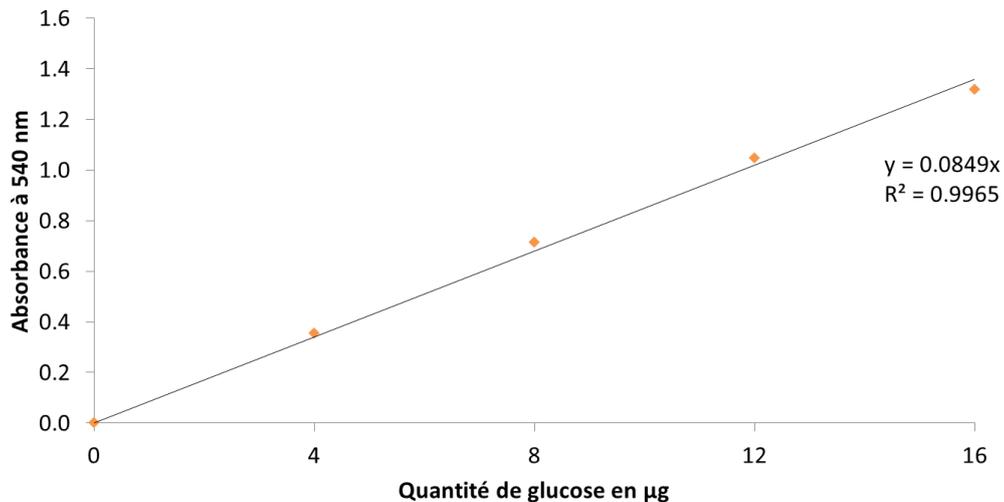


Figure 43 : Gamme étalon permettant le dosage du glucose en solution. Les valeurs expérimentales obtenues ont été ajustées à l'équation d'une droite et l'équation de cette droite ainsi que son coefficient de détermination R^2 sont affichés.

Le calcul de la quantité de glucose contenue dans un échantillon inconnu s'effectue à partir de cette gamme étalon, par lecture de l'absorbance d'un échantillon à 540 nm.

II.2. Modification des paramètres expérimentaux

II.2.1. Modification du temps de sonication

Lors de la formation des nanoparticules par émulsification, le temps de sonication a été modifié. Le temps de référence est de 10s à une amplitude de 30%. Les autres temps utilisés sont de 5s, 15s et 20s à une amplitude de 30%. Les temps de sonication utilisés pour les deux sonication successives sont identiques.

II.2.2. Modification du temps de centrifugation

La synthèse des nanoparticules nécessite des étapes de lavages des nanoparticules. Lors de ces étapes, le temps de centrifugation a été modifié. Le temps de référence est de 8 min à 12000 rpm et à 8°C. Les autres temps utilisés sont de 16 min, 32 min et 48 min à 12000 rpm et à 8°C. Les temps de centrifugation utilisés pour les trois centrifugations successives sont identiques.

II.3. Nanoparticules stériles

II.3.1. Protocole de préparation

La préparation de nanoparticules stériles s'effectue par la technique de double émulsion décrite au paragraphe II.1 avec quelques modifications pour réduire le risque de contamination.

Le matériel et les solutions pouvant être stérilisés ont été autoclavés 20 min à 120°C. La solution d'AMG est filtrée avant utilisation. La solution de PLGA ne peut pas être stérilisée à cause du DCM. La solution de PVA n'est pas stérilisable par filtration car la solution est trop visqueuse, il est donc placé à la fin de sa dissolution dans un flacon stérile fermé immédiatement, qui ne sera rouvert que le jour de la synthèse. Une solution de PVA est préparée pour chaque nouvelle synthèse de nanoparticules stériles.

La synthèse des nanoparticules stériles débute sous une hotte aspirante. A l'issue de l'étape d'évaporation du DCM, les erlenmeyers contenant les solutions de nanoparticules sont bouchés et emmenés sous hotte à flux laminaire. La suite de la synthèse s'effectue en conditions stériles. Lors de

la dernière resuspension, la solution de nanoparticules est introduite dans des tubes stériles fermés. Avant lyophilisation, les tubes sont placés soit 1h à -80°C soit trempés dans de l'azote liquide pendant 5 min. Une fois congelées, les nanoparticules sont lyophilisées puis stockées à -20°C jusqu'à utilisation. Avant utilisation, les nanoparticules sont resuspendues à 100 mg/mL dans de l'eau ou un tampon Hepes stériles.

II.3.2. Tests de stérilité

Pour déterminer le caractère stérile des nanoparticules, deux milieux de cultures liquides ont été utilisés : le bouillon TS (Tryptic Soy Broth, BD® Bacto®) et le bouillon LB (Lysogeny Broth Lennox, BD® Difco®). Les milieux solides ont été préparés à partir de TS Agar (Tryptic Soy Agar, BD® Difco®) et LB Agar (Lysogeny Broth Lennox, BD® Difco®). Les milieux TS contiennent de la caséine pancréatique, du soja, et des sels de sodium ; le bouillon TS contient également du dextrose (glucose) et des sels de potassium ; le TS Agar contient de l'agar pour solidifier le milieu. Les milieux LB contiennent du tryptone, de l'extrait de levure et des sels de sodium ; le LB Agar contient en plus de l'agar.

Différents échantillons sont testés : des nanoparticules préparées en conditions stériles ainsi que des nanoparticules non préparées en conditions stériles, correspondant au témoin positif, à une concentration de 100 mg/mL. Le témoin négatif correspond à du milieu de culture nonensemencé.

10 µL d'échantillon sontensemencés dans 2 mL de milieu de culture liquide (LB ou TS), puis incubés à 25°C ou 37°C pendant 2 semaines. A l'issue de cette incubation, les différents échantillons sont étalés sur géloses correspondantes (LB ou TS) et incubés à 25°C et 37°C pendant 1 semaine. Les géloses sont ensuite observées pour mettre en évidence la présence de contaminations.

III. Caractérisation physico-chimique et biochimique des nanoparticules

III.1. Analyse de la morphologie des nanoparticules

La morphologie des nanoparticules produites a été analysée par microscopie électronique à balayage (MEB) avec un microscope Philips XL 30 ESEM-FEG. L'analyse a été effectuée sur une solution de nanoparticules à 1 µg/mL diluées dans l'eau. Cette solution est ensuite déposée sur une pastille de carbone, elle-même déposée sur un plot métallique. La solution est séchée puis métallisée par une

fine couche d'or (quelques nanomètres). La mise en évidence du système cœur-coquille a été effectuée par dépôt sur la pastille de carbone de nanoparticules sous forme lyophilisée, puis par métallisation à l'or. Les acquisitions ont ensuite été effectuées à une tension de 20 kV. Les images obtenues sont exploitées *via* le logiciel de traitement d'images ImageJ.

III.2. Mesure de la taille et de l'indice de polydispersité

Le diamètre hydrodynamique moyen (Z), la distribution en taille et l'indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules ont été déterminés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à l'aide d'un appareil Zetasizer - Nano ZS, Malvern Instrument. L'appareil est équipé d'un laser He-Ne qui émet une lumière monochromatique de longueur d'onde 633 nm. La lumière diffusée est récupérée et analysée à un angle de 173°. A l'aide de différents traitements mathématiques du signal effectués par le logiciel Zetasizer Software, le diamètre hydrodynamique Z et le PDI sont obtenus. Pour chaque échantillon analysé, les valeurs obtenues correspondent à la moyenne de 3 mesures consécutives. Pour effectuer une mesure, 1 mL de solution de nanoparticules est placé dans une macro cuve de mesure en polystyrène. Les nanoparticules sont diluées dans un tampon Hepes, préalablement filtré, à une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$. Les mesures sont effectuées à 37°C.

III.3. Mesure de la charge

Le potentiel zêta des nanoparticules a été déterminé par électrophorèse laser Doppler (ELS) à l'aide de l'appareil Zetasizer - Nano ZS, Malvern Instrument. A l'aide de différents traitements mathématiques du signal effectués par le logiciel Zetasizer Software, le potentiel zêta et donc la charge sont obtenus. Pour chaque échantillon analysé, le potentiel zêta correspond à la moyenne de 3 mesures consécutives. Pour effectuer la mesure, 1 mL de suspension de nanoparticules est placé dans une cuve à capillaire replié en polystyrène. Les nanoparticules sont diluées à 100 $\mu\text{g/mL}$ dans un tampon Hepes, préalablement filtré. Les mesures sont effectuées à 37°C.

III.4. Répartition de l'AMG dans les nanoparticules

La détermination de la quantité d'AMG accessible de la surface des NPe s'effectue par un dosage BCA comme décrit paragraphe II.1.2.

Le dosage de la quantité d'AMG en surface des NPe s'effectue donc par mélange de 50 μ L de NPe (ou NP pour servir de témoin) à 75 mg/mL avec 1 mL de la solution de réactifs du kit BCA. Les échantillons sont incubés en même temps que ceux de la gamme étalon effectuée sur l'AMG. L'absorbance de ces échantillons est ensuite mesurée à 562 nm et la quantité d'AMG est déterminée à partir de la gamme étalon.

IV. Préparation et caractérisation des hydrogels

IV.1. Protocole de préparation des hydrogels

La formation des hydrogels à base de fibrine s'effectue par mélange des différents précurseurs préparés en tampon Hepes, aux concentrations présentées dans le tableau ci-dessous :

	Concentration initiale	Concentration finale
Sels concentrés	NaCl 3 M et CaCl ₂ 400 mM	NaCl 150 mM et CaCl ₂ 20 mM
Amidon de blé	4% (m/v)	2% (m/v)
HFb	50 mg/mL	18 mg/mL
Glucose	400 mg/mL	20 mg/mL
AMG	3,3 mg/mL	35 μ g/mL
NP et NPe	100 mg/mL	2 mg/mL
HTb	20 U/mL	0,72 U/mL

Tableau 3 : Concentrations initiales et finales des précurseurs utilisés pour la synthèse des différentes formulations d'hydrogels.

Ces précurseurs sont introduits successivement dans l'ordre indiqué dans ce tableau. Préalablement, la solution d'amidon est chauffée à 90°C pendant 2h ; le fibrinogène (HFb) et la thrombine (HTb) sont

incubés à 37°C pendant 15 min ; la solution d'AMG est préparée extemporanément ; les nanoparticules sont décongelées à température ambiante.

Après ajout de la solution d'amidon, le mélange est laissé à refroidir pendant quelques minutes pour éviter l'agrégation des protéines introduites par la suite. Après introduction de la thrombine, la solution de précurseurs est déposée sur une pastille de Téflon® et est mise à polymériser pendant 1 h à 37 °C.

Différents volumes de gels, et donc différents volumes de précurseurs, ont été utilisés lors de ces travaux. Les volumes utilisés seront détaillés et associés à une méthode d'analyse.

IV.2. Détermination des propriétés viscoélastiques

L'étude des propriétés viscoélastiques a été réalisée avec un rhéomètre Anton Paar MCR301, équipé d'un module de géométrie plan-plan de 50 mm. La déformation est réglée à 1% et la fréquence à 1 Hz. La température est fixée à 37°C. Afin d'éviter l'évaporation, de l'huile est ajoutée dans la cupule de mesure.

Différentes formulations de matériaux ont été étudiées : des hydrogels de fibrine, fibrine-amidon, fibrine-amidon-AMG et fibrine-amidon-NPe. Des matériaux d'environ 1 mL ont été préparés et mis à polymériser sous le module du rhéomètre. Pour cette étude, les concentrations finales en AMG et NPe sont respectivement de 2 µg/mL et 1 mg/mL. Les volumes utilisés de précurseurs sont les suivants ($V_{\text{total}} = 1 \text{ mL}$) :

	Fibrine	Fibrine-amidon	Fibrine-amidon-AMG	Fibrine-amidon-NPe
Tampon Hepes	554 µL	54 µL	53,4 µL	44 µL
Sels concentrés	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Amidon de blé	/	500 µL	500 µL	500 µL
HFb	360 µL	360 µL	360 µL	360 µL
AMG	/	/	0,6 µL	/
NPe	/	/	/	10 µL
HTb	36 µL	36 µL	36 µL	36 µL

Tableau 4 : Protocole de préparation des hydrogels à base de fibrine, d'amidon et d'AMG libre ou encapsulée pour l'étude par rhéologie.

IV.3. Structure interne de l'hydrogel

L'étude de la structure interne des hydrogels s'effectue par microscopie confocale grâce à un marquage post-synthèse du réseau de fibrine par l'AlexaFluor568. Pour cela, les matériaux sont rincés 3 fois dans 1 mL de solution borate 50 mM pH 8,3 et placés sous agitation orbitale pendant 1h à 37°C. Les matériaux sont ensuite placés dans 500 µL de solution d'AlexaFluor568 à 60 µg/mL et mis sous agitation sur la nuit à 37°C à l'abri de la lumière. Les gels sont ensuite rincés dans 1 mL de solution borate 50 mM pH 8,3 pendant 1h, sous agitation à 37°C puis dans 2 bains successifs d'1 mL de tampon Hepes afin d'éliminer l'AlexaFluor568 non greffée. L'observation des matériaux a été réalisée avec un microscope confocal inversé à balayage laser LSM 710, Zeiss. Les images obtenues sont ensuite exploitées *via* le logiciel ImageJ.

Différentes formulations de matériaux ont été étudiées : des hydrogels de fibrine et fibrine-amidon. Des matériaux de 200 µL ont été préparés. Les volumes de précurseurs présentés dans le tableau ci-dessous sont donnés pour la préparation de 3 matériaux ($V_{\text{total}} = 700 \mu\text{L}$) :

	Fibrine	Fibrine-amidon
Tampon Hepes	387,8 µL	37,8 µL
Sels concentrés	35 µL	35 µL
Amidon	/	350 µL
HFb	252 µL	252 µL
HTb	25,2 µL	25,2 µL

Tableau 5 : Protocole de préparation des hydrogels à base de fibrine et d'amidon pour l'étude par microscopie confocale.

IV.4. Fuite des précurseurs et produit d'hydrolyse de l'amidon

La diffusion du glucose, de l'AMG et des NPe hors d'hydrogels de fibrine, fibrine-amidon 2% ou fibrine-amidon 4% a été étudiée. De l'AMG marquée à l'AlexaFluor568 (AMG*) a été utilisée pour l'étude de la diffusion de l'AMG comme décrit au paragraphe II.1.2.a. Des NPe marquées au 9,10-diphénylanthracène (NPe^{dip}) ont été utilisées. Pour cela, le diphénylanthracène a été ajouté à 0,125% (m/v) à la solution de PLGA lors de la synthèse des nanoparticules. La suite du protocole de préparation des nanoparticules est identique à celui décrit au paragraphe II.1.

Des hydrogels de 200 μL des différentes formulations ont été préparés. Les volumes de précurseurs présentés dans le **Tableau 6**, le **Tableau 7** et le **Tableau 8** sont donnés pour la préparation de 3 matériaux ($V_{\text{total}} = 700 \mu\text{L}$).

A l'issue de la polymérisation, des matériaux de chaque formulation sont incubés dans 2 mL d'une solution de trypsine à 1 mg/mL préparée dans un tampon d'Hepes pendant 1h à 37°C. Ces matériaux permettent de déterminer la quantité maximale de glucose, d'AMG* ou de NPe^{diφ} qui peut être relargué hors de chaque hydrogel, correspondant au 100% de glucose, d'AMG* ou de NPe^{diφ} relargué. Une deuxième série de matériaux de chaque formulation est incubé dans 2 mL de solution d'Hepes 10 mM pH 7,4 à 37°C. A des temps prédéterminés, 200 μL de surnageant sont prélevés et une analyse de la quantité de glucose, d'AMG* ou de NPe^{diφ} relargué est effectuée.

- **Fuite du glucose :**

	Fibrine-glucose	Fibrine - amidon 2% - glucose	Fibrine - amidon 4% - glucose
Tampon Hepes	352,8 μL	2,8 μL	2,8 μL
Sels concentrés	35 μL	35 μL	35 μL
Amidon	/	350 μL à 4% (m/v)	350 μL à 8% (m/v)
HFb	252 μL	252 μL	252 μL
Glucose	35 μL	35 μL	35 μL
HTb	25,2 μL	25,2 μL	25,2 μL

Tableau 6 : Protocole de préparation des hydrogels à base de fibrine, d'amidon et de glucose pour l'étude de la diffusion du glucose au sein de ces hydrogels.

Le glucose relargué est quantifié à l'aide du kit glucose décrit au paragraphe II.1.2.b.

- Fuite de l'AMG* :

	Fibrine-AMG*	Fibrine - amidon 2% - AMG*	Fibrine - amidon 4% - AMG*
Tampon Hepes	380,4 µL	30,4 µL	30,4 µL
Sels concentrés	35 µL	35 µL	35 µL
Amidon	/	350 µL à 4% (m/v)	350 µL à 8% (m/v)
HFb	252 µL	252 µL	252 µL
AMG*	7,4 µL	7,4 µL	7,4 µL
HTb	25,2 µL	25,2 µL	25,2 µL

Tableau 7 : Protocole de préparation des hydrogels à base de fibrine, d'amidon et d'AMG* pour l'étude de la diffusion de l'AMG au sein de ces hydrogels.

L'AMG* relarguée est quantifiée par mesure de l'intensité d'émission de fluorescence à 600 nm ($\lambda_{exc} = 575$ nm).

- Fuite des NPe^{diφ} :

	Fibrine- NPe ^{diφ}	Fibrine - amidon 2% - NPe ^{diφ}	Fibrine - amidon 4% - NPe ^{diφ}
Tampon Hepes	373,8 µL	23,8 µL	23,8 µL
Sels concentrés	35 µL	35 µL	35 µL
Amidon	/	350 µL à 4% (m/v)	350 µL à 8% (m/v)
HFb	252 µL	252 µL	252 µL
NPe ^{diφ}	14 µL	14 µL	14 µL
HTb	25,2 µL	25,2 µL	25,2 µL

Tableau 8 : Protocole de préparation des hydrogels à base de fibrine, d'amidon et de NPe^{diφ} pour l'étude de la diffusion des NPe au sein de ces hydrogels.

La quantité de NPe^{diφ} libérées est déterminée par mesure de l'intensité d'émission de fluorescence à 411 nm ($\lambda_{exc} = 376$ nm).

V. Stabilité des nanoparticules en solution et en hydrogels

V.1. Suivi du comportement en solution

L'étude de la stabilité en solution a été effectuée sur une solution de nanoparticules à 2 mg/mL préparée dans un tampon Hepes contenant de l'azide à 1% (m/v). Cette solution est mise sous agitation à 37°C pendant 2 mois. L'analyse de la taille, de l'organisation et de la morphologie des nanoparticules a été effectuée à différents temps (t = 0, 7, 14, 21, 28 et 52 jours) par prélèvement d'une partie de cette solution.

V.1.1. Evolution de la morphologie

L'étude de l'évolution morphologique des nanoparticules a été effectuée sur une solution de nanoparticules diluées à 1 µg/mL dans l'eau préalablement dialysées contre de l'eau. L'observation au MEB a été effectuée comme décrit au paragraphe III.1.

V.1.2. Analyse de la taille des nanoparticules

Le suivi de la taille des nanoparticules s'effectue par DLS sur une solution de nanoparticules diluées à 100 µg/mL comme décrit au paragraphe III.2.

V.1.3. Répartition des nanoparticules en solution

L'évolution de l'organisation des nanoparticules en solution a été effectuée par microscopie confocale. Des nanoparticules (NP et NPe) marquées au 9,10-diphénylanthracène (respectivement NP^{diφ} et NPe^{diφ}) ont été utilisées comme décrit au paragraphe IV.4. 10 µL de solution de NP^{diφ} et de NPe^{diφ} ont été déposés sur une lamelle de verre puis observés. Une diode à 405 nm a été utilisée pour observer les NP^{diφ} et les NPe^{diφ}. L'objectif est un objectif à immersion et le grossissement utilisé est de x400. Les images obtenues sont ensuite exploitées *via* le logiciel de traitement d'images ImageJ.

V.2. Suivi du comportement au sein d'hydrogels

L'étude de la stabilité en hydrogel a été effectuée sur des nanoparticules (NPs, correspondant soit à des NP soit à des NPe) contenues dans des hydrogels. Différentes formulations de matériaux ont été préparées : des hydrogels de fibrine, fibrine-amidon, fibrine-NPs et fibrine-amidon-NPs. Des matériaux de 200 μL ont été préparés et les volumes de précurseurs présentés dans le tableau ci-dessous sont donnés pour la préparation de 3 matériaux ($V_{\text{total}} = 700 \mu\text{L}$) :

	Fibrine	Fibrine-amidon	Fibrine-NPs	Fibrine-amidon-NPs
Tampon Hepes	387,8 μL	37,8 μL	373,8 μL	23,8 μL
Sels concentrés	35 μL	35 μL	35 μL	35 μL
Amidon	/	350 μL	/	350 μL
HFb	252 μL	252 μL	252 μL	252 μL
Nanoparticules (NPs)	/	/	14 μL	14 μL
HTb	25,2 μL	25,2 μL	25,2 μL	25,2 μL

Tableau 9 : Protocole de préparation des hydrogels à base de fibrine, d'amidon et de nanoparticules pour l'étude de la stabilité des nanoparticules en hydrogel.

Les matériaux obtenus sont placés dans 2 mL d'une solution d'Hepes 10 mM pH 7,4 contenant 150 mM de NaCl et 20 mM de CaCl_2 .

V.2.1. Répartition des nanoparticules au sein d'hydrogels

Pour effectuer la détermination de l'organisation des nanoparticules en hydrogel, des nanoparticules marquées ($\text{NP}^{\text{di}\phi}$ ou $\text{NPe}^{\text{di}\phi}$) ont été utilisées, et le réseau de fibrine est marqué post-synthèse avec de l'AlexaFluor568 comme décrit respectivement aux paragraphes IV.4 et IV.3. Les matériaux sont ensuite observés au microscope confocal. L'observation du réseau de fibrine s'effectue avec un laser DPSS à 561 nm et une diode à 405 nm a été utilisée pour observer les $\text{NP}^{\text{di}\phi}$ et les $\text{NPe}^{\text{di}\phi}$.

V.2.2. Suivi de la morphologie des nanoparticules contenues dans les hydrogels

L'évolution de la morphologie des nanoparticules contenues dans des hydrogels a été effectuée à partir d'hydrogels de fibrine-NPe et fibrine-amidon-NPe. L'observation au MEB a nécessité l'élimination des sels présents. Les matériaux sont préalablement placés à trois reprises dans 1 mL d'eau et mis sous agitation orbitale pendant 1h. A l'issue de 3 étapes de rinçage, les matériaux sont placés dans une solution de trypsine à 500 µg/mL préparée dans l'eau, puis incubés à 37°C pendant 3h. Une fois le matériau dissout, les échantillons sont déposés sur la pastille de carbone puis métallisés comme décrit au paragraphe III.3.

VI. Production de glucose par l'AMG libre ou encapsulée

VI.1. Influence de différents paramètres expérimentaux sur l'activité de l'AMG

VI.1.1. Influence de la sonication

Pour étudier l'influence des étapes de sonication, effectuées lors de la préparation des nanoparticules, sur l'activité de l'AMG, l'AMG a été soumise à différentes étapes de sonication. Pour cela, 2,1mL d'AMG à 600 µg/mL ont été préparés dans un tampon Hepes. Cette solution d'AMG a soit subi une étape de sonication de 3 fois 10s (sonication 1) soit deux étapes de sonication (sonication 2). L'activité de l'AMG soumise à sonication a ensuite été déterminée comme décrit précédemment au paragraphe II.1.2.b.

VI.1.2. Mesure de l'activité résiduelle de l'AMG à 37°C

La mesure de l'activité résiduelle de l'AMG a été effectuée par incubation d'une solution d'AMG à 37°C. Pour cela, une solution d'AMG à 600 µg/mL a été préparée dans un tampon Hepes puis incubée à 37°C pendant 28 jours. A des temps prédéterminés (t = 0, 3, 6, 9 et 12 min), l'activité de l'AMG a

été déterminée comme décrit au paragraphe II.1.2.b. Cette activité est ensuite exprimée en pourcentage par rapport à l'activité déterminée à $t = 0$ min.

VI.2. Suivi de la production de glucose par l'AMG libre ou encapsulée en solution

Le suivi de la production de glucose en solution s'effectue à partir d'une solution d'amidon à 2% (m/v) obtenue par dilution d'une solution d'amidon à 4% (m/v) dans une solution d'Hepes 10 mM pH 7,4. A cette solution d'amidon, une solution de nanoparticules (NP et NPe) à 2 mg/mL ou une solution d'AMG à 35 ou 1,75 $\mu\text{g/mL}$ a été ajoutée (respectivement notées AMG 1X et AMG 0.05X). Ces différentes solutions sont incubées à 37°C pendant 28 jours. A différents temps ($t = 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35, 39, 42, 49$ et 52 jours), la quantité de glucose produite a été déterminée comme décrit au paragraphe II.1.2.b.

VI.3. Suivi de l'activité de l'AMG libre ou encapsulée au sein d'hydrogels à base de fibrine

Différentes formulations d'hydrogels ont été étudiées : des hydrogels de fibrine, fibrine-amidon, fibrine-amidon-NP, fibrine-amidon-AMG 1X, fibrine-amidon-AMG 0.05X et fibrine-amidon-NPe. Des matériaux de 200 μL ont été préparés. Les volumes de précurseurs présentés dans le tableau ci-dessous sont donnés pour la préparation de 3 matériaux ($V_{\text{total}} = 700 \mu\text{L}$) :

	Fibrine	Fibrine-amidon	Fibrine-amidon-NP	Fibrine-amidon-NPe	Fibrine-amidon-AMG 1X	Fibrine-amidon-AMG 0.05X
Hepes	166,2 µL	16,2 µL	10,2 µL	10,2 µL	13,2 µL	13,2 µL
Sels	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
Amidon	/	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
HFb	108 µL	108 µL	108 µL	108 µL	108 µL	108 µL
AMG	/	/	/	/	3,2 µL à 3,3 mg/mL	3,2 µL à 0,17 mg/mL
NP	/	/	6 µL	/	/	/
NPe	/	/	/	6 µL	/	/
HTb	10,8 µL	10,8 µL	10,8 µL	10,8 µL	10,8 µL	10,8 µL

Tableau 10 : Protocole de préparation des hydrogels à base de fibrine, d'amidon, d'AMG et de nanoparticules (NP et NPe) pour l'étude de la production de glucose en hydrogels.

Ces différents matériaux sont placés dans 2 mL de tampon Hepes contenant de l'azide à 1% (m/v), et des sels de NaCl 150 mM et CaCl₂ 20 mM, puis incubés à 37°C pour une durée de 28 jours. A des temps prédéterminés (t = 1, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 et 28 jours), 200 µL (correspondant à un prélèvement de 10% du volume) ou 2 mL (correspondant à un prélèvement total) de surnageant sont prélevés et remplacés par de la solution fraîche. La détermination de la quantité de glucose produite s'effectue à l'aide du kit glucose, comme décrit au paragraphe II.1.2.b.

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Préambule

Maitriser l'encapsulation de principes actifs et leur délivrance représente un double challenge qu'il est essentiel de relever en pharmacologie, mais aussi en science des biomatériaux, en particulier dans le cadre du développement de dispositifs composites proactifs et dynamiques. Pour assurer le contrôle de la délivrance d'un principe actif, le développement de systèmes de confinement par encapsulation au sein de particules peut alors être envisagé. Outre la nécessité d'avoir des caractéristiques essentielles, telles que la biocompatibilité et la biodégradation, il est également nécessaire de moduler la taille de ces particules. En effet ces particules doivent être assez petites pour ne pas modifier la fonctionnalité et les propriétés du dispositif, si tel n'est pas l'objectif de leur utilisation ; mais elles doivent également permettre une encapsulation efficace et en quantité suffisante pour servir de réservoir et de système de délivrance du principe actif.

Récemment, un projet de recherche dédié au développement d'un biomatériau composite, composé d'un hydrogel de fibrine et de particules de corail, a été développé afin d'améliorer post-implantation la survie de cellules souches mésenchymateuses humaines (projet de recherche financé par l'ANR et accompagné en maturation par la SATT IDF-Innov). Dans le cadre de ce projet, il est crucial de maitriser l'apport de glucose dans l'espace et dans le temps, par hydrolyse contrôlée d'amidon, biopolymère de glucose, au sein de l'hydrogel. La production locale du glucose dans le biomatériau s'effectue par hydrolyse de l'amidon *via* l'amyloglucosidase (AMG), une enzyme permettant la production de glucose à partir de l'amidon. La preuve de concept de la fonctionnalité de ce biomatériau sur la survie des cellules souches mésenchymateuses humaines a été établie *in vitro* et *in vivo*. Cependant, il a été mis en avant que contrôler l'action de l'AMG au sein de ce matériau devenait une nécessité. En effet, il est apparu nécessaire de maitriser différents paramètres tels que la fuite de cette enzyme en dehors de l'hydrogel ou encore la perte d'activité de l'AMG suite à son action prolongée. Le non-contrôle de ces différents paramètres pourrait conduire à une perte significative de l'action de l'AMG, voire à son inaction totale au sein du dispositif. Contrôler l'activité catalytique de l'AMG est donc un challenge qu'il est nécessaire de relever dans le cadre de ce projet de recherche.

Pour maitriser l'action de l'AMG dans l'espace et dans le temps, cette enzyme a été encapsulée dans des nanoparticules polymériques. Ces nanoparticules doivent servir de réservoir d'AMG mais également de coque protectrice de l'activité de cette enzyme. Le choix du polymère s'est porté sur l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), un copolymère biodégradable et biocompatible d'acide

polylactique (PLA) et d'acide polyglycolique (PGA), dont les propriétés physico-chimiques peuvent être moduler par modification du ratio PLA/PGA.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, la maîtrise de l'action de l'AMG a été conduite en deux étapes. La première a consisté à développer ce système de délivrance de l'AMG, basé sur des nanoparticules de PLGA. Pour encapsuler cette enzyme dans ces nanoparticules, une technique de double émulsion a été utilisée, avec un rendement de synthèse et une efficacité d'encapsulation associés. Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules produites par le protocole de double émulsion, telles que la taille et la charge, ont été déterminées et l'influence de la modification de paramètres expérimentaux sur ces propriétés a été étudiée. De plus, le protocole de synthèse utilisé a ensuite été optimisé afin de produire des nanoparticules stériles qui pourront être incluses au sein de l'hydrogel contenant les cellules souches mésenchymateuses et implanté *in vivo*. La deuxième partie a eu pour objectif de mieux comprendre l'hydrogel de fibrine contenant de l'amidon, d'un point de vue de ses propriétés viscoélastiques et de sa structure interne. Le comportement de l'AMG encapsulée dans les nanoparticules de PLGA a été étudié en solution et au sein d'hydrogels, permettant par ailleurs de comparer l'action de l'AMG sous forme libre et à celle sous forme encapsulée.

I. Développement des nanoparticules

La biodisponibilité de l'amyloglucosidase (AMG) est un paramètre important à maîtriser pour contrôler la production de glucose au sein d'un biomatériau composite de type hydrogel, à base de fibrine et d'amidon. Des nanoparticules d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) contenant de l'AMG ont ainsi été développées pour permettre de contrôler l'action de l'AMG au sein de cet hydrogel. Le PLGA a été choisi pour l'encapsulation de l'AMG car c'est un copolymère de PLA et PGA biodégradable et biocompatible, approuvé par la FDA. De plus, le PLGA possédant un ratio 50/50 (50% de PLA et 50% de PGA) a été utilisé car il présente le temps de dégradation le plus rapide par rapport aux autres PLGA (environ 2 mois²⁰⁴). L'encapsulation de l'AMG dans des nanoparticules de PLGA a été réalisée par une technique de double émulsion.

I.1. Synthèse des nanoparticules

L'encapsulation d'une molécule hydrophile peut se faire dans différents systèmes nanoparticulaires. Dans le cadre de cette étude, l'encapsulation de l'AMG a été effectuée par la production de nanoparticules de PLGA à partir d'une technique de double émulsion : water-in-oil-in-water.

I.1.1. Préparation des nanoparticules par la technique de double émulsion

La double émulsion (water-in-oil-in-water) est une technique qui permet la synthèse de nano et microparticules à partir d'un large choix de polymères. Cette technique permet l'encapsulation de molécules hydrophiles et hydrophobes. En effet, les particules issues d'une synthèse par double émulsion permettent la formation d'un système cœur-coquille. Ce système contient un cœur liquide ou semi-liquide aqueux pouvant contenir une molécule hydrophile et une coque de polymère permettant l'incorporation d'une molécule hydrophobe. Dans cette étude, la molécule à encapsuler dans des nanoparticules est l'AMG, une enzyme soluble dans des solutions aqueuses, et les nanoparticules sont synthétisées à partir de PLGA 50/50.

Le protocole de synthèse des nanoparticules de PLGA contenant de l'AMG est basé sur le protocole d'encapsulation de biomolécules décrit par *Solbrig et Saltzman, 2006*²⁰⁵.

a. Dispersion de l'AMG en solution organique

La synthèse des nanoparticules débute par la dissolution du PLGA (100 mg ; 2 mL) dans du dichlorométhane (DCM) pendant 1h à température ambiante. Le DCM a été choisi car c'est un solvant organique relativement non miscible à l'eau (2 g/100 mL à 20°C). Il est principalement utilisé dans l'industrie chimique, mais il est également utilisé comme solvant d'extraction dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique ou encore dans le processus de fabrication de prothèses dentaires (Sources Ineris et Organisation Mondiale de la Santé). Une solution aqueuse d'AMG (1,26 mg ; 100 µL préparés en solution tampon d'Hepes 10 mM, pH 7,4 (tampon Hepes)) est ensuite ajoutée à la phase organique. La solution d'AMG et la solution de PLGA sont émulsifiées par sonication de 3 fois 10 s (amplitude 30%) correspondant à 3 fois 100 Joules (sonication 1), et conduisant à l'obtention de la première émulsion eau/huile. Cette émulsion permet la formation de gouttelettes aqueuses d'AMG entourées par les chaînes de PLGA dispersées dans du DCM (**Figure 44**).

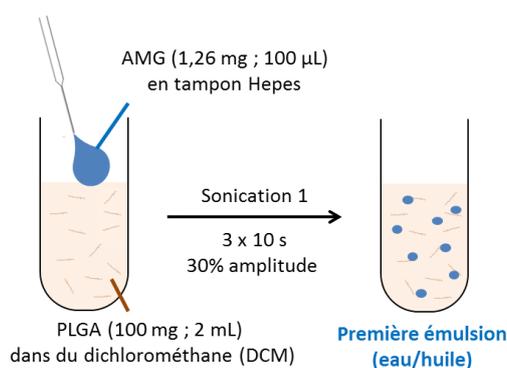


Figure 44 : Schéma présentant la première étape du protocole de synthèse des nanoparticules de PLGA par la technique de double émulsion : dispersion de l'AMG sous forme de gouttelettes en solution organique.

b. Dispersion de gouttelettes de PLGA contenant l'AMG dans une solution aqueuse

Afin de stabiliser les gouttelettes d'AMG et former des nanoparticules dispersées dans une solution aqueuse, un agent émulsifiant est utilisé. Pour ce faire, une solution d'alcool polyvinylique (PVA ; 5% (m/v) ; 4 mL préparés en tampon Hepes) est ajoutée à la première émulsion. Une deuxième sonication de 3 fois 10 s (amplitude 30%) correspondant à 3 fois 100 Joules (sonication 2) est effectuée et la deuxième émulsion eau/huile/eau est obtenue. Cette étape de sonication permet la formation de gouttelettes de PLGA contenant l'AMG, dispersées dans une solution aqueuse (**Figure 45**).

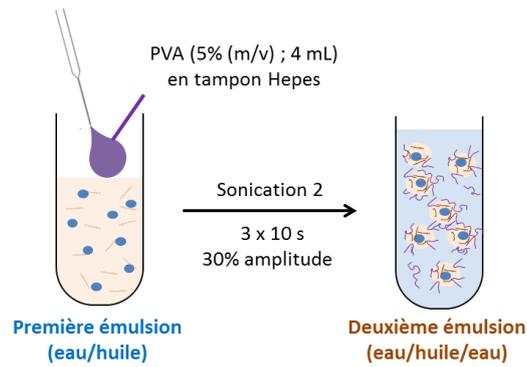


Figure 45 : Schéma présentant la deuxième étape du protocole de synthèse des nanoparticules de PLGA contenant l'AMG par la technique de double émulsion : dispersion de gouttelettes de PLGA contenant l'AMG dans une solution aqueuse.

c. Rigidification de la coque de PLGA

La deuxième émulsion est transférée dans un grand volume de PVA dilué (0,3% (m/v) ; 100 mL préparés en tampon Hepes) et mis sous agitation pendant 3h. Cette étape permet de stabiliser les nanoparticules par évaporation du DCM conduisant ainsi au durcissement de la coque de PLGA. Trois étapes de lavage successives sont ensuite effectuées afin d'éliminer tous les réactifs n'ayant pas contribué à la formation des nanoparticules (PLGA, AMG, PVA). Pour cela, les nanoparticules sont centrifugées à 12000 rpm pendant 8 min. Entre chaque étape de centrifugation, les nanoparticules sont resuspendues dans de l'eau (50 mL). Les nanoparticules obtenues sont ensuite lyophilisées et stockées à -20°C pendant 2 à 3 mois. Des nanoparticules témoins, appelées NP, ne contenant pas d'AMG (la solution aqueuse d'AMG est remplacée par le même volume de tampon Hepes) ont également été produites servant ainsi de nanoparticules contrôle lors des différentes expériences effectuées par la suite (**Figure 46**).

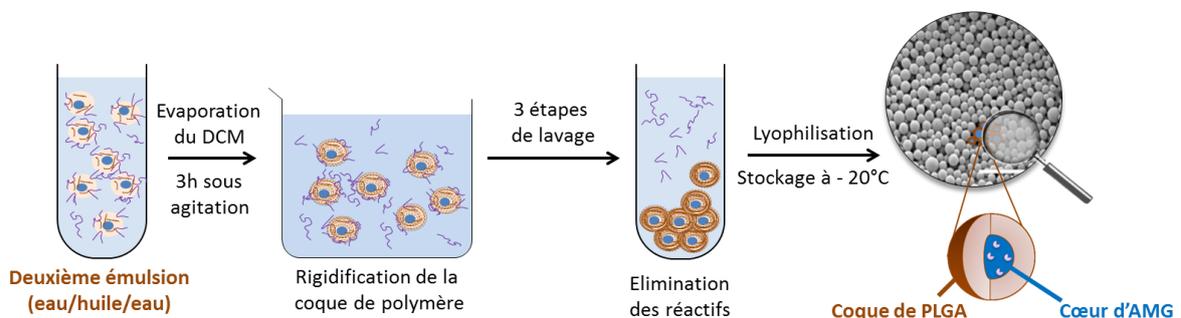


Figure 46 : Schéma présentant la dernière étape du protocole de synthèse des nanoparticules de PLGA contenant l'AMG par la technique de double émulsion : rigidification de la coque de PLGA suite à l'évaporation du DCM et élimination des réactifs en excès.

I.1.2. Rendement de synthèse

La détermination de la quantité de nanoparticules produite par le protocole de synthèse va permettre de calculer le rendement de synthèse. A partir des quantités initialement introduites en PLGA et en AMG ainsi que la quantité de nanoparticules obtenues après lyophilisation, le rendement de la synthèse peut-être calculé de la manière suivante et sera exprimé en pourcentage :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{quantité de nanoparticules}}{\text{quantité de PLGA introduite} + \text{quantité d'AMG introduite}} \times 100$$

Les rendements obtenus pour 3 synthèses différentes de nanoparticules vides (NP) et de nanoparticules où l'AMG a été encapsulée (NPe) sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	NP			NPe		
	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Quantité de PLGA introduite (mg)	98,8	100,1	99,1	99,8	100,1	99,5
Quantité d'AMG introduite (mg)	0	0	0	1,26	1,26	1,26
Quantité de nanoparticules obtenue (mg)	48,1	49,3	42,9	52,9	52,2	50,6
Rendement (%)	48,6	49,3	43,3	52,3	51,5	50,2
Rendement moyen (%)	47,1 ± 3,3			51,3 ± 1,1		

Tableau 11 : Rendements de synthèse des nanoparticules de PLGA obtenues par la technique de double émulsion. Le rendement moyen correspond à la moyenne des trois valeurs obtenues à partir des trois lots de nanoparticules issues de trois synthèses différentes avec ou sans AMG.

Le protocole de synthèse décrit précédemment, basé sur une technique de double émulsion (water-in-oil-in-water), a permis d'obtenir des nanoparticules de PLGA avec un rendement moyen de 47,1 ± 3,3% pour les NP et de 51,3 ± 1,1% pour les NPe. Ces résultats indiquent qu'il y a une perte d'environ 50% des constituants initialement introduits au cours de la synthèse. Par la suite, il sera donc intéressant de savoir si ce rendement peut être amélioré par modification des paramètres du protocole de synthèse.

I.1.3. Détermination de la quantité d'AMG encapsulée dans les nanoparticules de PLGA

Pour connaître l'efficacité de l'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules, il est important de déterminer la quantité d'AMG contenue dans les nanoparticules produites. Le taux d'encapsulation de l'AMG (EE pour Encapsulation Efficiency) est défini comme étant la quantité d'AMG contenue dans les nanoparticules après synthèse rapportée à la quantité totale d'AMG introduite au départ. Il est exprimé en pourcentage et est calculé de la manière suivante :

$$EE (\%) = \frac{\text{quantité d'AMG encapsulée}}{\text{quantité totale d'AMG introduite}} \times 100$$

a. Détermination du taux d'encapsulation par méthode directe

La quantité d'AMG encapsulée dans les nanoparticules peut être déterminée directement par dissolution des NPe suivie d'un dosage protéique. Pour cela, 500 µg de nanoparticules sont incubés dans 250 µL de NaOH 1 M pendant 1h. La dissolution des nanoparticules est visible à l'œil nu, la solution passant de opaque à limpide. Le pH de la solution est ensuite ramené à pH 7,4 par ajout de 250 µL de HCl 1 M.

Si la totalité de l'AMG introduite lors de la synthèse est encapsulée dans les NPe, 1,26 mg d'AMG (quantité d'AMG introduite lors de la synthèse des NPe) devraient être contenus dans 50 mg de NPe (rendement de synthèse de 50% environ), correspondant à 12,6 µg d'AMG contenus dans 500 µg de NPe. En tenant compte du volume de NaOH et HCl ajouté (500µL au total), la concentration d'AMG serait alors de 6,3 µg/mL (correspondant à $6,4 \times 10^{-5}$ µmol/mL). Cette concentration devrait donc pouvoir être détectée par les techniques classiques de dosage de protéines.

- **Quantification de l'AMG encapsulée par dosages protéiques**

Les techniques de quantification de protéines dans un échantillon habituellement utilisées sont la mesure de l'absorbance à 280 nm et les dosages colorimétriques tels que le dosage BCA. La mesure de l'absorbance à 280 nm et le dosage BCA ont été effectués sur la solution de nanoparticules dissoutes. Aucun signal n'a été obtenu pour les deux techniques, ce qui indiquerait que l'AMG n'a pas été encapsulée dans les nanoparticules ou bien que la quantité d'AMG encapsulée est trop faible pour être détectée.

Le dosage BCA est un test colorimétrique qui est basé sur la réduction par les protéines des ions Cu^{2+} en ions Cu^+ qui, par leur réaction avec l'acide bicinchoninique, conduit à un changement de couleur de l'échantillon mesurable à une longueur de 562 nm. La sensibilité du dosage BCA est de 10 μg dans 50 μL échantillon correspondant à une concentration massique en protéines de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La mesure de l'absorbance à 280 nm permet de déterminer une quantité de protéines en solution, calculée à partir de la loi de Beer-Lambert. Pour une absorbance de 0,1 unité, correspondant à la sensibilité de la technique de mesure de l'absorbance, la concentration molaire obtenue est de $5,6 \times 10^{-7}$ mol/L (coefficient d'extinction molaire de l'AMG à 280 nm : $1,77 \times 10^5$ L/mol/cm) correspondant à une concentration massique de 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (poids moléculaire de l'AMG : 97 kDa).

La sensibilité associée à ces deux techniques n'est donc pas adaptée à la détermination de la quantité d'AMG encapsulée lors de la synthèse des nanoparticules. Une autre technique, plus sensible, est nécessaire pour déterminer le taux d'encapsulation.

- **Quantification de l'AMG encapsulée par fluorescence**

La fluorescence intrinsèque d'une protéine peut être utilisée pour déterminer la quantité de protéines présentes dans un échantillon. La fluorescence intrinsèque des protéines est due à la présence d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) et est sensible à l'environnement dans lequel se trouvent ces acides aminés. En effet, la modification de l'environnement de ces acides aminés peut conduire à un changement du signal d'émission de fluorescence. Cependant, cette technique possède une faible sensibilité (de l'ordre de quelques $\mu\text{mol}/\text{L}$). Afin d'obtenir une meilleure sensibilité, une molécule fluorescente, l'AlexaFluor568 NHS Ester, a été greffée sur les amines primaires de l'AMG (AMG*). Le taux de greffage de l'AlexaFluor568 sur l'AMG obtenu est de 0,33 mol d'AlexaFluor568/mol d'AMG, ce qui veut dire qu'un tiers des molécules d'AMG sont marquées par le fluorophore. Le greffage de molécules d'AlexaFluor568 pourrait induire des modifications structurales de la protéine. Pour cela, il a été vérifié que l'AMG* maintient son activité enzymatique après greffage. Aucune perte d'activité de l'AMG* n'a été observée indiquant que le greffage de l'AlexaFluor568 sur l'AMG n'induit pas de modifications structurales importantes.

Préalablement à la quantification par fluorescence de l'AMG encapsulée, les nanoparticules doivent être dissoutes par ajout de NaOH puis d'HCl. Des spectres d'émission de fluorescence ont donc tout d'abord été effectués sur des solutions d'AMG* à 0,1 mg/mL ayant subi ce même traitement, afin de s'assurer que celui-ci n'affectait pas la fluorescence de l'échantillon. (**Figure 47**).

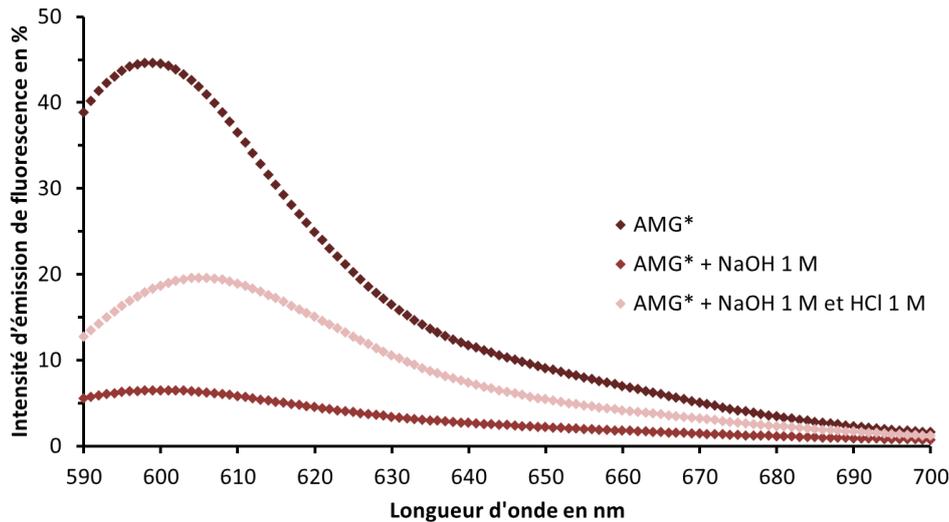


Figure 47 : Spectres d'émission de fluorescence de l'AMG* avant et après traitement chimique. Les spectres d'émission de fluorescence ont été effectués à une longueur d'onde d'excitation de 575 nm sur une solution d'AMG* à 0,1 mg/mL préparée en tampon Hepes, dans une solution de NaOH 1 M ou dans une solution de NaOH 1 M et de HCl 1 M.

Les spectres d'émission de fluorescence obtenus montrent que l'ajout de NaOH provoque une forte diminution de l'intensité de fluorescence de l'AMG* (quenching de fluorescence). Par ailleurs, l'ajout du NaOH et du HCl permet de diminuer cet effet de quenching mais ne permet pas de retrouver l'intensité d'émission de fluorescence de l'AMG* n'ayant subi aucun traitement. De plus, un décalage du spectre d'émission de fluorescence vers les grandes longueurs d'ondes (red shift ou effet bathochrome) est observé lors de l'ajout de NaOH et de HCl. Cette observation permet d'affirmer que l'environnement dans lequel se retrouve l'AlexaFluor568 est modifié. Cette technique ne peut donc pas être utilisée pour quantifier l'AMG encapsulée dans les nanoparticules de PLGA.

b. Détermination du taux d'encapsulation par méthode indirecte

La détermination de la quantité d'AMG encapsulée peut également s'effectuer par une méthode indirecte. Dans ce cas, la quantité d'AMG non encapsulée dans les nanoparticules est mesurée dans les surnageants de centrifugation issus de la synthèse des nanoparticules. Les surnageants sont nommés S1, S2 et S3 et correspondent respectivement à la première, deuxième et troisième étape de centrifugation. Le taux d'encapsulation peut alors être calculé de la manière suivante :

$$EE \text{ indirect } (\%) = \frac{\text{quantité d'AMG introduite} - \text{quantité d'AMG non encapsulée}}{\text{quantité d'AMG introduite}} \times 100$$

Cette quantification peut se faire comme décrit précédemment soit en mesurant l'absorbance à 280 nm, soit par dosage colorimétrique BCA. Cependant si l'on considère que la totalité de l'AMG introduite lors de la synthèse n'est pas encapsulée dans les NPe, alors après la première étape de centrifugation, la concentration en AMG retrouvée dans le surnageant S1 serait de 11,9 µg/mL (1,26 mg d'AMG contenue dans 106 mL de surnageant S1 soit $1,2 \times 10^{-4}$ µmol/mL) soit bien en dessous du seuil de sensibilité de ses 2 méthodes.

De la même manière, la fluorescence intrinsèque de l'AMG ne peut pas être utilisée à cause de sa sensibilité trop faible. En revanche l'utilisation de l'AMG* devrait permettre de quantifier l'AMG non encapsulée dans les nanoparticules.

- **Quantification de l'AMG* encapsulée par fluorescence**

La mesure de l'intensité d'émission de fluorescence liée à l'AlexaFluor568 pour différentes quantités d'AMG* permet d'établir une gamme étalon. Ces mesures de fluorescence sont effectuées à la longueur d'onde maximale d'excitation et à la longueur d'onde maximale d'émission de l'AlexaFluor568, correspondant respectivement à 575 nm et 600 nm (**Figure 48**). Cette gamme étalon permettra de déterminer une quantité d'AMG* présente dans les surnageants S1, S2 et S3 issus des étapes de centrifugation.

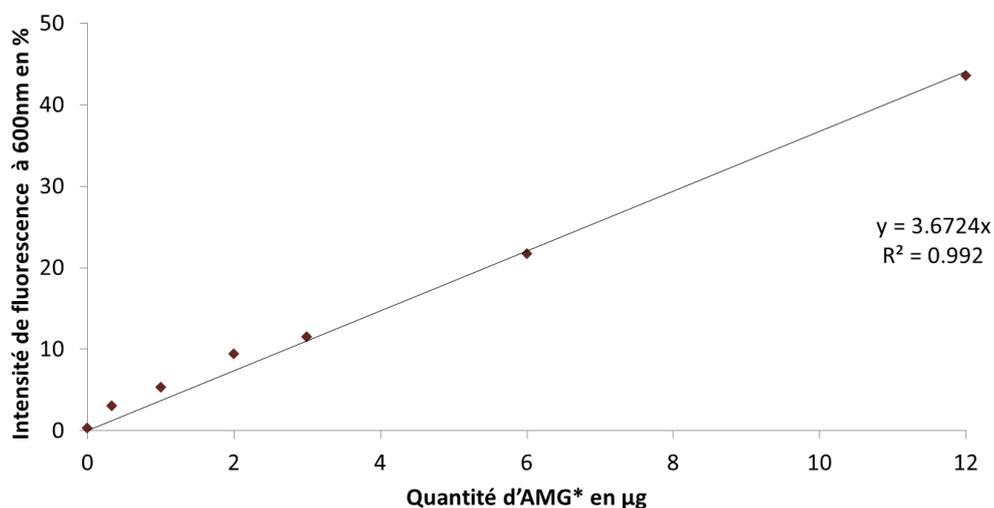


Figure 48 : Gamme étalon d'AMG* établie par mesure de l'intensité de fluorescence. L'intensité de l'émission de fluorescence obtenue à 600 nm est tracée en fonction de la quantité d'AMG* contenue dans la solution échantillon préparée en tampon Hepes. Les valeurs expérimentales ont été ajustées à l'équation d'une droite.

Des mesures de l'intensité de l'émission de fluorescence à 600 nm sur ces différents surnageants ont été effectués dans les mêmes conditions expérimentales que décrites précédemment. Ces valeurs d'intensité d'émission de fluorescence permettent de calculer la quantité d'AMG* présente dans l'échantillon, le pourcentage d'AMG* présent dans le surnageant et donc le taux d'encapsulation. Les différentes valeurs obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	NPe			
	S1	S2	S3	Total des 3 surnageants
Intensité d'émission de fluorescence (%)	12,26	0,686	0,415	13,36
Quantité d'AMG* dans chaque échantillon (µg)	10,0	0,6	0,3	10,9
% d'AMG* dans chaque surnageant	27,8	1,6	0,9	30,3
Taux d'encapsulation (%)	N.D	N.D	N.D	69,7

Tableau 12 : Taux d'encapsulation de l'AMG contenue dans des nanoparticules de PLGA déterminé par mesure de l'intensité d'émission de fluorescence. Valeurs d'intensité d'émission de fluorescence à 600 nm ($\lambda_{exc} = 575$ nm) des différents surnageants (S1, S2 et S3) issus de la synthèse des NPe*. L'intensité d'émission de fluorescence obtenue pour les surnageants issus de la synthèse des NP a été retranchée à celle des NPe*. Le calcul de la quantité d'AMG* a été effectuée à partir de la gamme étalon effectuée sur l'AMG*. Le pourcentage d'AMG* a été calculé par rapport à la quantité initialement introduite pour préparer les NPe*.

Le taux d'encapsulation d'AMG au sein de nanoparticules de PLGA est donc de 69,7%. Cela signifie que 17 µg d'AMG sont contenus dans 1 mg de NPe.

- **Mesure de l'activité de l'AMG non encapsulée**

La quantification de l'AMG encapsulée au sein des nanoparticules peut également s'effectuer indirectement par mesure de l'activité de cette enzyme. En effet, l'AMG est une enzyme capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α -(1,4) de l'amidon par ses extrémités non réductrices conduisant à la formation de glucose. L'activité enzymatique de l'AMG est connue pour ses conditions optimales d'activité (environ 70 U/mg à pH 4,8 et à 60°C). Il a donc fallu dans un premier temps, déterminer l'activité de l'AMG dans nos conditions d'étude (37°C et pH 7,4). Pour cela, 1,26 µg d'AMG a été introduit dans 1 mL de solution d'amidon à 0,5% (m/v), préparé en tampon Hepes et incubé à 37°C. A des temps prédéterminés (t = 0, 3, 6, 9 et 12 min), une solution d'acide

trichloroacétique (TCA) a été ajoutée permettant de stopper la réaction d'hydrolyse de l'amidon par précipitation de l'AMG. L'AMG précipitée et l'amidon résiduel sont éliminés par centrifugation. La quantité de glucose produit est ensuite mesurée à l'aide du kit glucose fourni par Sigma, et la cinétique de production de glucose par l'AMG a été tracée (**Figure 49**).

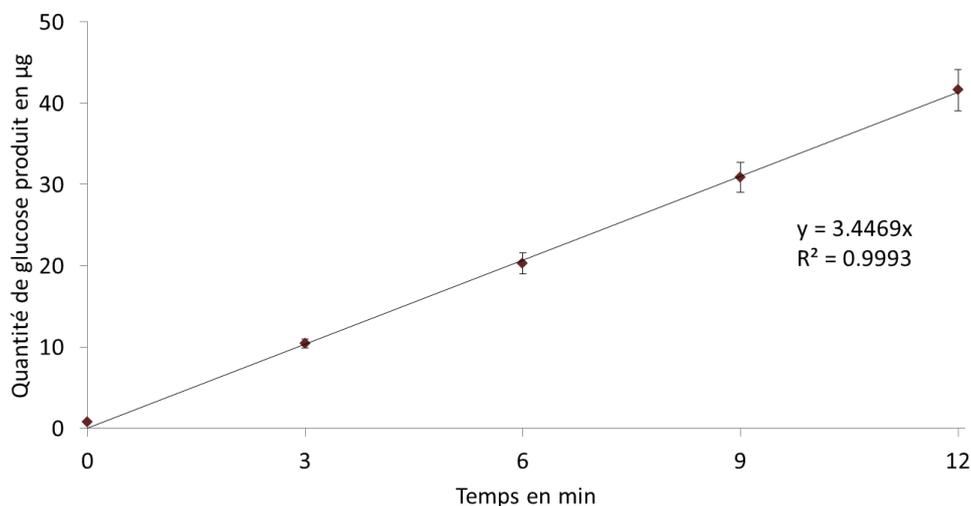
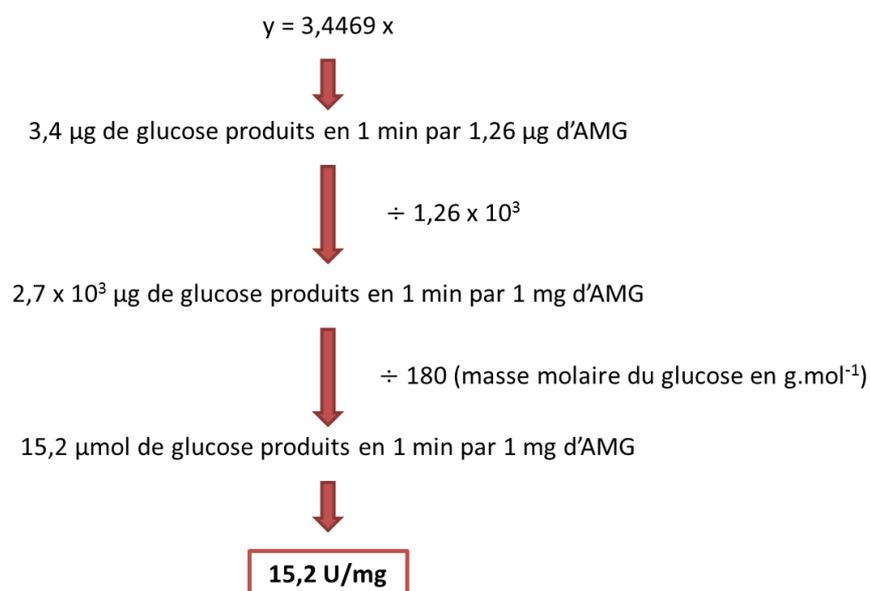


Figure 49 : Cinétique de production de glucose par l'AMG. 1,26 µg d'AMG a été incubé avec 1 mL d'amidon à 0,5% (m/v) préparé dans un tampon Hepes. A t = 0, 3, 6, 9 et 12 min, du TCA a été ajouté pour stopper la réaction. La quantité de glucose produit, déterminée à l'aide d'un kit Sigma, a été tracée en fonction du temps. L'expérience a été effectuée 3 fois. Les valeurs expérimentales ont été ajustées à l'équation d'une droite.

Cette cinétique de production de glucose permet le calcul de l'activité de l'AMG. Ce calcul a été effectué de la manière suivante :



L'activité de l'AMG à 37°C et à pH 7,4 est donc de 15,2 U/mg. Cette activité servira de référence et permettra de déterminer une quantité d'AMG présente dans un échantillon.

La quantité d'AMG non encapsulée dans les nanoparticules a été déterminée par mesure de l'activité de l'AMG contenue dans le surnageant S1 issu de la synthèse des NPe. La mesure d'activité a été effectuée comme décrit précédemment. La cinétique de production de glucose produit par les surnageants S1 pour les NP et NPe a ensuite été tracée (**Figure 50**).

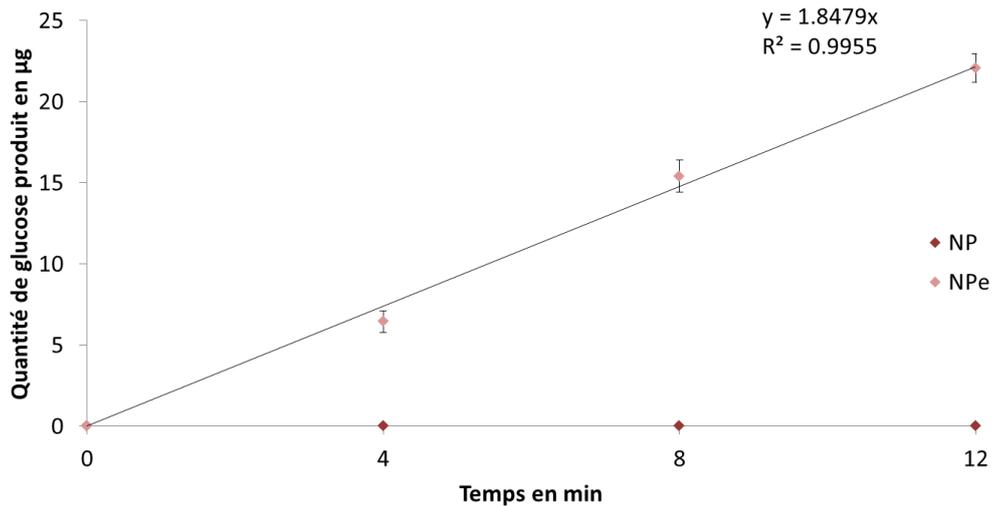


Figure 50 : Cinétique de production du glucose par l'AMG non encapsulée contenue dans les surnageants S1. 200 µL de surnageant S1 issu de la synthèse des NP ou des NPe ont été incubés à 37°C avec de l'amidon à 0,5% (m/v) ($V_{\text{total}} = 1 \text{ mL}$) préparé dans une solution d'Hepes 10 mM, pH 7,4. A $t = 0, 4, 8$ et 12 min, du TCA a été ajouté pour stopper la réaction. La quantité de glucose produit, déterminée à l'aide d'un kit Sigma, a été tracée en fonction du temps. Les valeurs expérimentales obtenues pour les NPe ont été ajustées à l'équation d'une droite. L'expérience a été effectuée en triplicat.

A partir de ces résultats, l'activité du surnageant liée à la présence d'AMG a été calculée comme décrit précédemment. Cette activité permet de revenir à une quantité d'AMG présente dans le surnageant et donc à la quantité d'AMG encapsulée dans les nanoparticules. Les différentes valeurs obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	NPe
Activité (U/mL)	0,051 ± 0,001
Quantité d'AMG dans le surnageant S1 (mg)	0,36 ± 0,01
% d'AMG dans le surnageant S1	28,8 ± 0,67
Taux d'encapsulation (%)	71,2 ± 1,67

Tableau 13 : Taux d'encapsulation déterminé par mesure de l'activité de l'AMG non encapsulée dans les NPe. Les valeurs d'activité du surnageant S1 ont été calculées à partir de la cinétique de production de glucose. Le calcul de la quantité d'AMG dans le surnageant a été effectué à partir de l'activité de référence. Le pourcentage d'AMG présente dans le surnageant a été calculé par rapport à la masse initiale introduite d'AMG pour préparer les NPe.

Dans le cas des NP, la valeur d'activité obtenue est nulle. Dans le surnageant S1 issu de la synthèse des NPe, $360 \pm 10 \mu\text{g}$ d'AMG ont été détectés dans le surnageant ce qui correspond à $28,8 \pm 0,67\%$ de la quantité totale d'AMG introduite lors de la synthèse des nanoparticules. Le taux d'encapsulation est donc de $71,2 \pm 1,67\%$. Cela signifie que $18 \mu\text{g}$ d'AMG sont contenus dans 1 mg de NPe.

La détermination directe de la quantité d'AMG encapsulée par dissolution des nanoparticules de PLGA n'a pas été possible à cause de la faible sensibilité des techniques de dosages protéiques disponibles et du traitement chimique trop drastique pour le maintien de l'intégrité de l'AMG. La quantification de l'AMG encapsulée s'est donc faite indirectement par détermination de la quantité d'AMG non encapsulée, présente dans les surnageants issus des étapes de lavage du protocole de synthèse. Pour cela, deux techniques ont été utilisées : l'une basée sur la mesure de l'intensité de l'émission de fluorescence de l'AMG marquée à l'AlexaFluor568 et l'autre sur la mesure de son activité enzymatique. Ces deux techniques ont permis de déterminer le taux d'encapsulation des nanoparticules produites par la technique de double émulsion. Les valeurs obtenues par ces deux techniques sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	Taux d'encapsulation (%)
Analyse par fluorescence	69,7
Mesure d'activité	71,2
Moyenne des deux méthodes	70,5 ± 1,1

Tableau 14 : Taux d'encapsulation de l'AMG contenue dans des nanoparticules de PLGA déterminé par deux techniques d'analyse différentes. Les valeurs ont été obtenues par deux techniques différentes : analyse de l'intensité d'émission de fluorescence et mesure de l'activité des surnageants issus des étapes de lavage lors de la synthèse des nanoparticules.

La valeur moyenne du taux d'encapsulation est donc de 70,5%, ce qui signifie que 17,5 µg d'AMG sont contenus dans 1 mg de NPe.

Des nanoparticules de PLGA contenant de l'AMG ont été produites par la technique de double émulsion avec un rendement de synthèse d'environ 50%. A l'issue de cette synthèse, environ 70% de l'AMG a été encapsulée dans les NPe correspondant à 17,5 µg d'AMG contenus dans 1 mg de NPe.

I.2. Caractérisation physico-chimique et biochimique des nanoparticules

La détermination des propriétés physico-chimiques et biochimiques des nanoparticules préparées par la technique de double émulsion a été effectuée, permettant notamment de déterminer leur taille, leur charge ainsi que la répartition de l'AMG au niveau des nanoparticules.

I.2.1. Analyse de la morphologie et mise en évidence du système cœur-coquille

La morphologie des nanoparticules produites par le protocole de synthèse décrit précédemment a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB). Le principe de cette technique repose

sur le balayage de la surface d'un échantillon par un faisceau d'électrons incidents d'une dizaine de kilovolts. La détection des électrons émis permet ensuite la formation d'une image.

Pour observer les nanoparticules en MEB, les échantillons ont été dilués à 1 µg/mL dans l'eau, séchés puis métallisés par une fine couche d'or (quelques nanomètres). Les nanoparticules, contenant ou non de l'AMG (NP et NPe), ont ensuite été observées (**Figure 51**).

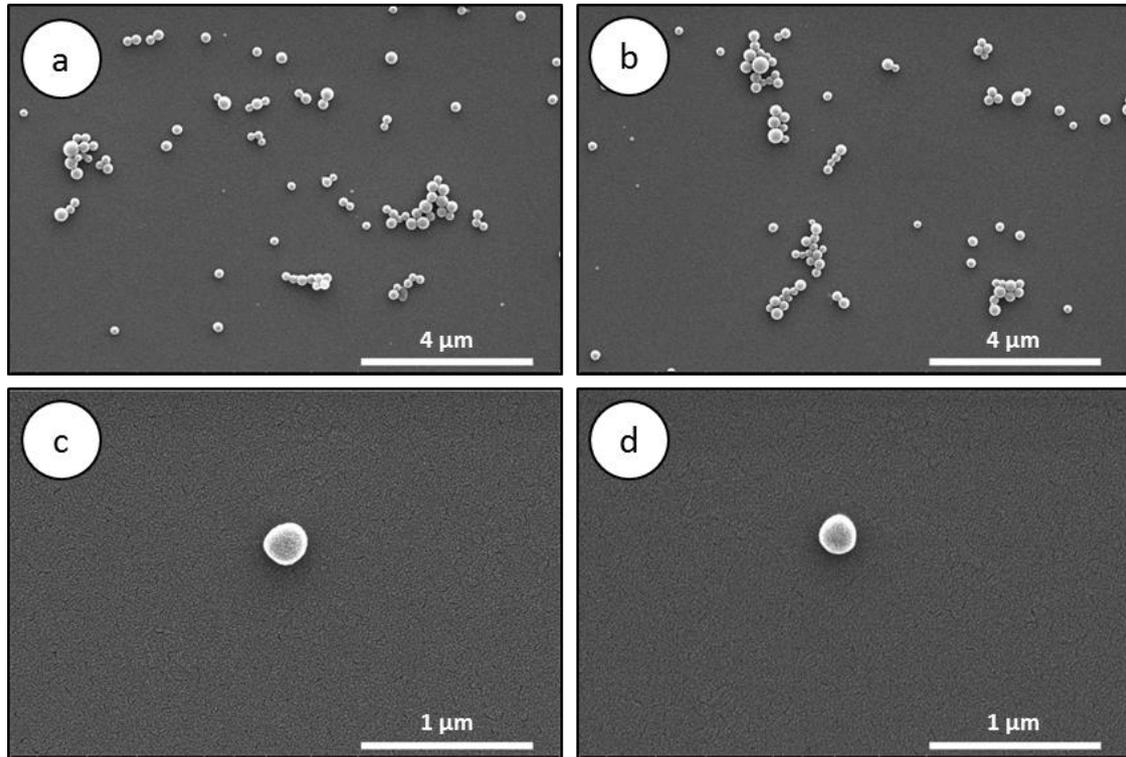


Figure 51 : Etude de la morphologie des nanoparticules de PLGA vides ou contenant de l'AMG par MEB. (a) et (c) : images des nanoparticules vides (NP) ; (b) et (d) : images des nanoparticules contenant de l'AMG (NPe). L'analyse a été effectuée à 20 kV.

Les nanoparticules contenant ou non de l'AMG présentent une morphologie similaire et sphérique. (**Figure 51.a et b**). La légère modification de la forme sphérique observée sur les **Figure 51.c et d** est due à la tension et au grossissement utilisés. En effet, l'augmentation du grossissement à la tension de 20 kV conduit à une augmentation de la focalisation du faisceau d'électrons et à l'augmentation locale de la température, entraînant une déformation progressive des nanoparticules. Cette modification de la morphologie des nanoparticules indique qu'elles sont sensibles au faisceau d'électrons à la tension utilisée et à un grossissement trop élevé. Ces observations permettent de conclure que les nanoparticules produites par la technique de double émulsion sont sphériques et que l'encapsulation de l'AMG ne modifie pas la morphologie de ces nanoparticules.

La microscopie électronique à balayage a également permis de mettre en évidence le système cœur-coquille des nanoparticules produites par une technique de double émulsion. Dans ce cas, les nanoparticules ont été déposées sous forme lyophilisée sur une pastille de carbone puis métallisées à l'or. Des nanoparticules dont la coque a été brisée ont pu être observées au MEB (**Figure 52**).

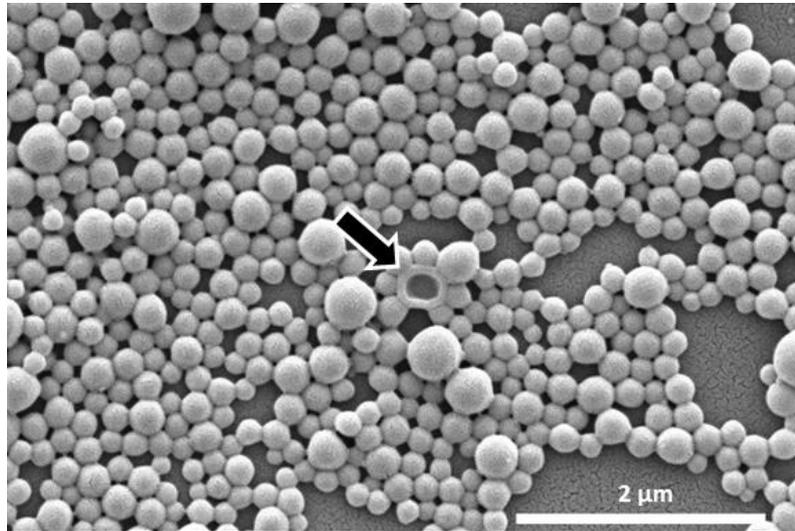


Figure 52 : Mise en évidence du système cœur-coquille des nanoparticules de PLGA par MEB. La flèche indique une nanoparticule brisée. L'analyse a été effectuée à 20 kV.

A partir des différentes images de MEB obtenues présentant des nanoparticules brisées, les proportions entre l'épaisseur de la coque et le cœur ont pu être déterminées. Ainsi, l'épaisseur de la coque de nanoparticules brisées a été mesurée et rapportée à la taille totale de la nanoparticule, permettant d'obtenir un ratio défini de la manière suivante :

$$\text{Ratio (\%)} = \frac{\text{épaisseur de la coque} \times 2}{\text{taille de la nanoparticule}}$$

A titre d'exemple, trois mesures sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	Epaisseur (nm)	Diamètre (nm)	Ratio (%)
Mesure n°1	96	401	47,9
Mesure n°2	70	393	35,6
Mesure n°3	67	315	42,5
Moyenne	77,7 ± 15,9	369,7 ± 47,5	42,0 ± 6,2

Tableau 15 : Ratios entre l'épaisseur de la coque et la taille de nanoparticules observées au MEB.

Le ratio entre l'épaisseur de la coque et la taille des nanoparticules est de $42,0 \pm 6,2$ %, ce qui signifie que l'épaisseur de la coque représente environ 40% du diamètre total de la nanoparticule. Le diamètre du cœur de celle-ci correspondrait donc à 60% du diamètre total. Le volume du cœur et de la coquille des nanoparticules correspondent respectivement à 22% et 78% du volume total des nanoparticules. Les différentes valeurs obtenues sont explicitées et schématisées dans la **Figure 53**.

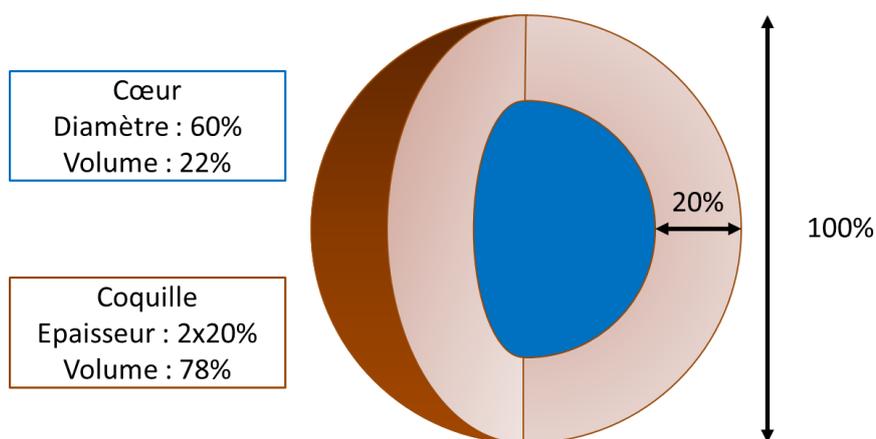


Figure 53 : Répartition entre le cœur et la coquille des nanoparticules de PLGA produites par la technique de double émulsion.

Les informations obtenues en MEB indiquent qu'à l'issue du protocole synthèse par la technique water-in-oil-in-water décrit précédemment, des nanoparticules sphériques sont obtenues avec un système cœur-coquille. Cette caractéristique indique que les nanoparticules peuvent servir de réservoir pour l'encapsulation de molécules.

1.2.2. Détermination de la taille et de l'indice de polydispersité

La détermination de la taille et de l'indice de polydispersité des nanoparticules préparées par la technique de double émulsion a été réalisée à partir de deux techniques différentes : la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et la microscopie électronique à balayage (MEB).

La DLS permet d'obtenir une mesure de la taille et une information sur la distribution de la taille de particules dans le domaine submicronique. Pour des systèmes présentant une distribution granulométrique, la taille des particules obtenue est une valeur moyenne pondérée. Dans la suite de cette étude, le diamètre hydrodynamique moyen des particules, correspondant au double du rayon hydrodynamique moyen, obtenu par DLS et exprimé par rapport à une intensité, sera présenté sous la forme d'une taille moyenne nommée Z et sera exprimée en nanomètre.

Pour effectuer les mesures de DLS, une concentration en nanoparticules de 100 µg/mL diluées dans un tampon Hepes a été choisie. Cette concentration a été retenue afin d'utiliser un minimum de nanoparticules sans perdre leur signal. La distribution de taille des nanoparticules contenant ou non de l'AMG et mesurée par DLS met en avant une distribution monomodale en taille (**Figure 54**). En effet, la distribution de taille des nanoparticules vides (NP) exprimée en pourcentage d'intensité se superpose à celle des nanoparticules contenant l'AMG (NPe). Cela indique donc que l'encapsulation de l'AMG et ses paramètres intrinsèques (taille, structure, etc), n'affecteraient pas les paramètres de taille de ces nanoparticules.

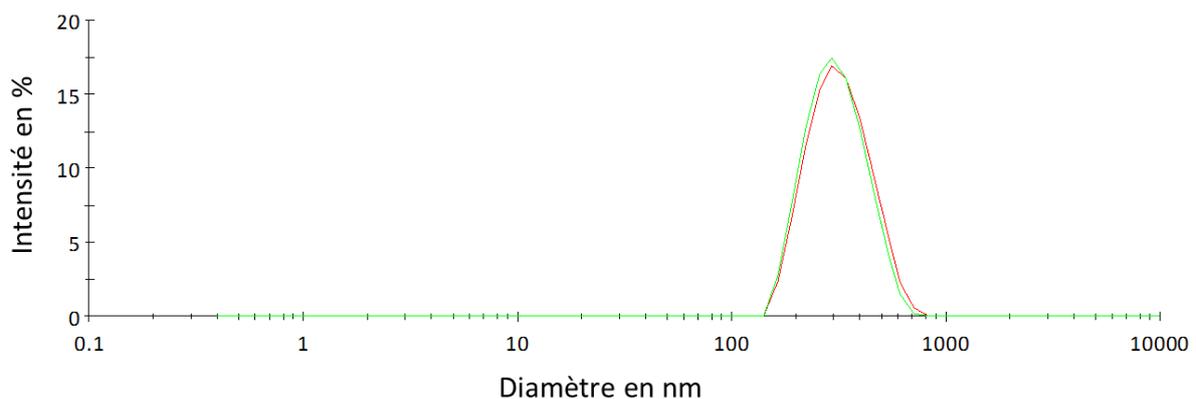


Figure 54 : Distribution de taille en intensité des nanoparticules déterminée par DLS. Les nanoparticules ont été diluées à 100 µg/mL dans un tampon Hepes et la mesure a été effectuée à 37°C. La distribution des NP est présentée en trait continu rouge et celle des NPe en trait continu vert.

A partir des fonctions d'autocorrélation et des distributions de taille exprimées en pourcentage d'intensité obtenues par le logiciel Zetasizer Software, le diamètre hydrodynamique moyen Z est

obtenu pour les nanoparticules contenant ou non de l'AMG (**Tableau 16**). Le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules (NP et NPe) est du même ordre de grandeur, aux alentours de 300 nm. L'encapsulation de l'AMG ne semble donc pas modifier la taille des nanoparticules. L'indice de polydispersité (PDI) de l'échantillon a également été déterminé (**Tableau 16**). Il est calculé à partir des fonctions d'autocorrélation et est sans unité. D'après la norme ISO 22412:2008 intitulée « Particle size analysis – Dynamic light scattering (DLS) », un échantillon présentant un PDI inférieur à 0,1 est considéré comme monodisperse. Il est important de noter que cet indice ne tient pas compte des échantillons pouvant contenir deux populations de particules monodisperses. Concernant les nanoparticules préparées par la technique de double émulsion, aussi bien pour les NP que pour les NPe, le PDI est de l'ordre de 0,1. Par considération des écart-types, les NP et les NPe forment donc deux populations pseudo-monodisperses de nanoparticules d'environ 300 nm.

	Diamètre hydrodynamique, Z (nm)	Indice de polydispersité, PDI
NP	304,7 ± 18,0	0,097 ± 0,033
NPe	309,0 ± 12,5	0,091 ± 0,023

Tableau 16 : Diamètre hydrodynamique moyen (Z) et indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules déterminés par DLS. Les mesures ont été effectuées à 37°C à partir de solutions de nanoparticules à 100 µg/mL préparées dans un tampon Hepes. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois mesures obtenues à partir de trois lots de nanoparticules issus de trois synthèses différentes.

Cependant, les valeurs de diamètre hydrodynamique ainsi que la distribution de taille (exprimée en pourcentage d'intensité) sont à nuancer si ces valeurs doivent être comparées avec d'autres techniques d'analyse de taille, telles que la microscopie électronique à balayage. En effet, un biais lors de l'analyse de la mesure peut apparaître. La diffusion de la lumière est sensible à la taille de la particule qui la diffuse : plus la particule sera grosse, plus la lumière sera diffusée. Ainsi, dans le cas d'une solution contenant deux populations de nanoparticules en proportions équivalentes (la première de 5 nm de rayon et la deuxième de 50 nm de rayon), lorsque la distribution en taille est exprimée en nombre deux pics équivalents (répartition 1 : 1) sont obtenus (**Figure 55.a**). Cependant, si cette distribution en nombre est convertie en volume, la répartition des deux pics sera de 1 : 1000 (le volume est proportionnel à r^3) (**Figure 55.b**). Enfin, par conversion en intensité, cette répartition sera de 1 : 1 000 000 (l'intensité est proportionnelle à r^6) (**Figure 55.c**).

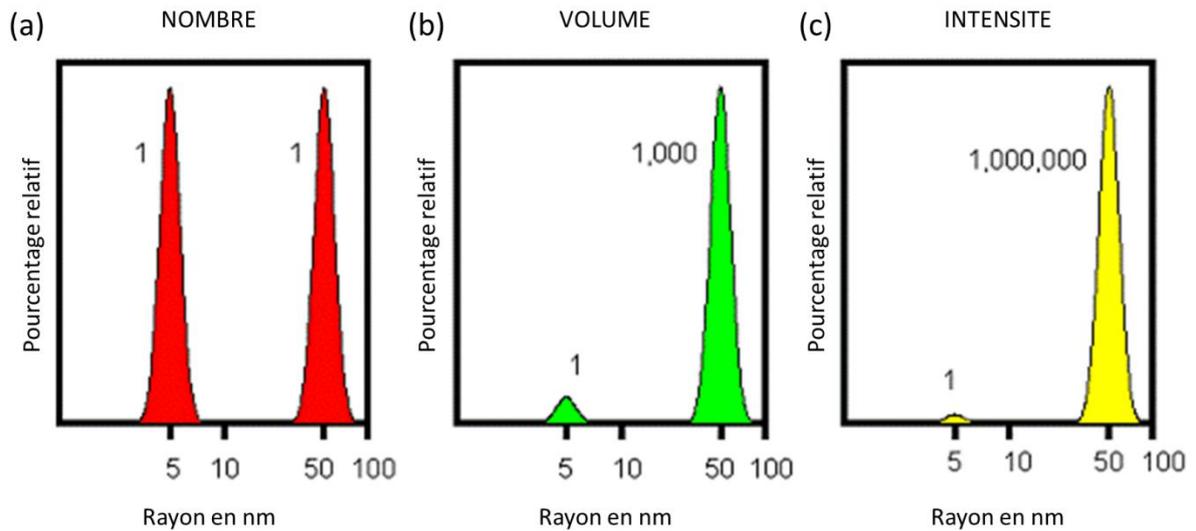


Figure 55 : Distribution de taille de deux populations distinctes de nanoparticules. La distribution de la taille peut être exprimée en nombre (a), en volume (b) et en intensité (c).

Afin de comparer les résultats obtenus en DLS avec des résultats obtenus par d'autres techniques telles que le MEB, la distribution en taille des nanoparticules sera exprimée en nombre (**Figure 56**).

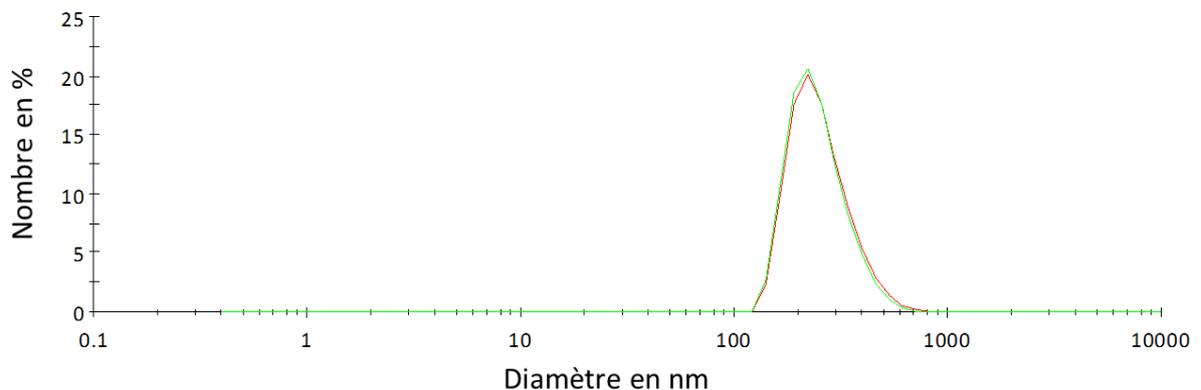


Figure 56 : Distribution de taille en nombre des nanoparticules déterminée par DLS. Les nanoparticules ont été diluées à 100 $\mu\text{g/mL}$ dans un tampon Hepes et la mesure a été effectuée à 37°C. La distribution des NP est présentée en trait continu rouge et celle des NPe en trait continu vert.

La distribution de taille des NP et NPe exprimée en nombre met en évidence un déplacement du maximum du pic vers les plus petites tailles. Ces résultats indiquent donc qu'un plus grand nombre de nanoparticules ont un diamètre inférieur à 300 nm.

La taille des nanoparticules a également été déterminée par MEB.

Pour déterminer par MEB la taille des nanoparticules produites par la technique de double émulsion, les nanoparticules ont été diluées à 1 µg/mL dans l'eau, séchées, métallisées à l'or puis observées comme décrit précédemment. A l'aide du logiciel d'analyse d'images ImageJ, la taille des nanoparticules a pu être mesurée (**Tableau 17**) :

	Diamètre moyen (nm)
NP	224,3 ± 45,1
NPe	232,1 ± 53,8

Tableau 17 : Diamètre moyen des nanoparticules de PLGA déterminé par MEB. Les valeurs correspondent à la moyenne de mesures effectuées sur environ 200 nanoparticules.

La taille des nanoparticules mesurée par MEB est d'environ 230 nm. Ces valeurs semblent cohérentes avec ce qui a été observé en DLS et qui indiquait que la taille des nanoparticules était inférieure à 300 nm. La distribution de taille exprimée en nombre a été également déterminée par MEB et à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ (**Figure 57**).

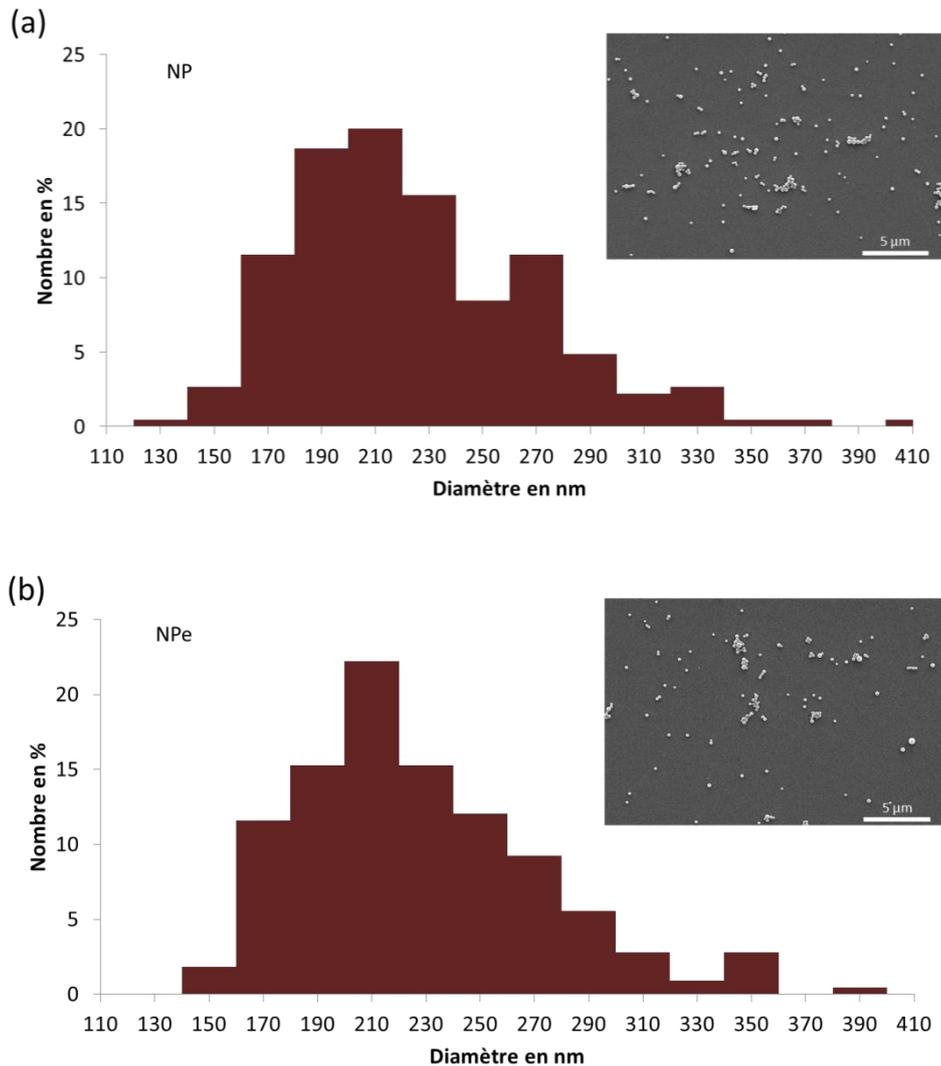


Figure 57 : Distribution de taille en nombre des nanoparticules déterminée par MEB. Environ 200 nanoparticules ont été mesurées pour (a) les NP et (b) les NPe. En insert, des images de MEB correspondant respectivement aux NP et aux NPe sont présentées ; la barre d'échelle est de 5 µm.

Ces résultats indiquent que les nanoparticules sont réparties de manière homogène en taille au sein de l'échantillon. En effet, une seule population monodisperse de nanoparticules a été observée. De plus, la distribution de taille obtenue pour les NP est similaire à celle obtenue pour les NPe.

Les observations au MEB et à la DLS ont mis en évidence que les nanoparticules présentent une répartition homogène en taille et qu'elles ne sont pas sous forme agrégée. Ces résultats confirment donc que l'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules de PLGA ne modifie ni la taille et ni la distribution de taille de ces nanoparticules.

1.2.3. Etude de la charge des nanoparticules

La charge des nanoparticules préparées par la technique de double émulsion a été déterminée par mesure du potentiel zêta. Le potentiel zêta représente la charge, ou potentiel électrostatique, qu'une particule acquiert une fois mise en solution. L'analyse de la valeur absolue du potentiel zêta donne des informations concernant la stabilité du système. En effet, si des particules ont une valeur de potentiel zêta élevée en valeur absolue, ces particules, fortement chargées auront tendance à se repousser. Au contraire, si des particules ont une valeur du potentiel zêta proche de zéro, elles auront tendance à se rapprocher et à s'agréger. Il est souvent considéré qu'une suspension de particules ayant un potentiel zêta inférieur à $|10 \text{ mV}|$ est instable, alors qu'une valeur supérieure à $|30 \text{ mV}|$ leur confèrera en général une bonne stabilité.

Divers paramètres peuvent influencer la mesure du potentiel zêta, tels que le pH et la conductivité. Il est donc important d'associer une mesure de potentiel zêta aux composants de la solution utilisée pour diluer les nanoparticules. Dans le cadre de cette étude, une solution d'Hepes 10 mM pH 7,4 a été utilisée et les mesures ont été effectuées à 37°C.

Le potentiel zêta des nanoparticules contenant l'AMG (NPe) ainsi que celui des nanoparticules témoin (NP) a été mesuré (**Tableau 18**).

	Potentiel zêta (mV)
NP	- 2,24 ± 0,25
NPe	- 3,95 ± 0,19

Tableau 18 : Potentiel zêta des nanoparticules produites par la technique de double émulsion. Les NP et les NPe ont été diluées à 100 µg/mL dans un tampon Hepes. Les mesures ont été effectuées à 37°C. Les valeurs correspondent à la moyenne de valeurs obtenues à partir de trois lots de nanoparticules issus de trois synthèses différentes.

La charge des NP et des NPe est respectivement de - 2,24 mV et - 3,95 mV. La charge des NPe est donc plus faible que celle des NP. Cette différence de charge pourrait s'expliquer par la présence d'AMG en surface des NPe car, à pH 7,4 l'AMG est plutôt chargée négativement (pHi ~ 4,5). Cependant, la charge des nanoparticules (NP et NPe) reste faible et est de l'ordre de - 3 mV : elles sont donc proches de la neutralité. De plus, la distribution du potentiel zêta des nanoparticules produites par la technique de double émulsion indique que les nanoparticules ont une distribution monomodale d'un point de vue de leur charge (**Figure 58**).

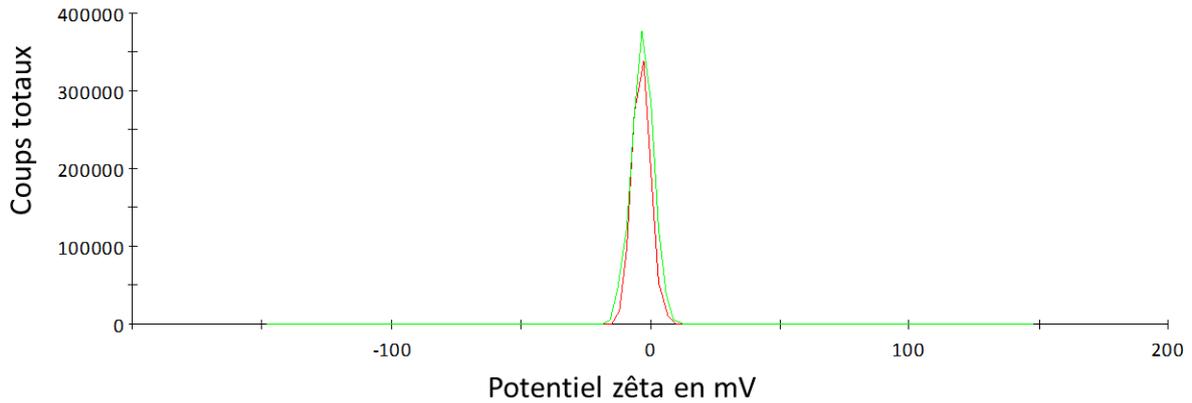


Figure 58 : Distribution du potentiel zêta des nanoparticules. Les nanoparticules ont été diluées à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans un tampon Hepes, et les mesures ont été effectuées à 37°C. La distribution des NP est présentée en trait continu rouge et celle des NPe en trait continu vert.

Ces mesures de potentiel zêta indiquent donc que l'encapsulation de l'AMG au sein de nanoparticules de PLGA, préparées par la technique de double émulsion, modifie légèrement la charge des nanoparticules mais que les NP et NPe reste proche de la neutralité dans la solution d'étude. Comme expliqué précédemment, une suspension de particules ayant un potentiel zêta inférieur à $|10 \text{ mV}|$ est souvent considérée comme instable. Ces nanoparticules pourraient donc avoir tendance à s'agréger au cours du temps. Il sera donc intéressant d'observer par la suite la stabilité de ces nanoparticules.

1.2.4. Répartition de l'AMG au sein des nanoparticules

Les nanoparticules de PLGA préparées par la technique de double émulsion se présentent sous la forme d'un système composé d'un cœur correspondant à 22% du volume total des nanoparticules et d'une coquille représentant 78% de celui-ci. Lors de la préparation des nanoparticules, l'AMG est introduite dans la phase aqueuse alors que le PLGA est introduit dans la phase organique. Au cours des étapes de sonication, l'AMG peut soit rester dans la phase aqueuse soit diffuser dans la phase organique partiellement ou dans sa totalité. Différentes hypothèses peuvent alors être émises concernant la répartition de l'AMG dans les nanoparticules (**Figure 59**).

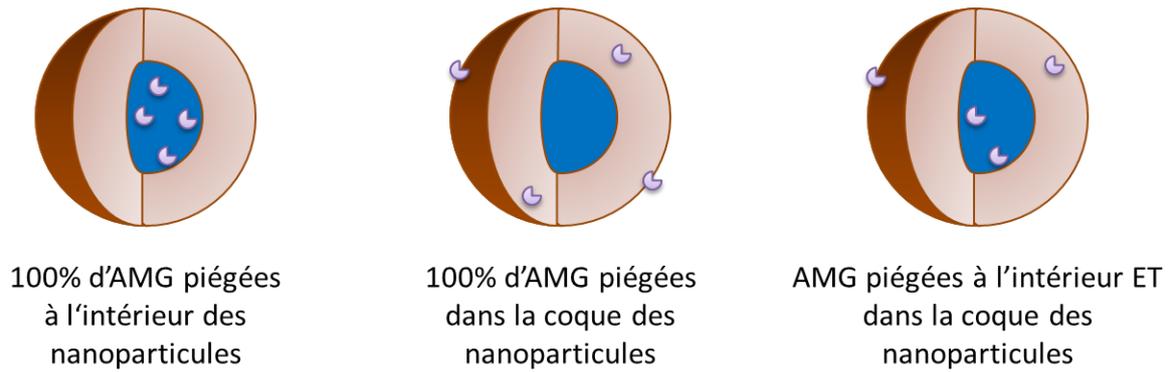


Figure 59 : Hypothèses émises concernant la répartition de l'AMG dans les nanoparticules.

La première hypothèse consiste à dire que toute l'AMG se situe dans le cœur liquide/aqueux de la nanoparticule. Ceci indiquerait que lors de la synthèse des nanoparticules, l'enzyme n'aurait pas diffusé de la phase aqueuse vers la phase organique. La deuxième hypothèse est basée sur le fait que l'AMG pourrait diffuser complètement dans la phase organique. Dans ce cas, l'intégralité de l'AMG se trouverait piégée dans la coque de PLGA. La troisième hypothèse est une hypothèse hybride où une partie de l'AMG aurait diffusé dans la phase organique et l'autre partie serait restée dans la phase aqueuse. Cette diffusion partielle de l'enzyme conduirait à la formation d'une nanoparticule qui contiendrait une partie de l'AMG en son cœur et l'autre dans la coque de PLGA, pouvant également être accessible de la surface des nanoparticules.

Pour mettre en évidence l'AMG accessible depuis la surface des NPe, un dosage BCA a été utilisé comme décrit précédemment. Pour effectuer ce test, une gamme étalon a tout d'abord été effectuée à partir de solutions d'AMG préparées à différentes concentrations (**Figure 60**).

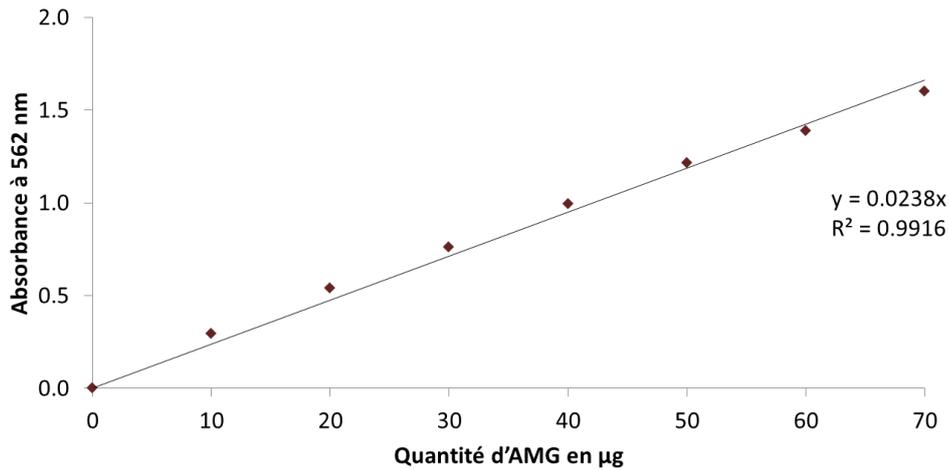


Figure 60 : Gamme étalon d'AMG déterminée par dosage BCA. Différentes quantités d'AMG sont utilisées : 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 et 70 µg. Le dosage BCA est effectué et l'absorbance obtenue à 562 nm est tracée en fonction de la quantité d'AMG contenue dans la solution échantillon. Les valeurs expérimentales ont été ajustées à l'équation d'une droite.

Une solution contenant soit des NP soit des NPe à 75 mg/mL a été dosée par le test BCA. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	NPe		
	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Absorbance à 562 nm	0,180	0,290	0,294
Quantité d'AMG contenue dans l'échantillon (µg)	12,7	21,8	22,6
% d'AMG par rapport à la quantité totale encapsulée	14,4	24,7	25,7
% d'AMG à la surface des nanoparticules	21,6 ± 6,6		

Tableau 19 : Pourcentage d'AMG accessible de la surface des NPe. La quantité d'AMG détectée dans l'échantillon a été mesurée par un test BCA sur 50 µL de solution de nanoparticules à 75 mg/mL. L'absorbance à 562 nm a été relevée et la quantité d'AMG déterminée à partir de la gamme étalon. Le pourcentage d'AMG a été exprimé en fonction de la quantité totale d'AMG encapsulée. La valeur moyenne obtenue est représentative des valeurs de trois lots de nanoparticules issus de trois synthèses différentes.

A partir de la gamme étalon effectuée sur l'AMG, il a été possible de déterminer la quantité d'AMG accessible de la surface des NPe. En émettant l'hypothèse que les réactifs du dosage BCA n'aient pas diffusé au sein des nanoparticules, 21,6% de l'AMG encapsulée lors de la synthèse des NPe serait

accessible depuis la surface. Cela indique donc qu'au maximum 20% de l'AMG encapsulée est directement disponible à la fin de la synthèse des nanoparticules. De plus, cela correspondrait à 3,5 µg d'AMG/mg NPe disponibles après synthèse pour hydrolyser de l'amidon et produire du glucose. Ces résultats sont en accord avec les mesures du potentiel zêta des nanoparticules, où la différence de charge entre les NP et les NPe avait été attribuée à la possible présence d'AMG en surface des NPe.

La caractérisation des nanoparticules a permis une meilleure compréhension de leurs propriétés physico-chimiques et biochimiques. En effet, les nanoparticules obtenues par la technique de double émulsion présentent un diamètre d'environ 250 - 300 nm, forment une population monodisperse de nanoparticules sphériques et non chargées. Ces nanoparticules sont formées d'un système cœur-coquille qui leur permet de servir de réservoir lors de l'encapsulation de l'AMG. Il a également été mis en évidence que le volume du cœur ne représente que 22% du volume total des nanoparticules. De plus, environ 20% de l'AMG encapsulée serait disponible depuis la surface des NPe permettant une disponibilité immédiate de l'AMG pour produire du glucose à l'issue de la synthèse des NPe.

I.3. Optimisation des nanoparticules produites par la technique de double émulsion

Afin d'améliorer le rendement de synthèse ou de modifier certaines caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules telles que la taille, les conditions expérimentales utilisées lors de la synthèse peuvent être modifiés. De plus, pour une utilisation *in vivo*, il est nécessaire d'obtenir des nanoparticules stériles. Il est alors nécessaire d'adapter le protocole mis en place afin de limiter les éventuelles contaminations biologiques.

1.3.1. Influence des paramètres expérimentaux sur les caractéristiques physico-chimiques et le rendement de synthèse des nanoparticules

L'influence du temps de sonication et du temps de centrifugation sur la taille et le rendement de synthèse des nanoparticules a été étudiée afin d'obtenir des nanoparticules de plus petites tailles, pouvant servir à d'autres applications où des nanoparticules de taille inférieure à 100 nm seraient nécessaires, mais également pour augmenter le rendement de synthèse.

a. Modification du temps de sonication

Au cours de la préparation des nanoparticules par la technique de double émulsion, 2 étapes successives de sonication sont nécessaires pour permettre la formation d'un cœur aqueux et d'une coque polymérique. Des études précédentes ont montré que l'énergie libérée par la sonication pouvait influencer la taille des nanoparticules. En effet, plus l'intensité de la sonication est élevée, plus la taille des gouttelettes formées lors de la formation des émulsions, et donc la taille des nanoparticules, sera faible¹⁶⁷.

L'intensité des deux étapes de sonication a donc été modifiée en jouant sur le temps de sonication (plus le temps de sonication est long, plus l'intensité sera élevée). Les temps de sonication choisis sont les suivants : 5 s, 10 s, 15 s et 20 s ; le temps de sonication de référence correspondant à 10 s. Les temps utilisés sont identiques pour les deux étapes de sonication.

Dans un premier temps, l'influence de la variation du temps de sonication sur le rendement de synthèse a été étudiée. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Temps de sonication			
	5 s	10 s	15 s	20 s
Rendement (%)	52,8	51,3	53,4	53,7

Tableau 20 : Rendements de synthèse obtenus suite à la modification du temps des étapes de sonication du protocole de synthèse des nanoparticules de PLGA.

Quel que soit le temps de sonication utilisé, le rendement de synthèse reste inchangé et est de l'ordre de 53%. Le temps de sonication n'a donc aucune influence sur le rendement de synthèse.

Ensuite, le diamètre hydrodynamique moyen Z ainsi que l'indice de polydispersité de ces nanoparticules ont été déterminés par DLS. Les conditions expérimentales de mesure sont identiques à celles utilisées précédemment et les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	Temps de sonication			
	5 s	10 s	15 s	20 s
Diamètre hydrodynamique, Z (nm)	311,6	309,0	305,2	300,5
Indice de polydispersité, PDI	0,105	0,091	0,088	0,085

Tableau 21 : Influence du temps de sonication sur le diamètre hydrodynamique moyen (Z) et l'indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules de PLGA. Les mesures ont été effectuées à 37°C à partir de solutions de nanoparticules à 100 µg/mL préparées dans un tampon Hepes.

Ces valeurs semblent indiquer une diminution de la taille moyenne des nanoparticules à mesure que le temps de sonication augmente. Une tendance identique est observée pour l'indice de polydispersité indiquant une augmentation du caractère monodisperse de ces nanoparticules. Ces résultats sont donc en accord avec la littérature. Cependant, les temps de sonication utilisés ne permettent pas une diminution significative de la taille des nanoparticules.

Dans cette étude, le temps de sonication le plus élevé est de 20 s. Il serait donc intéressant d'augmenter ce temps de sonication pour savoir si la taille des particules continue à diminuer. Cependant, même si les étapes de sonication sont effectuées dans la glace, l'augmentation locale de la température pourrait avoir une influence sur les caractéristiques des nanoparticules. Tout d'abord, les nanoparticules de PLGA sont sensibles à la chaleur. En effet, la température de transition vitreuse du PLGA 50/50 est d'environ 40°C, ce qui indique qu'au-delà de cette température, les nanoparticules seront plus sensibles à leur environnement et à la déformation. Cette sensibilité a d'ailleurs été observée lors des expériences de MEB lorsque les nanoparticules sont visualisées à une tension élevée (20 kV) puisqu'elles semblent se déformer sous l'effet du faisceau d'électrons et perdre leur aspect sphérique. De plus, la molécule encapsulée dans les nanoparticules est une enzyme qui est donc sensible à la chaleur. L'augmentation du temps de sonication pourrait alors induire une diminution de son activité enzymatique.

b. Modification du temps de centrifugation

Afin d'utiliser les nanoparticules de PLGA contenant l'AMG dans une application biomédicale à des fins cliniques et industrielles, le temps et le rendement de synthèse doivent être optimisés. Il est donc important de produire une grande quantité de nanoparticules dans un temps le plus court possible. Pour cela, l'influence du temps de centrifugation lors des étapes de lavage utilisées après évaporation du dichlorométhane a été étudiée. Ces étapes permettent d'éliminer les molécules n'ayant pas contribué à la formation des nanoparticules, qui resteront dans le surnageant, et de collecter les nanoparticules dans le culot. Si des nanoparticules restent en solution après la centrifugation, cela conduit à une perte de nanoparticules et donc à une diminution du rendement. Le temps de centrifugation a donc été augmenté pour améliorer le rendement. Pour cela, différents temps de centrifugation ont été choisis: 8 min, 16 min, 32 min et 48 min ; le temps de centrifugation de référence correspondant à 8 min. Les temps utilisés pour les trois étapes de centrifugation sont identiques.

Les rendements de synthèse des nanoparticules produites par modification du temps de centrifugation ont été calculés comme décrit précédemment et sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Temps de centrifugation			
	8 min	16 min	32 min	48 min
Rendement (%)	51,3	61,7	73,0	78,0

Tableau 22 : Rendements de synthèse obtenus suite à la modification du temps de centrifugation des étapes de lavages lors de la synthèse des nanoparticules.

Les résultats obtenus indiquent que plus le temps de centrifugation augmente, plus le rendement augmente, passant de 51,3% à un rendement de 78,0% pour des temps de centrifugation respectifs de 8 min et de 48 min. Ceci indique qu'avec un temps de centrifugation court, et notamment celui utilisé pour le protocole de synthèse de référence, un grand nombre de nanoparticules reste dans le surnageant et sont éliminées. Il semble donc intéressant d'augmenter le temps de centrifugation, néanmoins il est nécessaire de vérifier que cette modification du protocole de synthèse n'influence pas les propriétés physico-chimiques des nanoparticules.

Le diamètre hydrodynamique et l'indice de polydispersité de ces nanoparticules ont donc été déterminés par DLS, et sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Temps de centrifugation			
	8 min	16 min	32 min	48 min
Diamètre hydrodynamique, Z (nm)	309,0	299,8	282,4	267,1
Indice de polydispersité, PDI	0,091	0,099	0,113	0,131

Tableau 23 : Influence du temps de centrifugation sur le diamètre hydrodynamique moyen (Z) et l'indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules. Les mesures ont été effectuées à 37°C à partir de solution de nanoparticules à 100 µg/mL préparées dans un tampon Hepes.

Les résultats montrent que plus le temps de centrifugation augmente, plus le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules diminue, passant d'une taille de 309 nm pour un temps de centrifugation de 8 min à une taille de 267,1 nm pour un temps de centrifugation de 48 min. De plus, l'augmentation du temps de centrifugation entraîne une augmentation de l'indice de polydispersité, qui dépasse même la valeur seuil de 0,1 pour les temps 32 min et 48 min. Ceci indique que la population de nanoparticules récupérées est polydisperse et cette polydispersité est probablement due au fait qu'un allongement du temps de centrifugation permettrait la sédimentation de nanoparticules de plus petite taille.

Il serait intéressant d'effectuer les étapes de lavages avec un temps de centrifugation de 8 min, de collecter le surnageant et d'effectuer une deuxième étape de centrifugation de 48 min sur ce surnageant. Ce protocole pourrait permettre d'isoler deux populations monodisperses de nanoparticules de taille différente.

L'influence de certains paramètres expérimentaux sur les caractéristiques physico-chimiques a été investiguée. L'augmentation du temps de sonication semble permettre la production de nanoparticules de plus petite taille, mais cet effet reste à confirmer en allongeant le temps de sonication. L'augmentation du temps de centrifugation a quant à lui permis d'augmenter le rendement de synthèse des nanoparticules. Cependant, l'augmentation du temps de centrifugation conduit à la modification des caractéristiques des nanoparticules. En effet, le PDI augmente et la taille moyenne des nanoparticules diminue indiquant qu'un plus grand nombre de nanoparticules de petite taille a été récupéré.

1.3.2. Préparation de nanoparticules stériles

L'implantation *in vivo* d'un hydrogel contenant des nanoparticules de PLGA, dans lesquelles l'AMG a été encapsulée, a été envisagée dans le cadre du projet de recherche ANR. Dans ce contexte, l'utilisation de nanoparticules stériles est donc obligatoire. De ce fait, le protocole de synthèse présenté précédemment a été optimisé pour obtenir des nanoparticules stériles. La stérilité des nanoparticules produites à l'issue de cette synthèse a ensuite été vérifiée.

a. Protocole de synthèse

Afin d'obtenir des nanoparticules stériles, le protocole de synthèse décrit précédemment a dû être optimisé pour réduire le risque de contamination.

Dans un premier temps, l'ensemble des solutions et matériels servant à la synthèse des nanoparticules ont été stérilisés par filtration ou autoclavage, à l'exception des solutions de PVA (solution trop visqueuse pour être filtrée) et de PLGA (présence de DCM). La synthèse des nanoparticules s'effectue ensuite sous une hotte à flux laminaire. Néanmoins certaines étapes ne peuvent pas être réalisées dans ces conditions de stérilité et sont donc exposées à de possibles contaminations extérieures, à savoir les étapes où le dichlorométhane est présent (de la dissolution du PLGA à l'évaporation du DCM) et l'étape de lyophilisation.

Il est donc nécessaire de vérifier par des tests de stérilité que les nanoparticules produites grâce à ce protocole ne présentent pas de trace de contaminations par des micro-organismes.

b. Tests de stérilité

Pour effectuer les tests de stérilité, deux milieux de culture riches et non sélectifs ont été utilisés : le bouillon Tryptic Soy (TS) et le bouillon Lysogeny Broth (LB). La présence de dextrose (glucose) dans le milieu TS en fait un milieu plus riche que le milieu LB. Ces deux milieux sont couramment utilisés en microbiologie pour l'amplification et la culture de bactéries aérobies et anaérobies facultatives courantes, telles qu'*Escherichia coli*, et des levures. Les nanoparticules synthétisées en conditions stériles, NP et NPe, sont incubées dans les deux milieux de culture en condition liquide à 25°C et 37°C pour une durée de 14 jours. Cette étape de culture en condition liquide permet l'amplification des bactéries et une culture sur des temps longs comparé à la culture en condition solide. La température 37°C a été choisie car elle permet le développement de nombreuses bactéries. La température 25°C a quant à elle été choisie pour favoriser le développement des levures. L'utilisation

de deux milieux de culture ainsi que de deux températures permet à un plus grand nombre de microorganismes de se développer et donc d'obtenir un large spectre de contamination possible.

Un témoin négatif (milieu de culture seul) et un témoin positif (ajout de NPe non préparées en conditions stériles) sont également testés. A l'issue de cette incubation, une fraction de ces échantillons est étalée sur les milieux solides (géloses) correspondants (géloses LB et TS) et incubés à 25°C et 37°C pendant 7 jours. Cette étape, habituellement utilisée pour l'isolement des bactéries, permet une meilleure observation de la contamination. En effet, les nanoparticules présentes dans les milieux de culture liquides rendent le milieu opaque, ne permettant pas de distinguer les échantillons contaminés des échantillons non contaminés. A la fin de l'incubation, les géloses sont analysées (**Tableau 24**).

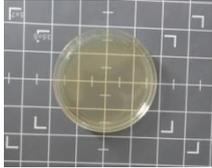
	LB		TS		
	25°C	37°C	25°C	37°C	
Témoin négatif	-	-	-	-	<p>Absence de contamination -</p> 
Témoin positif	+	+	+	+	
NP	-	-	-	-	
NPe	-	-	-	-	

Tableau 24 : Tests de stérilité des NP et des NPe issues de la synthèse optimisée pour la production de nanoparticules stériles. + correspond à un échantillon contaminé; - correspond à un échantillon non contaminé. Géloses obtenues à la fin du test de stérilité présentant un échantillon non contaminé et un échantillon contaminé.

Les résultats obtenus montrent que le témoin négatif ne présente pas de trace de contaminations alors que le témoin positif met bien en évidence la présence d'une contamination, et ce quel que soit le milieu de culture et la température utilisés. De plus, aucune contamination n'est visible sur les géloses correspondant aux échantillons NP et NPe préparés en conditions stériles. Le protocole de synthèse optimisé semble donc être adapté pour produire des nanoparticules stériles qui pourront être utilisées dans un hydrogel implanté *in vivo*.

Il est cependant nécessaire de préciser que, pour une utilisation en phase clinique, selon la norme ISO 11137-2:2013 concernant la stérilisation des produits de santé, une étape de stérilisation

supplémentaire sera tout de même nécessaire. Une technique envisageable serait la stérilisation aux rayons gamma. En effet, il a été montré que ce type de stérilisation ne modifie pas de manière significative la structure de nanoparticules de PLGA contenant une biomolécule²⁰⁶. Cependant, les radiations gamma peuvent conduire à la dégradation de protéines²⁰⁷ et pourrait donc réduire la bioactivité de l'AMG contenue dans les nanoparticules. Il faudrait donc au préalable pouvoir étudier l'effet de ce type de stérilisation sur l'activité de l'AMG, sous forme libre ou encapsulée.

II. Stabilité et activité des nanoparticules de PLGA en solution et au sein d'un hydrogel

L'hydrogel de fibrine est un biomatériau souvent utilisé en ingénierie tissulaire du fait de sa biocompatibilité et biodégradabilité. A une concentration de 18 mg/mL en fibrinogène, cet hydrogel a également mis en avant sa capacité à favoriser l'adhérence, l'étalement, la prolifération de cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSM) ainsi que l'expression *in vitro* de phosphatase alcaline osseuse, un marqueur de la formation osseuse³. Cependant, il a été mis en évidence que la mort massive des hCSMs post-implantation serait due à la présence d'un environnement ischémique (faible apport en oxygène et en nutriments) présent au site d'implantation. Dans ce type d'environnement reproduit *in vitro* ($pO_2 < 0,1\%$), il a été démontré que l'apport de glucose permet d'augmenter de manière significative la survie de hCSMs. Ces résultats ont également été confirmés *in vivo*. Dans le cadre du projet de recherche financé par l'ANR, cet hydrogel de fibrine a donc été enrichi en amidon pour créer un réservoir de glucose. Le glucose est produit par hydrolyse enzymatique de l'amidon par l'AMG. Cet hydrogel a pour objectif d'apporter de manière continue du glucose sur une durée de 1 mois.

II.1. L'hydrogel de fibrine-amidon

La fibrine est un biopolymère qui se forme suite au clivage du fibrinogène par la thrombine lors de la dernière étape de la cicatrisation, permettant la formation d'un réseau tridimensionnel de fibrine. L'incorporation d'amidon au sein d'un hydrogel de fibrine et son influence sur les propriétés structurales et viscoélastiques de l'hydrogel ont été étudiées.

II.1.1. Préparation et manipulation des hydrogels

La formation des hydrogels à base de fibrine et d'amidon s'effectue tout d'abord par mélange des précurseurs en solution, puis par incubation à 37°C pendant 1h pour l'étape de polymérisation.

Pour cela, les hydrogels sont préparés dans un tampon Hepes et les concentrations finales en sodium et calcium sont respectivement de 150 mM en chlorure de sodium (NaCl) et 20 mM en chlorure de calcium (CaCl₂). A cette solution est ajouté l'amidon, préalablement chauffé à 90°C pendant 2h, a une concentration finale de 2% (m/v). Ce mélange est laissé à refroidir à température ambiante pendant quelques minutes avant l'ajout des protéines afin d'éviter leur agrégation. Une fois le mélange refroidi, le fibrinogène humain (HFb) est ajouté à une concentration finale de 18 mg/mL. Enfin, 0,72 U/mL de thrombine humaine (HTb) sont ajoutés pour permettre le clivage du HFb. L'ensemble des précurseurs en solution est déposé sur des pastilles de Téflon® et incubé à 37°C pendant 1h pour polymérisation. Après ce temps de polymérisation, les hydrogels obtenus sont démoulés facilement des pastilles et peuvent ainsi être utilisés pour effectuer différents types d'analyses (**Figure 61**).

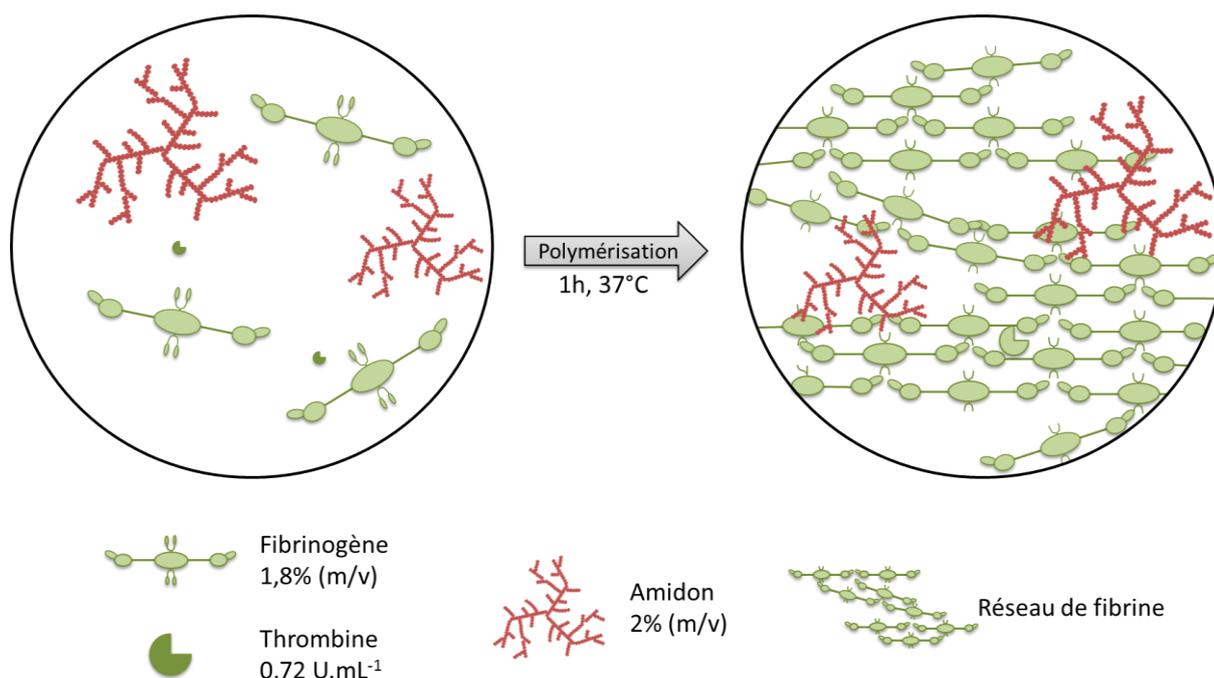


Figure 61 : Schéma présentant la synthèse des hydrogels de fibrine-amidon.

Dans certains cas, de l'AMG peut être ajoutée à la formulation des hydrogels et cet ajout s'effectue avant l'ajout de l'HTb. Sous forme libre, l'AMG est ajoutée à une concentration finale de 35 µg/mL, permettant d'obtenir un hydrogel de fibrine-amidon-AMG. Sous la forme encapsulée (NPe), l'AMG

est ajoutée à 2 mg/mL en concentration finale, correspondant à une concentration de 35 $\mu\text{g/mL}$ d'AMG libre. Cette deuxième formulation permet d'obtenir un hydrogel de fibrine-amidon-NPe.

Les gels obtenus sont autosupportés, résistants à la déformation et opaques quel que soit la formulation utilisée (fibrine, fibrine-amidon, fibrine-amidon-AMG et fibrine-amidon-NPe) (**Figure 62**).

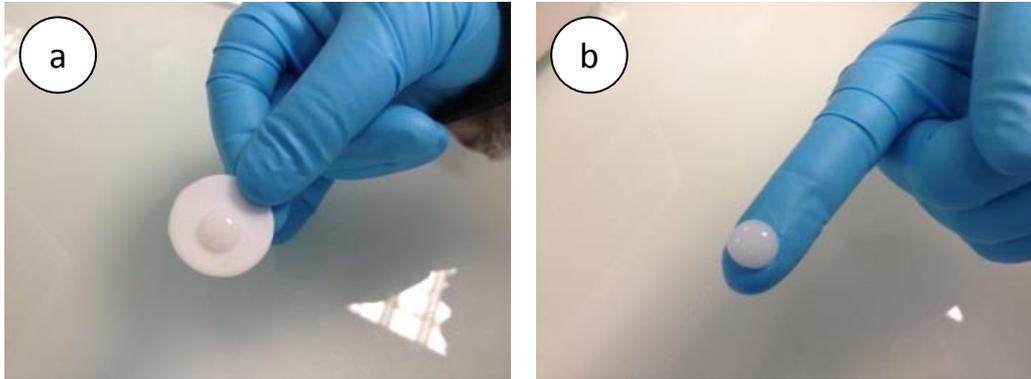


Figure 62 : Hydrogels de fibrine-amidon-NPe synthétisés sur pastille de Téflon®. (a) avant démoulage de la pastille et (b) après démoulage.

Les hydrogels ainsi formés sont facilement manipulables. Ceci peut être un avantage dans le cadre d'une utilisation clinique, lors de la manipulation du matériau par un chirurgien.

II.1.2. Propriétés mécaniques et structure des hydrogels

Les gels se comportent comme des solides viscoélastiques et peuvent être caractérisés par rhéologie. Cette technique consiste en l'étude du comportement de matériaux soumis à une contrainte ou une déformation. Les modules viscoélastiques de l'hydrogel peuvent ainsi être déterminés : G' correspond au module de stockage ou également appelé module élastique, G'' est le module de perte ou module visqueux. Lorsque G' est inférieur à G'' , l'échantillon est sous forme liquide et quand G' est supérieur à G'' , l'échantillon est sous forme gélifiée. Le point de gel est atteint au moment où G' est égal à G'' , correspondant à la transition sol-gel de l'échantillon. Pour déterminer ces paramètres, l'ensemble des précurseurs en solution (HFb, HTb, amidon, AMG ou NPe) est placé sous le rhéomètre puis la mesure des paramètres G' et G'' est effectuée à 37°C avec une déformation imposée de 1% appliquée à une fréquence de 1Hz (**Figure 63**).

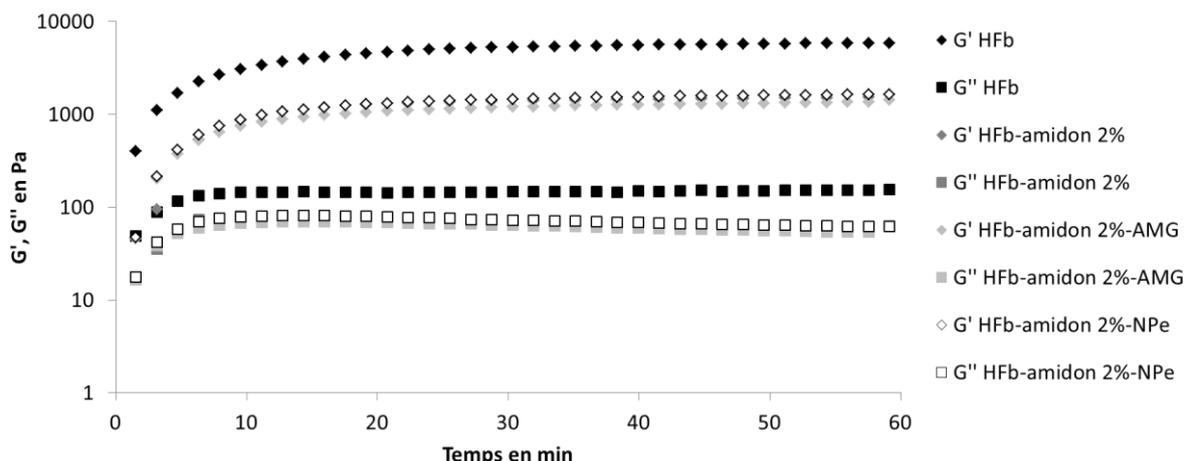


Figure 63 : Evolution des propriétés viscoélastiques des hydrogels mesurées par rhéologie. Evolution au cours du temps du module de stockage (G') et du module de perte (G'') des hydrogels de fibrine, fibrine-amidon, fibrine-amidon-AMG et fibrine-amidon-NPe avec les concentrations suivantes : fibrine 18 mg/mL, amidon 2% (m/v), AMG 2 μ g/mL, NPe 1 mg/mL. Les mesures ont été effectuées par cisaillement à une fréquence de 1 Hz et une déformation de 1%, à 37°C. Les modules des formulations HFb-amidon 2%, HFb-amidon 2%-AMG et HFb-amidon 2%-NPe se superposent.

Ces différentes formulations mettent en avant un temps de gel inférieur à 1 min. Une estimation plus précise n'est pas possible dans ces conditions expérimentales car 1 min correspond au plus petit temps mesurable lors de la mise en place de la mesure des propriétés viscoélastiques de ces matériaux.

Les modules de stockage G' et de perte G'' sont déterminés à 1h, temps pour lequel les valeurs atteignent un équilibre et correspondant au temps de polymérisation utilisé pour la préparation des hydrogels. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	G' (Pa)	G'' (Pa)
Fibrine	5850	155
Fibrine-amidon	1520	55
Fibrine-amidon-AMG	1190	64
Fibrine-amidon-NPe	1490	73

Tableau 25 : Propriétés viscoélastiques des hydrogels obtenues par rhéologie. Valeurs du module de stockage (G') et du module de perte (G'') des hydrogels de fibrine, fibrine-amidon, fibrine-amidon-AMG et fibrine-amidon-NPe, obtenus après 1h de gélification.

Pour les différentes formulations d'hydrogels, la valeur du module de stockage G' est supérieure à 1000 Pa, ce qui est cohérent avec le caractère autosupporté et manipulable des matériaux. La valeur de G' de ces différents matériaux est comprise entre 1 et 6 kPa, correspondant aux caractéristiques d'un gel mou ($G' \sim 10^3$ Pa). En comparaison, une émulsion présente un module élastique d'environ 10^{-3} Pa et un polymère solide d'environ 10^9 Pa.

A partir de ces valeurs de module de stockage, la taille de maille du réseau de fibrine peut être calculée grâce à la formule suivante :

$$G' = \frac{k_B T}{\xi^3} \quad \Leftrightarrow \quad \xi = \sqrt[3]{\frac{k_B T}{G'}}$$

- G' : module de stockage en Pa
- k_B : constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)
- T : température en Kelvin (310 K soit 37°C)
- ξ : taille de la maille du réseau en m^3

La taille de maille moyenne pour les différentes formulations de matériaux est comprise entre 9 et 15 nm et est donc d'environ 10 nm.

L'hydrogel de fibrine présente une valeur de G' d'environ 6 kPa et une valeur de 155 Pa pour G'' . Lorsque de l'amidon est ajouté à la composition du matériau, la valeur du module de stockage et celle du module de perte diminuent de manière significative indiquant une diminution des propriétés viscoélastiques des matériaux à base d'amidon. Cette diminution des propriétés viscoélastiques pourrait conduire à une hétérogénéité au sein de l'hydrogel. Il est donc intéressant d'étudier la structure interne du matériau et la répartition de l'amidon dans le réseau de fibrine. Il est également important de noter que l'introduction de l'AMG sous forme libre ou encapsulée (NPe) ne modifie pas les propriétés viscoélastiques du matériau fibrine-amidon.

Afin de visualiser la structure interne des matériaux, le réseau protéique de fibrine a été marqué par greffage d'un fluorophore : l'AlexaFluor568. Le marquage a été effectué post-synthèse pour ne pas perturber la formation du réseau de fibrine. Les hydrogels de fibrine et de fibrine-amidon ont ensuite été observés en microscopie confocale (**Figure 64**).

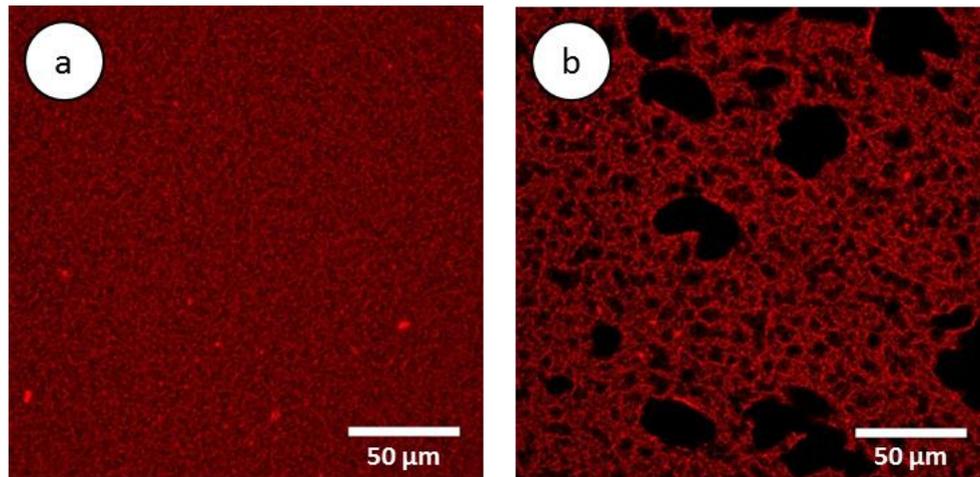


Figure 64 : Observation en microscopie confocale d'un hydrogel de fibrine avec ou sans amidon. Les hydrogels de (a) fibrine et de (b) fibrine-amidon 2% (m/v) ont été marqués à l'AlexaFluor568 post-synthèse puis observés au microscope confocal avec un grossissement x400. Le laser utilisé est un laser DPSS à 561 nm. La barre d'échelle est de 50 µm.

L'observation au microscope confocal de la structure de l'hydrogel de fibrine (**Figure 64.a**) met en évidence la formation d'un réseau régulier de fibres denses et homogènes. Au contraire, dans le cas de l'hydrogel de fibrine-amidon (**Figure 64.b**), l'ajout d'amidon induit une hétérogénéité du matériau avec apparition de zones noires, non protéiques réparties dans le réseau qui modifie la structure globale de l'hydrogel. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus précédemment par rhéologie.

Les zones noires observées au sein de l'hydrogel devraient correspondre aux zones où de l'amidon est présent. Néanmoins, malgré de nombreux essais de marquage de l'amidon avec des colorants spécifiques des polysaccharides (fushine, concanavaleine A et lugol), la présence d'amidon au sein de l'hydrogel n'a pas pu être mise en évidence. L'hypothèse a donc été émise que les zones non marquées par l'AlexaFluor568 correspondent à des amas d'amidon.

La sensibilité de la microscopie confocale ne permet pas de déterminer la taille de maille du réseau de fibrine. La taille des amas d'amidon peut quant à elle être déterminée et est de 5 à 40 µm.

II.1.3. Fuite des précurseurs et produit d'hydrolyse de l'amidon au sein d'hydrogels à base de fibrine

Le glucose est un élément essentiel à la survie des hCSMs dans un environnement hypoxique. L'idée première du projet de recherche ANR a été d'inclure du glucose dans la préparation de l'hydrogel de fibrine, ce qui rendrait le glucose directement disponible pour les hCSMs. Cependant, le glucose est une petite molécule d'environ 1 nm de diamètre et la maille du réseau de fibrine est d'environ 10 nm. Il pourrait donc diffuser rapidement vers l'extérieur de l'hydrogel se rendant indisponible pour les cellules. Des modèles mathématiques ont alors été élaborés permettant de justifier l'utilisation d'amidon comme viscosigène. En effet, l'amidon a un rôle double. Il sert de réservoir de glucose au sein de l'hydrogel de fibrine et il doit également servir à augmenter la viscosité interne du matériau pour ralentir la fuite du glucose. Ces modèles mathématiques ont alors été étudiés expérimentalement.

a. Etude de la fuite du glucose

La diffusion de molécules de glucose au sein d'un hydrogel de fibrine ou de fibrine-amidon a été étudiée. Pour cela, des hydrogels de fibrine contenant du glucose à 20 mg/mL avec ou sans amidon à 2 ou 4% (m/v) ont été préparés. L'ajout d'amidon devrait permettre d'augmenter la viscosité interne de l'hydrogel et ainsi permettre de réduire la fuite du glucose. La cinétique de libération du glucose au sein de ces différents hydrogels est présentée ci-dessous (**Figure 65**).

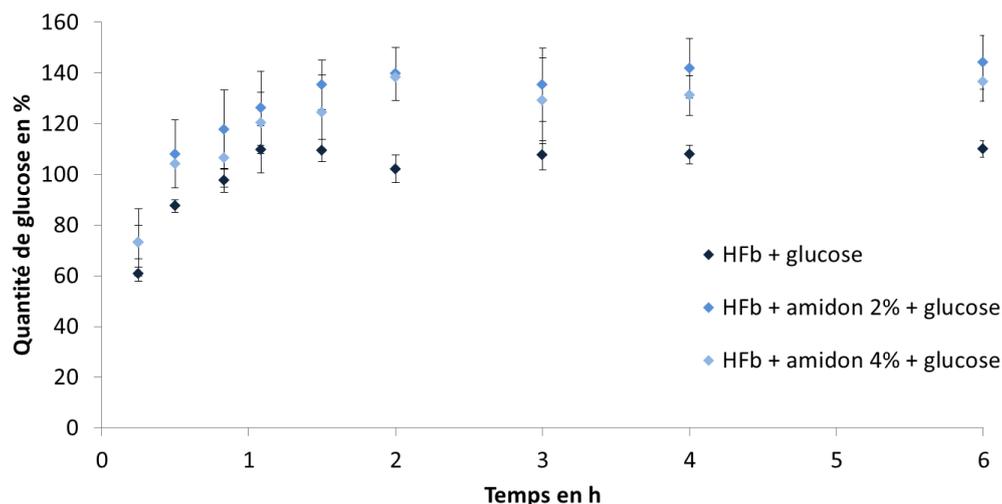


Figure 65 : Cinétique de diffusion du glucose à partir d'hydrogels à base de fibrine. Des hydrogels de 200 μ L de fibrine ou fibrine-amidon ont été préparés contenant du glucose à 20 mg/mL (fibrine à 18 mg/mL et amidon à 2 ou 4% (m/v)). Les hydrogels sont placés dans 2 mL de tampon Hepes et 200 μ L du surnageant sont prélevés puis remplacés à différents temps pour effectuer le dosage du glucose. L'expérience a été effectuée en triplicat et les écart-types sont représentés par les barres d'erreur.

Les résultats obtenus montrent qu'en moins d'une heure, la totalité du glucose introduit lors de la préparation de l'hydrogel de fibrine a diffusé hors du matériau, ce qui est en accord avec les modèles mathématiques mis au point précédemment. La même cinétique de diffusion est observée au sein des hydrogels de fibrine contenant de l'amidon à 2 ou 4%. Pourtant, les modèles mathématiques indiquaient que la présence d'amidon permettrait de réduire de plusieurs heures la fuite du glucose grâce à ses propriétés viscosigènes. Dans les cas des hydrogels de fibrine contenant de l'amidon, les valeurs de glucose libéré hors des matériaux sont supérieures à 100%. Cette valeur pourrait être due à du glucose présent dans la solution d'amidon, glucose qui serait par la suite libéré lors de cette expérience. L'erreur pourrait également être induite par l'introduction d'une solution concentrée de glucose (400 mg/mL) dans la formulation des hydrogels.

L'apport de glucose en solution directement au sein d'un hydrogel n'est donc pas une bonne alternative pour une libération contrôlée sur des temps longs. L'amidon peut néanmoins être utilisé comme source de glucose *via* une hydrolyse par une enzyme spécifique : l'AMG. En effet, l'AMG est une exo-amylase qui catalyse principalement l'hydrolyse des liaisons glucosidiques α -(1,4) successivement à partir des extrémités non réductrices de l'amidon, libérant ainsi du glucose, ce qui permettrait la production de glucose *in situ*.

b. Etude de la fuite de l'AMG

L'AMG est une enzyme qui présente un diamètre environ dix fois supérieur à celui d'une molécule de glucose (10 nm de diamètre). Elle devrait donc diffuser plus lentement hors du matériau.

Afin de pouvoir suivre la diffusion de l'AMG hors de l'hydrogel, de l'AMG marquée à l'AlexaFluor568 (AMG*) a été introduite dans la composition des hydrogels, à une concentration de 35 µg/mL. La quantité maximale d'AMG* pouvant être libérée hors du matériau a été déterminée préalablement par hydrolyse complète du réseau de fibrine par une protéase : la trypsine. Pour cela, les hydrogels sont incubés dans une solution de trypsine, pendant 1h à 37°C et l'intensité d'émission de fluorescence est mesurée à 600 nm ($\lambda_{exc} = 575$ nm) pour permettre la quantification de l'AMG*. Il a par ailleurs été vérifié par mesure d'activité et par électrophorèse SDS-PAGE que la trypsine ne dégrade pas l'AMG*. La quantité maximale d'AMG* pouvant être libérée d'un hydrogel de 200 µL est de 7 µg.

Des hydrogels de fibrine-AMG*, fibrine-amidon 2%-AMG* et fibrine-amidon 4%-AMG* ont ensuite été incubés en tampon Hepes pour suivre la cinétique de libération de l'enzyme marquée. Pour cela, l'intensité d'émission de fluorescence du surnageant est mesurée à 600 nm ($\lambda_{exc} = 575$ nm) à des temps prédéterminés (**Figure 66**).

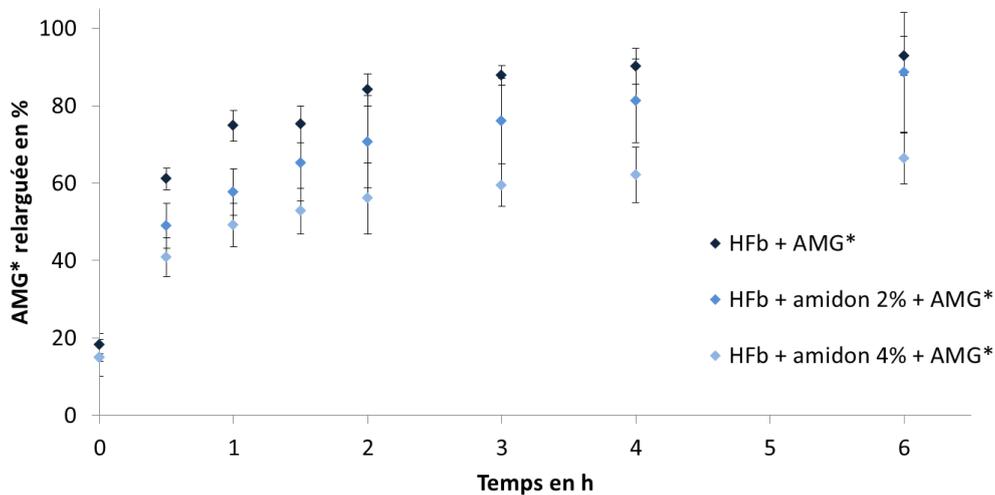


Figure 66 : Cinétique de diffusion de l'AMG* à partir d'hydrogels à base de fibrine. Des hydrogels de 200 µL de fibrine ou fibrine-amidon ont été préparés contenant de l'AMG* à 35 µg/mL (fibrine à 18 mg/mL et amidon à 2 ou 4% (m/v)). Les hydrogels sont placés dans 2 mL de tampon Hepes et 200 µL du surnageant sont prélevés à différents temps, la fluorescence mesurée à 600 nm ($\lambda_{exc} = 575$ nm) et l'échantillon replacé dans le surnageant. L'expérience a été effectuée en triplicat et les écarts types associés sont affichés. La valeur 100% correspond à la quantité maximale d'AMG* pouvant être libérée des hydrogels.

Les résultats obtenus indiquent qu'au bout d'une heure, environ 80% de l'AMG* contenue dans l'hydrogel de fibrine a diffusé hors du matériau. L'ajout d'amidon à 2% ou 4% dans la composition de l'hydrogel permet de réduire la fuite de l'AMG* à 60% et 50% respectivement. La diffusion de l'AMG hors du réseau de fibrine, dont la taille de la maille est d'environ 10 nm, est donc plus lente que celle du glucose.

De plus, l'ajout d'amidon abaisse la cinétique de diffusion de l'AMG hors de l'hydrogel en augmentant la viscosité interne du matériau. Ceci est en accord avec les modèles mathématiques mis au point précédemment. Toutefois, la diffusion de l'AMG observée de façon expérimentale est plus rapide que celle prédite par les modèles mathématiques et semble encore trop rapide pour permettre une hydrolyse progressive de l'amidon, et donc une libération de glucose sur des temps longs. L'encapsulation de l'AMG dans des nanoparticules de PLGA d'environ 250 - 300 nm pourrait alors permettre de ralentir sa libération et donc d'augmenter sa biodisponibilité dans le temps.

c. Suivi de la fuite des nanoparticules

Les nanoparticules de PLGA contenant l'AMG et synthétisées par la technique de double émulsion, présentent un diamètre d'environ 250 nm. Leur taille est donc 25 fois supérieure à celle de l'AMG et leur diffusion hors des hydrogels à base de fibrine devrait être plus lente comparé à ce qui a été précédemment observé pour l'AMG libre. Les modèles mathématiques mettaient en avant qu'au sein d'un hydrogel de fibrine ou fibrine-amidon, les nanoparticules ne diffusaient quasiment pas hors du matériau.

Pour suivre la diffusion des nanoparticules hors de l'hydrogel, du 9,10-diphénylanthracène a été introduit dans la phase organique lors de la préparation des nanoparticules. Le 9,10-diphénylanthracène est un fluorophore hydrophobe qui est piégé dans la coque de PLGA conduisant à la production de NPe fluorescentes (NPe^{diφ}). Ces NPe^{diφ} peuvent être détectées par mesure de l'intensité d'émission de fluorescence à 411 nm ($\lambda_{exc} = 376$ nm). La quantité maximale de NPe^{diφ} qui peut être libérée hors de l'hydrogel a été déterminée comme décrit précédemment, par hydrolyse complète du réseau de fibrine par la trypsine.

Des hydrogels de fibrine-NPe^{diφ}, fibrine-amidon 2%-NPe^{diφ} et fibrine-amidon 4%-NPe^{diφ} ont ensuite été incubés en tampon Hepes afin de suivre la cinétique de libération de ces nanoparticules. Pour cela, l'intensité d'émission de fluorescence du surnageant est mesurée à 411 nm ($\lambda_{exc} = 376$ nm) à des temps prédéterminés (**Figure 67**).

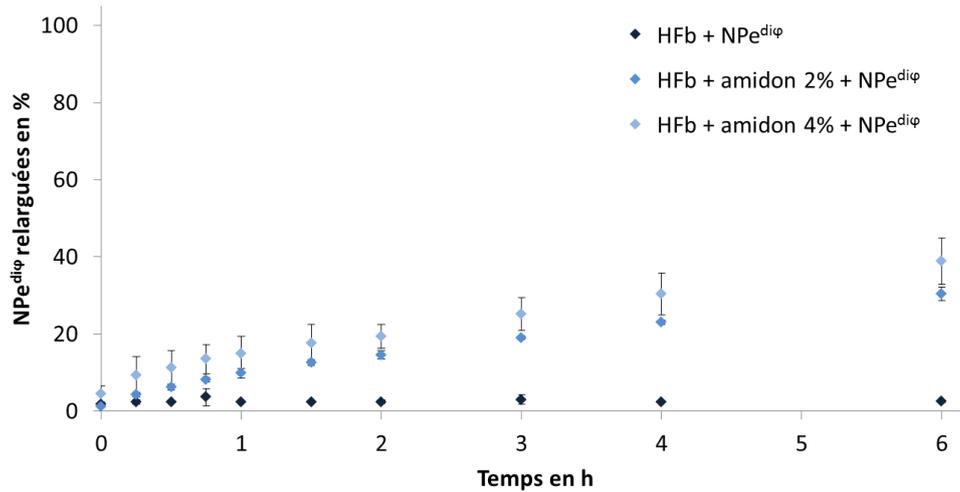


Figure 67 : Cinétique de diffusion des NPe^{diφ} à partir des hydrogels. Des hydrogels de 200 μ L de fibrine ou fibrine-amidon ont été préparés contenant des NPe^{diφ} à 2 mg/mL (fibrine à 18 mg/mL et amidon à 2 ou 4% (m/v)). Les matériaux sont placés dans 2 mL de tampon Hepes et 200 μ L du surnageant sont prélevés à différents temps, la fluorescence mesurée à 411 nm ($\lambda_{exc} = 376$ nm) et l'échantillon replacé dans le flacon. L'expérience a été effectuée en triplicat et les écart-types sont représentés par les barres d'erreur. La valeur 100% correspond à la quantité maximale de NPe^{diφ} pouvant être libérée des hydrogels.

Dans le cas de l'hydrogel de fibrine, l'intensité d'émission de fluorescence mesurée dans les surnageants est très faible (inférieure à 3%) ce qui prouve que les NPe^{diφ} ne diffusent quasiment pas hors de l'hydrogel. Ceci est en accord avec les modèles mathématiques.

Lorsque de l'amidon 2% est ajouté à la composition de l'hydrogel de fibrine, au bout d'une heure environ 10% des NPe^{diφ} ont fui hors du matériau et environ 30% au bout de 6h. Cette tendance est accentuée avec de l'amidon 4% puisque 20% des NPe^{diφ} ont fui hors de l'hydrogel en 1h et 40% en 6h. L'ajout d'amidon dans la formulation de l'hydrogel ne permet donc pas de réduire la fuite des NPe^{diφ} comparée à un gel de fibrine, mais au contraire, favorise la fuite des NPe^{diφ} hors du matériau.

La détermination des propriétés viscoélastiques du matériau ainsi que l'observation de celui-ci en microscopie confocale a mis en évidence que l'incorporation d'amidon au sein de l'hydrogel de fibrine perturbe la formation du réseau tridimensionnel de fibrine, créant une importante hétérogénéité au sein de l'hydrogel. L'hydrolyse de l'amidon par les NPe^{diφ} pourrait conduire à un hydrogel plus lâche, permettant une diffusion plus rapide des NPe^{diφ} hors du matériau comparée à celle observée pour un hydrogel de fibrine. Ainsi plus il y a d'amidon dans l'hydrogel, plus l'hétérogénéité est élevée et plus l'hydrolyse de l'amidon serait importante, conduisant à une fuite plus importante des NPe^{diφ} hors de l'hydrogel de fibrine-amidon.

Néanmoins, plus de 60% des NPe^{dip} présentes dans l'hydrogel de fibrine-amidon 2% sont retenues dans le matériau à 6h, ce qui correspond à une quantité d'AMG trois fois plus importante que lorsqu'elle est introduite sous forme libre pour la même formulation de matériau (4,2 µg d'AMG sous forme encapsulée contre 1,4 µg d'AMG sous forme libre dans un hydrogel de 200 µL). L'encapsulation de l'AMG dans des nanoparticules de PLGA permet donc d'augmenter de manière significative la quantité d'AMG disponible au sein de l'hydrogel.

La quantité d'AMG sous forme encapsulée retenue dans l'hydrogel de fibrine-amidon est supérieure à celle de l'AMG sous forme libre. Ce résultat fait des NPe un outil intéressant pour augmenter et maîtriser la biodisponibilité de l'AMG dans l'hydrogel, sans modifier les propriétés de celui-ci. De plus, l'encapsulation de l'AMG au sein de nanoparticules permettrait la production et la libération continue de glucose au sein de l'hydrogel.

II.2. Etude de la stabilité des nanoparticules

L'hydrogel de fibrine-amidon contenant de l'AMG encapsulée dans des nanoparticules de PLGA a été développé pour permettre la libération de glucose sur des temps longs, idéalement sur une période d'un mois. Il est donc important de connaître la stabilité des nanoparticules sur cette période de temps pour pouvoir prédire leur comportement en solution et en hydrogel.

II.2.1. Suivi du comportement des nanoparticules en solution

La stabilité des nanoparticules de PLGA contenant l'AMG a tout d'abord été étudiée en solution. Leurs propriétés physico-chimiques (taille, organisation et morphologie) ont été déterminées à différents temps. Cette étude a été effectuée sur une solution de NPe à 2 mg/mL préparées dans un tampon Hepes puis incubées à 37°C sur une période de 2 mois.

a. Evolution de la morphologie des nanoparticules en solution

La dégradation et l'agrégation de nanoparticules polymériques peuvent entraîner un changement de leur morphologie. L'évolution de la morphologie des nanoparticules en solution a donc été suivie au microscope électronique à balayage (MEB) sur une durée de 52 jours. Pour cela, les NPe ont été diluées à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans l'eau, déposées sur une pastille de carbone, séchées puis métallisées à l'or pour être observées après différents temps d'incubation (**Figure 68**).

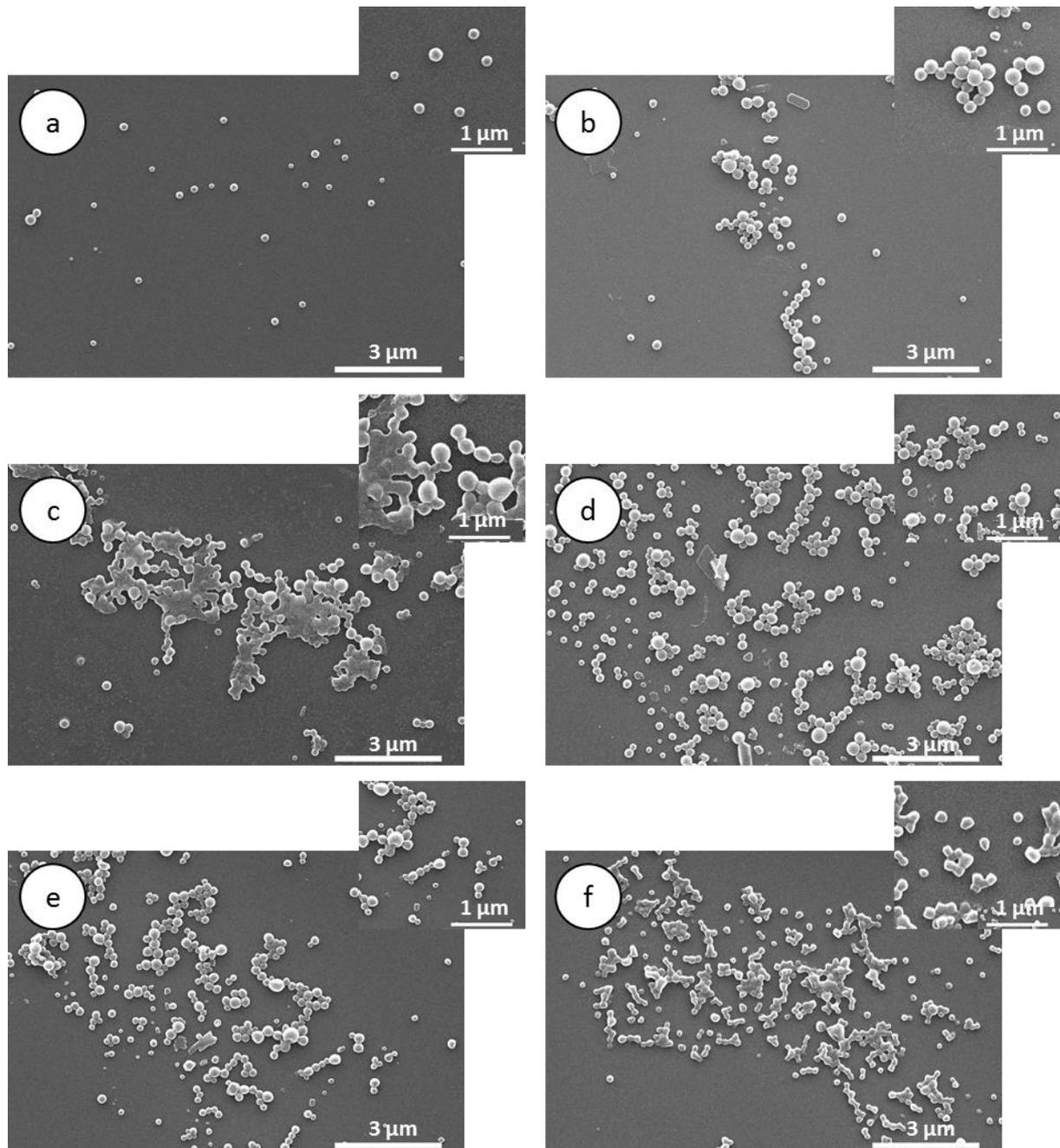


Figure 68 : Evolution de la morphologie des NPe observée en microscopie électronique à balayage. Les images représentent les NPe après différents temps d'incubation à 37°C en tampon Hepes : (a) 0, (b) 7, (c) 14, (d) 21, (e) 28 et (f) 52 jours. La barre d'échelle est de 3 μm , et celle en insert est de 1 μm . L'analyse a été effectuée à 20 kV.

Les résultats de MEB montrent que les nanoparticules s'agrègent dès 7 jours d'incubation (agrégats de quelques micromètres). La taille des agrégats ne semble pas augmenter au cours du temps mais leur nombre semble augmenter à mesure que le temps d'incubation augmente. Cette agrégation est en accord avec la neutralité des nanoparticules qui indiquait qu'elles pouvaient être sensibles à l'agrégation. De plus, les nanoparticules perdent progressivement leur forme sphérique et se déforment au cours du temps, adoptant une morphologie plus allongée. Cette différence de morphologie est très visible sur la **Figure 68.f**, correspondant à 2 mois d'incubation, où peu de nanoparticules ont maintenu une morphologie sphérique. De plus, la différence de morphologie observée n'est pas seulement due à l'agrégation des nanoparticules. En effet, la perte de la forme sphérique des nanoparticules est également visible sur des nanoparticules isolées. Ces observations indiqueraient donc que la dégradation et l'agrégation progressive des nanoparticules induiraient une déformation de celles-ci.

b. Evolution de la taille et de la répartition des nanoparticules en solution

La détermination de la taille et de l'organisation des NPe après incubation dans un tampon Hepes a été réalisée à différents temps à partir de trois méthodes différentes : la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microscopie confocale et la microscopie électronique à balayage (MEB).

Pour effectuer les mesures de DLS, les nanoparticules ont été diluées à 100 µg/mL dans un tampon Hepes. Le diamètre hydrodynamique et l'indice de polydispersité ont ensuite été déterminés à 37°C aux différents temps de l'étude et sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Temps en jours					
	0	7	14	21	28	52
Diamètre hydrodynamique moyen, Z (nm)	297	290	755	5485	2730	4850
Indice de polydispersité, PDI	0,056	0,066	0,682	1	1	1

Tableau 26 : Evolution en solution du diamètre hydrodynamique moyen (Z) et de l'indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules au cours du temps. Les mesures ont été effectuées à 37°C à partir de solution de nanoparticules à 100 µg/mL préparées dans un tampon Hepes.

Les résultats obtenus par DLS indiquent qu'à J0 et J7, les NPe représentent une population monodisperse ($PDI < 0,1$) de nanoparticules d'environ 300 nm de diamètre possédant une distribution monomodale en taille, comme décrit précédemment. Après 14 jours d'incubation, le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules augmente à 755 nm et le PDI passe à 0,68, indiquant la formation d'une population polydisperse. L'augmentation de la taille et du PDI peuvent s'expliquer par l'agrégation des nanoparticules en solution, augmentant la polydispersité de l'échantillon. A J21, J28 et J52, le diamètre hydrodynamique moyen est compris entre 2700 et 5500 nm et l'indice de polydispersité plafonne à 1. La valeur du diamètre hydrodynamique n'est pas indicative de la taille réelle des nanoparticules mais plutôt de la taille moyenne des agrégats présents en solution en raison de la forte polydispersité de ces échantillons. Ces résultats de DLS indiquent qu'entre 7 et 14 jours, les nanoparticules s'agrègent et que cette agrégation se caractérise par une augmentation progressive du diamètre hydrodynamique moyen et du PDI. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus par MEB, même si dans ce cas une agrégation semble visible dès 7 jours.

Pour confirmer l'agrégation des nanoparticules en solution, des nanoparticules dont la coque a été marquée par du 9,10-diphénylanthracène (NPe^{diq}) ont été utilisées comme décrit précédemment. Ces nanoparticules ont ensuite été observées au microscope confocal après différents temps d'incubation à une concentration de 2 mg/mL (**Figure 69**).

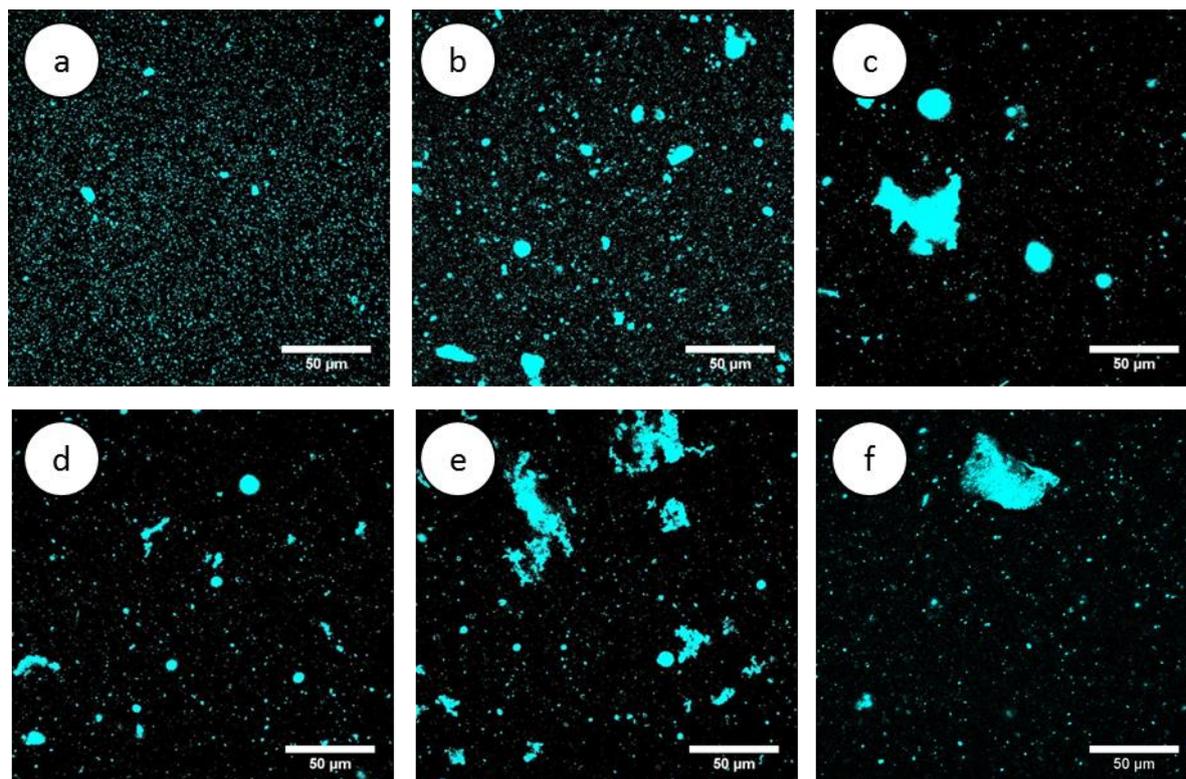


Figure 69 : Observation en microscopie confocale des NPe^{diop} en solution à différents temps d'incubation. Les NPe ont été marqués au diphénylanthracène puis observées au microscope confocal à un grossissement x400, par dépôt d'une solution de nanoparticules à 2 mg/mL à différents temps d'incubation : (a) 0, (b) 7, (c) 14, (d) 21, (e) 28 et (f) 52 jours. Une diode à 405 nm a été utilisée, et la barre d'échelle est de 50 µm.

Les observations au microscope confocal mettent en évidence qu'à J0, les nanoparticules semblent monodisperses et de taille nanométrique. Après 7 jours d'incubation, de petits agrégats de nanoparticules de quelques micromètres à une dizaine de micromètres apparaissent. Après 14, 21 et 28 jours d'incubation à 37°C, la taille de ces agrégats augmente allant jusqu'à atteindre 40 µm pour certains. Après 2 mois d'incubation, de gros agrégats sont toujours présents mais ils semblent moins nombreux, indiquant que ces agrégats pourraient s'être dégradés. L'apparition de ces agrégats dès J7 est cohérente avec les observations effectuées par MEB.

A partir des images obtenues par MEB (**Figure 68**), la taille moyenne de nanoparticules isolées et agrégées a été mesurée à J0, J28 et J52 à l'aide du logiciel d'analyse d'images ImageJ et est présentée dans le tableau ci-dessous :

	Temps en jours		
	0	28	52
Diamètre des NPe	232,1 ± 53,8	208,3 ± 52,6	171,1 ± 29,8

Tableau 27 : Evolution du diamètre des nanoparticules observées par MEB. Environ 100 nanoparticules ont été mesurées sur les images de MEB présentées précédemment.

Les résultats obtenus mettent en évidence une diminution du diamètre des nanoparticules. En effet, entre J0 et J52, les nanoparticules ont leur diamètre qui a diminué d'environ 60 nm, correspondant à une perte moyenne d'environ 25% de leur taille. Cette diminution de taille peut correspondre à l'érosion progressive des nanoparticules et donc à leur dégradation.

L'étude de la stabilité des nanoparticules en solution effectuée par DLS, microscopie confocale et MEB a permis de mettre en évidence que les NPs ont tendance à s'agréger dès 7 à 14 jours d'incubation, et qu'une forte agrégation est observée à partir de 14 jours. Cette agrégation se traduit par une augmentation de l'indice de polydispersité et conduit à l'augmentation du diamètre hydrodynamique moyen de l'échantillon. Ce phénomène d'agrégation observé est en accord avec les mesures de potentiel zêta effectuées précédemment. En effet, les nanoparticules ne présentent pas de charge apparente dans la solution d'étude. Elles auront donc tendance à s'agréger puisqu'aucune répulsion n'existe entre les nanoparticules. Il a également été observé que la taille des nanoparticules isolées ou contenues dans les agrégats diminue d'environ 25% après 52 jours d'incubation, correspondant à une érosion progressive des nanoparticules, ce qui indiquerait qu'elles commencent à se dégrader. De plus, la morphologie de ces nanoparticules évolue au cours du temps passant d'une forme sphérique à une forme allongée, confirmant ainsi la dégradation progressive des nanoparticules en solution. Cependant, ces résultats indiquent que la dégradation complète des nanoparticules de PLGA contenant l'AMG nécessiterait plus de 2 mois.

II.2.2. Etude du comportement des nanoparticules contenues dans des hydrogels

Dans le cadre du projet de recherche ANR, les nanoparticules sont utilisées au sein d'un hydrogel de fibrine enrichi en amidon et doivent permettre la production et la libération de glucose afin

d'améliorer la survie des hCSMs. Pour cela, l'étude de la stabilité des NPe au sein d'hydrogels a été effectuée sur des hydrogels de fibrine (18 mg/mL) et des hydrogels de fibrine-amidon 2% (m/v) contenant des NPe à 2 mg/mL sur 14 jours. Ce temps correspond à celui qui a été utilisé pour effectuer la preuve de concept de la biofonctionnalité du biomatériau *in vitro* et *in vivo*.

a. Suivi de l'organisation des nanoparticules au sein d'hydrogels

La répartition des nanoparticules au sein des hydrogels a été observée grâce à l'utilisation des NP et des NPe dont la coque a été marquée par du 9,10-diphénylanthracène (NP^{diφ} et NPe^{diφ}) comme décrit précédemment. Le réseau protéique de fibrine a été marqué post-synthèse à l'AlexaFluor568 comme décrit précédemment et les hydrogels ont ensuite été observés en microscopie confocale.

La stabilité du réseau de fibrine dans les hydrogels de fibrine et fibrine-amidon a tout d'abord été étudiée (**Figure 70**).

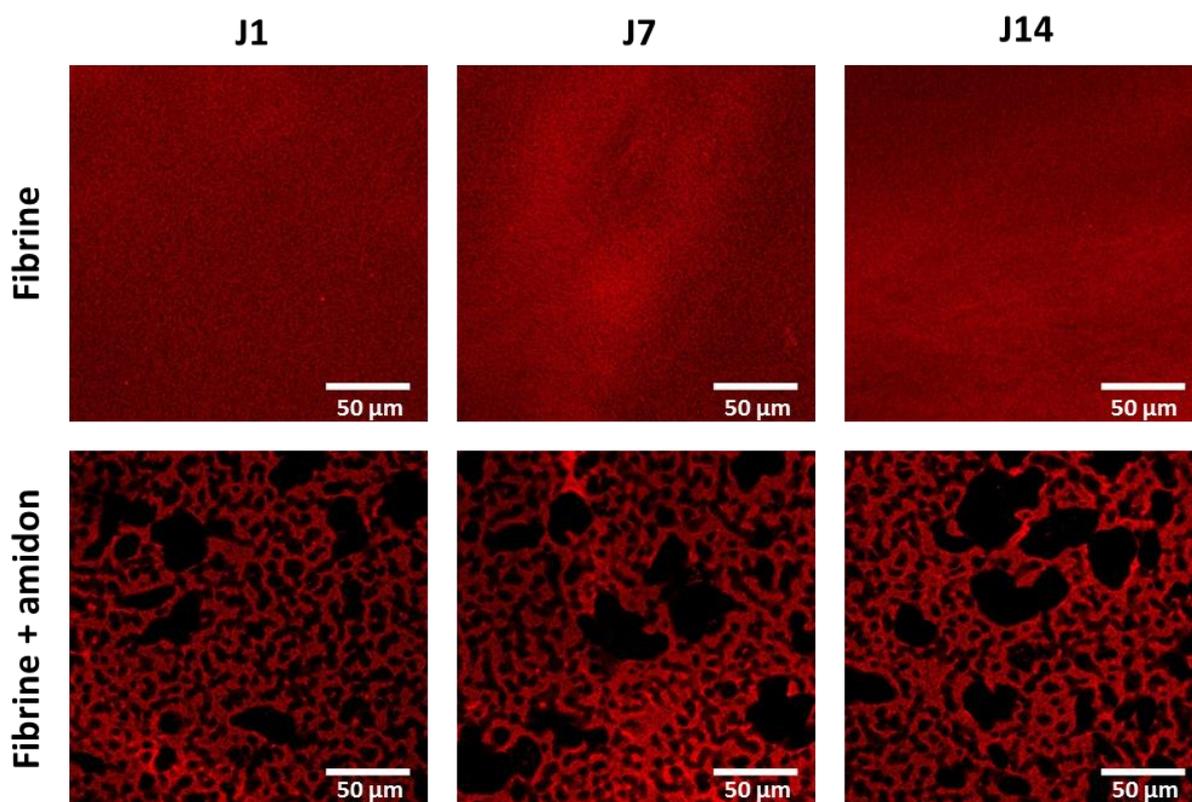


Figure 70 : Stabilité des hydrogels de fibrine et fibrine-amidon observée en microscopie confocale. Les hydrogels de fibrine (18 mg/mL) et fibrine-amidon 2% (m/v) ont été marqués à l'AlexaFluor568 post-synthèse puis observés au microscope confocal à différents temps avec un grossissement de x400. Le laser utilisé est un laser DPSS à 561 nm, la barre d'échelle est de 50 µm.

Comme observé précédemment, l'hydrogel de fibrine est composé d'un réseau régulier de fibres denses et homogènes. L'ajout d'amidon dans la formulation du matériau induit une hétérogénéité et l'apparition de blocs non protéiques répartis de manière hétérogène dans le réseau. Néanmoins après 7 ou 14 jours d'incubation en tampon Hepes contenant 150 mM de NaCl et 20 mM de CaCl₂ (tampon Hepes et sels), la structure de ces réseaux reste identique, indiquant que ces réseaux ainsi que le marquage fluorescent sont stables au cours du temps.

La stabilité des nanoparticules au sein des hydrogels a ensuite été étudiée, en commençant par l'hydrogel de fibrine (**Figure 71**).

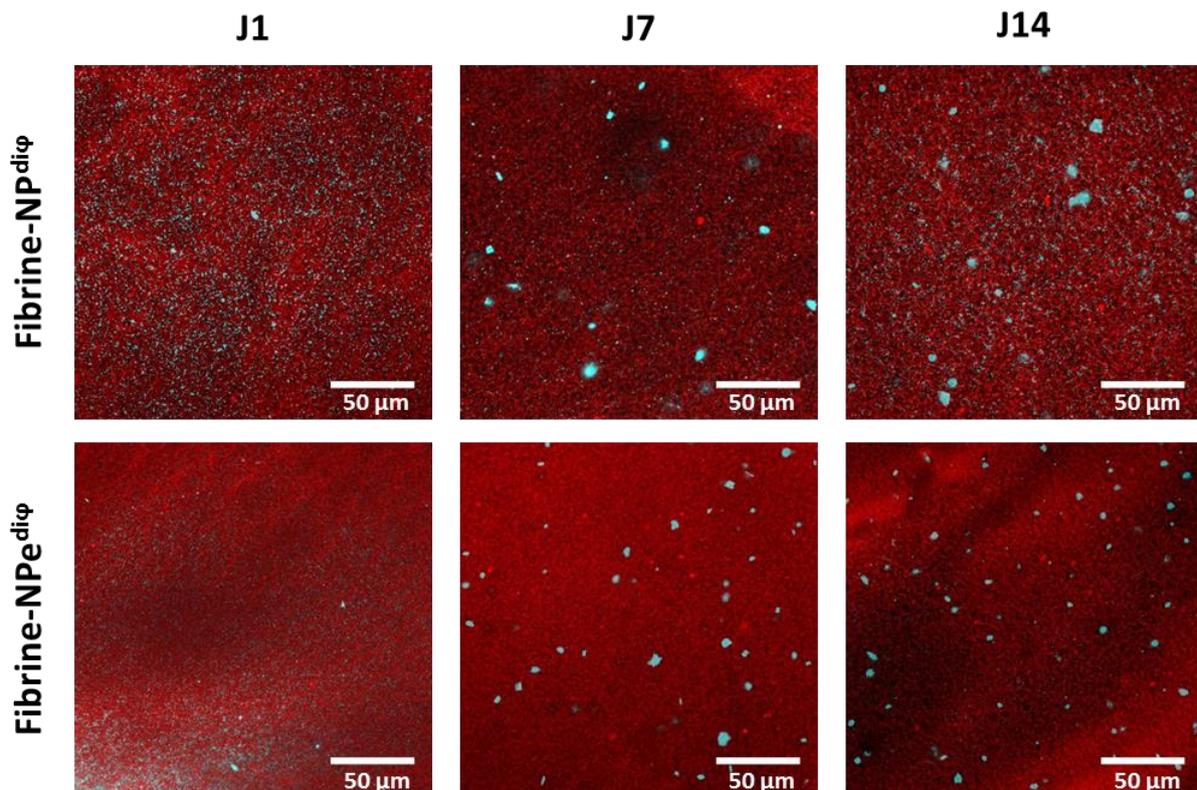


Figure 71 : Stabilité des nanoparticules au sein de l'hydrogel de fibrine observée en microscopie confocale. Les hydrogels de fibrine (18 mg/mL) contenant des NP^{diφ} et des NPe^{diφ} à 2 mg/mL ont été marqués post-synthèse à l'AlexaFluor568 puis observés au microscope confocal à différents temps avec un grossissement de x400. Pour le marquage à l'AlexaFluor568, le laser utilisé est un laser DPSS à 561 nm, pour les NP^{diφ} et les NPe^{diφ}, une diode à 405 nm a été utilisée. La barre d'échelle est de 50 μm.

Ces résultats montrent qu'à J1, les nanoparticules (NP^{diφ} et NPe^{diφ}) forment une population monodisperse et sont réparties de manière homogène au sein de l'hydrogel. A partir de 7 jours d'incubation à 37°C, des agrégats de nanoparticules de quelques micromètres apparaissent au sein du réseau de fibrine, comme observé précédemment lors de l'étude de la stabilité des nanoparticules en solution. Cependant, la taille des agrégats n'augmente pas à J14 contrairement à

ce qui a été observé lors de l'étude en solution. L'hydrogel de fibrine, pourrait donc servir de barrière physique entre les nanoparticules/agrégats et ainsi éviter d'augmenter l'agrégation des nanoparticules au cours du temps. Cette analyse est valable aussi bien pour les NP^{diφ} que pour les NPe^{diφ}, indiquant que l'encapsulation de l'AMG dans des nanoparticules de PLGA ne modifie pas leur comportement au sein d'un hydrogel de fibrine.

La répartition des NP^{diφ} et des NPe^{diφ} a ensuite été étudiée au sein de l'hydrogel de fibrine-amidon (Figure 72).

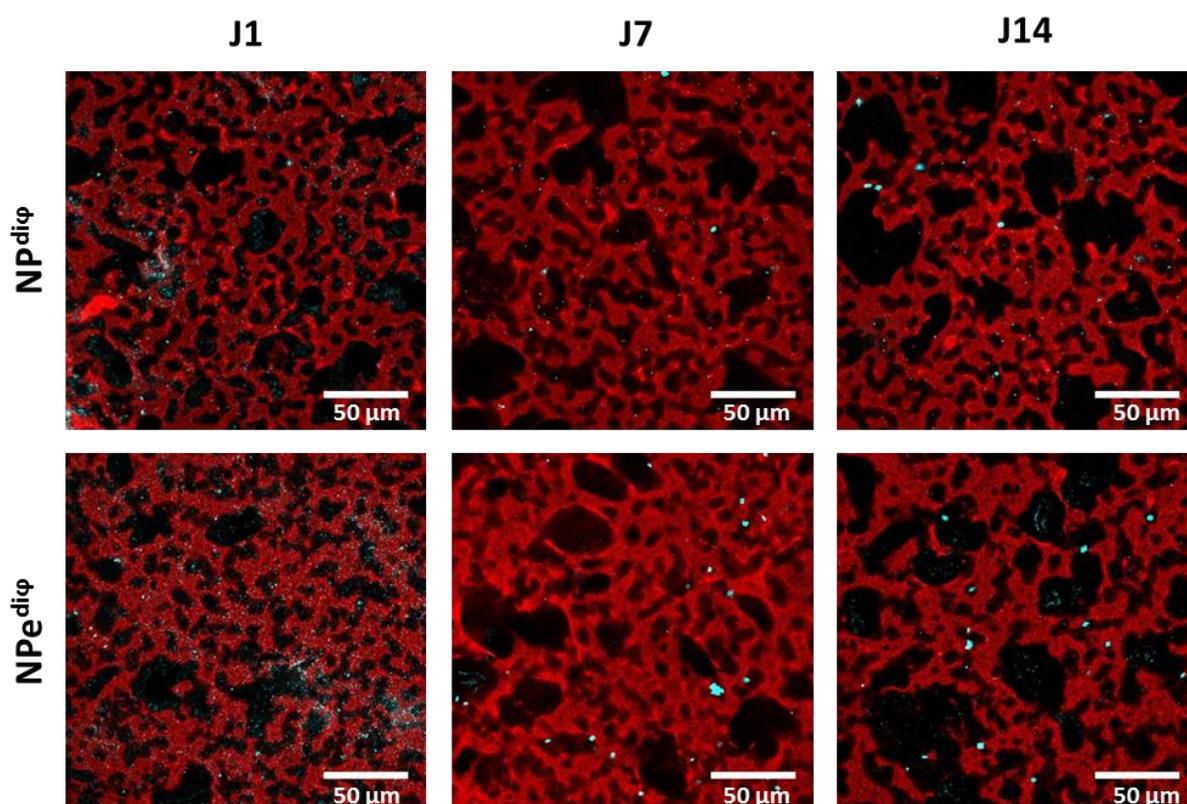


Figure 72 : Stabilité des nanoparticules au sein de l'hydrogel de fibrine-amidon observée en microscopie confocale. Les hydrogels de fibrine-amidon (respectivement 18 mg/mL et 2% (m/v)) contenant des NP^{diφ} et des NPe^{diφ} à 2 mg/mL ont été marqués post-synthèse à l'AlexaFluor568 puis observés au microscope confocal à différents temps avec un grossissement de x400. Pour le marquage à l'AlexaFluor568, le laser utilisé est un laser DPSS à 561 nm, pour les NP^{diφ} et NPe^{diφ}, une diode à 405 nm a été utilisée. La barre d'échelle est de 50 μm.

Les observations de microscopie confocale indiquent qu'à J1, les nanoparticules (NP^{diφ} et NPe^{diφ}) sont réparties de façon homogène au sein de l'hydrogel de fibrine-amidon, aussi bien dans le réseau de fibrine que dans les amas d'amidon. Après 7 jours d'incubation, des agrégats de quelques micromètres sont observés et la taille de ses agrégats n'augmente pas à J14, comme observé dans un hydrogel de fibrine. La présence d'amidon dans la formulation de l'hydrogel ne semble donc pas

modifier le profil d'agrégation des nanoparticules au cours du temps. Il est important de noter que la microscopie confocale ne permet pas une analyse fine de la taille des agrégats.

Ces résultats obtenus semblent être identiques pour les NP^{diφ} et les NPe^{diφ} démontrant que l'encapsulation de l'AMG ne semblerait pas affecter l'agrégation de ces nanoparticules. Pourtant l'AMG devrait permettre l'hydrolyse de l'amidon pouvant conduire à une modification de la structure interne de l'hydrogel après quelques jours. Cette hydrolyse permettrait alors l'obtention d'un réseau plus lâche et une plus grande possibilité de diffusion des agrégats dans l'hydrogel. Ces résultats pourraient peut-être s'expliquer par une faible hydrolyse de l'amidon présent au sein de l'hydrogel après 14 jours d'incubation.

b. Suivi de la morphologie des nanoparticules contenues dans des hydrogels

L'étude morphologique des nanoparticules effectuée en solution a permis de mettre en évidence une évolution progressive d'une forme sphérique vers une forme allongée. Il est donc intéressant de déterminer si ce changement morphologique peut également être observé lorsque les nanoparticules sont contenues dans un hydrogel.

Pour cela, des hydrogels de fibrine et fibrine-amidon contenant des NPe ont été préparés puis dégradés par incubation de l'hydrogel dans une solution de trypsine. Les échantillons sont ensuite dilués dans l'eau, déposés sur une pastille de carbone, séchés, puis métallisés à l'or pour être observés au MEB (**Figure 73**).

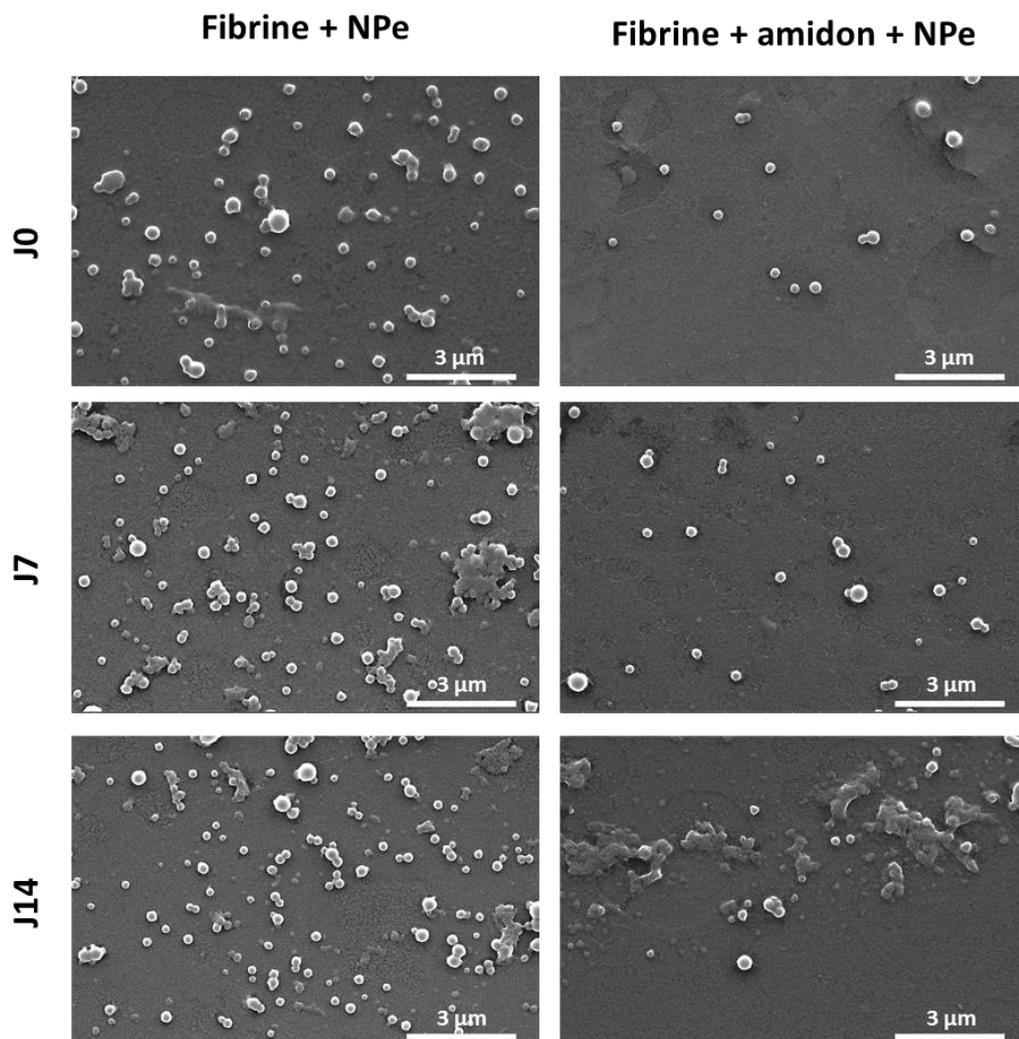


Figure 73 : Evolution de la morphologie des NPe ayant été contenues dans des hydrogels, observée en microscopie électronique à balayage. Les images représentent les NPe ayant été contenues dans des hydrogels de fibrine ou fibrine-amidon après différents temps d'incubation à 37°C. La barre d'échelle est de 3 μm. L'analyse a été effectuée à 20 kV.

Le protocole expérimental mis en place permet bien d'observer au MEB les nanoparticules contenues initialement dans les hydrogels de fibrine et de fibrine-amidon. Cependant, les nanoparticules semblent recouvertes, modifiant leur morphologie. Cette différence est sûrement due à la présence de protéines (fibrine et trypsine) dans l'échantillon, qui pourrait former une couche protéique autour des nanoparticules.

Il est tout de même important d'observer que des différences sont visibles entre les nanoparticules contenues dans l'hydrogel de fibrine et celles contenues dans l'hydrogel de fibrine-amidon. Il semblerait que les NPe contenues dans l'hydrogel de fibrine s'agrègent dès 7 jours d'incubation, alors que celles contenues dans l'hydrogel de fibrine-amidon semble s'agréger à partir de 14 jours.

Cette différence pourrait s'expliquer par la différence de quantité de NPe présentes au sein de l'hydrogel. En effet, d'après ces observations de MEB, les nanoparticules contenues dans l'hydrogel de fibrine-amidon semblent moins nombreuses que celles contenues dans l'hydrogel de fibrine. Ceci semble logique puisqu'il a été montré précédemment que dans l'hydrogel de fibrine, la quasi-totalité des nanoparticules restent piégées au sein du réseau, alors qu'en présence d'amidon, 40% des nanoparticules ont été libérées de l'hydrogel au bout de 6h.

De plus, après 14 jours d'incubation, les NPe contenues dans l'hydrogel de fibrine-amidon semblent être plus agrégées que celles contenues dans l'hydrogel de fibrine. Cette différence d'agrégation peut s'expliquer par le fait que l'ajout d'amidon dans la formulation de l'hydrogel conduit à une augmentation de l'hétérogénéité du matériau et que, l'amidon présent au sein de cet hydrogel peut être hydrolysé, même partiellement par l'AMG présente dans les NPe, créant de plus grands espaces de diffusion pour ces nanoparticules.

L'étude du comportement des nanoparticules d'un point de vue de leur stabilité a permis de mettre en évidence que, de par leur neutralité, les nanoparticules ont tendance à s'agréger.

En solution, les nanoparticules s'agrègent vers 7 à 14 jours d'incubation, avec un pic d'agrégation atteint après 14 jours. Cette agrégation est caractérisée par une augmentation du diamètre hydrodynamique moyen et de l'indice de polydispersité des nanoparticules ainsi que par une modification de leur morphologie. Par ailleurs, il a été observé par MEB que la taille des nanoparticules isolées ou contenues dans les agrégats diminue au cours du temps, indiquant que les nanoparticules se dégradent progressivement.

En hydrogel, les nanoparticules s'agrègent également vers 7 jours d'incubation, mais la taille des agrégats ne semble pas augmenter entre 7 et 14 jours. En effet, il a été observé que les agrégats formés au sein des hydrogels semblent plus petits que ceux observés en solution, indiquant que le réseau de fibrine pourrait ralentir l'agrégation des nanoparticules observée en solution. Cependant, des différences semblent être observées entre les NPe contenues dans l'hydrogel de fibrine et celles contenues dans l'hydrogel de fibrine-amidon. En effet, l'agrégation des NPe au sein de l'hydrogel de fibrine-amidon semble plus importante. Cela pourrait s'expliquer par l'hydrolyse de l'amidon par les NPe qui conduirait à un réseau plus lâche, permettant aux NPe de diffuser plus facilement au sein de l'hydrogel et ainsi de faciliter leur agrégation.

II.3. Production de glucose par l'AMG libre ou encapsulée

L'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules doit permettre la production de glucose au sein d'un hydrogel de fibrine-amidon sur 1 mois. L'étude et la comparaison de la production de glucose par l'AMG sous forme libre ou encapsulée est donc un paramètre important à déterminer pour mettre en avant l'intérêt de l'utilisation des NPe.

II.3.1. Influence des conditions expérimentales sur l'activité de l'AMG

L'activité d'une enzyme est dépendante de nombreux paramètres tels que la température, le pH ou encore le temps de stockage... Il est donc important de vérifier que l'activité de l'AMG n'est pas modifiée suite aux étapes nécessaires à son encapsulation et que l'enzyme reste active sur des temps longs, permettant ainsi une hydrolyse prolongée de l'amidon.

a. Influence des étapes de sonication sur l'activité de l'AMG

Pour produire les NPe, deux étapes de sonication de 3 fois 10 s à 30% d'amplitude effectuées dans la glace sont nécessaires. L'effet de ces étapes de sonication sur l'activité catalytique de l'AMG a donc été étudié.

Pour cela, l'activité de l'AMG a été mesurée après une étape de sonication (sonication 1) et après deux étapes de sonication (sonication 2). Ces différents traitements sont effectués sur une solution d'AMG à 600 µg/mL, ce qui correspond à la concentration d'AMG introduite lors de la synthèse des nanoparticules. La cinétique de production de glucose pour les différents échantillons d'AMG est présentée en **Figure 74**.

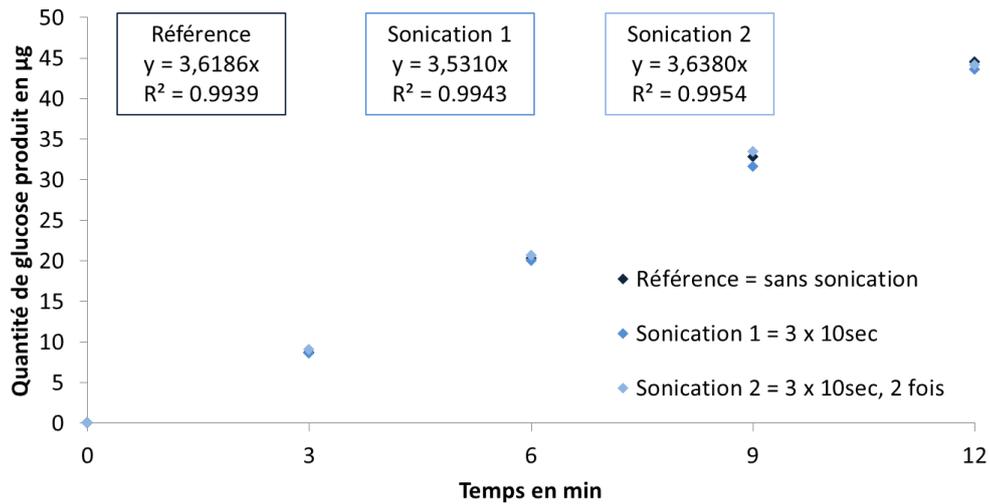


Figure 74 : Cinétiques de production de glucose par l'AMG avec ou sans sonication. 1,2 µg d'AMG ayant subi ou non une ou deux étapes de sonication est incubé avec 1 mL d'amidon à 0,5% (m/v) préparé dans un tampon Hepes. A t = 0, 3, 6, 9 et 12 min, du TCA a été ajouté. La quantité de glucose produite a été tracée en fonction du temps. L'équation des courbes de tendance ainsi que leur coefficient de détermination R^2 sont affichés dans les encadrés.

Les résultats montrent que la cinétique de production de glucose est identique pour l'AMG ayant subi ou non des étapes de sonication et l'activité catalytique calculée est de l'ordre de 16 U/mg dans tous les cas. La sonication n'a donc aucune influence sur l'activité catalytique de l'enzyme.

b. Détermination de l'activité résiduelle de l'AMG au cours du temps

L'hydrolyse de l'amidon au sein des hydrogels doit permettre la libération de glucose sur des temps longs, allant jusqu'à un mois. Il est donc important de s'assurer que l'AMG reste active sur cette période de temps. Pour cela, la cinétique de production de glucose par l'AMG a été déterminée après différents temps de stockage à 37°C. La méthode de détermination de l'activité de l'AMG a été effectuée comme décrit précédemment par incubation d'une quantité connue d'AMG (1,26 µg) dans une solution d'amidon à 0,5% (m/v). La cinétique de production du glucose à différents temps a ensuite été tracée (**Figure 75**).

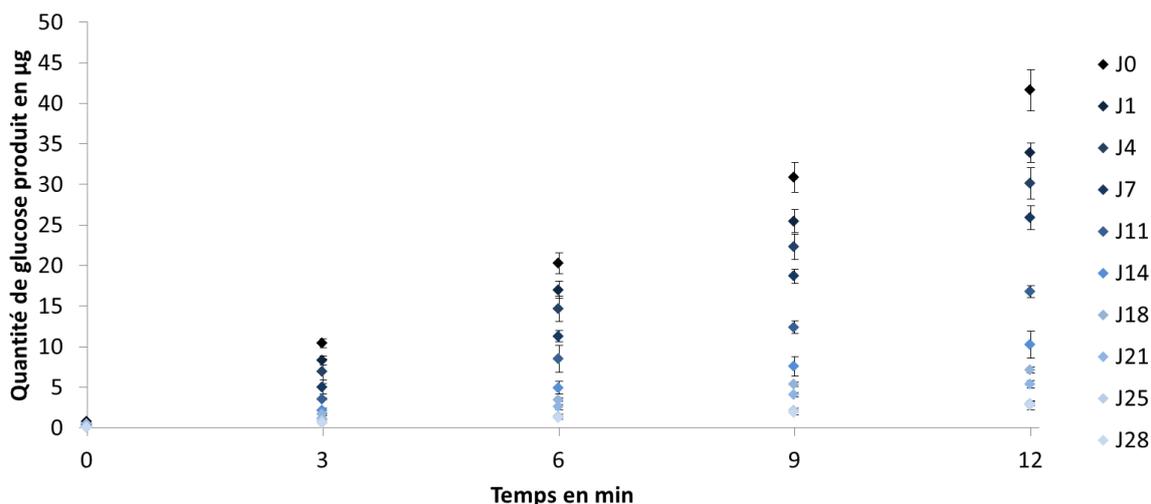


Figure 75 : Evolution des cinétiques de production de glucose par l'AMG stockée à 37°C. 1,26 µg d'AMG a été incubé avec 1 mL d'amidon à 0,5% (m/v) préparé dans un tampon Hepes. A t = 0, 3, 6, 9 et 12 min, du TCA a été ajouté. La quantité de glucose produit a été déterminée puis tracée en fonction du temps. L'expérience a été effectuée 3 fois et les écarts types associés sont affichés.

Ces cinétiques de production de glucose mettent en évidence une production linéaire de glucose par l'AMG sur 12 min. Cependant, une diminution de la pente de ces cinétiques est observée au cours du temps, montrant une diminution de l'activité de l'AMG à mesure que le temps de stockage augmente. A partir de ces cinétiques de production de glucose, l'activité restante, également appelée activité résiduelle, a donc été déterminée et tracée en fonction du temps (**Figure 76**).

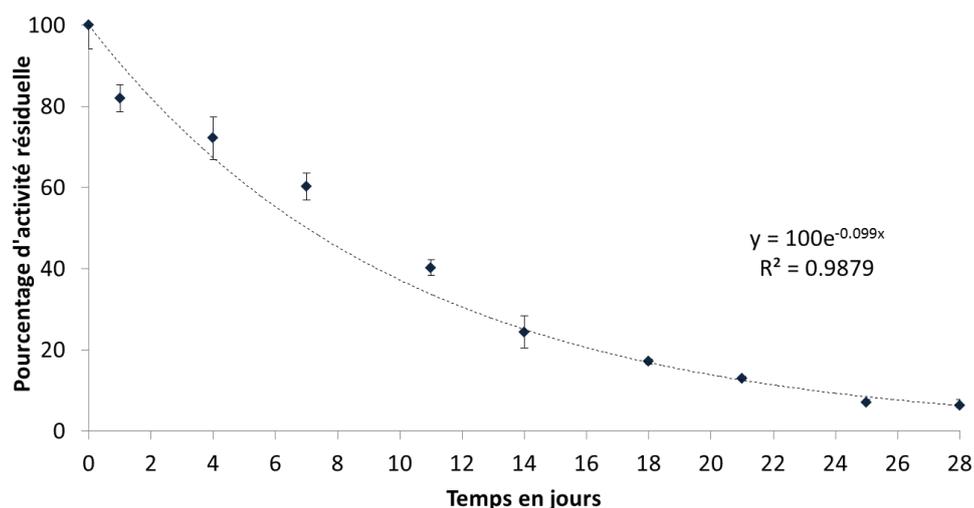


Figure 76 : Evolution de l'activité résiduelle de l'AMG au cours du temps à 37°C. Les activités ont été calculées à partir des cinétiques de production de glucose présentées précédemment et sont exprimées par rapport à l'activité à J0. L'expérience a été effectuée 3 fois et les écart-types sont représentés par les barres d'erreur. Les valeurs expérimentales ont été ajustées à l'équation d'une exponentielle décroissante.

Après 28 jours d'incubation à 37°C, l'AMG en solution a perdu plus de 90% de son activité. L'activité résiduelle d'une enzyme suit une décroissance exponentielle qui peut être exprimée de la manière suivante :

$$A_r(t) = A_0^{-k_d t}$$

- $A_r(t)$: activité résiduelle de l'AMG à un temps t
- A_0 : activité initiale de l'AMG
- k_d : constante de vitesse de dénaturation de l'AMG à 37°C en jour⁻¹
- t : temps d'exposition de l'AMG à 37°C en jours

Dans le cas de l'AMG, l'équation est $y = 100e^{-0,099x}$. La constante de vitesse de dénaturation de l'AMG à 37°C est donc de 0,099 jour⁻¹. A partir de cette constante, le temps de demi-vie ($t_{1/2}$ exprimé en jours) de l'AMG à 37°C peut être calculé de la manière suivante :

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{k_d}$$

Le temps de demi-vie de l'AMG à 37°C est donc de 7 jours. Cela signifie qu'après 7 jours d'incubation à 37°C dans un tampon Hepes, l'AMG a perdu 50% de son activité. L'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules de PLGA aurait donc un double intérêt : réduire la diffusion de l'AMG hors des hydrogels et protéger l'AMG en empêchant une perte d'activité de l'enzyme.

II.3.2. Suivi de la production de glucose par l'AMG libre ou encapsulée en solution

L'intérêt de l'utilisation des NPe serait de permettre une production progressive de glucose. La cinétique de production de glucose de l'AMG encapsulée a été effectuée en solution puis comparée à celle de l'AMG sous forme libre.

L'amidon est un polymère de glucose contenant des liaisons glucosidiques α -(1,4) et α -(1,6), donc si l'amidon est hydrolysé totalement, 1 mg d'amidon permet la production de 1 mg de glucose. C'est-à-dire qu'une solution d'amidon à 20 mg/mL (correspondant à 2% (m/v)) permet au maximum la production d'une solution de glucose à 20 mg/mL.

L'AMG hydrolyse préférentiellement les liaisons glucosidiques α -(1,4) par les extrémités non réductrices libérant une unité de glucose, mais présente également une activité d'hydrolyse des liaisons glucosidiques α -(1,6) pour permettre le débranchement de l'amidon qui est beaucoup plus lente. La quantité maximale de glucose produite par l'AMG a donc été déterminée expérimentalement. De plus, pour vérifier que l'hydrolyse de l'amidon par l'AMG est totale, deux autres enzymes ont également été utilisées. L' α -amylase permet l'hydrolyse aléatoire des liaisons glucosidiques α -(1,4) et la pullulanase hydrolyse l'amidon au niveau des liaisons glucosidiques α -(1,6). L'utilisation de ces deux enzymes associées à l'AMG devrait permettre l'hydrolyse totale de l'amidon et ainsi la détermination de la quantité maximale de glucose produite expérimentalement à partir d'amidon.

Pour cela, 20 mg d'amidon préparés dans un tampon Hepes ont été incubés avec un excès d'AMG ou avec un excès d'AMG, d' α -amylase et de pullulanase. Ces différentes solutions ont été placées à 60°C, température optimale d'activité pour ces différentes enzymes, pour une durée de 4 jours pour permettre l'hydrolyse totale de l'amidon. La suite du protocole est identique à celui utilisé précédemment pour déterminer l'activité de l'AMG. La quantité de glucose produite a été déterminée et les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	AMG seule			AMG, α -amylase et pullulanase		
Quantité de glucose produite (mg)	20,39	18,92	19,52	19,06	19,32	21,51
Moyenne de glucose produit (mg)	19,61 \pm 0,74			19,97 \pm 1,36		
% de glucose produit par rapport à la valeur théorique	98,1 \pm 3,7			99,8 \pm 6,8		

Tableau 28 : Quantités maximales de glucose produit par hydrolyse de l'amidon par l'AMG ou un cocktail d'enzymes. De l'AMG ou un cocktail d'enzymes a été incubé à 60°C avec 1 mL d'amidon à 2% (m/v) préparé dans un tampon Hepes. Après 4 jours d'incubation à 60°C, du TCA a été ajouté. La quantité de glucose produit a été déterminée à l'aide d'un kit glucose. L'expérience a été effectuée trois fois et les valeurs moyennes obtenues sont présentées.

La quantité maximale théorique produite par 20 mg d'amidon est de 20 mg de glucose correspondant à 100% de glucose produit. D'un point de vue expérimental, lors de l'ajout d'AMG à 20 mg d'amidon, 19,61 \pm 0,74 mg de glucose sont produits soit environ 98% de la quantité maximale théorique. Lors de l'ajout d'un cocktail d'enzymes permettant l'hydrolyse complète de l'amidon (AMG, α -amylase et pullulanase), 19,97 \pm 1,36 mg de glucose sont produits soit environ 99% de la

quantité maximale théorique. Cette expérience met en évidence que la présence seule d'AMG dans une solution d'amidon permet l'hydrolyse totale de celui-ci sur un temps long.

Une étude cinétique de la production de glucose par l'AMG sous forme libre et encapsulée a ensuite été effectuée. Pour cela, une solution d'amidon à 2% (m/v) a été utilisée. Différentes solutions d'AMG (libre ou encapsulée) ont été introduites dans ces solutions d'amidon :

- des nanoparticules (NP et NPe) à 2 mg/mL, les NP servant ainsi de nanoparticules témoin
- une solution d'AMG à 35 µg/mL (AMG 1X), correspondant à la même quantité d'AMG encapsulée dans des NPe à 2 mg/mL
- une solution d'AMG à 1,75 µg/mL (AMG 0.05X), correspondant au 1/20 de la quantité d'AMG encapsulée dans des NPe à 2 mg/mL

Ces différents échantillons ont été préparés dans un tampon Hepes et incubés à 37°C pendant 2 mois. La quantité de glucose a été déterminée comme décrit précédemment et les différentes cinétiques de production de glucose ont été obtenues (**Figure 77**).

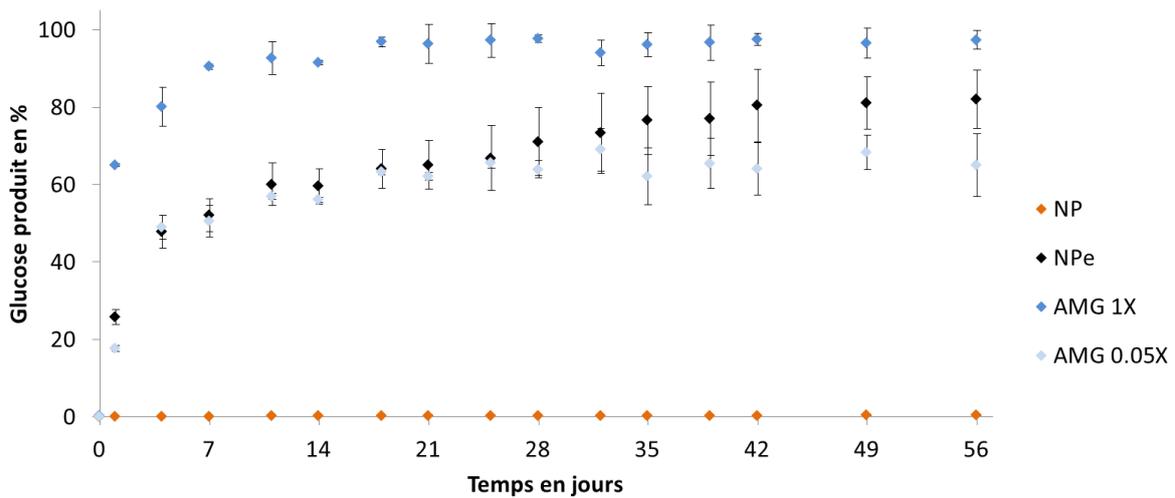


Figure 77 : Cinétiques de production de glucose par l'AMG libre ou encapsulée en solution. 2 mg de nanoparticules (NP et NPe), 35 µg d'AMG (AMG 1X) ou 1,75 µg d'AMG (AMG 0.05X), ont été incubés avec 1 mL d'amidon à 2% (m/v) préparé dans un tampon Hepes à 37°C. A des temps prédéterminés, du TCA a été ajouté. La quantité glucose produit a été tracée en fonction du temps. L'expérience a été effectuée en n = 3 pour AMG 1X et AMG 0.05X et en n = 6 pour NP et NPe (6 lots différents de nanoparticules utilisés). Les écarts types associés sont affichés.

Les nanoparticules témoin (NP) ne permettent pas de production de glucose, indiquant que sans AMG, aucune molécule de glucose n'est produite par hydrolyse spontanée de l'amidon.

L'ajout d'AMG 1X dans une solution d'amidon permet une production importante de glucose dès les premiers jours d'incubation. En effet, à J1, plus de 60% de glucose a été produit. Après 7 jours d'incubation, la production de glucose par l'AMG 1X est arrivée à un plateau correspondant à la quantité maximale de glucose pouvant être produite. L'AMG 1X permet donc une production de glucose immédiate et importante mais sur une durée courte (7 jours).

L'ajout d'AMG 0.05X dans une solution d'amidon permet une production moindre de glucose comparée à celle de l'AMG 1X. En effet, après 1 jour d'incubation, l'AMG 0.05X n'a produit que 20% de glucose. Cependant, un plateau est atteint à J14 correspondant à environ 60% de la quantité maximale de glucose qui peut être produit. Ce résultat met donc en évidence la perte d'activité de l'AMG au cours du temps. En effet, même si de l'amidon est encore présent dans la solution, l'activité résiduelle de l'AMG n'est pas suffisante pour l'hydrolyser conduisant à une phase plateau de production de glucose.

L'ajout de NPe dans la solution d'amidon permet une production de glucose semblable à celle observée pour l'AMG 0.05X dans les premiers jours d'incubation. En effet, après 1 jour d'incubation, les NPe ont produit 20% de glucose, et après 14 jours d'incubation, cette quantité représente 60%. Cependant, cette quantité continue d'augmenter jusqu'à atteindre, après 1 mois et demi d'incubation, une valeur d'environ 80%, valeur à laquelle la production de glucose semble avoir atteint un plateau. Ces résultats indiquent que l'ajout d'AMG sous forme encapsulée permet une production progressive de glucose sur 1 mois et demi avec une production immédiate de glucose. Les nanoparticules contenant l'AMG représentent donc un intérêt comparé à l'AMG sous forme libre. L'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules de PLGA permettrait donc de protéger l'activité catalytique de cette enzyme.

Pour connaître le mécanisme par lequel l'AMG encapsulée est capable d'hydrolyser de l'amidon sur des temps plus longs, il serait intéressant de suivre la libération de l'AMG, de quantifier cette AMG libérée mais également de déterminer son activité.

Cette étude en solution a permis de mettre en évidence l'intérêt d'utiliser l'AMG sous forme encapsulée plutôt que d'utiliser la forme libre de cette enzyme. L'utilisation des nanoparticules permet en effet une production progressive de glucose mais également une production immédiate de glucose qui pourra être disponible dès le début pour les hCSMs.

II.3.3. Suivi de l'activité de l'AMG libre ou encapsulée au sein d'hydrogels à base de fibrine

Une étude en hydrogel de fibrine-amidon a été effectuée pour déterminer si l'effet positif des NPe observé en solution est également visible en hydrogel. Pour cela, différentes formulations d'hydrogels de 200 μ L ont été préparées comme décrit précédemment :

- des hydrogels de fibrine (18 mg/mL) et fibrine-amidon 2% (m/v), servant d'hydrogels témoin
- des hydrogels de fibrine-amidon-NP (2 mg/mL), servant d'hydrogels témoin pour les nanoparticules
- des hydrogels de fibrine-amidon-NPe (2 mg/mL)
- des hydrogels de fibrine-amidon-AMG (35 μ g/mL, AMG 1X), cette quantité d'AMG correspond à la quantité d'AMG encapsulée dans des NPe à 2 mg/mL
- des hydrogels de fibrine-amidon-AMG (1,75 μ g/mL, AMG 0.05X), cette quantité d'AMG correspond au 1/20 de la quantité d'AMG encapsulée dans des NPe à 2 mg/mL

Ces différents hydrogels ont été placés dans du tampon Hepes et sels et incubés à 37°C pendant 1 mois. Le glucose produit peut ainsi diffuser hors du matériau dans le surnageant. La totalité du surnageant est prélevée à chaque temps étudié pour mimer un renouvellement total du milieu, condition proche du comportement *in vivo*, et donc forcer la diffusion du glucose hors du matériau. La quantité de glucose produit et relargué a été estimée mathématiquement de la manière suivante :

$$Quantité_{estimée}(t) = quantité_{glucose}_{mesurée}(t) + quantité_{glucose}_{mesurée}(t-1)$$

La quantité de glucose obtenu a ensuite été tracée en cumulatif en fonction du temps d'incubation (**Figure 78**).

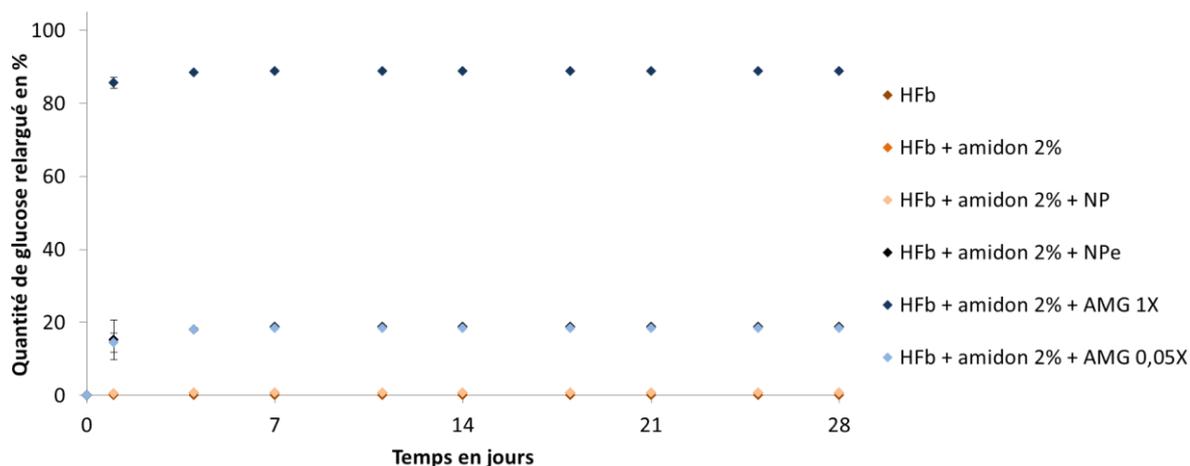


Figure 78 : Quantité de glucose relargué des hydrogels par l'AMG libre ou encapsulée (prélèvement total). Des hydrogels de 200 μ L de fibrine (18 mg/mL), fibrine-amidon 2% (m/v) ont été préparés contenant soit des nanoparticules (NP et NPe, 2 mg/mL), soit de l'AMG sous forme libre (AMG 1X à 35 μ g/mL et AMG 0.05X à 1,75 μ g/mL). Ces hydrogels sont placés dans 2 mL de tampon HEPES et sels. La totalité des surnageants a été prélevée pour doser la quantité de glucose produit. Cette quantité a été tracée en fonction du temps. L'expérience a été effectuée en $n = 3$ pour AMG 1X et AMG 0.05X et en $n = 6$ pour NP et NPe (6 lots différents de nanoparticules utilisés). Les cinétiques de relargage obtenues pour les hydrogels de fibrine, fibrine-amidon et fibrine-amidon se superposent. Les écarts types associés sont affichés.

Les hydrogels témoin (fibrine, fibrine-amidon et fibrine-amidon-NP) n'induisent pas de production de glucose. Ces matériaux témoins indiquent donc qu'en absence d'AMG, l'hydrolyse de l'amidon n'est pas possible et ne conduit pas à la production de glucose.

L'introduction d'AMG 1X dans la composition de l'hydrogel permet une production immédiate de glucose correspondant à 80% de la quantité maximale de glucose qui peut être produit au sein de l'hydrogel. Cette valeur correspond à la valeur plateau de la production de glucose par l'AMG 1X dans ces conditions. L'AMG 1X permet donc une production immédiate et importante de glucose le premier jour mais ne permet pas une production progressive de glucose sur plusieurs jours. Ce résultat indiquerait que l'AMG a diffusé hors du matériau et que le prélèvement total du surnageant a conduit à son élimination complète.

Lors de l'ajout d'AMG 0.05X dans la formulation de l'hydrogel, une production plus faible de glucose est observée (20% de la quantité maximale de glucose qui peut être produit au sein de l'hydrogel), mais cette valeur correspond au maximum de la quantité de glucose qui peut être produit par l'AMG 0.05X au sein de l'hydrogel de fibrine-amidon. Cette absence de production de glucose après 1 jour indiquerait également que l'AMG a diffusé complètement hors de l'hydrogel et qu'elle a été éliminée lors du prélèvement total du surnageant.

La cinétique de production de glucose par les NPe est identique à celle obtenue pour l'AMG 0.05X. En effet, les NPe permettent au maximum la production de 20% de la quantité maximale de glucose qui peut être produit. Cette valeur n'est pas en accord avec les valeurs obtenues lors de la production de glucose par les NPe en solution. Ceci indiquerait que les NPe ont également diffusé complètement hors du matériau et qu'elles ont été éliminées lors du prélèvement du surnageant.

Ces différents résultats indiquent qu'après 1 jour, l'AMG sous forme libre ou encapsulée ne permet plus la production de glucose au sein de l'hydrogel de fibrine-amidon. Cependant, les quantités de glucose produit sont peut-être faibles et cette condition de prélèvement n'est peut-être pas adaptée à cette étude. Une deuxième condition de prélèvement a alors été utilisée. Elle consiste à prélever 10% du volume du surnageant. Elle permet de mimer un renouvellement partiel du milieu et de moins forcer la diffusion du glucose hors du matériau. La quantité de glucose produit et relargué hors de l'hydrogel suite au prélèvement de 10% a été estimée mathématiquement de la manière suivante :

$$\text{Quantité}_{\text{estimée}}(t) = \text{quantité glucose}_{\text{mesurée}}(t) - 0,90 \times \text{quantité glucose}_{\text{mesurée}}(t-1)$$

Cette estimation mathématique permet de tenir compte de la dilution du surnageant due au prélèvement de 10% effectué. La quantité de glucose obtenue a ensuite été tracée en cumulatif en fonction du temps d'incubation (**Figure 79**).

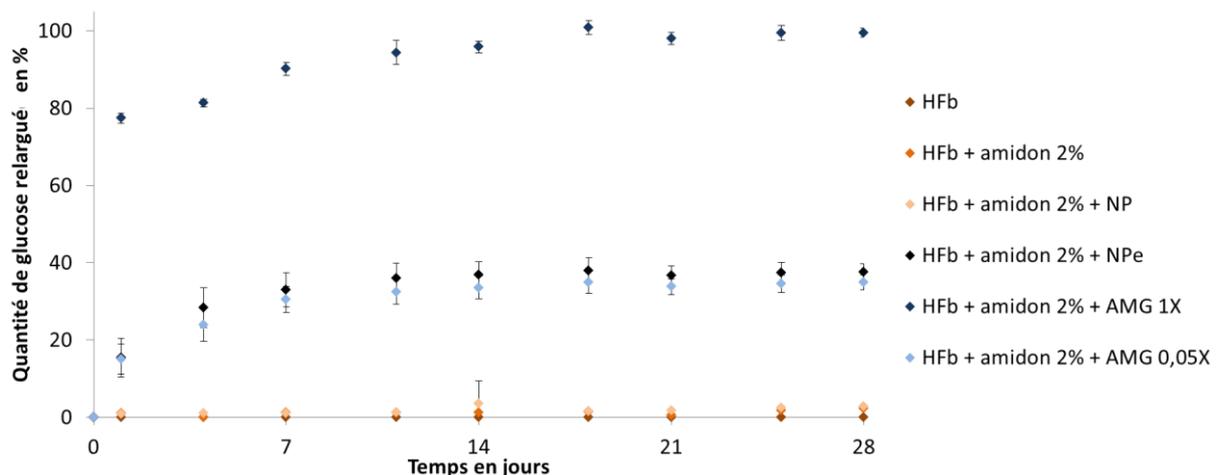


Figure 79 : Quantité de glucose relargué des hydrogels par l'AMG libre ou encapsulée (prélèvement 10%). Des hydrogels de 200 μ L de fibrine (18 mg/mL), fibrine-amidon 2% (m/v) ont été préparés contenant soit des nanoparticules (NP et NPe, 2 mg/mL), soit de l'AMG sous forme libre (AMG 1X à 35 μ g/mL et AMG 0.05X à 1,75 μ g/mL). Les hydrogels sont placés dans 2 mL de tampon Hepes et sels. 10% des surnageants ont été prélevés pour doser la quantité de glucose produit. Cette quantité a été tracée en fonction du temps. L'expérience a été effectuée en n = 3 pour AMG 1X et AMG 0.05X et en n = 6 pour NP et NPe (6 lots différents de nanoparticules utilisés). Les écarts types associés sont affichés.

Les hydrogels de fibrine, fibrine-amidon et fibrine-amidon-NP ne permettent pas la production de glucose. Les résultats obtenus sur ces matériaux témoins sont identiques à ceux obtenus précédemment lors de l'étude de la production de glucose au sein d'hydrogel et par prélèvement total du surnageant.

Lors de l'ajout d'AMG 1X dans la formulation du matériau, une importante production de glucose est observée comme précédemment. En effet, après 1 jour d'incubation, environ 80% de la quantité maximale de glucose qui peut être produit au sein de l'hydrogel est déjà produit et relargué hors du matériau. Après 7 jours d'incubation, un plateau est atteint et correspond au maximum de glucose qui peut être produit. L'AMG 1X permet donc une production importante de glucose le premier jour mais ne permet pas une production progressive de glucose sur plusieurs jours ou semaines. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus durant l'étude en solution, indiquant que l'AMG 1X permet une production de glucose immédiate mais seulement sur une durée de 7 jours.

L'utilisation d'AMG 0.05X permet une production moins importante de glucose que lors de l'utilisation d'AMG 1X comme observé précédemment. Effectivement, après 1 jour d'incubation, l'AMG 0.05X a permis la production d'environ 20% de la quantité maximale de glucose qui peut être produit. Cette quantité de glucose produit augmente jusqu'à 7 jours où elle atteint un plateau correspondant à environ 35%. L'ajout d'une quantité plus faible d'AMG permet donc de réduire la production de glucose mais ne modifie pas la cinétique de production de glucose.

L'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules de PLGA (NPe) permet d'obtenir une production de glucose similaire à celle observée pour l'AMG 0.05X. En effet, seulement 20% de glucose est produit après 1 jour. La production de glucose augmente puis atteint ensuite un plateau correspondant à une valeur d'environ 35% à partir de J7 et ce jusqu'à 28 jours. Cette cinétique de production de glucose permet de mettre en évidence que, les NPe ne permettent pas une production progressive de glucose sur 28 jours en hydrogel. De plus, l'utilisation de NPe ou bien d'AMG sous forme libre à une concentration 20 fois plus faible conduit à la production d'une même quantité de glucose. Ce résultat est différent de celui obtenu lors de l'étude de la production de glucose par les NPe en solution. Différentes hypothèses peuvent être émises concernant ce résultat :

- les NPe diffusent hors du matériau, diminuant la biodisponibilité de l'AMG au sein de l'hydrogel
- l'AMG libérée des NPe diffuse hors de l'hydrogel, ne permettant plus la production de glucose
- la quantité de glucose produite après 7 jours est si faible qu'elle n'est plus détectable

Une étude complémentaire serait donc nécessaire pour une meilleure compréhension de ces résultats. En effet, la libération de l'AMG hors des nanoparticules pourrait être suivie pour savoir si du glucose peut encore être produit par l'AMG. Il serait également intéressant de suivre le relargage des nanoparticules hors de l'hydrogel sur 28 jours pour voir si l'hydrolyse de l'amidon par les NPe induit une augmentation de la diffusion des NPe. En effet, la production de glucose par les NPe à partir de l'amidon contenu dans l'hydrogel pourrait conduire à la formation de mailles de grande taille au sein du réseau de fibrine permettant une diffusion plus importante des NPe hors de l'hydrogel.

De plus, il serait intéressant d'utiliser un autre protocole pour déterminer la quantité de glucose produite et relarguée hors de l'hydrogel. L'utilisation d'un hydrogel par temps d'étude serait une alternative. En effet, cela permettrait de ne pas forcer la diffusion du glucose ni de le diluer dans le surnageant à cause des prélèvements effectués.

L'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules de PLGA nécessite des étapes de sonication qui n'induisent pas de perte d'activité de l'AMG. Cependant, l'utilisation d'AMG sur plusieurs semaines induit une perte importante de son activité.

Lors de l'étude de la production de glucose en solution, il a été mis en évidence que l'AMG sous forme libre permettait une production importante et immédiate de glucose, mais la production de glucose sur plusieurs jours ou semaines n'a par la suite pas été observée. La cinétique de production de glucose par les NPe est différente : une production plus faible de glucose a été observée au premier jour d'étude, mais les NPe permettent ensuite une production progressive de glucose sur 1 mois et demi. Ce résultat met ainsi en avant l'intérêt d'utiliser l'AMG sous forme encapsulée plutôt que sous une forme libre et de l'effet protecteur des nanoparticules vis-à-vis de l'activité de l'AMG. Cependant, lors de l'utilisation des NPe au sein des hydrogels de fibrine-amidon, cet effet n'a pas été observé. En effet, les NPe permettent une production immédiate de glucose mais cette production atteint un plateau dès le septième jour, soulevant ainsi différentes hypothèses (fuite des nanoparticules, fuite de l'AMG libérée). Il a par ailleurs été observé qu'une quantité d'AMG 20 fois plus faible et sous forme libre permet d'obtenir une cinétique de production identique à celle obtenue par les NPe.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ingénierie tissulaire vise à reproduire les processus biologiques afin de favoriser la réparation de fonctions défaillantes. En particulier, il s'agit de mettre en place au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire des processus biologiques et physicochimiques favorisant la régénération. L'émergence de ce domaine implique le développement de nouveaux matériaux support servant de matrice pour permettre aux cellules des tissus spécifiques de se développer. Outre la nécessité de ces biomatériaux à favoriser le développement de cellules en contact avec celui-ci, ils doivent présenter différentes caractéristiques essentielles, telles que la biocompatibilité, mais ils doivent également être capable d'interagir et de créer un dialogue dynamique avec le milieu cellulaire environnant. L'un des principaux défis de la science des biomatériaux est donc de contrôler le comportement cellulaire à l'échelle du biomatériau.

Pour maîtriser ces différents paramètres, dans le temps mais aussi l'espace, l'une des possibilités est de moduler l'apport des éléments essentiels au devenir des cellules *via* leur confinement et leur délivrance contrôlée. Ainsi, l'encapsulation de molécules bioactives au sein de particules suivi du relargage contrôlé du principe actif encapsulé représente une stratégie de choix. Ce système de délivrance doit permettre d'effectuer une encapsulation et un relargage efficace de la biomolécule en servant de réservoir et de coque protectrice de cette biomolécule.

C'est ce challenge qu'il a été proposé de relever dans le cadre d'un projet de recherche ANR axé sur la survie des cellules souches dans un biomatériau composite pour les grandes pertes de substances osseuses. Dans ce projet, un matériau a été développé afin d'améliorer la survie de hCSMs après implantation *in vivo*. Il a été en particulier mis en avant la nécessité de contrôler, au sein de ce matériau constitué d'un hydrogel de fibrine enrichi en amidon, l'apport et la production de glucose pendant 1 mois.

Une enzyme spécifique, l'amyloglucosidase (AMG), a été introduite dans l'hydrogel pour permettre l'hydrolyse de l'amidon et donc la production de glucose au sein du biomatériau. Cependant, *via* des modèles mathématiques, il a été mis en évidence que l'AMG fuyait hors de l'hydrogel. Ceci a d'ailleurs été vérifié et prouvé expérimentalement. Dans ce contexte, l'encapsulation de l'AMG dans des nanoparticules s'est imposé comme une alternative intéressante et pertinente pour permettre l'apport progressif et contrôlé de glucose au sein de l'hydrogel.

Des nanoparticules de PLGA contenant l'AMG (NPe) ont donc été développées, optimisées, puis étudiées d'un point de vue de leur stabilité et de leur capacité à générer du glucose en solution, mais également au sein d'hydrogels.

Pour produire ces nanoparticules contenant l'AMG, une technique de double émulsion (water-in-oil-in-water) a été adaptée. Des caractéristiques essentielles comme la capacité à générer des lots

reproductibles et homogènes ont été validées. Au sein des nanoparticules produites, la quantité d'AMG encapsulée a été déterminée par dosage *via* deux approches complémentaires, la première basée sur l'analyse de la fluorescence de l'AMG marquée non encapsulée, et la deuxième basée sur la mesure de l'activité de l'AMG contenue dans les surnageants de centrifugation. Elles ont permis de démontrer que le taux de chargement en protéine correspond à 17,5 µg d'AMG par mg de nanoparticules.

Lors de la caractérisation physico-chimique et biochimique de ces nanoparticules, leur observation au microscope électronique à balayage (MEB) a permis de mettre en évidence que les particules produites sont sphériques et qu'elles sont formées d'un système de type cœur-coquille. La démonstration de cette caractéristique permet d'affirmer que ces nanoparticules peuvent servir de réservoir et de lieu de stockage pour l'AMG. Il a également été observé que la coque de PLGA représente environ 78% du volume de ces nanoparticules. De plus, par l'analyse combinée effectuée en MEB et par diffusion dynamique de la lumière (DLS), il a été déterminé que les nanoparticules produites par la technique de double émulsion forment une population monodisperse ($PDI < 0,1$) de nanoparticules possédant un diamètre d'environ 250-300 nm. De plus, au cours du protocole d'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules de PLGA, l'enzyme subit différents traitements qui malgré tout n'affectent pas les propriétés de ces nanoparticules. Lors de l'étude de la charge, il a été mis en avant que les nanoparticules sont proches de la neutralité, mais que l'encapsulation de l'AMG induit une diminution de 1,5 mV du potentiel zêta des nanoparticules. Ceci tend à indiquer que de l'AMG, chargée négativement au pH étudié, pourrait se situer à la surface des NPe. Pour mettre en évidence la présence de cette AMG accessible depuis la surface des NPe, un dosage protéique a été effectué sur ces NPe. Il a été mis en évidence qu'au maximum 20% de l'AMG encapsulée dans les NPe est disponible depuis l'extérieur des NPe, sans nécessiter de traitement ou de relargage de l'enzyme encapsulée. Ce point intéressant permet d'indiquer qu'à l'issue de la synthèse des NPe, une fraction de l'AMG "retenue" par les NPe est directement disponible. La potentielle activité catalytique de l'AMG encapsulée contenue au cœur du composite ne dépendrait donc pas obligatoirement du relargage de celle-ci depuis les nanoparticules dans le milieu environnant. Cette caractéristique représente un atout pour envisager l'utilisation potentielle de ce type de système dans les matériaux hybrides d'ingénierie tissulaire, systèmes dans lesquels la nanoparticule ne joue pas le rôle de système de stockage et de délivrance, mais un rôle de protecteur et de "porteur" de la biomolécule d'intérêt.

Une fois les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules fixées, différents paramètres expérimentaux ont été modifiés afin de connaître leur influence sur ces caractéristiques. Pour cela, le temps de sonication a tout d'abord été modulé. Plus le temps de sonication augmente, plus le

diamètre hydrodynamique moyen Z et le PDI des nanoparticules diminuent, ce qui indique que l'augmentation du temps de sonication permet la formation d'une population de nanoparticules de plus en plus petites et de plus en plus monodisperse. Afin d'augmenter le rendement de synthèse des nanoparticules, le temps de centrifugation a aussi été modifié lors de la préparation des nanoparticules. Par augmentation de la durée de centrifugation de 8 min à 48 min, le rendement de synthèse a pu être augmenté de manière significative en passant d'environ 50% à 78%. Cependant, l'étude de la taille et de la polydispersité de ces nanoparticules a mis en évidence que plus le temps de centrifugation est important, plus le diamètre Z diminue et le PDI augmente. Ceci indique qu'un plus grand nombre de nanoparticules de petite taille sont récoltées lors de l'augmentation du temps de centrifugation mais en créant une population de nanoparticules de plus en plus polydisperse. La synthèse des nanoparticules a également été optimisée afin de produire des nanoparticules stériles qui pourront être utilisées dans l'hydrogel composite puis implanté *in vivo*. Des tests de stérilité ont été effectués permettant de confirmer que ce protocole optimisé est adapté à la production de nanoparticules stériles.

Durant l'étude des propriétés viscoélastiques des hydrogels à base de fibrine, il a été mis en évidence que l'incorporation des nanoparticules dans la formulation de l'hydrogel n'induisait pas de modification des propriétés viscoélastiques du matériau. Cependant, la présence d'amidon dans l'hydrogel diminue significativement ses propriétés pouvant créer une hétérogénéité au sein de l'hydrogel. Ce résultat a été confirmé lors de l'observation de la structure interne du matériau où des zones non protéiques ont été observées, correspondant à des amas d'amidon de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres. Malgré cette hétérogénéité, des modèles mathématiques ont mis en évidence l'importance de l'ajout d'amidon dans la formulation de l'hydrogel, où l'augmentation de la viscosité interne du matériau permet de réduire la fuite du glucose. L'étude expérimentale de ces modèles a mis en avant que, quel que soit la concentration en amidon, la totalité du glucose introduit fuit hors du matériau en moins d'une heure. L'AMG quant à elle fuit plus lentement, mais après 6 heures d'incubation, une fuite correspondant tout de même à environ 80 % de la quantité d'AMG contenue initialement dans l'hydrogel de fibrine-amidon est observée. En revanche, plus de 60% des NPe contenues dans cet hydrogel sont retenues après le même temps d'incubation. Ce résultat indique donc qu'après 6h d'incubation, la quantité d'AMG sous forme encapsulée est trois fois plus élevée que celle sous forme libre, augmentant de manière significative la quantité d'AMG présente au sein de l'hydrogel fibrine-amidon.

Durant l'étude de la stabilité des nanoparticules en solution, il a été observé que les nanoparticules commencent à s'agréger entre 7 et 14 jours d'incubation, et une importante agrégation est observée après 14 jours. Cette agrégation se caractérise par une augmentation du diamètre hydrodynamique

moyen et du PDI des nanoparticules ainsi qu'à un changement progressif de leur morphologie sur 2 mois (passage d'une forme sphérique à une forme allongée). Cependant, il a été observé que la taille des nanoparticules isolées ou contenues dans les agrégats diminue au cours du temps, indiquant une érosion progressive des nanoparticules. Ces résultats sont en accord avec la neutralité des nanoparticules et leur sensibilité à l'agrégation. Lorsque ces nanoparticules sont contenues dans un hydrogel, elles s'agrègent également dès 7 à 14 jours d'incubation. Cependant, l'hydrolyse de l'amidon par les NPe semble faciliter l'agrégation de ces nanoparticules. En effet, la taille des agrégats contenus au sein de l'hydrogel de fibrine ne semble pas augmenter, contrairement à ceux contenus dans l'hydrogel de fibrine-amidon. Il a également été observé que les agrégats formés dans les hydrogels semblent plus petits que ceux observés en solution. Ceci pourrait indiquer que la présence du réseau de fibrine ralentirait voire stopperait l'agrégation des nanoparticules.

Enfin, l'objectif principal de l'encapsulation de l'AMG dans les nanoparticules de PLGA est de permettre un apport progressif de glucose au sein du biomatériau. Il a tout d'abord été vérifié que les étapes de sonication lors de la préparation des nanoparticules n'induisent pas de perte d'activité de l'AMG. Toutefois, il a été observé qu'une action prolongée de l'AMG en solution conduit à une perte de plus de 90% de son activité après 28 jours à 37°C, limitant sa possible action sur des temps longs. Lors de l'étude de la cinétique de production du glucose en solution, l'AMG sous forme libre a permis une production importante et immédiate de glucose dès le premier jour d'incubation, sans permettre une production progressive de glucose. Par contre, les NPe ont permis une production trois fois plus faible de glucose au premier jour d'incubation, mais cette étape est suivie par une production progressive de glucose sur 2 mois. Ce résultat met donc en évidence l'intérêt de l'utilisation de l'AMG sous forme encapsulée et de l'effet protecteur que peut apporter les nanoparticules vis-à-vis de l'activité de l'AMG. Cependant, lors de l'utilisation de ces NPe au sein de l'hydrogel de fibrine-amidon, une production immédiate de glucose est observée correspondant à celle produite en solution après 7 jours d'incubation. Une fois ce temps d'incubation atteint, une absence de production de glucose est observée. Différentes hypothèses ont alors été émises pouvant expliquer cet arrêt de production de glucose : soit une fuite des nanoparticules hors de l'hydrogel, soit une fuite de l'AMG libérée des NPe. Par ailleurs, il a été observé qu'une quantité d'AMG 20 fois plus faible et sous forme libre permet d'obtenir une cinétique de production de glucose identique à celle des NPe.

Les différents résultats obtenus soulèvent donc de nouvelles questions.

Comment se comportent les nanoparticules d'un point de vue de leur stabilité sur des temps longs en hydrogel ?

L'étude de la stabilité des nanoparticules en hydrogel n'a été effectuée que sur une durée de 14 jours. Il serait donc intéressant d'étudier la stabilité de ces nanoparticules au sein du biomatériau mais pendant des périodes allant de 1 à 2 mois. Ces résultats pourraient confirmer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle le réseau de fibrine permet de ralentir le phénomène d'agrégation des nanoparticules. De plus, en conditions d'applications cliniques, des hCSMs seront présentes et actives au sein de l'hydrogel modifiant les conditions environnementales. Le réseau de fibrine va tendre à disparaître, et des enzymes et autres facteurs cellulaires vont être produits localement. Ces différentes modifications environnementales vont ainsi très certainement impacter le devenir des nanoparticules. Au cours de ces travaux, à travers de premières études où a été analysée la stabilité des NPe en présence de milieux conditionnés, l'importance et l'impact potentiel de ces modifications physico-chimiques du microenvironnement local des nanoparticules ont été appréhendés. Les résultats préliminaires laissent suggérer que le devenir des nanoparticules, en particulier dans le temps, serait sensiblement différent en milieu contenant des facteurs produits par les cellules qu'en milieu tamponné simple. La cinétique de dégradation pourrait être favorisée conduisant un phénomène de fusion-déformation. Mais ces premiers résultats se doivent d'être reproduits et validés, en particulier pour éliminer tout risque de mauvaise interprétation due à des problèmes de contamination et de variation de composition des milieux conditionnés. Ce résultat est prometteur, mais ces analyses nécessitent donc d'être approfondies.

Pourquoi la production de glucose par les NPe en hydrogel stagne après 7 jours d'incubation ?

Une cinétique de production progressive de glucose par les NPe avait été observée lors de l'étude en solution sur 2 mois mais cet effet n'a pas été visible lors l'étude en hydrogel. Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ce résultat. Les nanoparticules pourraient fuir hors du matériau conduisant à la diminution de la biodisponibilité de l'AMG. En effet, il a été mis en évidence lors de l'étude de diffusion des NPe que, malgré leur taille, ces nanoparticules pouvaient fuir hors de l'hydrogel. Des expériences supplémentaires seraient alors nécessaires pour étudier la fuite des nanoparticules pendant 1 mois. La deuxième hypothèse est basée sur la fuite de l'AMG, préalablement libérée des NPe contenues dans le biomatériau. En effet, les NPe sont conçues pour libérer de l'AMG. Or, il a été mis en évidence que l'AMG diffuse rapidement hors de l'hydrogel de fibrine-amidon. Une fois l'AMG libérée des nanoparticules, celle-ci pourrait alors diffuser rapidement hors du matériau, conduisant à un arrêt de la production *in situ* de glucose. Une étude de la cinétique de libération de l'AMG des nanoparticules permettrait d'expliquer cette absence de production

progressive de glucose par les NPe. De plus, il serait intéressant de savoir si l'AMG libérée maintient son activité, permettant de confirmer l'effet protecteur des nanoparticules sur l'activité de l'AMG.

Une fois ces différents comportements expliqués, est-il possible d'optimiser et de contrôler ces comportements ?

Lors de l'étude de la stabilité de nanoparticules, il a été observé que 2 mois ne suffisent pas à la dégradation complète des nanoparticules. Il serait donc intéressant de les optimiser afin de réduire ce temps de dégradation, par exemple en changeant la longueur de chaîne du PLGA. Ceci étant, comme décrit plus haut, il semblerait aussi qu'en milieu complexes, et en particulier en milieu conditionnés, le devenir des nanoparticules de PLGA serait également modulable. De plus, initialement, la taille nanométrique des particules était aussi l'une des caractéristiques essentielles. Cependant, il a été mis en avant que, dans l'hydrogel de fibrine-amidon, ces nanoparticules diffusent en partie hors du matériau ce qui entraîne une perte de celles-ci et de fait compromet leur efficacité. Il pourrait donc aussi être envisagé, pour limiter la fuite des nanoparticules, de produire des particules de taille plus grande que celles utilisées dans cette étude. Des systèmes micrométriques et/ou de type microémulsion pourraient être proposés pour encapsuler l'AMG.

Quel est finalement le gain à utiliser l'AMG sous forme encapsulée sur la survie des hCSMs ?

Une étude préliminaire *in vitro* et *in vivo* concernant l'efficacité des NPe a été effectuée au sein du laboratoire B2OA (Laboratoire de Bioingénierie et de Bioimagerie OstéoArticulaire), partenaire du projet de recherche sur l'amélioration de la survie des cellules souches dans un biomatériau hydrogel composite implanté (Figure 80).

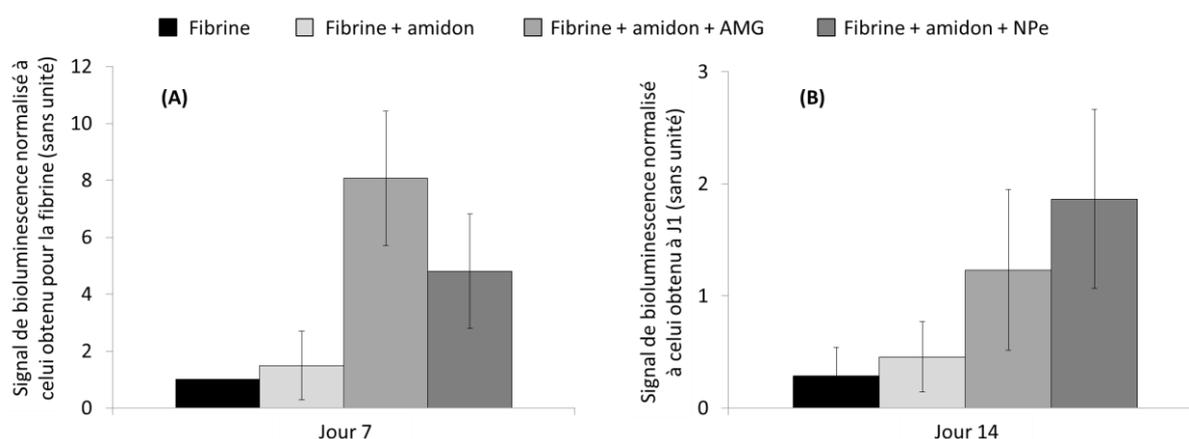


Figure 80 : Mesures (A) *in vitro* et (B) *in vivo* du signal de bioluminescence (BLI) émis par les hCSMs^{Luc} vivantes. *In vitro*, les hCSMs^{Luc} (hCSMs transfectées par le gène de la luciférase) sont cultivées au sein de différentes formulations d'hydrogels dans une station hypoxique ($pO_2 < 0,1\%$) à 37°C pendant 7 jours. *In vivo*, les différentes formulations d'hydrogels sont implantées en site ectopique chez la souris nude pendant 14 jours, et le signal de BLI est mesuré directement sur la souris vivante.

Que ce soit *in vitro* (après 7 jours au sein d'hydrogels) ou encore *in vivo* (après 14 jours post-implantation dans des hydrogels), en absence de glucose, la viabilité des hCSMs^{LUC} est extrêmement faible et correspond à celle de l'hydrogel de fibrine seul. Par contre, cette viabilité est augmentée par un apport de glucose, que cet apport soit effectué suite à l'hydrolyse de l'amidon par de l'AMG sous forme libre ou sous forme encapsulée. Alors qu'à 7 jours l'action de l'AMG apportée par les NPe semble plus faible que celle de l'AMG libre ; à 14 jours, la tendance semble inversée. Ceci est intéressant car dans l'absolue, il est essentiel que l'activité cellulaire soit plutôt progressive et augmente au cours du temps. Le retard à 7 jours n'est donc pas compromettant, au contraire. En revanche, le bénéfice de l'apport de l'AMG sous forme encapsulée, semblant favoriser l'amélioration de la survie des hCSMs implantées dans l'hydrogel de fibrine-amidon après 14 jours, est lui plutôt prometteur. Une meilleure compréhension de la cinétique de libération de l'AMG encapsulée dans les NPe, ainsi que la stabilité de ces NPe en conditions d'application clinique au sein d'hydrogels apparait donc nécessaire afin de mieux comprendre leur effet réel et avantage sur la survie des hCSMs implantées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. DiMarino, A. M., Caplan, A. I. & Bonfield, T. L. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front. Immunol.* **4**, 1–10 (2013).
2. Kim, N. & Cho, S.-G. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J. Intern. Med.* **28**, 387–402 (2013).
3. Bensaïd, W. *et al.* A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* **24**, 2497–2502 (2003).
4. Petite, H. *et al.* Tissue-engineered bone regeneration. *Nat. Biotechnol.* **18**, 959–63 (2000).
5. Deschepper, M. *et al.* Proangiogenic and Prosurvival Functions of Glucose in Human Mesenchymal Stem Cells upon Transplantation. *Stem Cells* **31**, 526–535 (2013).
6. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941–2953 (2008).
7. Yoda, I. *et al.* Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion. *BMC Microbiol.* **14**, 234 (2014).
8. Lauer, G. *et al.* The titanium surface texture elects adherence and growth of human gingival keratinocytes and human maxillar osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* **22**, 2799–2809 (2001).
9. Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J. & Vacanti, J. P. Tissue Engineering Special Feature: Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 2480–2487 (2006).
10. Deligianni, D. D., Katsala, N. D., Koutsoukos, P. G. & Missirlis, Y. F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* **22**, 87–96 (2000).
11. Bohinc, K. *et al.* Metal surface characteristics dictate bacterial adhesion capacity. *Int. J. Adhes. Adhes.* **68**, 39–46 (2016).
12. Truong, V. K. *et al.* The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials* **31**, 3674–3683 (2010).
13. Xiao, X. *et al.* The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways. *Sci. Rep.* **5**, 9409 (2015).
14. Wu, C. *et al.* Porous nanofilm biomaterials via templated layer-by-layer assembly. *Adv. Funct.*

- Mater.* **23**, 66–74 (2013).
15. Tripathi, G. & Basu, B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceram. Int.* **38**, 341–349 (2012).
 16. Danilevicius, P. *et al.* The effect of porosity on cell ingrowth into accurately defined, laser-made, polylactide-based 3D scaffolds. *Appl. Surf. Sci.* **336**, 2–10 (2015).
 17. Han, G., Müller, W. E. G., Wang, X., Lilja, L. & Shen, Z. Porous titania surfaces on titanium with hierarchical macro- and mesoporosities for enhancing cell adhesion, proliferation and mineralization. *Mater. Sci. Eng. C* **47**, 376–383 (2015).
 18. Grover, C. N. *et al.* Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films. *Acta Biomater.* **8**, 3080–3090 (2012).
 19. Irvine, S. A. *et al.* Printing cell-laden gelatin constructs by free-form fabrication and enzymatic protein crosslinking. *Biomed. Microdevices* **17**, 1–8 (2015).
 20. Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. & Wang, Y. L. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* **79**, 144–152 (2000).
 21. Cozzolino, A. M. *et al.* Modulating the Substrate Stiffness to Manipulate Differentiation of Resident Liver Stem Cells and to Improve the Differentiation State of Hepatocytes. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
 22. Gibson, C. C., Puleo, D. a. & Bizios, R. Biological Interactions on Materials Surfaces. *Biol. Interact. Mater. Surfaces Elipsometr*, 199–224 (2009).
 23. Zhu, X. *et al.* Engineered, Robust Polyelectrolyte Multilayers by Precise Control of Surface Potential for Designer Protein, Cell, and Bacteria Adsorption. *Langmuir* **32**, 1338–1346 (2016).
 24. Sahli, R., Fave, C. & Boujlel, K. Switching On/O ff the Chemisorption of Thioctic-Based Self-Assembled Monolayers on Gold by Applying a Moderate Cathodic/ Anodic Potential. (2013).
 25. Kawashita, M. *et al.* Effect of fibronectin adsorption on osteoblastic cellular responses to hydroxyapatite and alumina. *Mater. Sci. Eng. C* **69**, 1268–1272 (2016).
 26. Arima, Y. & Iwata, H. Preferential adsorption of cell adhesive proteins from complex media on self-assembled monolayers and its effect on subsequent cell adhesion. *Acta Biomater.* **26**, 72–81 (2015).
 27. Regis, S. *et al.* Altering surface characteristics of polypropylene mesh via sodium hydroxide

- treatment. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **100 A**, 1160–1167 (2012).
28. Van Vlierberghe, S., Vanderleyden, E., Boterberg, V. & Dubruel, P. Gelatin functionalization of biomaterial surfaces: Strategies for immobilization and visualization. *Polymers (Basel)*. **3**, 114–130 (2011).
 29. Feng, B. *et al.* Surface characterization of titanium and adsorption of bovine serum albumin. *Mater. Charact.* **49**, 129–137 (2002).
 30. Gao, J. N. L. E. L. R. S. Surface modification of polyglycolic acid meshes increases the seeding density and spreading of smooth muscle cells. *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 417–424 (1998).
 31. Feng, B., Weng, J., Yang, B. C., Qu, S. X. & Zhang, X. D. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials* **24**, 4663–4670 (2003).
 32. Janorkar, A. V., Proulx, S. E., Metters, A. T. & Hirt, D. E. Surface-confined photopolymerization of single- and mixed-monomer systems to tailor the wettability of poly(L-lactide) film. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **44**, 6534–6543 (2006).
 33. Guan, J., Gao, C., Feng, L. & Shen, J. Surface modification of polyurethane for promotion of cell adhesion and growth 1: Surface photo-grafting with N , N-dimethylaminoethyl methacrylate and cytocompatibility of the modi[®] ed surface. *J. Mater. Sci.* **12**, 447–452 (2001).
 34. Khorasani, M. T., Mirzadeh, H. & Irani, S. Plasma surface modification of poly (l-lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) films for improvement of nerve cells adhesion. *Radiat. Phys. Chem.* **77**, 280–287 (2008).
 35. Recek, N. *et al.* Protein adsorption on various plasma-treated polyethylene terephthalate substrates. *Molecules* **18**, 12441–12463 (2013).
 36. El-Sherbiny, I. & Yacoub, M. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2013**, 316–42 (2013).
 37. Robert, L., Robert, a-M. & Renard, G. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. *Pathol. Biol. (Paris)*. **58**, 187–198 (2010).
 38. Pasqui, D., De Cagna, M. & Barbucci, R. Polysaccharide-based hydrogels: The key role of water in affecting mechanical properties. *Polymers (Basel)*. **4**, 1517–1534 (2012).
 39. Xu, X., Jha, A, Harrington, DA., Farach-Carson, M. Hyaluronic Acid - Based Hydrogel: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks. *Soft Matter* **8**, 3280–3294 (2012).

40. Ranga, A., Lutolf, M. P., Hilborn, J. & Ossipov, D. A. Hyaluronic Acid Hydrogels Formed in Situ by Transglutaminase-Catalyzed Reaction. *Biomacromolecules* **17**, 1553–1560 (2016).
41. Leach, J. B. & Schmidt, C. E. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **26**, 125–135 (2005).
42. Burdick, J. A., Chung, C., Jia, X., Randolph, M. a & Langer, R. Controlled Degradation and Mechanical Behavior of Photopolymerized Hyaluronic Acid Networks Controlled Degradation and Mechanical Behavior of Photopolymerized Hyaluronic Acid Networks. *Society* **6**, 386–391 (2005).
43. Seidlits, S. K. *et al.* The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation. *Biomaterials* **31**, 3930–3940 (2010).
44. Cowan, C. M., Soo, C., Ting, K. & Wu, B. in **66**, 239–285 (2005).
45. Pape, L. G. & Balazs, E. A. The Use of Sodium Hyaluronate (Healon®) in Human Anterior Segment Surgery. *Ophthalmology* **87**, 699–705 (1980).
46. Tokatlian, T., Cam, C. & Segura, T. Porous Hyaluronic Acid Hydrogels for Localized Nonviral DNA Delivery in a Diabetic Wound Healing Model. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 1084–1091 (2015).
47. Ahmadi, F., Oveisi, Z., Samani, M. & Amoozgar, Z. Chitosan based hydrogels: Characteristics and pharmaceutical applications. *Res. Pharm. Sci.* **10**, 1–16 (2015).
48. Ji, C., Khademhosseini, A. & Dehghani, F. Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* **32**, 9719–9729 (2011).
49. Sacco, P. *et al.* Insight into the ionotropic gelation of chitosan using tripolyphosphate and pyrophosphate as cross-linkers. *Int. J. Biol. Macromol.* **92**, 476–483 (2016).
50. Hong, Y. *et al.* Covalently crosslinked chitosan hydrogel: Properties of in vitro degradation and chondrocyte encapsulation. *Acta Biomater.* **3**, 23–31 (2007).
51. Zou, X., Zhao, X. & Ye, L. Synthesis of cationic chitosan hydrogel and its controlled glucose-responsive drug release behavior. *Chem. Eng. J.* **273**, 92–100 (2015).
52. Saladino, S. *et al.* Formulation of Different Chitosan Hydrogels for Cartilage Tissue Repair. **38**, 505–510 (2014).
53. Azuma, K. *et al.* *Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing: Old and New*

- Materials. Journal of Functional Biomaterials* **6**, (2015).
54. Low, W., Kenward, M. A., Amin, M. & Martin, C. Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for the Controlled Release of Antimicrobial Essential Oils and Metal Ions for Wound Management Applications. *Medicines* **3**, 8 (2016).
 55. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem* **78**, 929–958 (2010).
 56. Tan, H. & Marra, K. G. Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Materials (Basel)*. **3**, 1746–1767 (2010).
 57. Bigi, A., Panzavolta, S. & Rubini, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials* **25**, 5675–5680 (2004).
 58. Gorgieva, S. & Kokol, V. in *Biomaterials Applications for Nanomedicine* 1–36 (InTech, 2011). doi:10.5772/24118
 59. L Helseth, J. & Veis, A. Collagen self-assembly in vitro. **256**, 7118–7128 (1981).
 60. Djabourov, M., Leblond, J. & Papon, P. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *J. Phys.* **49**, 319–332 (1988).
 61. Achilli, M. & Mantovani, D. Tailoring mechanical properties of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering: The effects of pH, temperature and ionic strength on gelation. *Polymers (Basel)*. **2**, 664–680 (2010).
 62. Yunoki, S., Ohyabu, Y. & Hatayama, H. Temperature-responsive gelation of type i collagen solutions involving fibril formation and genipin crosslinking as a potential injectable hydrogel. *Int. J. Biomater.* **2013**, (2013).
 63. Xing, Q. *et al.* Increasing mechanical strength of gelatin hydrogels by divalent metal ion removal. *Sci. Rep.* **4**, 4706 (2014).
 64. Koshy, S. T. *et al.* Click-Crosslinked Injectable Gelatin Hydrogels. *Adv. Healthc. Mater.* **5**, 541–547 (2016).
 65. Ito, A. *et al.* Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 196–199 (2003).
 66. Seliktar, D., Black, R. A., Vito, R. P. & Nerem, R. M. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Ann. Biomed. Eng.* **28**, 351–

- 362 (2000).
67. Salamon, A. *et al.* Gelatin-based hydrogels promote chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Materials (Basel)*. **7**, 1342–1359 (2014).
 68. McCain, M. L., Agarwal, A., Nesmith, H. W., Nesmith, A. P. & Parker, K. K. Micromolded gelatin hydrogels for extended culture of engineered cardiac tissues. *Biomaterials* **35**, 5462–5471 (2014).
 69. Zhao, X. *et al.* Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* **5**, 108–118 (2016).
 70. Zerhouni, E., Wolberg, A. S. & Campbell, R. a. Thrombin Generation, Fibrin Clot Formation and Hemostasis. *Science (80-.)*. **38**, 15–23 (2004).
 71. Wolberg, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* **21**, 131–142 (2007).
 72. Kita, R., Takahashi, A. & Kaibara, M. Formation of Fibrin Gel in Fibrinogen - Thrombin System: Static and Dynamic Light Scattering Study. *Biomacromolecules* **3**, 1013–1020 (2002).
 73. Bidault, L., Deneufchatel, M., Vancaeyzeele, C., Fichet, O. & Larreta-Garde, V. Self-supported fibrin-polyvinyl alcohol interpenetrating polymer networks: An easily handled and rehydratable biomaterial. *Biomacromolecules* **14**, 3870–3879 (2013).
 74. Janmey, P. A., Winer, J. P. & Weisel, J. W. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J. R. Soc. Interface* **6**, 1–10 (2009).
 75. Zhao, H. *et al.* Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomed. Mater* **3**, 15001–9 (2008).
 76. Jockenhoevel, S. *et al.* Fibrin gel - advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* **19**, 424–430 (2001).
 77. Christman, K. L., Fok, H. H., Sievers, R. E., Fang, Q. & Lee, R. J. Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Eng.* **10**, 403–409 (2004).
 78. Morin, K. T. & Tranquillo, R. T. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel. *Exp. Cell Res.* **319**, 2409–2417 (2013).
 79. Jain, K. K. Drug delivery systems - an overview. *Methods Mol. Biol.* **437**, 1–50 (2008).

80. Boisseau, P. & Loubaton, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Phys.* **12**, 620–636 (2011).
81. Calvo, P. *et al.* PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as vector for drug delivery in prion diseases. *J. Neurosci. Methods* **111**, 151–155 (2001).
82. Sonvico, F. *et al.* Folate-conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjug. Chem.* **16**, 1181–1188 (2005).
83. Bhattarai, N., Gunn, J. & Zhang, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 83–99 (2010).
84. Tang, S., Tian, B., Ke, Q.-F., Zhu, Z.-A. & Guo, Y.-P. Gentamicin-loaded carbonated hydroxyapatite coatings with hierarchically porous structures: drug delivery properties, bactericidal properties and biocompatibility. *RSC Adv.* **4**, 41500–41509 (2014).
85. Aubert-Viard, F. *et al.* Chitosan finishing nonwoven textiles loaded with silver and iodide for antibacterial wound dressing applications. *Biomed. Mater.* **10**, 15023 (2015).
86. des Rieux, A., Shikanov, A. & Shea, L. D. Fibrin hydrogels for non-viral vector delivery in vitro. *J. Control. Release* **136**, 148–154 (2009).
87. Warheit, D. B., Sayes, C. M., Reed, K. L. & Swain, K. A. Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacol. Ther.* **120**, 35–42 (2008).
88. Letchford, K. & Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65**, 259–69 (2007).
89. Kabanov, A. V, Batrakova, E. V & Alakhov, V. Y. Pluronic (R) block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Control. Release* **82**, 189–212 (2002).
90. Kataoka, K., Matsumoto, T., Yokoyama, M. & Okano, T. Aspartate) Copolymer Micelles : Their Pharmaceutical Characteristics and Biological Significance. *J. Control. Release* **64**, 143–153 (2000).
91. Marin, A. *et al.* Drug delivery in pluronic micelles: Effect of high-frequency ultrasound on drug release from micelles and intracellular uptake. *J. Control. Release* **84**, 39–47 (2002).
92. Cohen, R., Kanaan, H., Grant, G. J. & Barenholz, Y. Prolonged analgesia from Bupisome and

- Bupigel formulations: From design and fabrication to improved stability. *J. Control. Release* **160**, 346–352 (2012).
93. Kulkarni, P. R., Yadav, J. D. & Vaidya, K. A. Liposomes : a Novel Drug Delivery System. **3**, 5–16 (2011).
94. de Araujo, D. R. *et al.* Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. *Can. J. Anaesth.* **51**, 566–572 (2004).
95. Toongsuwan, S., Li, L. C., Erickson, B. K. & Chang, H. C. Formulation and characterization of bupivacaine lipospheres. *Int. J. Pharm.* **280**, 57–65 (2004).
96. Shi, G., Guo, W., Stephenson, S. M. & Lee, R. J. Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations. *J. Control. Release* **80**, 309–319 (2002).
97. Chatterjee, S. N. & Agarwal, S. Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **4**, 51–72 (1988).
98. Sung, S.-Y. *et al.* Targeting L1 cell adhesion molecule expression using liposome-encapsulated siRNA suppresses prostate cancer bone metastasis and growth. *Oncotarget* **5**, 9911–29 (2014).
99. zur Muhlen, A., Schwarz, C. & Mehnert, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 149–155 (1998).
100. Yang, S., Zhu, J., Lu, Y., Liang, B. & Yang, C. Body Distribution of Camptothecin Solid Lipid Nanoparticles After Oral Administration. *Pharm. Res.* **16**, 751–757 (1999).
101. Ethirajan, A. *et al.* Biomimetic hydroxyapatite crystallization in gelatin nanoparticles synthesized using a miniemulsion process. *Adv. Funct. Mater.* **18**, 2221–2227 (2008).
102. Pregibon, D. C., Toner, M. & Doyle, P. S. Multifunctional encoded particles for high-throughput biomolecule analysis. *Science* **315**, 1393–6 (2007).
103. Oh, J. K., Drumright, R., Siegwart, D. J. & Matyjaszewski, K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog. Polym. Sci.* **33**, 448–477 (2008).
104. Sahiner, N., Godbey, W. T., McPherson, G. L. & John, V. T. Microgel, nanogel and hydrogel-hydrogel semi-IPN composites for biomedical applications: Synthesis and characterization. *Colloid Polym. Sci.* **284**, 1121–1129 (2006).

105. Eckmann, D. M., Composto, R. J., Tsourkas, A. & Muzykantov, V. N. R. Nanogel Carrier Design for Targeted Drug Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2**, 8085–8097 (2014).
106. Das, M., Mardyani, S., Chan, W. C. W. & Kumacheva, E. Biofunctionalized pH-responsive microgels for cancer cell targeting: Rational design. *Adv. Mater.* **18**, 80–83 (2006).
107. Urakami, H. *et al.* Surfactant-free synthesis of biodegradable, biocompatible, and stimuli-responsive cationic nanogel particles. *Biomacromolecules* **14**, 3682–3688 (2013).
108. Liu, X., Jin, X. & Ma, P. X. Nanofibrous hollow microspheres self-assembled from star-shaped polymers as injectable cell carriers for knee repair. *Nat. Mater.* **10**, 398–406 (2011).
109. Gao, J., Wong, J. S.-P., Hu, M., Li, W. & Li, R. K. Y. Facile preparation of hierarchically porous polymer microspheres for superhydrophobic coating. *Nanoscale* **2013** (2013). doi:10.1039/c3nr05281h
110. Lajoinie, G. *et al.* Ultrafast vapourization dynamics of laser-activated polymeric microcapsules. *Nat. Commun.* **5**, 1–8 (2014).
111. Chen, S., Gao, F., Wang, Q., Su, Z. & Ma, G. Double emulsion-templated microspheres with flow-through pores at micrometer scale. *Colloid Polym. Sci.* **291**, 117–126 (2013).
112. Zhang, G.-H. *et al.* Fabrication of hollow porous PLGA microspheres for controlled protein release and promotion of cell compatibility. *Chinese Chem. Lett.* **24**, 710–714 (2013).
113. Wischke, C. & Schwendeman, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* **364**, 298–327 (2008).
114. Ruan, G. & Feng, S.-S. Preparation and characterization of poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol)–poly(lactic acid) (PLA–PEG–PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. *Biomaterials* **24**, 5037–5044 (2003).
115. Alshamsan, A. Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. *Saudi Pharm. J.* **22**, 219–222 (2014).
116. Baimark, Y. & Srisuwan, Y. Preparation of alginate microspheres by water-in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca²⁺ post-cross-linking. *Adv. Powder Technol.* **25**, 1541–1546 (2014).
117. Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L. & Davis, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control. Release* **57**, 171–85 (1999).

118. Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H. & Elaissari, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. **496**, 173–190 (2015).
119. Wang, Y. *et al.* PLGA/PDLLA core–shell submicron spheres sequential release system: Preparation, characterization and promotion of bone regeneration in vitro and in vivo. *Chem. Eng. J.* **273**, 490–501 (2015).
120. Elzoghby, A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *J. Control. Release* **172**, 1075–1091 (2013).
121. Elzoghby, A. O., Abo El-Fotoh, W. S. & Elgindy, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *J. Control. Release* **153**, 206–216 (2011).
122. Elzoghby, A. O., Samy, W. M. & Elgindy, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J. Control. Release* **157**, 168–182 (2012).
123. Lohcharoenkal, W. *et al.* Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–12 (2014).
124. Rahimnejad, M., Mokhtarian, N. & Ghasemi, M. Production of protein nanoparticles for food and drug delivery system. *J. Biotechnol.* **8**, 4738–4743 (2009).
125. Elzoghby, A. O., Samy, W. M. & Elgindy, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J. Control. Release* **161**, 38–49 (2012).
126. Fuchs, S. *et al.* Transglutaminase: new insights into gelatin nanoparticle cross-linking. *J. Microencapsul.* **27**, 747–754 (2010).
127. Nitta, S. K. & Numata, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1629–1654 (2013).
128. Kratz, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Control. Release* **132**, 171–183 (2008).
129. Desai, N. *et al.* Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1317–1324 (2006).
130. Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C. & Zhang, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1650–62 (2008).
131. Shelke, N. B., James, R., Laurencin, C. T. & Kumbar, S. G. Polysaccharide biomaterials for drug

- delivery and regenerative engineering. *Polym. Adv. Technol.* **25**, 448–460 (2014).
132. Okuyama, K. *et al.* Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydr. Polym.* **41**, 237–248 (2000).
133. Tiyaboonchai, W. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan Univ. J.* **11**, 51–66 (2003).
134. Mao, S., Sun, W. & Kissel, T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 12–27 (2010).
135. Jameela, S. R. & Jayakrishnan, A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle : studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. **16**, 769–775 (1995).
136. Zhang, Y., Yang, Y., Tang, K., Hu, X. & Zou, G. Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. *J. Appl. Polym. Sci.* **107**, 891–897 (2008).
137. Sarmiento, B. *et al.* Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm. Res.* **24**, 2198–2206 (2007).
138. De Campos, A. M., Sánchez, A. & Alonso, M. J. Chitosan nanoparticles: A new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* **224**, 159–168 (2001).
139. Jiménez, E. Dextranase in sugar industry: A review. *Sugar Tech* **11**, 124–134 (2009).
140. van Manen, H.-J., van Apeldoorn, A. a, Verrijck, R., van Blitterswijk, C. a & Otto, C. Intracellular degradation of microspheres based on cross-linked dextran hydrogels or amphiphilic block copolymers: a comparative raman microscopy study. *Int. J. Nanomedicine* **2**, 241–252 (2007).
141. Thakur, V. *et al.* Vincristine sulfate loaded dextran microspheres amalgamated with thermosensitive gel offered sustained release and enhanced cytotoxicity in THP-1, human leukemia cells: In vitro and in vivo study. *Mater. Sci. Eng. C* **61**, 113–122 (2016).
142. Sajadi Tabassi, S. A., Tafaghodi, M. & Jaafari, M. R. Induction of high antitoxin titers against tetanus toxoid in rabbits by intranasal immunization with dextran microspheres. *Int. J. Pharm.* **360**, 12–17 (2008).
143. Li, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 342–353 (1999).

144. Kohn, F. E., Ommen, J. G. V. A. N. & Feuen, J. The mechanism of the ring-opening polymerization of lactide and glycolide. **19**, 1081–1088 (1983).
145. Porter Keith A. Ring Opening Polymerization of Lactide for The synthesis of Poly (Lactic Acid). 25–32 (2006).
146. Jelonek, K. & Kasperczyk, J. Polyesters and polyester carbonates for controlled drug delivery. *Polimery/Polymers* **58**, 858–863 (2013).
147. Chan, J. M., Valencia, P. M., Zhang, L., Langer, R. & Farokhzad, O. C. Cancer Nanotechnology. **624**, 163–175 (2010).
148. Hayashi, T. Biodegradable polymers for biomedical uses. *Prog. Polym. Sci.* **19**, 663–702 (1994).
149. Labet, M. & Thielemans, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 3484 (2009).
150. Shimao, M. Biodegradation of plastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 242–247 (2001).
151. Lim, H. A., Raku, T. & Tokiwa, Y. Hydrolysis of polyesters by serine proteases. *Biotechnol. Lett.* **27**, 459–464 (2005).
152. Woodruff, M. A. & Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* **35**, 1217–1256 (2010).
153. Pitt, C. G. *et al.* Aliphatic Polyesters . I . The Degradation of Poly (ϵ - caprolactone) In Vivo. *J. Appl. Polym. Sci.* **26**, 3779–3787 (1981).
154. Sun, H., Mei, L., Song, C., Cui, X. & Wang, P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials* **27**, 1735–1740 (2006).
155. Natarajan, V., Krithica, N., Madhan, B. & Sehgal, P. K. Formulation and evaluation of quercetin polycaprolactone microspheres for the treatment of rheumatoid arthritis. *J. Pharm. Sci.* **100**, 195–205 (2011).
156. Raval, J. P., Naik, D. R., Amin, K. A. & Patel, P. S. Controlled-release and antibacterial studies of doxycycline-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *J. Saudi Chem. Soc.* **18**, 566–573 (2014).
157. Guerreiro, L. H. *et al.* Polymeric particles for the controlled release of human amylin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **94**, 101–106 (2012).
158. Lunt, J. Large-scale production, properties and commercial application of polylactic acid

- polymers. *Polym. Degrad. Stab.* **3910**, 14(-152 (1998).
159. Martin, O. A. . Plasticization and properties of biodegradable multiphase systems polymer. *Poly(lactic acid)* **42**, 6209–6219 (2001).
160. De Tayrac, R. *et al.* In vitro degradation and in vivo biocompatibility of poly(lactic acid) mesh for soft tissue reinforcement in vaginal surgery. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **85**, 529–536 (2008).
161. Anderson, J. M. & Shive, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 72–82 (2012).
162. Lee, B. K., Yun, Y. & Park, K. PLA micro- and nano-particles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2016). doi:10.1016/j.addr.2016.05.020
163. Kumari, A. *et al.* Nanoencapsulation and characterization of Albizia chinensis isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **82**, 224–232 (2011).
164. Leo, E., Brina, B., Forni, F. & Vandelli, M. A. In vitro evaluation of PLA nanoparticles containing a lipophilic drug in water-soluble or insoluble form. *Int. J. Pharm.* **278**, 133–141 (2004).
165. Pandey, S. K., Ghosh, S., Maiti, P. & Haldar, C. Therapeutic efficacy and toxicity of tamoxifen loaded PLA nanoparticles for breast cancer. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 309–319 (2014).
166. Makadia, H. K. & Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. **3**, 1377–1397 (2011).
167. McCall, R. L. & Sirianni, R. W. PLGA nanoparticles formed by single- or double-emulsion with vitamin E-TPGS. *J. Vis. Exp.* 51015 (2013). doi:10.3791/51015
168. Danhier, F. *et al.* PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **161**, 505–22 (2012).
169. Dias, D. J. S. *et al.* Chlorambucil Encapsulation into PLGA Nanoparticles and Cytotoxic Effects in Breast Cancer Cell. *J. Biophys. Chem.* **6**, 1–13 (2015).
170. Lin, R., Ng, L. S. & Wang, C. H. In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles. *Biomaterials* **26**, 4476–4485 (2005).
171. Chereddy, K. K. *et al.* PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. *J. Control. Release* **194**, 138–47 (2014).

172. Lin, W.-J. *et al.* Pegylated Polyester Polymeric Micelles as a Nano-carrier: Synthesis, Characterization, Degradation, and Biodistribution. *J. Exp. Clin. Med.* **2**, 4–10 (2010).
173. Tran, V. T. *et al.* Protein-loaded PLGA-PEG-PLGA microspheres: A tool for cell therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.* **45**, 128–137 (2012).
174. Logeart-Avramoglou, D. *et al.* In vitro and in vivo bioluminescent quantification of viable stem cells in engineered constructs. *Tissue Eng. Part C. Methods* **16**, 447–458 (2010).
175. DiMauro, S. & Schon, E. A. Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2656–2668 (2003).
176. Brahim-Horn, M. C. & Pouysségur, J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* **581**, 3582–3591 (2007).
177. Yu, D. Y. & Cringle, S. J. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp. Eye Res.* **80**, 745–751 (2005).
178. Erecińska, M. & Silver, I. A. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir. Physiol.* **128**, 263–276 (2001).
179. Minchenko, O., Opentanova, I. & Caro, J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6- bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett.* **554**, 264–270 (2003).
180. Russ, A. L., Haberstroh, K. M. & Rundell, A. E. Experimental strategies to improve in vitro models of renal ischemia. *Exp. Mol. Pathol.* **83**, 143–159 (2007).
181. Paquet, J. *et al.* Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. *Stem Cells Transl. Med.* **4**, 809–821 (2015).
182. Brunelle, J. K. & Chandel, N. S. Oxygen deprivation induced cell death: An update. *Apoptosis* **7**, 475–482 (2002).
183. Otto, S. *et al.* Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation. *Tissue Eng. A* **16**, 153–64 (2010).
184. Harvey, R. A. *Lippincott's Illustrated Reviews*.
185. Schiller, J. Claude Bernard et la réaction histochimique du glycogène. Un document inédit. *Rev. Hist. Sci. (Paris)*. **18**, 109–112 (1965).
186. Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C. &

- Ameneiros-Rodríguez, E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* **5**, 85–100 (2016).
187. Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E. & Cascante, M. How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J. Mol. Evol.* **45**, 446–455 (1997).
188. Zimmerman, M. & Snow, B. *An Introduction to Nutrition*. 813 (2012).
189. Pérez, S. & Bertoft, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch/Staerke* **62**, 389–420 (2010).
190. Shen, J. *et al.* Effect of water and methanol on the dissolution and gelatinization of corn starch in [MMIM][[(MeO)HPO 2]. *RSC Adv.* **5**, 60330–60338 (2015).
191. Kötting, O., Kossmann, J., Zeeman, S. C. & Lloyd, J. R. Regulation of starch metabolism: The age of enlightenment? *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 321–329 (2010).
192. Bertolini, A. *Starches: characterization, properties and applications*. (2010).
193. Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S. & Gill, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chem.* **81**, 219–231 (2003).
194. Mukerjea, R., Slocum, G. & Robyt, J. F. Determination of the maximum water solubility of eight native starches and the solubility of their acidic-methanol and -ethanol modified analogues. *Carbohydr. Res.* **342**, 103–110 (2007).
195. Kandra, L. Alpha-amylases of medical and industrial importance. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **666–667**, 487–498 (2003).
196. Payan, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1696**, 171–180 (2004).
197. Kishimoto, Y., Oyama, T. & Nitta, Y. Crystal Structure 2 . 2 A Resolution of fl-Amylase from *Bacillus* at. **1130**, 1120–1130 (1999).
198. Katsuya, Y., Mezaki, Y., Kubota, M. & Matsuura, Y. Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 A resolution. *J Mol Biol* **281**, 885–897 (1998).
199. Mikami, B. *et al.* Crystal Structure of Pullulanase: Evidence for Parallel Binding of Oligosaccharides in the Active Site. *J. Mol. Biol.* **359**, 690–707 (2006).
200. Lee, J. & Paetzel, M. Structure of the catalytic domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*.

- Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 188–92 (2011).
201. Sorimachi, K. *et al.* Solution structure of the granular starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **259**, 970–987 (1996).
202. Pazur, J. H. & Ando, T. ARTICLE : The Hydrolysis of Glucosyl The Hydrolysis of Glucosyl Oligosaccharides by Fungal Amyloglucosidase *. (1960).
203. Norouzzian, D. *et al.* Fungal glucoamylases. *Biotechnol. Adv.* **24**, 80–5 (2006).
204. Samadi, N. *et al.* The effect of lauryl capping group on protein release and degradation of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) particles. *J. Control. Release* **172**, 436–443 (2013).
205. Solbrig, C. M., Cody, V. & Saltzman, W. M. Polymer Nanoparticles for Immunotherapy from Encapsulated Tumor-Associated Antigens and Whole Tumor Cells. **4**, 47–57 (2006).
206. Ranjan, A. P., Mukerjee, A., Helson, L. & Vishwanatha, J. K. Scale up, optimization and stability analysis of Curcumin C3 complex-loaded nanoparticles for cancer therapy. *J. Nanobiotechnology* **10**, 38 (2012).
207. Gaber, M. H. Effect of gamma-irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 203–6 (2005).

ANNEXES

Liste des travaux

Résumés publiés dans des revues scientifiques avec comité de lecture

- **Glucose Delivery System Based-hydrogel Composite Scaffold for Enhancing MSC Survival**, Joseph Paquet, Julie Boisselier, Mickael Deschepper, Elodie Lefebvre, Adeline Gand, Véronique Larreta Garde, Hervé Petite, Emmanuel Pauthe, *Tissue Engineering Part A.*, Volume 21, Supplement 1, **2015**.
- **Engineering of a glucose delivery system based-hydrogel composite scaffold for enhancing mesenchymal stem cells survival**, Julie Boisselier, Joseph Paquet, Véronique Larreta Garde, Elodie Lefebvre, Adeline Gand, Mathilde Barbosa, Delphine Logeart-Avramaglou, Emmanuel Pauthe, Hervé Petite, *Frontier in Bioengineering and Biotechnology* 4, **2016**.

Communications orales dans des congrès internationaux

- **Glucose delivery system based-hydrogel composite scaffold for enhancing mesenchymal stem cells survival**, Julie Boisselier, Joseph Paquet, Véronique Larreta Garde, Elodie Lefebvre, Adeline Gand, Mathilde Barbosa, Delphine Logeart-Avramaglou, Hervé Petite, Emmanuel Pauthe, *10th World Biomaterial Congress, Montreal Canada*, **17-22 mai 2016**
- **Engineering of a glucose delivery for enhancing mesenchymal stem cells survival in a hydrogel scaffold**. Julie Boisselier, Joseph Paquet, Laurent Bidault, Michael Deschepper, Elodie Lefebvre, Charline Gossart, Julie Dubois, Adeline Gand, Delphine Logeart-Avramaglou, Véronique Larreta Garde, Hervé Petite, Emmanuel Pauthe. *27th European Conference on Biomaterials ESB 2015, Kraków Poland*, **30 août-3 septembre 2015**
- **Biomaterials as functionalized delivery systems: from nanoparticles synthesis to physicochemical-induced properties**. Julie Boisselier, Julie Dubois, Michel Boissière, Véronique Larreta Garde, Adeline Gand, Emmanuel Pauthe. *International Symposium on Biomaterial & Smart Systems, Cergy France*, **27-28 octobre 2014**

Communications par voies d'affiches dans des réunions scientifiques

- **Enhancement of mesenchymal stem cells survival based on a glucose delivery composite: from construct development to *in vivo* experiments.** Julie Boisselier, Joseph Paquet, Elodie Lefebvre, Pierre Becquart, Mathilde Barbosa, Adeline Gand, Véronique Larreta Garde, Hervé Petite, Emmanuel Pauthe. *Biomat 2015, Sainte Marie de Ré, 12-14 octobre 2015*
- **Engineering of a glucose delivery system based-hydrogel composite scaffold: towards enhancement of mesenchymal stem cells survival and functionality after implantation into large bone defect.** Julie Boisselier, Laurent Bidault, Michael Deschepper, Julie Dubois, Joseph Paquet, Adeline Gand, Delphine Logeart-Avramaglou, Hervé Petite, Véronique Larreta Garde, Emmanuel Pauthe. *Workshop du Pôle de Médecine Régénératrice de Bordeaux, Talence, 17-18 novembre 2014*
- **Biomaterials as functionalized delivery systems: from nanoparticles synthesis to physicochemical-induced properties.** Julie Boisselier, Julie Dubois, Michel Boissiere, Véronique Larreta Garde, Adeline Gand, Emmanuel Pauthe. *Assises Nationales de la Recherche en Biomatériaux, Autrans, 19-20 mai 2014*

Glucose Delivery System Based-Hydrogel Composite Scaffold for enhancing MSC survival

J. Paquet¹, J. Boisselier², L. Bidault², M. Deschepper¹, E. Lefebvre², C. Gossard², J. Dubois², A. Gand², D. Logeart-Avramoglou¹, V. Larreta Garde², H. Petite¹, E. Pauthe²;

¹Laboratoire B2OA, UMR 7052 CNRS, Paris, FRANCE,

²University of Cergy Pontoise, Biomaterial for Health group, ERRMECe, Cergy Pontoise, FRANCE.

Constructs developed for tissue engineering present limited potential due to massive death of transplanted cells after engraftment. This issue can be overcome by *in situ* supplying glucose that acts as the main metabolic fuel for Mesenchymal Stem Cells in severe hypoxia. In this study, a composite construct is engineered to provide glucose to MSCs and to enhance their survival when transplanted. Two combined strategies are developed. The glucose leakage outside the tissue construct is delayed by increasing the intrinsic viscosity of the fibrin hydrogels by supplementation with starch. The starch polysaccharide serves as the main source of glucose. The long-term supply of glucose is achieved adding α -amyloglucosidase (AMG)-containing poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. Sustained delivery of α -amyloglucosidase into the starch-loaded fibrin gel provides continuous production of glucose *in situ* via the enzymatic hydrolysis of starch. Hydrogels containing fibrin, starch and AMG are self-supported and present a storage moduli superior to 1 kPa. Enzymes containing-nanoparticles are able to produce glucose over a month and allow sustained glucose delivery inside hydrogels. Experiments show that MSCs loaded in these hydrogels and placed either *in vitro* under hypoxia or ectopically implanted in nude mice have a survival rate significantly higher than MSCs in fibrin gels over 14 days. This work is a proof of concept that an innovative-engineered construct, based on a starch hydrogel containing α -amyloglucosidase is able to deliver glucose versus time. In the context of regenerative medicine, it represents a highly pertinent system to enhance Human Mesenchymal Stem Cells survival in cell constructs.

Résumé

En ingénierie tissulaire, la survie *in vivo* de cellules souches implantées au sein d'un biomatériau est limitée par les conditions d'un environnement ischémique qui se caractérise par un déficit en oxygène et en nutriments. Récemment, dans le cadre d'un projet de recherche dédié au développement d'un hydrogel composite à base de fibrine, biomatériau conçu pour améliorer la survie de cellules souches post-implantation, il a été mis en évidence la nécessité de contrôler dans le temps et l'espace la disponibilité du glucose au sein de ce matériau. Cet apport *in situ* de glucose est réalisé par dégradation contrôlée de l'amidon, un polymère de glucose. Cette production est assurée par action enzymatique d'un catalyseur spécifique de l'hydrolyse de l'amidon, l'amyloglucosidase (AMG).

Toutefois, il convient de maîtriser différents paramètres tels que la fuite de l'AMG en dehors de l'hydrogel ou encore sa perte d'activité au cours du temps. Dans ce contexte, l'encapsulation de l'AMG dans des nanoparticules d'un polymère biodégradable et biocompatible, ici l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), devrait permettre le contrôle des paramètres susmentionnés.

Des nanoparticules de type core-shell contenant l'AMG (NPe) ont été synthétisés par l'adaptation d'un protocole de double émulsion (water-oil-water). Différentes méthodes ont été développées pour déterminer les propriétés physico-chimiques et biochimiques des nanoparticules produites. Le protocole de synthèse a été optimisé afin de produire des nanoparticules reproductibles et stériles utilisables dans des hydrogels implantables *in vivo*.

Le cahier des charges de l'hydrogel enrichi en amidon et en NPe impose un apport continu de glucose pendant 1 mois. La stabilité des nanoparticules a été étudiée en solution et dans les hydrogels. La production de glucose grâce à ces NPe a été investiguée en solution et en hydrogel mettant en avant l'intérêt de ces nanoparticules au sein du dispositif.

Mots clefs : nanoparticules, PLGA, double émulsion, production progressive de glucose, hydrogel.

Abstract

In tissue engineering, the *in vivo* survival of stem cells located within a biomaterial is limited by an ischemic environment characterized by a low supply of oxygen and nutrients. Recent studies on fibrin based hydrogels (designed to improve stem cells survival after implantation) have highlighted the need to control the spatiotemporal availability of glucose within a biomaterial scaffold. Glucose release occurs through the degradation of starch, a glucose polymer, at a rate controlled by the action of the enzyme amyloglucosidase (AMG), a specific catalyst for the hydrolysis of starch.

In order to eventually be of clinical impact, critical parameters must be tuned, such as the AMG leakage outside the hydrogel and its loss of activity over time. In this context, AMG encapsulation within nanoparticles of a biodegradable and biocompatible polymer, here poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), is a promising means toward controlling the above parameters.

The AMG-containing core-shell type nanoparticles (NPe) were synthesized by an adaptation of the double emulsion technique (water-oil-water). Different methods have been developed to determine the physicochemical and biochemical properties of the resulting nanoparticles. The synthesis was optimized to produce sterile and reproducible nanoparticles appropriate for *in vivo* implantable hydrogels.

Nanoparticle stability and glucose release were investigated in solution and in hydrogels. A key specification of the hydrogel system, enriched in starch and NPe, is the continuous supply of glucose over 1 month. Glucose production was observed to meet this specification, highlighting the potential advantages of this approach.

Keywords: nanoparticles, PLGA, double emulsion, progressive production of glucose, hydrogel.