



HAL
open science

Formation et clivage de gels de nanoparticules lipidiques : systèmes de délivrance de principes actifs

Ismail Cheibani

► **To cite this version:**

Ismail Cheibani. Formation et clivage de gels de nanoparticules lipidiques : systèmes de délivrance de principes actifs. Chimie théorique et/ou physique. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV017 . tel-01505547

HAL Id: tel-01505547

<https://theses.hal.science/tel-01505547>

Submitted on 11 Apr 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Physique Moléculaire et Structurale**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Ismail CHEIBANI

Thèse dirigée par **Isabelle TEXIER-NOGUES**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et des Matériaux et
Interfaces (LCMI)**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Formation et clivage de gels de nanoparticules lipidiques : systèmes de délivrance de principes actifs

Thèse soutenue publiquement le **20/07/2016**
devant le jury composé de :

M. Thierry DELAIR

Professeur, Université de Lyon 1, Lyon, Rapporteur

M. Hamid ELAISSARI

Directeur de recherches CNRS, Université de Lyon 1, Lyon, Rapporteur

M. Antoine HOANG

Ingénieur chercheur CEA, Grenoble, Examinateur

Mme. Séverine VIGNOUD

Ingénieur chercheur CEA, Grenoble, Examinatrice

M. Olivier RENAUDET

Professeur, Université Grenoble-Alpes, Grenoble, Président



A ma mère

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Chimie des Matériaux et Interfaces (LCMI) au Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA, Grenoble), dont je remercie le directeur, **Gilles Marchand** de m'y avoir intégré.

Un immense merci à ma directrice de thèse, **Isabelle TEXIER-NOGUES**. Merci Isabelle pour ta disponibilité. Merci pour m'avoir suivi et encouragé tout au long de cette thèse. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris et en particulier, de la rigueur scientifique, entre autres. Merci encore pour avoir corrigé avec beaucoup d'attention mon manuscrit (et ce malgré que tu attendais la naissance de ton bébé).

Merci à **Antoine HOANG** d'avoir co-encadré cette thèse. Merci pour les conseils précieux que tu m'as donnés.

Je remercie beaucoup **Thierry DELAIR** et **Hamid ELAISSARI** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci également à **Olivier RENAUDET** d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel du LCMI que j'ai côtoyé pendant ces années. Merci à chacun d'entre vous.

Je remercie aussi tout le personnel du CERMAV pour m'avoir aidé à faire les caractérisations rhéologiques.

ABREVIATIONS

BOP : (Benzotriazol-1-yloxy) tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate

DiD : Perchlorate de 1,1'-Dioctadécyl-3,3',3'-Tétraméthylindodicarbocyanine

DIEA : N,N-diisopropyléthylamine

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

DMSO : Diméthylsulfoxyde

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

LNP : Nanoparticules lipidiques

Mal : Maléimide

ONB : Ortho nitrobenzyle

PEG : Polyéthylène glycol

PLGA : Poly (acide lactique-coglycolique)

PPOC : 2-(2-nitrophényl) -propyl

RMN : Résonance à Magnétique Nucléaire

SA : Acide stéarique

SLN : Nanoparticule Lipidique Solide

SPDP : Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate

UV : Ultraviolet

RESUME

Les nanotechnologies sont devenues depuis plusieurs années un axe majeur de développement dans les domaines du diagnostic, de l'imagerie, de la délivrance de médicament, du suivi thérapeutique et de l'ingénierie tissulaire. L'administration de produits non injectables sous leur forme libre ou bien possédant une toxicité élevée, peut être facilitée par l'utilisation de nanovecteurs, modifiant leur distribution. Ils permettent donc de réduire les doses administrées, limiter les effets secondaires et diriger le contenu du vecteur (agent de contraste, drogue) vers un organe cible ou une tumeur, en présentant à la surface de celui-ci des molécules de ciblage de ces zones spécifiques.

Cette thèse s'inscrit dans cette thématique : nous avons exploré les possibilités de former des gels chimiques à partir des nanoparticules lipidiques qui sont constituées d'un cœur huileux pouvant encapsuler de petites molécules hydrophobes et d'une couche de surfactants permettant la stabilisation des gouttelettes en phase aqueuse.

Nous avons pu synthétiser plusieurs surfactants PEGylés fonctionnalisés (thiol, maléimides, amine, oxyamines et ONB-maléimide). Les protocoles de synthèse de ces surfactants sont affinés et reproductibles.

Ces surfactants ont été incorporés à la surface des nanoparticules lipidiques. Les nanoparticules fonctionnalisées ainsi obtenues ont été caractérisées et les fonctions présentes à leur surface sont mises en évidence.

Différentes sortes de gels chimiques stables, résistant à la dilution, rapides à fabriquer et contrôlables ont été élaborés.

Ces gels chimiques peuvent être utilisés dans l'avenir pour encapsuler des protéines ou des drogues.

Mots clés : Nanoparticules lipidiques, gels, orthonitrobenzyle, activation photochimique, PEG.

ABSTRACT

Nanotechnology became for several years a major development in the areas of diagnostics, imaging, drug delivery, therapeutic monitoring, and tissue engineering. The administration of non-injectable products in their free form or with high toxicity, can be facilitated by the use of nanocarriers, changing their distribution. They therefore reduce the doses administered, limit side effects and direct the contents of the vector (contrast agent, drug) to a target organ or tumor, by presenting to the surface thereof targeting molecules of these areas specific.

This thesis fits into this theme : we have explored the possibilities of forming chemical gels based on lipid nanoparticles which are composed of an oily heart can encapsulate small hydrophobic molecules and a layer of surfactants allowing stabilization of the droplets in the aqueous phase.

We have synthesized several PEGylated functionalized surfactants (thiol, maleimide, amine, and oxyamines ONB-maleimide). synthesis protocols of these surfactants are refined and repeatable.

These surfactants were incorporated into the surface of lipid nanoparticles. The functionalized nanoparticles thus obtained have been characterized and the functions present at their surface are highlighted.

Different kinds of chemical gels stable, resistant to dilution, fast and controllable manufacturing have been developed.

These chemical gels can be used in the future for encapsulating proteins or drugs.

Keywords : Lipid nanoparticles, gels, orthonitrobenzyl, photochemical activation, PEG.

SOMMAIRE

CHAPITRE 1. INTRODUCTION GENERALE	5
CHAPITRE 2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES NANOPARTICULES ET HYDROGELS	8
A. Nanoparticules : Synthèse, caractérisation et applications	9
2.1 Introduction	9
2.2 Nanoparticules organiques	10
1. Techniques « TOP-DOWN »	11
2. Techniques « BOTTOM-UP »	11
2.3 Les micelles, vésicules et liposomes lipidiques	12
2.4 Micelles polymériques, Polymersomes et Polymères conjugués	14
2.5 Dendrimères	16
2.6 Nanocapsules polymériques	17
2.7 Nanoparticules polymériques	18
2.8 Nanoparticules lipidiques	19
2.9 Conclusion	23
B. Les hydrogels	24
2.1 Introduction	24
2.2 Mécanisme de formation de réseau	24
2.3 Caractéristiques des hydrogels	25
2.4 Caractérisation des hydrogels	26
2.5 Les applications des hydrogels	26
2.6 Méthodes de synthèse des hydrogels	27
C. Hydrogels de nanoparticules	29
CHAPITRE 3. GELS DE NANOPARTICULES CROSSLINKES PAR PEG	30
3.1 Introduction	31
3.2 Gels chimiques de LNP obtenus par couplage NH ₂ /NHS	32
1) Synthèse du surfactant SACONHPEG100-NH ₃ +TFA-	32
2) Synthèse des LNP fonctionnalisées amines à la surface	34
3) Caractérisation et stabilité des LNP-NH ₂	35
a) Taille et potentiel zêta	35
b) Mise en évidence des fonctions amines à la surface des particules	39
4) Stabilité des fonctions NH ₂ présentes à la surface des LNP au cours du temps	43
5) Gélification des LNP-NH ₂ en présence des PEG-NHS-PEG	45
6) Caractérisation du gel de LNP-NH ₂ par rhéologie	46
3.3 Conclusion	49
CHAPITRE 4. GELS DE LNP CROSSLINKES PAR PEG PHOTOFORMABLE	50
4.1 Introduction	51
4.2 Gels chimiques photoformables obtenus par couplage Oxyamine/Aldéhyde	52
1) Synthèse du surfactant SACONH-PEG100-ONH-PPOC	53
2) Synthèse des LNP fonctionnalisées oxyamines à la surface	54
3) Caractérisation et stabilité des LNP-ONH-PPOC	54
a) Taille et potentiel Zêta	54
b) Mise en évidence des fonctions oxyamines à la surface des LNP	57
4) Stabilité des fonctions oxyamines présentes en surface de LNP au cours du temps	62
5) Photoformation du gel chimique Oxyamine-aldéhyde	64

a) Gélification en utilisant le glutaraldéhyde	64
b) Gélification en utilisant un PEG dialdéhyde	65
6) Caractérisation du gel de LNP oxyamines par rhéologie	66
4.3 Conclusion	68
CHAPITRE 5. GELS NANO/NANO A PARTIR DE LNP- THIOL	69
5.1 Introduction	70
5.2 Gels chimiques obtenus par formation d'un pont disulfure	71
1) Synthèse du surfactant SACONH-PEG100-S-S-PYR	71
2) Synthèse de LNP fonctionnalisées SSPYR et thiols à leur surface	72
3) Caractérisation et stabilité des LNP-SS-PYR	74
a) Taille et potentiel Zêta	76
b) Mise en évidence des fonctions thiols à la surface des LNP	77
4) Stabilité des fonctions thiols présentes à la surface des LNP au cours du temps	80
5) Gels chimiques de LNP obtenus par couplage thiol/disulfure	82
a) Formation du gel	84
b) Rhéologie du gel	84
6) Gels chimiques de LNP obtenus par irradiation des LNP-SH	85
a) Formation du gel	86
b) Rhéologie du gel	89
7) Conclusion	93
CHAPITRE 6. GELS NANO/NANO A PARTIR DE NANOPARTICULES THIOLS ET MALEIMIDES, ET PHOTOCUVAGE DES GELS	95
6.1 Introduction	96
6.2 Synthèse des surfactants PEG-Mal et PEG-ONB-Mal	99
1) Synthèse du surfactant PEG-Mal	99
2) Synthèse du surfactant PEG-ONB-Mal	99
6.3 Synthèse des LNP fonctionnalisées maléimide ou ONB-maléimide	101
6.4 Caractérisation et stabilité des LNP-Mal et LNP-ONB-Mal	102
1) Taille et potentiel Zêta	102
2) Mise en évidence des fonctions maléimides à la surface des nanoparticules	105
a) Mise en évidence des fonctions maléimides des LNP-Mal	106
b) Mise en évidence des fonctions ONB-maléimides à la surface des LNP	111
6.5 Gels chimiques de LNP obtenus par couplage thiol/maléimide	118
1) Formation des gels	118
2) Rhéologie des gels	120
3) Photocuvage du gel LNP-ONB-Mal-S-LNP	121
6.6 Conclusion	124
CHAPITRE 7. DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	125
7.1 Introduction	126
7.2 Synthèse des surfactants SA-CONH-PEG100-X	126
7.3 Formulation des nanoparticules fonctionnalisées	128
7.4 Réactivité des fonctions en surface des nanoparticules	131
7.5 Formation des gels chimiques	133
7.6 Perspectives	137
CHAPITRE 8. PARTIE EXPERIMENTALE	138
8.1 Synthèse et caractérisation des PEG fonctionnalisés	139

1) Les produits chimiques	139
2) Synthèse du surfactant SA-CONH-PEG100-NH2 3	139
3) Synthèse du surfactant SA-CONH-PEG100-SS-PYR 10	141
4) Synthèse du surfactant SA-CONH-PEG100-ONH-PPOC	142
5) Synthèse du surfactant SA-CONH-PEG100-Mal	144
6) Synthèse du surfactant PEG-ONB-Mal	145
8.2 Synthèse et caractérisation des nanoparticules	147
1) Les produits chimiques	147
2) Synthèse des nanoparticules et purification	147
a) Préparation de la phase huileuse	147
b) Préparation de la phase aqueuse	148
c) Mélange des phases et sonication	148
d) Purification	149
3) Caractérisation des nanoparticules	150
a) Taille, polydispersité et potentiel zêta	150
b) Caractérisation par fluorescence des nanoparticules fonctionnalisées	150
8.3 Synthèse et caractérisation des gels	152
1) Synthèse des gels	152
a) Gel de LNP-NH2 + NHS-PEG-NHS	152
b) Gel de LNP-ONH-PPOC + aldéhyde-PEG-aldéhyde (ou glutaraldéhyde)	152
c) Gel de LNP-SH + LNP-SSPYR	153
d) Gel de LNP-SH irradiées	153
e) Gel de LNP-SH + LNP-Mal	154
f) Gel de LNP-SH + LNP-ONB-Mal	154
2) Photoclivage du gel (LNP-SH + LNP-ONB-Mal)	154
3) Dégradation du gel (LNP-SH irradiées ou LNP-SH + LNP-SSPYR)	154
4) Caractérisation des gels	155
a) Choix du plan de mesure	155
b) Détermination du domaine linéaire	157
c) Mesures rhéologiques sur les nanoparticules et gels	159
d) Mise en évidence de la photoformation ou la dégradation des gels de nanoparticules	159
REFERENCES	160

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GENERALE

Les nanotechnologies sont devenues depuis plusieurs années un axe majeur de développement dans les domaines du diagnostic, de l'imagerie, de la délivrance de médicament, du suivi thérapeutique et de l'ingénierie tissulaire. L'administration de produits non injectables sous leur forme libre ou bien possédant une toxicité élevée, peut être facilitée par l'utilisation de nanovecteurs, modifiant leur distribution. Ils permettent donc de réduire les doses administrées, limiter les effets secondaires et diriger le contenu du vecteur (agent de contraste, drogue) vers un organe cible ou une tumeur, en présentant à la surface de celui-ci des molécules de ciblage de ces zones spécifiques. Mais plus que de simples porteurs d'agents thérapeutiques, une nouvelle génération de nanomédicaments voit le jour avec des effets thérapeutiques propres. L'industrie pharmaceutique a déjà mis au point des traitements innovants contre le cancer utilisant les propriétés des nanotechnologies.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour but de développer des gels chimiques biocompatibles à partir des nanoparticules lipidiques développées en tant que nanovecteurs au CEA /LETI / DTBS depuis 8 ans.

Pour cela, plusieurs méthodes de synthèse organique et de gélification vont être utilisées pour pouvoir obtenir des gels de nanoparticules pouvant encapsuler des molécules d'intérêt et les relarguer sous contrôle. Des techniques d'analyses seront utilisées pour caractériser toute la procédure, de la synthèse des surfactant fonctionnalisés, en passant par la formation des nanoparticules et leurs fonctionnalisations, jusqu'à la gélification et la destruction des gels sous l'action d'un réactif ou de la lumière.

Le chapitre 2 de ce manuscrit va être consacré à la bibliographie des hydrogels et des nanoparticules.

Le chapitre 3 s'intéresse au développement des gel chimiques de nanoparticules lipidiques en utilisant des crosslinkers polyéthylène glycol.

Le chapitre 4 abordera la possibilité de former ces gels sous l'action de la lumière.

Le chapitre 5 met en place la procédure de gélification par couplage covalent direct entre deux types de nanoparticules.

Le chapitre 6 développe la possibilité de former des gels photoclivables sous l'action de la lumière.

Une conclusion sera faite dans le chapitre 7 pour résumer et comparer tous les résultats obtenus.

Dans le chapitre 8, nous détaillerons tous les modes opératoires utilisés pour la synthèse organique, préparation des nanoparticules lipidiques et la gélification.

CHAPITRE 2

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

DES NANOPARTICULES ET

HYDROGELS

A.Nanoparticules : Synthèse, caractérisation et applications

2.1 Introduction

Une des principales limitations des nombreux médicaments actuellement disponibles est leur manque de spécificité envers le site pathologique. Typiquement, seulement 1% de la dose administrée atteint la cellule cible tandis que le reste du médicament est distribué dans tout l'organisme (1,2). En outre, une proportion importante des nouvelles drogues chimiques sont insolubles ou peu solubles dans l'eau. Ces deux facteurs combinés nécessitent l'administration de doses totales très élevées de médicaments pour atteindre des concentrations locales suffisantes sur le site de distribution, provoquant de nombreux effets toxiques hors cible. Le concept de ciblage de médicaments a été proposé par Paul Erlich dès 1906 (2). La "balle magique" serait composée d'une entité qui devrait reconnaître et se lier à la cible biologique tandis qu'une seconde entité devrait assurer la fonction thérapeutique.

Dès la seconde moitié du XXe siècle, beaucoup de recherches ont été consacrées à l'élaboration de systèmes de délivrance de médicaments à base de nanomatériaux, pour réaliser ce concept de médicament ciblé.

Les principaux avantages de l'utilisation de nano-systèmes attendus pour la délivrance de médicaments sont : (i) une amélioration de la biodisponibilité des drogues chimiques en augmentant la solubilité aqueuse, (ii) une meilleure interaction avec les membranes cellulaires et les protéines, les nano-systèmes étant de taille similaire aux structures biologiques. (iii) une grande fonctionnalité qui offre la possibilité de concevoir des plates-formes multifonctionnelles, y compris des revêtements menant à une circulation prolongée dans le sang, des ligands de ciblage qui introduisent la possibilité de traverser différentes membranes biologiques, (iv) la possibilité d'adapter les propriétés physiques des nanomédicaments qui ouvre la possibilité de réaliser la libération de médicament activée à distance, et enfin, (v) la

possibilité de développer des systèmes multimodaux qui combinent des propriétés différentes.

Pour atteindre sa cible, le nanocarrier de médicament idéal doit être - stable dans l'environnement biologique avec une durée de vie dans la circulation sanguine adoptée, -être non toxique pour les composants cellulaires du sang et -être invisible pour le système immunitaire (3). Pour obtenir ces propriétés, il est possible de jouer sur les différentes propriétés physico-chimiques des nanoparticules : nature chimique, taille, la chimie de surface, leur charge, leur déformabilité

2.2 Nanoparticules organiques

Bien que des nanoparticules inorganiques telles que les particules d'oxyde de fer ou particules d'or soient utilisées en nanomédecine, les nanoparticules organiques sont plus étudiées pour les applications de délivrance de médicaments.

Les nanoparticules organiques sont basées sur des structures organiques naturelles ou synthétiques. La nature offre un large éventail d'exemples de nanoparticules organiques telles que les agrégats de protéines, les émulsions lipidiques, les émulsions de lait, ou des structures organisées plus complexes tels que les virus..etc.

Pour les formulations pharmaceutiques, des nanoparticules peuvent être utilisées : des liposomes, des polymersomes, des nanoparticules polymériques ..

Les molécules utilisées pour la fabrication des nanoparticules organiques peuvent être biodégradables, ce qui en fait des systèmes attrayants pour l'administration de médicaments et les applications biomédicales.

Les nanoparticules organiques peuvent être fabriquées à la fois par la méthode "top-down" et par la méthode "bottom-up". Pour les techniques "top-down", la plus commune est le broyage mécanique. Récemment, d'autres techniques plus complexes impliquant la microfluidique et la lithographie ont été utilisées (4, 5). Pour les techniques "bottom-up", les

nanoparticules organiques sont généralement produites par des méthodes de précipitation et de condensation (6, 7), en utilisant les méthodologies synthétiques (8, 9) ou en appliquant des principes d'auto-assemblage.

1. Techniques « TOP-DOWN »

Les techniques qui impliquent la synthèse de matériaux à l'échelle nanométrique à partir de leurs matériaux de base de taille macroscopique ou microscopique sont connus sous le nom de techniques "top-down", indiquant une fabrication par réduction de la taille.

Dans les techniques "top-down", le broyage est la technique la plus utilisée. Les processus de broyage sont basés sur le broyage mécanique de la matière en vrac pour obtenir des nanostructures avec une large distribution de taille. Ces processus sont principalement utilisés pour fabriquer des nanoparticules de drogue à partir de composés très peu solubles dans l'eau, et presque tous les produits sur le marché fabriqués par cette technique utilisent le broyeur à billes, aujourd'hui connu sous le nom de technologie NanoCrystal™ (10, 11).

Une des inconvénients de cette technique est l'inévitable contamination des nanomatériaux produits due à l'abrasion.

D'autres techniques « top-down » comprennent l'utilisation de la microfluidique et de la lithographie. Elles ont été utilisées récemment pour produire des nanomatériaux organiques pour la nanomédecine et pour des applications en microélectronique. Ce genre de méthodes offre plus de contrôle sur la taille, la forme, et la composition des nanoparticules (12).

2. Techniques « BOTTOM-UP »

Les techniques "bottom-up" sont basées sur la construction des nanoparticules à partir de molécules simples par synthèse chimique ou par auto-organisation. Les techniques de "bottom-up" sont utilisées pour la génération d'une large gamme de nanomatériaux tels que des micelles (13, 14), des vésicules (15, 16), des liposomes (17, 18), des polymersomes (19,

20), des polymères conjugués, des dendrimères (21, 22), des capsules et des nanoparticules polymériques (23-27).

Comme c'est la méthode que l'on utilisera par la suite pour synthétiser les nanoparticules, nous allons fournir une description générale des différentes nanoparticules organiques produites par des techniques "bottom-up".

2.3 Les micelles, vésicules et liposomes lipidiques

Les liposomes, vésicules et micelles sont des nanoparticules formées par auto-assemblage supramoléculaire de tensio-actifs et de lipides (28). La cohésion de l'ensemble est assurée par la faible solubilité dans l'eau des molécules amphiphiles.

Le terme « micelles » a été introduit par McBain en 1913 (29) pour décrire les particules colloïdales formées par les détergents et les savons. Quand des molécules amphiphiles sont dispersées dans de l'eau, leurs parties non polaires s'assemblent pour former des agrégats moléculaires, laissant le côté polaire en contact direct avec les molécules de solvant, il en résulte une structure sphérique ou cylindrique qui protège les queues hydrophobes dans le centre. Des micelles inverses peuvent être obtenues lorsque la molécule amphiphile est ajoutée dans un solvant non polaire. Dans ce cas, la particule formée a le groupe de tête dans le centre et les chaînes de queue dans l'extérieur. La forme et la taille des micelles peuvent être contrôlées par la nature de la molécule amphiphile et les conditions de la solution telle que la concentration, la température, le pH et la force ionique (30). Les micelles sont des systèmes véritablement dynamiques. Normalement, la formation de micelles ne se produit pas en dessous d'une certaine concentration du tensio-actif, appelée la concentration micellaire cinétique (CMC)

Les vésicules, contrairement aux micelles, sont des compartiments aqueux entourés d'une bicouche de différentes molécules amphiphiles (31). Lorsque la membrane présente une seule bicouche amphiphile, elles sont appelées vésicules uni-lamellaires (ULV : Unilamellar Vesicles), et si elle est composée de plus d'une bicouche amphiphile, les vésicules sont connues comme des vésicules multi-lamellaires (MLV).

Selon leur composition, deux types de vésicules peuvent être distinguées : 1) d'abord, des vésicules composées de glycolipides, naturels ou synthétiques, de structures similaires à celles des membranes cellulaires ; 2) les vésicules à base de phospholipides et de leurs mélanges, découverts par Bangham en 1961 (32), aussi appelés « liposomes » ou « vésicules lipidiques ».

Les propriétés des vésicules telles que leur taille et leur polydispersité, leur potentiel de surface, leur degré d'ionisation, leur perméabilité et leur stabilité physique dépendent du procédé utilisé pour leur préparation, ainsi que de la nature des molécules qui les composent (33). Les procédés de préparation des vésicules peuvent être classés en deux catégories. La première est la formation spontanée de vésicules (34), dans laquelle il est juste nécessaire d'appliquer une certaine contrainte afin d'homogénéiser le système, mais pas d'énergie externe. Le second procédé de préparation des vésicules utilise des forces de cisaillement (35), et ce cisaillement peut être effectué par sonication, extrusion ou d'autres méthodes. Toutes ces techniques nécessitent l'apport d'énergie externe, car ces vésicules ne sont pas thermodynamiquement stables, même si elles peuvent avoir une grande stabilité cinétique. Pour la formation de MLVs (36), habituellement les lipides sont dissous dans un solvant organique. Puis le solvant est éliminé par évaporation sous vide pour former un film lipidique sec; cette étape est suivie de l'hydratation de la pellicule avec un tampon aqueux et d'agitation douce pour former finalement un mélange de MLV. La taille et la distribution en taille des MLV formés dépendent de la concentration, de la composition lipidique et de l'énergie fournie pendant l'agitation.

Les MLV peuvent aussi être formées à partir des ULV. La dispersion de taille des MLV la plus étroite est obtenue par procédé d'extrusion (37). Dans ce procédé, la suspension de lipides est forcée à passer à travers un filtre en polycarbonate ayant une taille de pores définie. Les vésicules extrudées ont un diamètre proche de la taille des pores.

Si les phospholipides sont dispersés en solution aqueuse, ils forment de grandes structures multi-lamellaires comme nous l'avons discuté ci-dessus. Néanmoins, plusieurs méthodes ont été développées pour former des structures multi-lamellaires ULV. La sonication est la méthode la plus courante pour produire des ULVs à partir de MLV. Les ultrasons appliqués pendant la sonication induisent des collisions entre les vésicules. Cela se traduit par la formation de fragments de bicouches lipidiques et d'autres petits agrégats qui se réarrangent

dans des vésicules ULVs (38). Il existe plusieurs inconvénients de cette technique tels qu'une distribution de taille non uniforme des vésicules formées et le manque de stabilité des vésicules formées qui ont tendance à s'agréger au cours du temps. En outre, les procédés de sonication ne peuvent pas être utilisés pour produire de grandes quantités, et la sonication génère une contamination potentielle des échantillons qui induit la dégradation des lipides.

Aujourd'hui, les vésicules et les liposomes jouent un rôle important dans la recherche comme systèmes modèles pour des membranes biologiques perméables (39). Ils ont également une importance pour l'industrie, en particulier dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire, car les vésicules peuvent encapsuler des molécules ou biomolécules d'intérêt faiblement solubles dans l'eau avec la possibilité de contrôler l'action des molécules incorporées. Dans le domaine pharmaceutique, certains de ces systèmes sont déjà sur le marché tels que le Doxil[®], l'Ambisome[®] et le Daunoxome[®] (40-42).

Le compartiment aqueux peut lui servir de réservoir pour l'encapsulation de principes actifs hydrosolubles ou biologiques, tels que ADN et protéines. Par exemple, l'encapsulation d'enzymes dans des liposomes les protège des dégradations chimiques lors de leur circulation dans le flux sanguin.

2.4 Micelles polymériques, Polymersomes et Polymères conjugués

De manière analogue aux lipides amphiphiles, les copolymères di-blocs, avec un bloc hydrophile et un bloc hydrophobe, forment des micelles dans certains solvants. Lorsqu'un solvant est thermodynamiquement bon pour l'un des blocs et génère la précipitation de l'autre bloc (43), en d'autres termes, lorsque l'un des blocs du copolymère est soluble dans le solvant et l'autre bloc insoluble, les parties non solubles des chaînes de copolymère s'assemblent pour former des agrégats micellaires avec un cœur formé de blocs de copolymères insolubles et une enveloppe composée par les blocs de copolymères solubles. Un très bon exemple de l'utilisation des micelles de copolymères à bloc comme nanovecteurs ciblés pour la délivrance thérapeutique sont les micelles formées par le polymère à bloc

polylactique, le polyméthoxy éthylène glycol et folate-poly (éthylène glycol) de diamètre 146 nm développés par Zhu et al (44).

Les polymersomes sont des vésicules artificielles de structure semblable à celle des vésicules lipidiques, mais à base de copolymères à blocs amphiphiles (45). Ils peuvent être préparés par les mêmes procédés que ceux utilisés pour les vésicules lipidiques et les liposomes. Les méthodes de préparation peuvent être résumées en deux groupes : les techniques sans solvant et les techniques de déplacement de solvant (46). Les techniques sans solvant consistent en l'hydratation du copolymère à blocs à l'état sec pour former des vésicules, par réhydratation du film polymérique (47) ou l'électro-formation (48). La dernière méthode consiste en la réhydratation des polymères répartis sur une paire d'électrodes ; une fois que le solvant est ajouté, un champ électrique est appliqué pour faciliter l'hydratation et la formation de vésicules.

Les techniques de déplacement de solvants sont des méthodes qui nécessitent une première étape pour dissoudre le copolymère à bloc dans un solvant organique avant le mélange avec de l'eau. Après le mélange, le solvant organique est éliminé par différents procédés.

Le procédé d'injection (49), l'évaporation en phase inverse (50, 51) et l'épuisement du détergent (52) sont des exemples de techniques de déplacement de solvants utilisées pour les polymères.

Les polymersomes sont très attractifs de par leur similarité structurale avec les membranes biologiques. Par rapport aux vésicules lipidiques et aux liposomes, les polymersomes présentent l'avantage de former des structures souples, une stabilité mécanique élevée et une résistance à un stimulus externe (53). Les polymersomes peuvent encapsuler des molécules hydrophobes ou hydrophiles. Ils peuvent être utilisés comme nanovecteurs pour l'administration d'agents thérapeutiques.

Un autre type de nanostructure à base de polymère sont les conjugués. Ces conjugués sont des structures hybrides solubles dans l'eau, formées par des chaînes de polymères liées de manière covalente à une molécule telle qu'un médicament ou une protéine. Le concept des polymères conjugués a été proposé en 1975 (54) par Ringsdorf avec un modèle de polymère conjugué-médicament à base de polymères synthétiques. Il a proposé qu'un certain nombre

de molécules- médicaments ou de molécules bioactives peuvent être liées de façon covalente à une macromolécule par l'intermédiaire d'un bras espaceur (linker), comportant une liaison clivable afin d'assurer la libération du médicament au niveau du site désiré ; le polymère conjugué peut contenir, en outre, des fonctions spécifiques de reconnaissance (molécules ciblées) ou d'autres molécules pour améliorer la biodisponibilité (55).

Dans tous les procédés pour la synthèse des polymères conjugués, le but est d'obtenir des structures bien définies avec une distribution étroite de poids moléculaire pour le polymère et un bras espaceur pour la liaison des molécules de médicaments ou des protéines. Les procédés de polymérisation radicalaire contrôlée, tels que la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP) et le transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT) (56) sont très appropriés pour la synthèse des polymères conjugués car ils fournissent un contrôle de haut niveau de la distribution de la taille des chaînes de polymère.

Quelques conjugués polymères protéine sont déjà sur le marché pharmaceutique tels que le Zinostatin Stimalmer® (SMANCS) pour le traitement de carcinome hépatocellulaire (57); l'Oncaspar® PEG-L-asparaginase pour le traitement de la leucémie (58), le PEG-intron™ pour traiter l'hépatite C, la sclérose en plaques (59), le Neulasta™ contre la neutropénie associée à la chimiothérapie du cancer (60).

2.5 Dendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules hautement ramifiées parfaitement monodispersées (61). Cette forte ramification des molécules de polymère donne aux dendrimères des propriétés chimiques et physiques différentes de molécules de polymères linéaires, qui sont d'un grand intérêt pour des applications biomédicales et industrielles.

Les dendrimères peuvent être synthétisés par des méthodes divergentes et convergentes. Dans les méthodes divergentes (62), le dendrimère se développe vers l'extérieur à partir de la molécule de base. Le monomère contenant un groupe réactif et deux groupes dormants réagit d'abord avec le noyau formant le dendrimère de première génération, et successivement, le

nouveau pourtour de la molécule est activé et réagit avec plusieurs monomères jusqu'à ce qu'une grande structure macromoléculaire se forme. Ce procédé présente les inconvénients que les produits secondaires formés ne sont pas faciles à purifier. Dans les méthodes convergentes (63), le dendrimère est synthétisé par étapes à partir des groupes extérieurs. Lorsque les molécules ramifiées sont assez grandes, elles sont attachées à une molécule noyau. Les dendrimères générés par ces procédés sont faciles à purifier et ont une structure contrôlée.

Des dendrimères ont déjà été utilisés comme agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (64), en tant que systèmes de délivrance de médicaments (65), en tant qu'agents thérapeutiques par capture de neutrons du Bore (66), en thérapie génique en tant que vecteurs de transfert de gènes à travers la membrane cellulaire (67), et en médecine régénératrice (68).

2.6 Nanocapsules polymériques

Les nanocapsules sont des coquilles polymériques avec une cavité interne aqueuse pouvant servir de réservoir pour une substance d'intérêt. Les meilleurs exemples de nanocapsules naturelles sont les capsides virales, dans lesquelles la coquille est composée de sous-unités protéiques identiques. Les capsides virales sont utilisées pour transporter du matériel génétique (69). Inspiré par les capsides de virus, les scientifiques ont mis au point des nanocapsules de polymères synthétiques qui offrent de nombreuses applications intéressantes pour l'encapsulation et la délivrance de principes actifs (chimiques ou biologiques).

Les nanocapsules peuvent être obtenues par polymérisation interfaciale ou par dépôt direct d'un polymère préformé. Les réactions de polymérisation interfaciale consistent en la réaction interfaciale entre deux monomères (70). Tout d'abord, une émulsion de deux phases non miscibles est formée. Chaque phase contient un monomère capable de réagir à l'intérieur de l'autre pour former une paroi initiale. Après la formation initiale de cette paroi, la

polymérisation est contrôlée par la diffusion, ce qui entraîne la formation de capsules de taille dépendant de l'émulsion initiale. Les avantages des procédés de polymérisation interfaciale sont la grande efficacité d'encapsulation des principes actifs et la possibilité d'une formation in situ des nanocapsules. Le principal inconvénient de ce procédé est l'élimination des solvants organiques utilisés pour former les émulsions support.

Plusieurs méthodes telles que la nanoprécipitation (71, 72), l'émulsion-diffusion (73-76), la double émulsification (77, 78), l'émulsion-coacervation (79-81), et la technique couche par couche (LBL) (82, 83) ont été proposées jusqu'à présent pour la préparation de nanocapsules par dépôt direct d'un polymère préformé.

2.7 Nanoparticules polymériques

Les nanoparticules polymériques également connues sous le nom de nanosphères polymériques, sont généralement définies comme des particules submicroniques de polymère solide ayant une structure de type matrice (84), dans laquelle un chargement peut être encapsulé dans la matrice de polymère ou adsorbé à la surface.

Comme les capsules polymériques, les nanoparticules polymériques peuvent également être préformées par des techniques de polymérisation in situ ou en utilisant des polymères formés. La réaction la plus couramment utilisée pour préparer des nanoparticules par polymérisation est la polymérisation en émulsion soit huile dans l'eau ou eau dans l'huile. Cette réaction consiste à disperser le monomère émulsionnable dans une phase dans laquelle il est soluble ; ensuite, la réaction est initiée par des agents physiques ou chimiques formant des radicaux libres qui entrent en collision avec les molécules de monomère. La réaction s'arrête lorsqu'il n'y a plus de monomère (85). Lorsque l'encapsulation d'un principe actif est souhaitée, la molécule à encapsuler est dissoute dans la solution de réaction, au début de la polymérisation avant l'addition du monomère. Le produit de synthèse est une dispersion stable de colloïdes de polymères dans un milieu aqueux (86).

Pour la délivrance de médicaments, les principales nanoparticules polymériques sont des particules de PLA, PLGA et nanoparticules de biopolymères comme chitosan...

2.8 Nanoparticules lipidiques

- Nanoparticules lipidiques solides (SLN)

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) ont été développées au début des années 1990.

Ce sont des suspensions colloïdales de lipides et sont élaborées en remplaçant le lipide liquide (huile) d'une émulsion huile/eau par un lipide solide ou un mélange de lipides solides.

Les SLN sont des dispersions ayant typiquement une teneur en eau de 70 à 99,9 % et se composent de 0,1 % à 30 % en pourcentage massique de lipides solides dispersés dans un milieu aqueux et le cas échéant stabilisé par 0,5% à 5% d'agent tensio-actif (87).

- Nanoparticules lipidiques (Lipidots™)

Le Laboratoire de Chimie des Microsystèmes et Interfaces (LCMI) (Anciennement LFCM, Laboratoire de Fonctionnalisation, Chimie et Microsystèmes) a développé depuis 8 ans un système de nanoparticules lipidiques appelées lipidots™. Ces nanovecteurs ont été imaginés dans un premier temps pour l'encapsulation de fluorophores lipophiles pour créer des agents de contraste fluorescents performants, puis ont vu ensuite leur domaine d'application s'étendre à la délivrance de médicaments (88).

Dans la suite du manuscrit, nous nous focalisons sur l'étude de ces nanoparticules lipidiques (lipidots™).

a) Le système Lipidot™

Les nanoparticules lipidiques fabriquées par ultrasons sont composées d'un cœur lipidique, mélange d'huile de soja et de supocire (de mono-, di- et triglycérides à longues chaînes C16 – C18 principalement, Tableau 2.1 et 2.2), et stabilisées par une monocouche de surfactants amphiphiles composée de phospholipides (lécithine de soja, dénomination commerciale Lécithine S75), et de surfactants PEGylés (stéarate de PEG2000, dénomination commerciale

MyrjS40) (Figure 2.1). Ces derniers confèrent notamment une grande stabilité colloïdale au système (88).

Composition de l'huile de soja	
Nature des acides gras	Pourcentage
C ₁₆	8,0 à 13,3
C ₁₆ : 1	< 0,2 %
C ₁₈	2,4 à 5,4 %
C ₁₈ : 1	17,7 à 26,1 %
C ₁₈ : 2	49,8 % à 57,1 %
C ₁₈ : 3	5,5 à 9,5 %

Composition de la SuppocireRNC	
Longueur de la chaîne carbonée des glycérides	Pourcentage
C ₈	0,1 à 0,9 %
C ₁₀	0,1 à 0,9 %
C ₁₂	25 à 50 %
C ₁₄	10 à 24,9 %
C ₁₆	10 à 24,9 %
C ₁₈	10 à 24,9 %

Tableau 2.1 et 2.2 : Composition des chaînes grasses présentes dans le cœur des lipidots®.

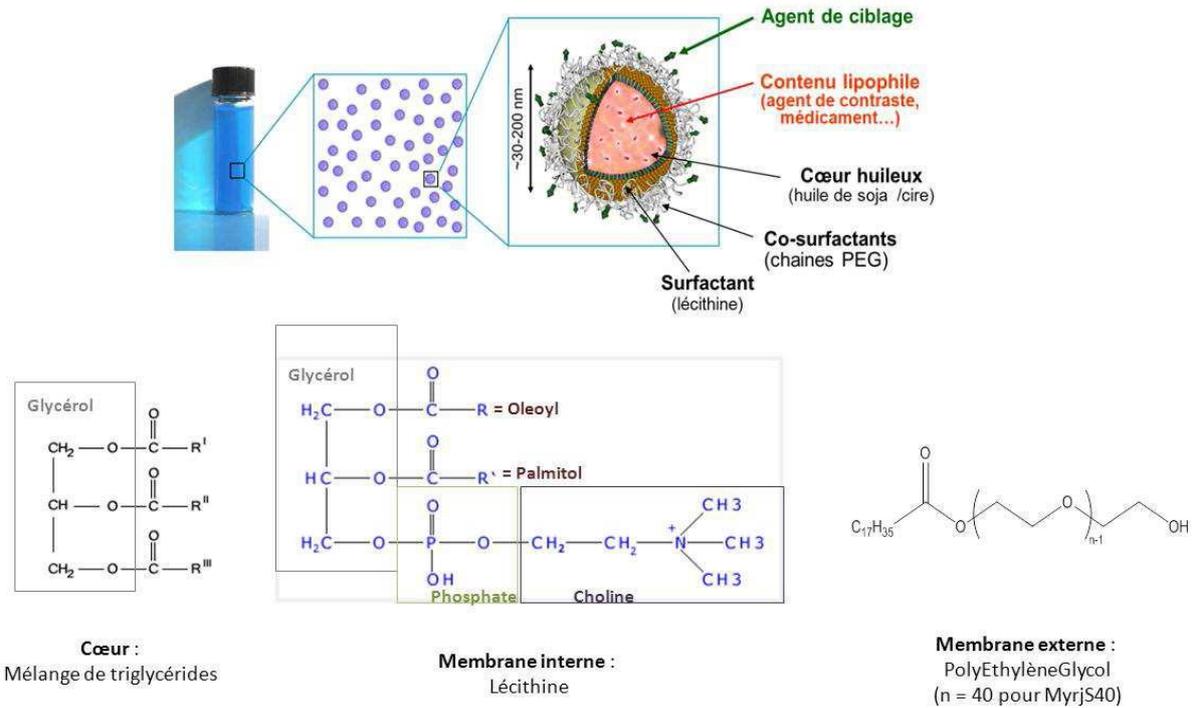


Figure 2.1 : Représentation schématique de la nanoparticule Lipidique.

La taille des nanoparticules obtenues est modulable. En effet, en modifiant les quantités de chacun des ingrédients, il est possible de synthétiser de manière reproductible des nanoparticules de 30 nm à 120 nm de diamètre. Il est également possible de moduler les propriétés du cœur en modifiant le ratio cire/huile afin d'ajuster sa viscosité. Ce qui retient sur les cinétiques de diffusions des molécules encapsulées en son sein.

Les lipidots sont stables plus de 1 an à température ambiante, et résistent à des pH compris entre 2 et 11.

Les lipidots™ sont des nanoparticules biocompatibles (l'ensemble des produits utilisés dans la formulation sont autorisés par les autorités de santé), biodégradables, dont tous les composés, principalement à base de lipides, peuvent être éliminés par l'organisme. Le cœur hydrophobe permet d'encapsuler des composés hautement lipophiles, qui ne pourraient pas être administrés tels quels sous forme libre par voie intraveineuse, car insolubles dans l'eau. La surface des nanoparticules à base de surfactants PEGylés permet d'envisager le greffage de molécules ou de biomolécules d'intérêt à l'extérieur des lipidots™, comme des peptides ou des anticorps (88).

b) Propriétés biologiques des Lipidots™

Des essais de toxicité cellulaire ont démontré la faible cytotoxicité des particules (IC50 = 1000 µg / mL de lipides sur la lignée de fibroblastes 3T3), ainsi qu'une faible captation des lipidots™ par les cellules myéloïdes (fibroblastes 3T3 et macrophages J774A). Des études de tolérance chez le rat, après administration intraveineuse d'une dose unique de 150 mg / kg de particules de diamètre 50 nm, ont montré que l'ensemble des animaux ont survécu au moins 6 semaines normalement avec prise de poids et consommation alimentaire et hydrique normales. Des essais immunologiques permettant de mettre en évidence l'activation ou non du complément en présence de lipidots ont été réalisés sur 24 h. Aucune induction d'inflammation (dosage des interleukine-1β, interleukines-6 et TNF-α) ou d'activation du complément n'ont été observées. Ces données ont mis en évidence la pertinence de ces nanoparticules pour la vectorisation *in vivo* de molécules d'intérêt (drogue, agent de contraste).

Ces premiers résultats nous ont encouragés à continuer le développement des lipidots et à proposer dans ce travail d'étudier la possibilité de former des gels chimiques stables à partir de ces nanoparticules.

2.9 Conclusion

La nanomédecine est en évolution constante depuis ces 40 dernières années afin de développer des objets plus performants, plus biocompatibles et moins toxiques. Les nanoparticules permettent d'encapsuler des composés sensibles à l'environnement, que ce soit des agents de contraste pour de l'imagerie de fluorescence, ou des composés thérapeutiques pour la délivrance de médicaments. Les nano-objets ont vu leur structure évoluer au cours du temps afin d'améliorer leurs propriétés de vectorisation *in vivo*. Peuvent être citées notamment, la couronne de surfactants hydrophiles permettant d'augmenter la demi-vie plasmatique du vecteur après injection ou encore le couplage de molécules d'adressage à la surface des objets permettant une délivrance ciblée du vecteur et de son contenu. Les nanoobjets deviennent ainsi des plateformes de plus en plus sophistiquées permettant de créer des objets bi ou tri modaux.

B. Les hydrogels

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons détaillé les différentes sortes de nanoparticules organiques. L'objectif de cette thèse étant de faire de ces nanoparticules des hydrogels chimiques, stables, biodégradables et pouvant encapsuler des molécules d'intérêt, dans la suite du chapitre, une étude bibliographique sur ce qui existe comme hydrogels sera faite.

2.1 Introduction

Le terme hydrogel décrit des structures de réseau en trois dimensions obtenues à partir de polymères synthétiques et/ou naturels qui peuvent absorber et retenir une quantité importante d'eau (89).

Cette partie du chapitre 1 passe en revue les méthodes de préparation d'hydrogels à partir de polymères hydrophiles de synthèse et d'origine naturelle. Les progrès récents dans les méthodes de réticulation pour la préparation d'hydrogels sont particulièrement abordés. Enfin, les hydrogels de nanoparticules seront également étudiés.

2.2 Mécanisme de formation de réseau

La gélification peut avoir lieu soit par liaison physique (gélification physique) ou par liaison chimique (gélification chimique).

Les gels physiques peuvent être classés en gels physiques forts et gels physiques faibles.

Les gels physiques forts possèdent de fortes liaisons physiques entre les chaînes de polymère. Des exemples de ces liaisons physiques fortes sont les microcristaux lamellaires, ou les hélices doubles et triples.

Les gels physiques faibles sont assemblés par des liens réversibles formés d'associations temporaires entre les chaînes. Ces associations ont des durées de vie limitées et sont

dynamiques avec en continu la rupture et la réformation des liens entre chaînes. Des exemples de liaisons physiques faibles sont des liaisons hydrogène, les associations ioniques ou des interactions hydrophobes.

En revanche, la gélification chimique implique la formation de liaisons covalentes et se traduit par un gel toujours solide. Les trois principaux processus de gélification chimique comprennent les réactions de condensation, d'addition et de couplage covalent.

2.3 Caractéristiques des hydrogels

La capacité de rétention d'eau et la perméabilité sont les plus importantes caractéristiques d'un hydrogel. Les groupes hydrophiles polaires sont les premiers à être hydratés au moment du contact avec l'eau (eau primairement liée). En conséquence, le gonflement du réseau expose les groupes hydrophobes capables d'interagir à leur tour avec les molécules d'eau. Cela conduit à la formation d'eau liée à des molécules hydrophobes, aussi appelée « eau secondairement liée ». L'eau primairement et secondairement liées sont souvent combinées et appelées « eau totale liée ». Le réseau va absorber de l'eau supplémentaire, en raison de la force d'entraînement osmotique des chaînes du réseau vers la dilution infinie. Ce gonflement supplémentaire s'oppose aux liaisons covalentes ou réticulation physique qui représentera une force de rétraction élastique du réseau. Ainsi, l'hydrogel atteindra un niveau de gonflement à l'équilibre. L'eau supplémentaire absorbée est appelée « eau libre » et remplit l'espace entre les chaînes du réseau et/ou le centre des pores ou macropores. En fonction de la nature et de la composition de l'hydrogel, l'étape suivante du gonflement peut être la désagrégation et/ou de dissolution du gel si les chaînes du réseau ou les liaisons transversales sont dégradables.

Les hydrogels biodégradables, contenant des liaisons labiles, sont avantageusement utilisés dans des applications telles que l'ingénierie tissulaire, la cicatrisation des plaies et l'administration de médicaments (90).

La biocompatibilité est la troisième propriété caractéristique la plus importante requise par un hydrogel dédié à des applications biomédicales. La biocompatibilité signifie l'absence de toxicité de l'hydrogel et de ses produits de dégradation. Idéalement, ils doivent être métabolisés en produits inoffensifs ou peuvent être excrétés par le processus de filtration rénale. Généralement, les hydrogels possèdent une bonne biocompatibilité grâce à leur surface hydrophile et à la faible énergie libre interfaciale lorsqu'ils sont en contact avec des fluides corporels, ce qui en résulte une faible tendance pour les protéines et cellules à adhérer à leur surface. En outre, les propriétés mécaniques des hydrogels minimisent l'irritation des tissus environnant (91).

2.4 Caractérisation des hydrogels

Les principales méthodes de caractérisation d'un hydrogel incluent l'étude de ses interactions avec l'eau (solubilité et gonflement), ses propriétés structurales et mécaniques.

Ils peuvent être caractérisés par FTIR (détermination de leurs structures chimiques), par rhéologie (détermination de leurs propriétés mécaniques) (92-95).

2.5 Les applications des hydrogels

Un des principaux domaines d'application des hydrogels synthétiques et naturels est l'ingénierie tissulaire, pharmaceutique et le domaine biomédical (96). En raison de leur forte capacité d'absorption de l'eau et leur biocompatibilité, ces matériaux sont utilisés dans le pansement des plaies, l'administration de médicaments, les systèmes transdermiques, les matériaux dentaires, les implants, les systèmes des polymères injectables, les applications

ophtalmiques (97). Quelques exemples de leurs applications des hydrogels sont présentés dans le tableau 2.3.

Application	Polymères	Référence
Soins des plaies	polyuréthane, poly(éthylène glycol), poly (propylène glycol),	98
	poly (vinylpyrrolidone), polyéthylène glycol	99
	Xanthan, méthyl cellulose	100
	carboxyméthyl cellulose, alginate	101
Délivrance de médicaments	Poly (vinylpyrrolidone)	102
	Amidon, poly (vinylpyrrolidone), Acide poly (acrylique)	103
	carboxyméthyl cellulose, hydroxypropyl methyl cellulose	104

Tableau 2.3 : Exemples d'applications des hydrogels.

2.6 Méthodes de synthèse des hydrogels

Des réseaux réticulés de polymères synthétiques tels que le polyéthylène glycol (PEG) (105), la polyvinylpyrrolidone (PVP) (106), l'acide polylactique (PLA) (107), l'acide polyacrylique (PAA) (108), le polyméthacrylate (PMA) (109), le polyéthylène glycol (PEG) (110), ou de biopolymères naturels (111) comme l'alginate, le chitosane, le carraghénane, l'acide hyaluronique, et la carboxyméthylcellulose ont été décrits dans la littérature. Les techniques

de préparation des hydrogels les plus utilisés sont : la réticulation physique (112) et la réticulation chimique (113,114).

a) La réticulation physique

Les gels physiques ou réversibles assemblés par réticulation physique présentent l'avantage d'une facilité relative de production sans utilisation d'agents de réticulation. Ces agents peuvent affecter l'intégrité des substances destinées à être piégées dans les hydrogels (par exemple : cellules, protéines, etc). Le choix du polymère, de sa concentration et du tampon de préparation peut conduire à la formation d'une large gamme de textures de gels.

Les gels physiques peuvent être préparés par chauffage/refroidissement d'une solution de polymère (115-117), par interaction ionique (118-120), par liaison hydrogène (121, 122).

b) La réticulation chimique

La réticulation chimique repose sur la formation de liaisons covalentes entre deux chaînes de polymères. La réticulation des polymères naturels ou synthétiques peut être réalisée par la réaction de leurs groupes fonctionnels (tels que OH, COOH, NH₂). Des groupes fonctionnels peuvent également être introduits sur le squelette des polymères par le greffage de monomères. Une autre possibilité est la polymérisation d'un monomère à l'intérieur d'un autre polymère solide pour former une structure de réseaux (123-125).

C'est la réticulation chimique qui va être utilisée dans la suite du manuscrit pour préparer des gels chimiques à partir des nanoparticules lipidiques. Ces gels chimiques ont l'avantage d'être stables et surtout résistants à la dilution.

C. Hydrogels de nanoparticules

La combinaison de nanoparticules et d'hydrogels crée des propriétés synergiques, uniques et potentiellement utiles qui ne figurent pas dans les nanoparticules ou hydrogels seuls. Ces propriétés conférées aux hydrogels de nanoparticules dépendent du type de nanoparticules incorporées, ce qui à son tour est déterminé par l'application envisagée du matériau composite conçu (126).

L'objectif de cette thèse est d'élaborer des gels chimiques à partir des nanoparticules lipidiques.

Il existe plusieurs approches couramment utilisées dans la littérature pour obtenir des hydrogels de nanoparticules : 1) formation d'un hydrogel dans une suspension de nanoparticules ; 2) incorporation physique des nanoparticules dans la matrice d'hydrogel après la gélification, 3) la formation des nanoparticules réactives à l'intérieur d'un gel préformé, et 4) la réticulation à l'aide des nanoparticules et agents de réticulation pour former des hydrogels (126).

C'est cette dernière méthode qui sera utilisée dans la suite du manuscrit pour la préparation des gels de nanoparticules lipidiques ; car nous voulons préparer des gels à partir des nanoparticules lipidiques par réticulation ou en utilisant un agent de réticulation. Pour cette méthode, il suffit de fonctionnaliser les nanoparticules et les faire réagir avec d'autres nanoparticules fonctionnalisées ou avec un agent de réticulation. Aussi, cette méthode permet de garder les propriétés physico-chimiques des nanoparticules même après gélification.

Dans les chapitres suivants, nous décrivons la préparation de plusieurs sortes de nanoparticules avec des surfactants fonctionnalisés à leur surface. Ensuite, dans chaque chapitre, des gels chimiques seront élaborés à partir de ces nanoparticules.

CHAPITRE 3

GELS DE NANOPARTICULES

CROSSLINKES PAR PEG

3.1 Introduction

Les nanoparticules lipidiques donnent lieu à des gels physiques lorsque leur concentration en lipides est élevée. En effet, la concentration massique élevée conduit au rapprochement des nanoparticules les unes des autres, et comme les surfactants PEG et phospholipides sont incorporés à la surface de ces nanoparticules, cela favorise la formation de liaisons hydrogène entre les surfactants, conduisant ainsi à la formation de gel physique. L'inconvénient de tels gels physiques est leur instabilité lors de la dilution à température élevée. Etant donné que les liaisons hydrogènes sont faibles, l'ajout d'un solvant aqueux conduit à l'éloignement des particules les unes des autres et donc à la destruction du gel physique.

L'objectif de ce chapitre est d'élaborer des gels chimiques stables et résistants à la dilution, à partir de nanoparticules lipidiques. Pour cela, nous allons introduire des groupes fonctionnels à la surface des nanoparticules et assurer la cohésion du gel non plus par des liaisons hydrogènes mais par des liaisons covalentes entre groupements fonctionnels et un crosslinker portant deux groupes pouvant réagir avec ce groupement.

Dans la suite de ce chapitre seront présentées les différentes étapes de la formation de ces gels chimiques qui sont :

- La synthèse de surfactants polyéthylène glycol fonctionnalisés ;
- L'incorporation de ces surfactants à la surface des nanoparticules ;
- La mise en évidence de la faisabilité de gels covalents à partir de LNP fonctionnalisées.

Dans ce chapitre, l'outil chimique utilisé pour former ces gels est un assemblage covalent : Amine/N-hydroxysuccinimide(NHS)-ester.

La réaction des NHS-ester avec des amines est fortement dépendante du pH : à pH faible, le groupe amine est protoné et aucun couplage ne se produit. A un pH trop élevé, l'hydrolyse du NHS-ester est rapide, et le rendement de couplage diminue. La valeur de pH optimal pour

la réaction amine/NHS-ester est 7-8,5. Dans cet intervalle de pH, les NHS-esters sont relativement stables par rapport à l'hydrolyse (127).

La formation de liaison peptidique entre un groupement amine et un groupement acide activé par une fonction N-hydroxysuccinimide (NHS) est une réaction rapide (Figure 2.1).

Dans ce travail, le groupement amine est introduit à la surface des nanoparticules lipidiques. Le groupement NHS est disponible sur un agent de couplage commercialisé par Sigma-Aldrich, NHS-PEG-NHS (65 unités éthylènes glycol).

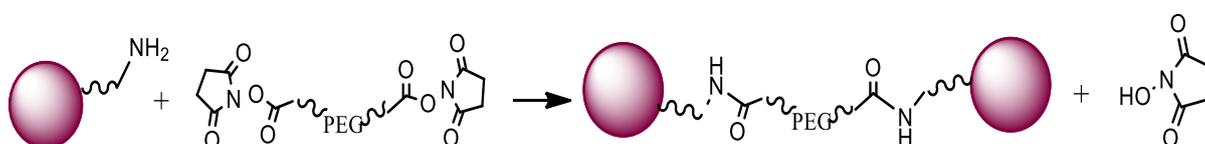


Figure 2.1 : Schéma de couplage amine-NHS-ester.

3.2 Gels chimiques de LNP obtenus par couplage NH_2/NHS

1) Synthèse du surfactant $\text{SA}_{\text{CONH}}\text{PEG100-NH}_3^+\text{TFA}^-$

Pour introduire les groupements amines à la surface des nanoparticules lipidiques, nous allons les formuler à l'aide de surfactants PEGylés modifiés par un groupement amine à leur extrémité hydrophile.

Le produit $\text{SA}_{\text{CONH}}\text{PEG100-NH}_3^+\text{TFA}^-$ (aussi noté PEG- NH_2 par la suite) est un surfactant de type polyéthylène glycol (100 unités) qui est lié à une chaîne grasse (C18) via une fonction amide et de l'autre côté possède une fonction amine (Figure 2-2). Le protocole de synthèse permettant d'obtenir ce surfactant est détaillé en partie expérimentale.

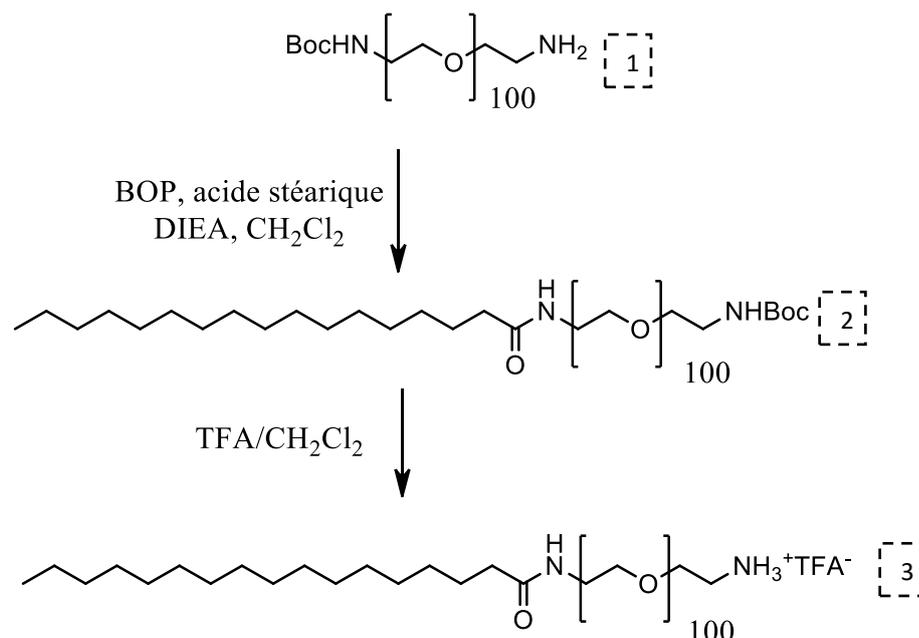


Figure 2-2 : Synthèse du surfactant $SA_{CONHPEG100-NH_3^+TFA^-}$.

Brièvement, la synthèse est réalisée en 2 étapes à partir du produit 1 commercialisé par Iris Biotech GmbH (rendement global de 61 %) et permet d'obtenir la molécule d'intérêt pure en moins de 3 jours. Les sels de TFA sont stables quelles que soient les conditions de stockage. Le produit est néanmoins conservé jusqu'à quelques mois au congélateur avant utilisation. La première étape de la synthèse est un couplage peptidique avec le réactif de castro (BOP) utilisé comme activateur d'acide. Le BOP permet une cinétique de couplage instantanée en transformant l'acide stéarique en ester activé (par le HMPA : hexamethylphosphoramide) lui-même réagissant immédiatement avec l'amine primaire (du NH₂-PEG₁₀₀-NHBoc). Il en résulte la formation d'une liaison amide particulièrement stable. La déprotection du groupement protecteur Boc se fait en milieu organique en présence de TFA. La perte de produit générée durant ces 2 étapes est due principalement à la purification qui a lieu par précipitation ou/et dialyse car aucune réaction secondaire n'a été identifiée par CCM.

2) Synthèse des LNP fonctionnalisées amines à la surface

Des nanoparticules basées sur la formulation de départ "F 50" classiquement utilisée dans le laboratoire (50 nm de diamètre, nommée F50-réf) et modifiées par incorporation de 5 %, 10%, 20 % et 40 % de PEG-NH₂ ont été synthétisées en suivant le protocole décrit dans le chapitre 8.

Brièvement, une phase huileuse et une phase aqueuse homogénéisées à 55 °C sont mélangées puis les nanoparticules sont obtenues par sonication du mélange.

La composition du prémix lipidique (lipides du cœur de la particule et phospholipides) est identique à celle de la formulation des nanoparticules « standard » (Tableau 2.1). Un fluorophore est inclus dans la phase huileuse (le DiD) pour permettre une visualisation des nanoparticules : il est présent à l'état de traces.

	Masse (mg)			
F50	Masse Huile	Masse Cire	Masse Lecithine	DiD
	68	272	65	0,04

Tableau 2.1 : Constituant du prémix lipidique.

Le Tableau 2.2 résume les différents constituants de la phase aqueuse nécessaires pour l'obtention de 3.25 mL de dispersion. Le surfactant PEG-NH₂ est ajouté à hauteur de 5 à 40 % massique par rapport à la masse totale de surfactants PEGylés. Ce surfactant possède 100 unités éthylène glycol alors que le Myrj s40 n'en possède que 40. Cela permet de penser que les fonctions NH₂ situées à l'extrémité du surfactant PEG-NH₂ peuvent être plus accessibles à la surface des particules. La quantité totale de surfactants PEGylés (en moles) diminue. La masse globale de surfactants PEGylés reste constante à 345 mg. La dissolution complète des surfactants PEGylés nécessite de chauffer la solution à 55 °C.

	Volume PBS	Masse Myrj S40	Masse SA _{COO} PEG100-NH ₂	Masse totale de surfactants	Nombre de moles total en surfactants
F50 avec 5% de PEG-NH ₂	2.5 mL	327,75 mg	17,25 mg	345 mg	159,35 μmol
F50 avec 10% de PEG-NH ₂	2.5 mL	310,5mg	34,5 mg	345 mg	154,8 μmol
F50 avec 20% de PEG-NH ₂	2.5 mL	276 mg	69 mg	345 mg	145,68 μmol
F50 avec 40% de PEG-NH ₂	2.5 mL	207 mg	138 mg	345 mg	127,45 μmol

Tableau 2.2 : Constituants de la phase aqueuse.

Après sonication, les nanoparticules sont purifiées par dialyse, et filtrées sur 0,22 μm.

3) Caractérisation et stabilité des LNP-NH₂

a) Taille et potentiel zêta

Le diamètre hydrodynamique, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta des LNP-NH₂ sont mesurés par diffusion quasi-élastique de la lumière (DLS) et leur stabilité au cours du temps (lors d'un stockage à 4°C) est étudiée.

Des nanoparticules de référence sans PEG-NH₂ (0% PEG-NH₂) sont incluses dans l'étude. Les LNP prises comme référence sont élaborées avec un Myrj s100, incorporé à une hauteur de 20 %, qui contient 100 unités d'éthylène glycol pour être dans les mêmes conditions qu'avec les particules incorporant le PEG-NH₂ dont le nombre d'unités PEG est aussi de 100. Ainsi, les nanoparticules 0 % PEG-NH₂ ont un diamètre hydrodynamique de 59 nm proche de celle des particules fonctionnalisées amine (à 20 % de PEG-NH₂) qui ont un diamètre moyen de 59 nm (Tableau 2.3, Figure 2.3). Les nanoparticules F-50, classiquement utilisées au laboratoire (100

% Myrj s40 avec 40 unités d'éthylène glycol), présentent pour leur part des diamètres hydrodynamiques plus proches de 50 nm de diamètre.

Echantillon	Diamètre (nm)	Polydispersité	Diamètre (nm)	Polydispersité	Diamètre (nm)	Polydispersité
	t = 0		t = 2 semaines		t = 3 mois	
F50-réf (100 % Myrj s40)	49 ±1	0,1 ±0,01	50 ±1	0,1 ±0,01	50 ±1	0,11 ±0,01
0% PEG-NH2	59 ±1	0,16 ±0,01	60 ±1	0,17 ±0,01	60 ±1	0,18 0,01
5%PEG-NH2	52 ±1	0,12 ±0,01	49 ±1	0,15 ±0,01	61 ±1	0,31 ±0,01
10%PEG-NH2	57 ±1	0,19 ±0,01	57 ±1	0,19 ±0,01	64 ±1	0,26 ±0,01
20% PEG-NH2	59 ±1	0,21 ±0,01	55 ±1	0,16 ±0,01	59 ±1	0,19 ±0,01
40% PEG-NH2	74 ±1	0,22 ±0,01	71 ±1	0,2 ±0,01	70 ±1	0,2 ±0,01

Tableau 2.3 : Tailles et indices de polydispersité des F50-réf et LNP fonctionnalisées amines.

Nous observons que les dispersions de LNP-NH2 sont stables, sans évolution notable de taille ou de polydispersité pendant au moins trois mois, comme illustré sur les deux Figures 2.3 et 2.4.

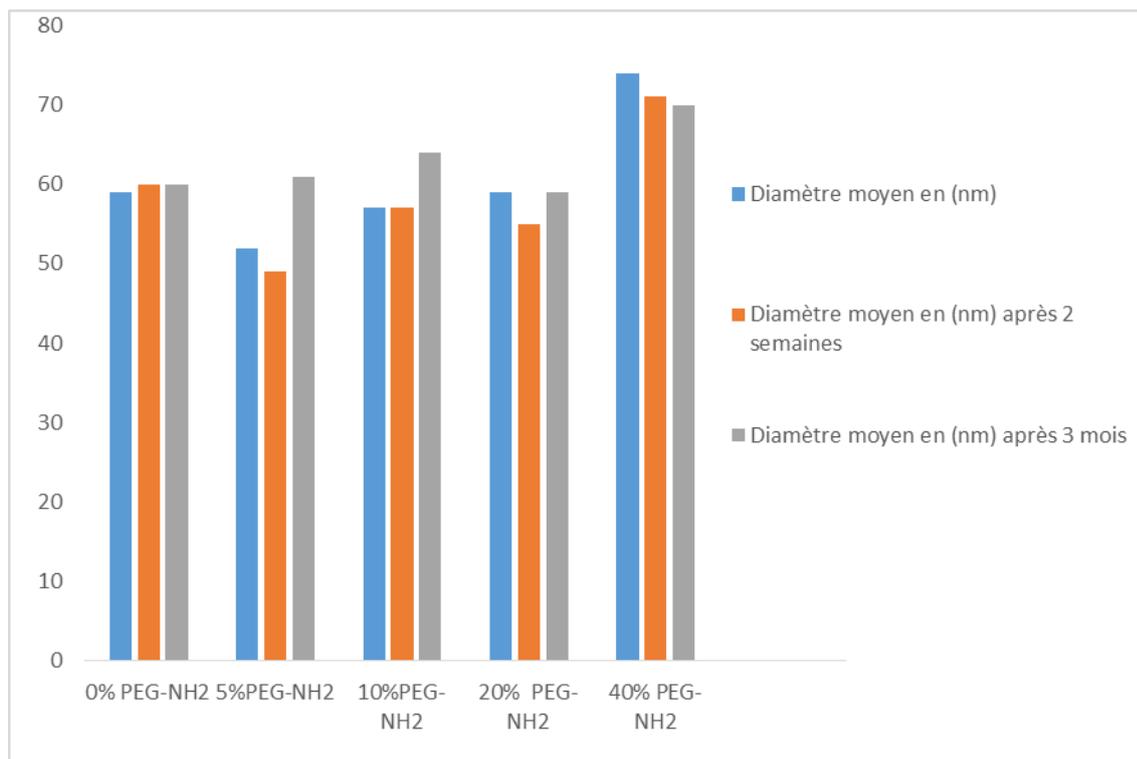


Figure 2.3 : Tailles des particules fonctionnalisées amine en fonction du taux de surfactant $SA_{CONH}PEG100-NH_3^+TFA^-$.

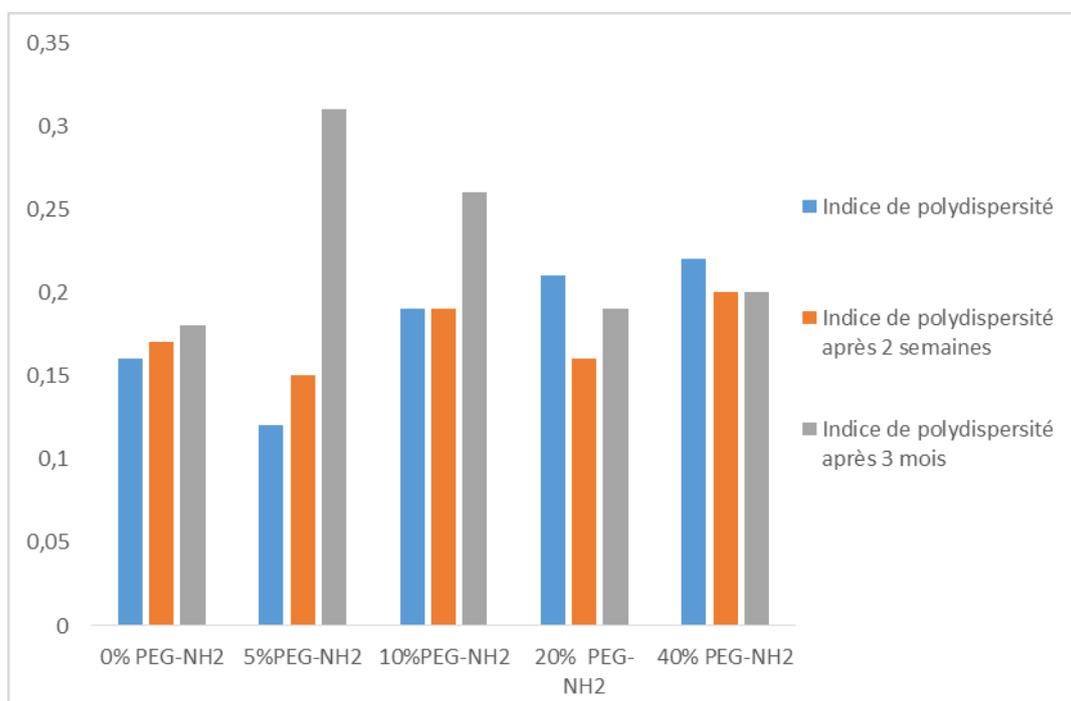


Figure 2.4 : Indices de polydispersité des particules fonctionnalisées amine en fonction du taux de surfactant $SA_{CONH}PEG100-NH_3^+TFA^-$.

Les tailles des particules restent dans une fourchette entre 50 et 60 nm, sauf pour celles avec 40 % de PEG-NH₂ dont le diamètre est plus important (70 nm). Les dispersions de particules 40% PEG-NH₂ présentent également un aspect gélifiant et sont difficiles à manipuler à cause de leur viscosité élevée par rapport aux dispersions des autres particules.

Un suivi de stabilité colloïdale des nanoparticules au cours de leur stockage à 4°C a été effectué. On constate que ces LNP gardent la même taille 3 mois après leur synthèse. Cependant, de petites augmentations en indice de polydispersité ont été remarquées pour 5 % et 10 % de PEG-NH₂ incorporés à la surface des particules.

Les charges à la surface des nanoparticules sont estimées par la mesure de leur potentiel Zêta en solution dans l'eau distillée (Tableau 2.4 et Figure 2.5).

Echantillon	Potentiel Zêta (mv)
0% PEG-NH ₂	-5 ±1
5%PEG-NH ₂	-4 ±1
10%PEG-NH ₂	-2 ±1
20% PEG-NH ₂	1 ±1
40% PEG-NH ₂	2 ±1

Tableau 2.4 : Valeur de potentiels Zêta mesurés dans l'eau.

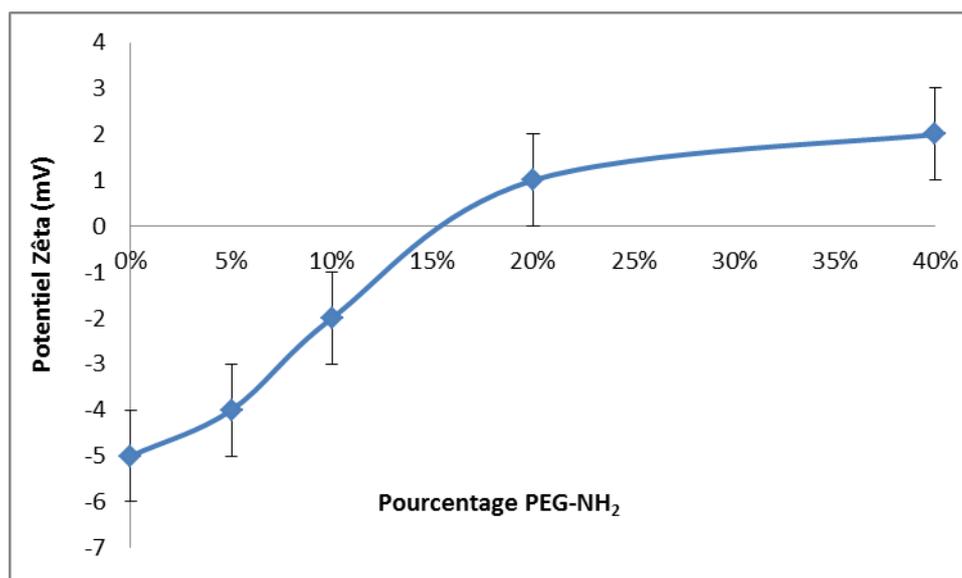


Figure 2.5 : Potentiel Zêta des LNP-NH₂ en fonction des masses du surfactant PEG-NH₂ incorporées.

Pour les nanoparticules fonctionnalisées par le PEG-NH₂, des valeurs un peu plus élevées que celles trouvées avec les nanoparticules standards ont été obtenues, bien que ce soit peu significatif par rapport à l'incertitude sur la mesure. Ce résultat va, cependant, dans le sens attendu pour une augmentation de la densité de charges positives à la surface des nanoparticules (fonctions NH₂ protonées et deviennent NH₃⁺ dans l'eau).

b) Mise en évidence des fonctions amines à la surface des particules

Vu l'impossibilité de caractériser la fonctionnalisation des LNP par RMN (les pics correspondant aux constituants des LNP empêchent la visibilité de ceux qui correspondent aux fonctions à la surface), la mise en évidence et la quantification des fonctions amines incorporées à la surface se fait par fluorescence. Les fonctions amines étant très réactives vis-à-vis des N-hydroxysuccinimide ester (noté NHS-ester), elles seront mises en évidence par réaction de couplage entre des nanoparticules NH₂ et la fluorescéine-NHS. La réaction a été conduite dans le tampon PBS pH 7.4 en présence d'EDC (1-Ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]

carbodiimide hydrochloride) permettant de retransformer les fonctions acides carboxyliques éventuelles (resultant de la réaction d'hydrolyse du NHS-ester) en fonction ester activé très réactif vis-à-vis des amines. La réaction est réalisée avec un équivalent de fluorescéine-NHS par rapport aux fonctions amines initialement introduites lors de la formulation.

Une purification par colonne d'exclusion stérique (Sephadex G-25 Medium, GE Healthcare) est réalisée pour séparer les nanoparticules LNP-NH-CO-Fluorescéine de la fluorescéine-NHS libre.

Les fractions d'élution recueillies sont analysées par spectrofluorimétrie sur un lecteur de plaques Tecan (Tecan Infinite M1000). Les analyses sont réalisées dans deux plages de longueurs d'onde : 1) excitation à 490 nm et émission à 520 nm, et 2) excitation à 640 nm et émission à 690 nm, qui correspondent respectivement à la fluorescéine et au DiD.

Le même protocole a été réalisé avec des particules LNP-NH₂ n'ayant pas été dialysées pour quantifier par comparaison le nombre de PEG-NH₂ incorporés à la surface des particules et estimer si la perte de ces PEG pendant la dialyse est importante. Cette mesure permet également de remonter au nombre réel de fonctions NH₂ qui réagissent avec la fluorescéine-NHS et donc en déduire le rendement de la réaction de greffage du fluorophore sur les nanoparticules.

Les particules de référence (0 % PEG-NH₂) ont également été mises à réagir avec la NHS-fluorescéine dans les mêmes conditions. Ces nanoparticules (ne portant pas de fonctions amines) constituent un contrôle négatif et permettent de vérifier que les résultats obtenus correspondent bien au couplage NH₂-NHS.

Les profils d'élution obtenus avec les 2 types de particules (LNP-NH₂ et LNP-Myrj s100) sont présentés Figure 2.8 et Figure 2.9. Les LNP supposées porter les fonctions amines à leur surface réagissent bien avec la fluorescéine-NHS (co-élution de la fluorescéine-greffée à la surface des nanoparticules et du DiD inclus dans le cœur des particules dans les premières fractions). Au contraire, le contrôle négatif (LNP-Myrj s100) n'a pas montré de réactivité vis-à-vis de la fluorescéine-NHS (Figure 2.6 et 2.7).

Les LNP non dialysées présentent une troisième bande dans la plage de longueurs d'ondes de la fluorescéine que l'on n'observe pas avec les particules dialysées. Cette bande pourrait correspondre aux surfactants PEG-NH₂ non incorporés à la surface des LNP et ayant réagi avec la fluorescéine-NHS. Le produit de couplage PEG-NH-CO-Fluorescéine éluerait bien

après les LNP car il a un poids moléculaire bien plus bas que celui des particules (~5 KDa pour les PEG et ~800 KDa pour les LNP) et avant la fluorescéine-NHS n'ayant pas réagi (0,5 KDa). Les profils d'éluion permettent donc de calculer le nombre de PEG incorporés à la surface des LNP et d'estimer le rendement de couplage NH₂/NHS.

Le rendement d'incorporation de PEG-NH₂ dans la nanoparticule est calculé en faisant le rapport entre l'aire de la bande de PEG non incorporés à celles des LNP (pour les LNP non dialysées).

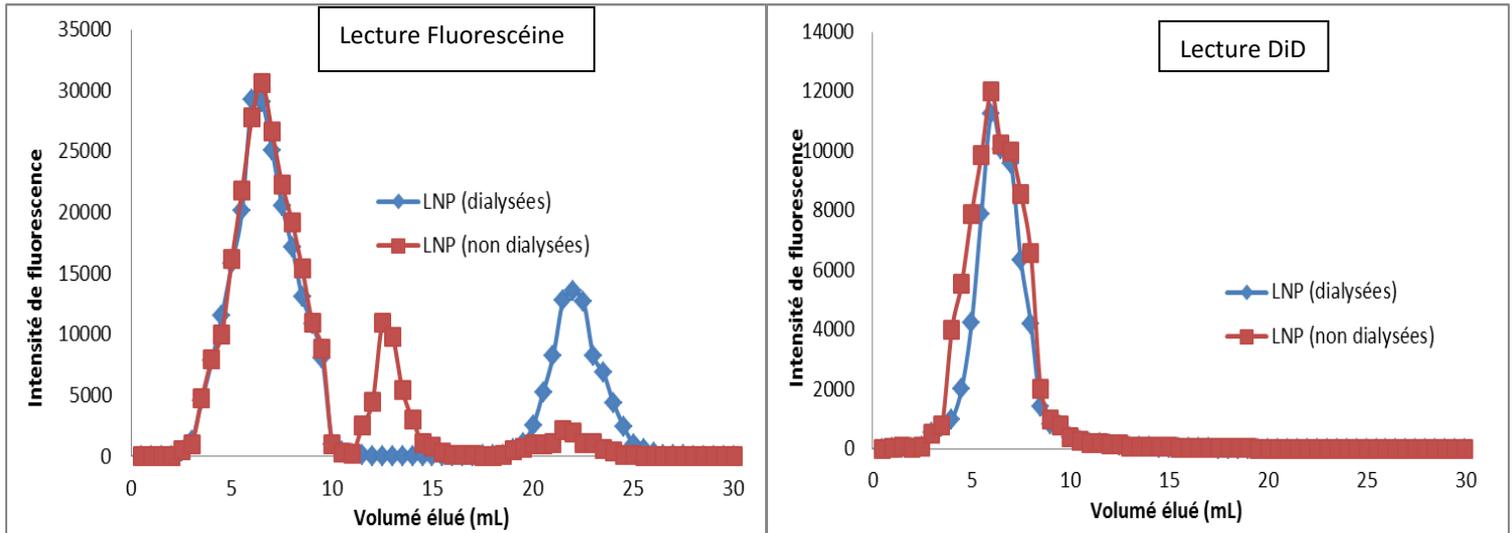


Figure 2.6 : Profils d'éluions des particules LNP-NH₂ (20% PEG-NH₂) + Fluorescéine-NHS (dialysées et non-dialysées).

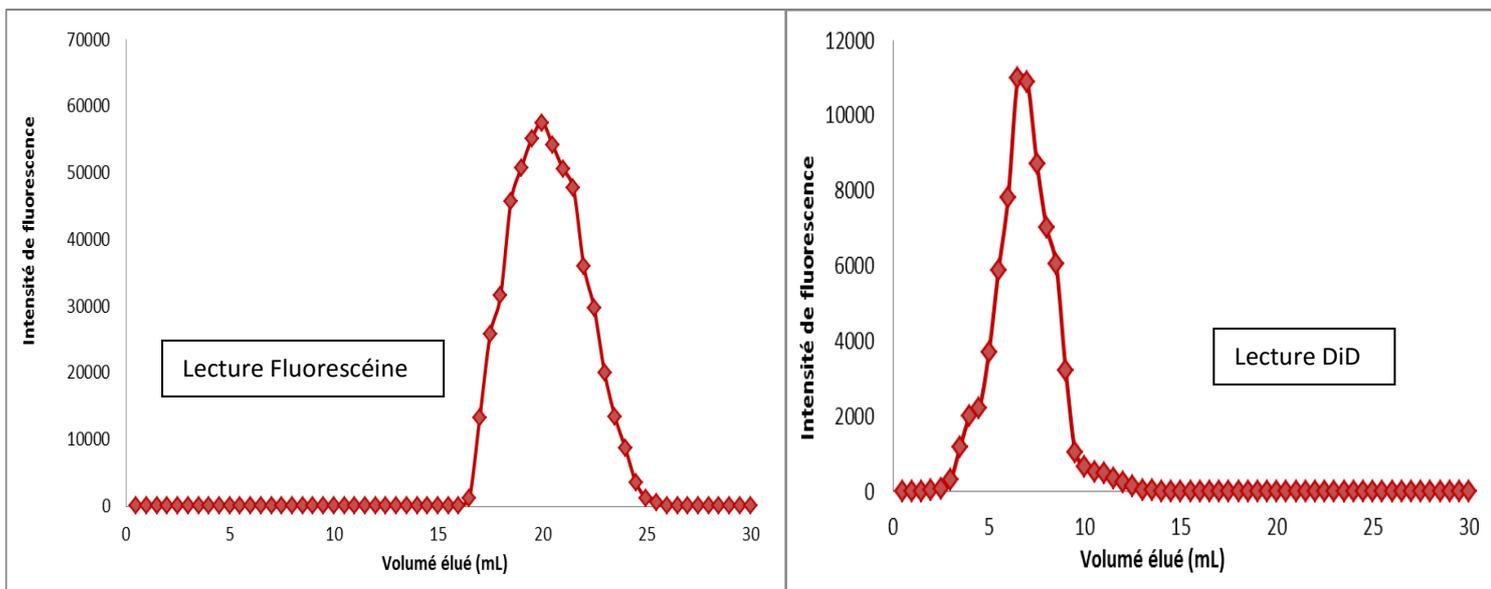


Figure 2.7 : Profils d'éluions des particules LNP-myrij-s100 (F50-réf) + Fluorescéine-NHS (contrôle négatif).

L'aire sous la courbe des bandes d'éluion peut être quantifiée. Les résultats sont regroupés Tableau 2.5.

Le rendement de greffage est calculé comme la somme des % fluorescéine-LNP + % fluorescéine-PEG (particules non dialysées).

	% fluorescéine-LNP (Fraction 3-10 mL)	% fluorescéine-PEG (Fraction 11-16 mL)	% Fluorescéine libre (Fraction 19-26 mL)
LNP (5 % PEG-NH ₂) dialysées	65	–	35
LNP (5 % PEG-NH ₂) non dialysées	66	27	7
LNP (10 % PEG-NH ₂) dialysées	68	–	32
LNP (10 % PEG-NH ₂) non dialysées	70	25	5
LNP (20 % PEG-NH ₂) dialysées	67	–	33
LNP (20 % PEG-NH ₂) non dialysées	70	24	6

Tableau 2.5 : Pourcentage de fluorescence pour chaque série de fractions.

Les résultats des quantifications sont présentés Tableau 2.6. On constate que le pourcentage d'incorporation des PEG-NH₂ à la surface des LNP est entre 70 et 75 % et ce pour les différents pourcentages massiques en surfactants dans les nanoparticules. Le rendement de greffage de la NHS-fluorescéine sur les PEG-NH₂ est reproductible, de 93-95 % (Tableau 2.6).

	Rendement d'incorporation	Rendement de greffage du fluorophore
LNP-NH ₂ (5%)	71 %	93 %
LNP-NH ₂ (10%)	74 %	95 %
LNP-NH ₂ (20%)	74 %	94 %

Tableau 2.6 : Pourcentage d'incorporation et de greffage obtenus sur les LNP-NH₂.

4) Stabilité des fonctions NH₂ présentes à la surface des LNP au cours du temps

Après un mois de préparation et de conservation à 4 °C, les nanoparticules NH₂ sont mises à réagir avec la NHS-fluorescéine (même protocole de mise en évidence que précédent). Ainsi, des LNP-NH₂ (dialysées et non dialysées) sont préparées. Les rendements d'incorporation et de greffage sont calculés (Figure 2.8 et Tableau 2.7).

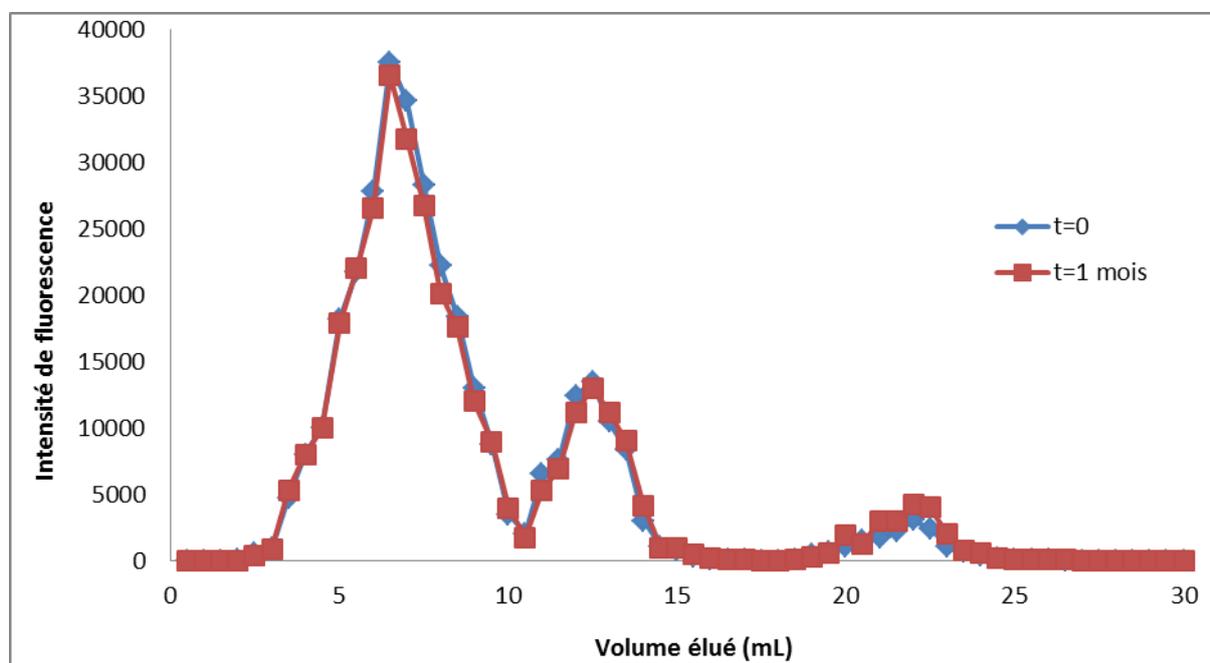


Figure 2.8 : Profils d'élutions des particules LNP-NH₂ (20% PEG-NH₂, non dialysées) + Fluorescéine-NHS, à la préparation et après un mois.

Les rendements de greffage de la fluorescéine-NHS sur les nanoparticules NH₂ juste après leur préparation et après un mois de stockage à 4°C (avec 5, 10 et 20 % de PEG-NH₂) sont donnés Tableau 2.7.

	Rendement d'incorporation à t = 0	Rendement d'incorporation à t = 1 mois	Rendement de greffage à t=0	Rendement de greffage à t= 1mois
LNP-NH ₂ (5%)	71 %	70 %	93 %	92 %
LNP-NH ₂ (10%)	74 %	73 %	95 %	94 %
LNP-NH ₂ (20%)	74 %	74 %	94 %	92 %

Tableau 2.7 : comparaison des rendements de greffage à t=0 et à t=1 mois.

D'après le tableau 2.7, les rendements de greffage des Fluorescéine-NHS à la surface des LNP ne sont presque pas changés, après un mois de préparation des nanoparticules. C'est-à-dire que les PEG-NH₂ incorporés à la surface des LNP lors de la préparation, y restent toujours, et que les fonctions amines restent actives vis-à-vis des fonctions NHS.

5) Gélification des LNP-NH₂ en présence des PEG-NHS-PEG

Comme il a été montré dans le paragraphe précédent, les LNP-NH₂ sont stables au cours du temps et la présence des fonctions amines est bien mise en évidence.

Ces LNP-NH₂ sont donc prêtes pour réagir avec des crosslinkers portant des fonctions NHS.

Pour ce faire, les LNP-NH₂ sont ajoutées goutte-à-goutte à une solution de polyéthylène glycol (NHS-PEG-NHS) qui possède deux fonctions NHS-ester à chacune de ces deux extrémités, lui permettant d'agir comme un crosslinker entre les nanoparticules. L'ordre d'addition des réactifs favorise la création de liaisons entre particules, introduites en défaut, plutôt que la formation de liaisons entre deux fonctions NH₂ portées par la même particule.

La réaction se fait en présence d'EDC (1 équivalent de PEG- NH₂ présents à la surface des particules pour 0.5 équivalent de NHS-PEG-NHS). Après 10 minutes d'agitation, un gel commence à se former qui une fois laissé se reposer commence à se désolidariser du solvant (PBS) et forme ainsi un gel insoluble (Figure 2.9).

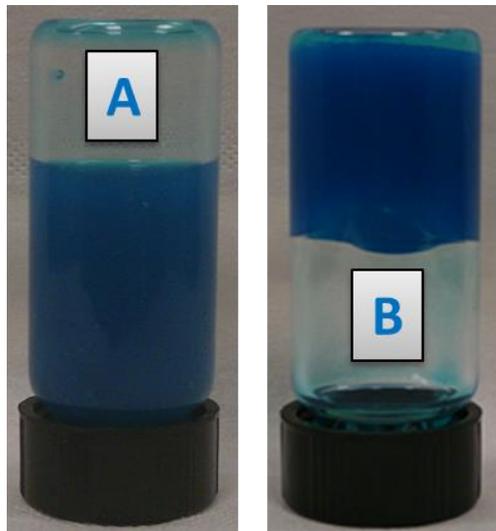


Figure 2-9 : A) LNP-NH₂ de départ. B) Après 10 minutes de réaction entre LNP-NH₂ et NHS-PEG-NHS.

6) Caractérisation du gel de LNP-NH₂ par rhéologie

La caractérisation des gels ainsi obtenus se fait par rhéologie à l'aide d'un rhéomètre AR2000 EX (TA Instruments). Une contrainte est appliquée et l'appareil mesure la déformation du matériau en régime dynamique pour une contrainte imposée à une fréquence variable. Ces mesures permettent de définir les propriétés viscoélastiques des gels chimiques. Ces propriétés sont représentées par deux grandeurs caractéristiques :

- le module G' ou le module de stockage (ou de conservation), il reflète le caractère "solide" élastique de l'échantillon et caractérise la proportion d'énergie accumulée dans le matériau sous forme élastique.

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

La contrainte $\delta(t)$ et la déformation $\gamma(t)$ sont liées par le module complexe de cisaillement G^* suivant les Equations 2.1 et 2.2 :

$$G^*(\omega) = \frac{\delta^*(t)}{\gamma^*(t)}$$

Equation 2.1 : Relation entre contrainte appliquée sur le matériau et la déformation.

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$$

Equation 2.2 : Module complexe de cisaillement en fonctions des modules d'élasticité et de viscosité.

Quand le module visqueux (G'') domine sur le module élastique (G'), le matériau est dans le domaine liquide. Si G' domine, le matériau appartient au domaine solide (Figure 2.11).

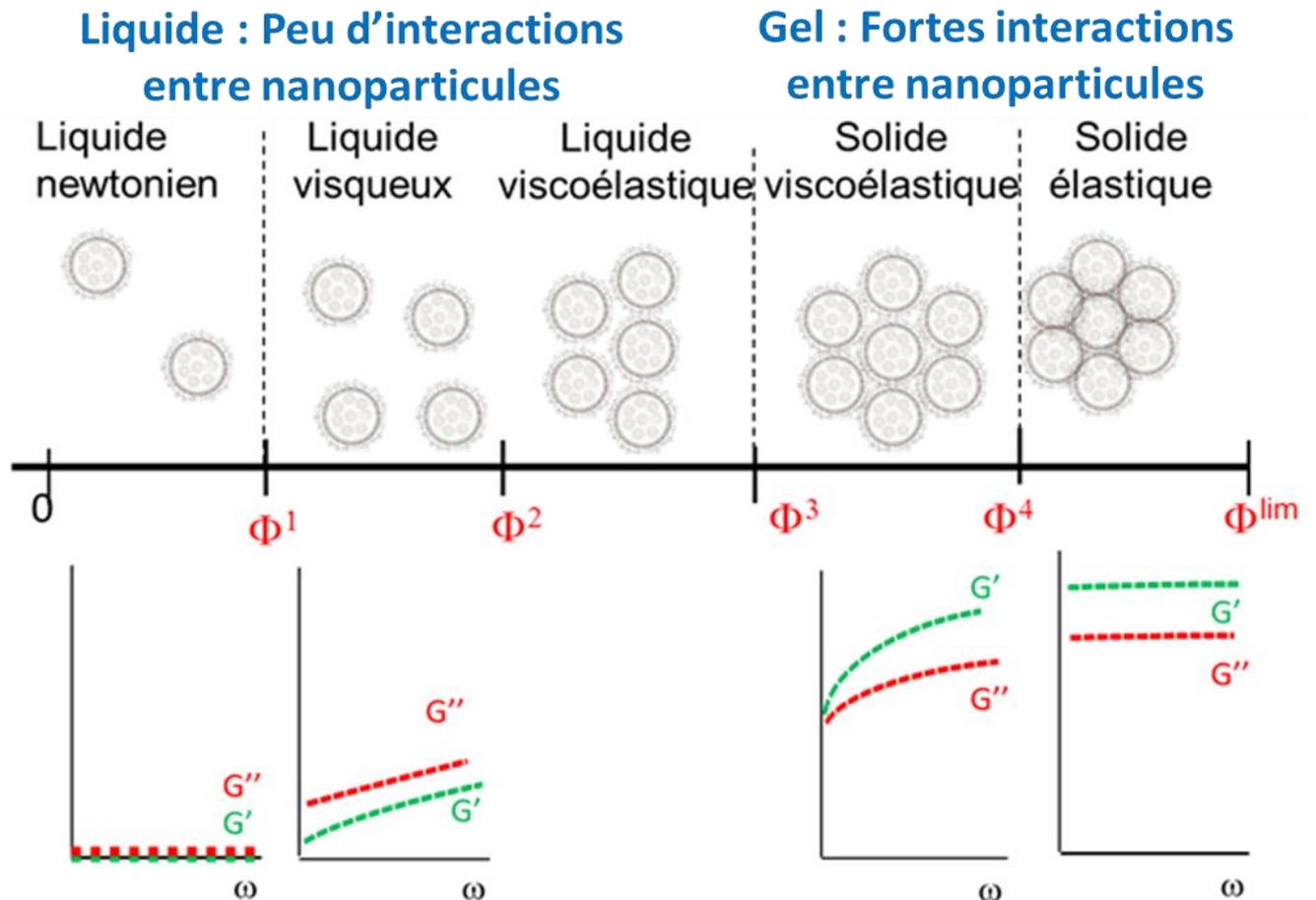


Figure 2.11 : Différents états du matériau en fonction de la fraction volumique en nanoparticules (ϕ).

La Figure 2.12 représente les deux modules d'élasticité et de viscosité mesurés en fonction de la fréquence d'oscillation. Les mesures sont faites sur un rhéomètre AR2000 EX (TA Instruments). Elles sont réalisées au CERMAV (CNRS, Grenoble) dans l'équipe de R. Auzély avec le conseil d'E. Bayma. La contrainte appliquée a été fixée à 3 Pa (valeur à laquelle les modules G' et G'' sont dans le domaine linéaire, après les mesures faites au préalable. Voir chapitre 8).

Les mesures rhéologiques sont faites après avoir éliminé le tampon PBS du flacon contenant le gel (le gel formé n'étant pas soluble, le tampon, emprisonné au-dessous, est évacué pour que les mesures faites sur le gel soient fiables).

Pour le gel de nanoparticules formé, on remarque que tout au long de la gamme de fréquence exploitée (0-10 Hz), le module élastique domine et G' atteint des valeurs de l'ordre de 4800 Pa. Les nanoparticules de départ (LNP-NH₂) sont également testées (Figure 2.12). On constate une grande différence entre les modules correspondant au gel et ceux correspondant aux LNP. Le module élastique G' des LNP est de l'ordre de 80 Pa, alors que celui des gels est aux environs de 4800 Pa, ce qui est le résultat de la formation d'un gel chimique relativement rigide.

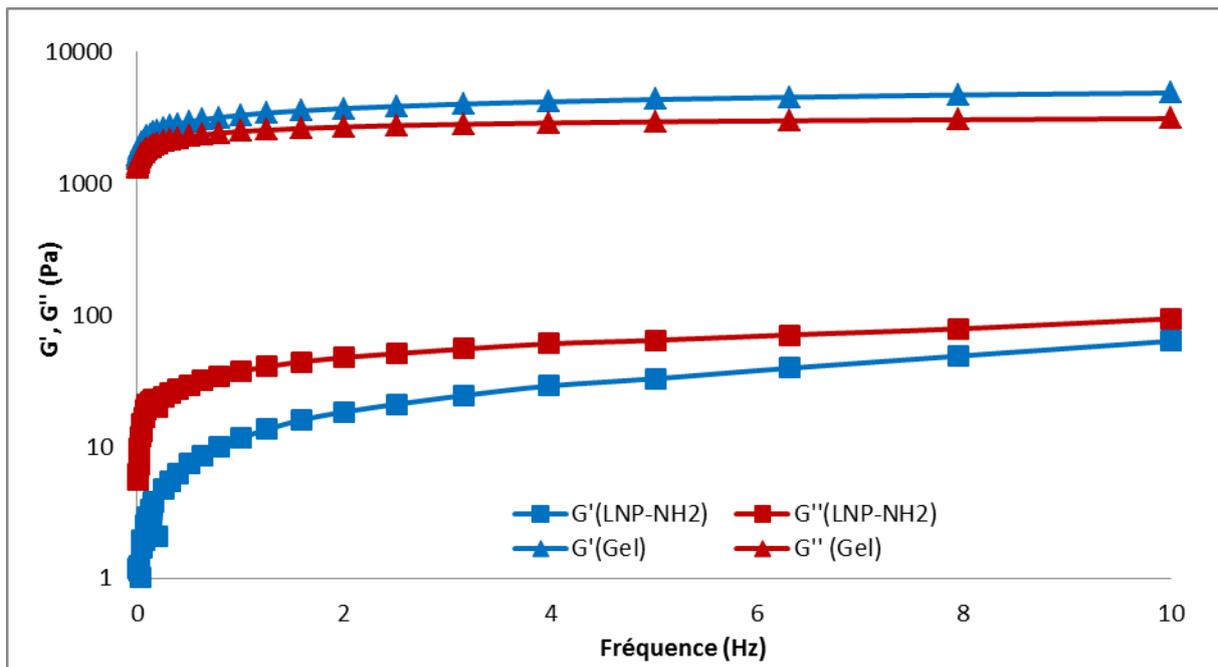


Figure 2.12 : Modules d'élasticité et de viscosité des LNP-NH₂ (courbes en bas) et du gel de LNP-NH₂ (courbes en haut).

La formation du gel constatée lors de la réaction entre les LNP-NH₂ et le NHS-PEG-NHS (formation de gel insoluble et relativement solide) est donc confirmée par les mesures rhéologiques.

3.3 Conclusion

Ces résultats montrent que:

- L'introduction des surfactants PEG-NH₂ à la surface des nanoparticules lipidiques ne change pas la stabilité de ces dernières ni leur homogénéité, puisque les tailles et indices de polydispersité des LNP-NH₂ restent stables pendant au moins 3 mois.
- Les formulations préparées avec différentes proportions de PEG-NH₂ montrent que la limite d'ajout du surfactant est de 20 %, pour l'obtention d'une dispersion homogène de particules. En effet, pour l'introduction de 40 % de surfactant, on observe une augmentation significative de la taille des particules et la formation d'un gel physique.
- La caractérisation par fluorescence montre bien l'incorporation des fonctions amines à la surface des LNP et que les rendements de greffage d'un fluorophore sont très importants. Par contre, les mesures faites montrent que les LNP perdent pendant la dialyse presque 25 % des PEG ajoutés au départ.
- Les fonctions amines incorporées à la surface des LNP sont stables. Ainsi, après un mois de formulation, le rendement de greffage reste inchangé.
- Les LNP-NH₂ réagissent avec les crosslinkers NHS-PEG-NHS et donnent lieu à des gels chimiques insolubles et stables dans le temps. L'ordre d'ajout (nanoparticules au crosslinker) est important et favorise une formation rapide du gel chimique
- La résistance et la durcicité du gel sont mises en évidence par rhéologie. Le gel ainsi formé a des valeurs de module d'élasticité importantes (4800 Pa). Les valeurs comparées avec celles obtenues avec les LNP-NH₂ de départ montrent une grande différence, résultat de la formation du gel.
- Les valeurs du module d'élasticité du gel obtenu sont élevées comparés par exemple à celles d'hydrogels de PEG (20 KDa) trouvées dans la littérature, $G' = 290 \text{ Pa}$ (132).

CHAPITRE 4

GELS DE LNP RETICULEES PAR PEG

PHOTOFORMABLE

4.1 Introduction

Dans le chapitre 3 de ce manuscrit, nous avons mis en œuvre la possibilité de synthèse de gels chimiques covalents basés sur réseau de nanoparticules lipidiques fonctionnalisées, assemblé par un crosslinker PEGylé (couplage amine-NHS).

Dans ce chapitre, nous allons étudier la possibilité de contrôler la formation des gels chimiques de nanoparticules lipidiques par la lumière. Nous partons du même principe que celui du chapitre 3 qui consiste à synthétiser des surfactants PEG fonctionnalisés, les incorporer dans la formulation des nanoparticules, et les faire réagir avec un agent de réticulation.

La lumière permet d'activer le groupe fonctionnel à la surface des nanoparticules pour activer la réaction de couplage avec l'agent de réticulation (Figure 4.1).

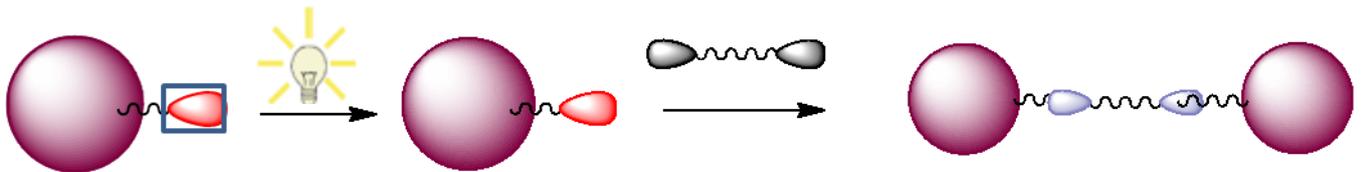


Figure 4.1 : Schéma de principe de photoformation du gel par photodéprotection d'une fonction à la surface d'une nanoparticule.

L'outil chimique utilisé dans ce chapitre est un couplage Oxyamine/Aldéhyde (Figure 4.2).

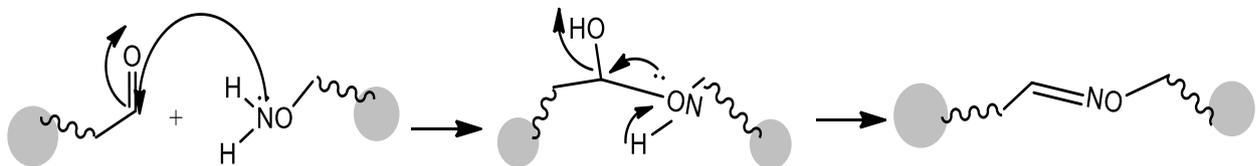


Figure 4.2 : Couplage entre une fonction oxyamine et une fonction aldéhyde.

Un groupement orthonitrobenzyle (ONB) est incorporé à la surface des LNP sous forme de NPPOC (2-(2-nitrophényl) -propyl). C'est un groupement photolabile qui protège la fonction oxyamine. La fonction oxyamine est photodéprotégée une fois incorporée à la surface des LNP, puis réagit avec des crosslinkers portant des fonctions aldéhydes. La chimie de couplage oxyamine/aldéhyde a déjà été précédemment utilisée au laboratoire pour la préparation de surfaces fonctionnalisées (128). Le groupe NPPOC est couramment utilisé pour la protection des acides aminés. Les acides aminés protégés par le NPPOC se sont révélés clivables deux fois plus vite que leurs correspondants protégés par des groupements NVOC (o-nitroveratryloxycarbonyl) (129).

Comme dans le précédent chapitre, la synthèse du surfactant PEG fonctionnalisé oxyamine sera décrite, puis la formulation des nanoparticules, la formation des gels et la caractérisation des matériaux obtenus.

4.2 Gels chimiques photoformables obtenus par couplage Oxyamine/Aldéhyde

L'objectif de cette partie est donc de synthétiser des nanoparticules fonctionnalisées oxyamines protégées par un groupement PPOC. Une fois synthétisées, ces LNP-Oxyamine protégées se déprotègent à la lumière et réagissent directement avec un crosslinker aldéhyde pour former un gel chimique (Figure 4.3).

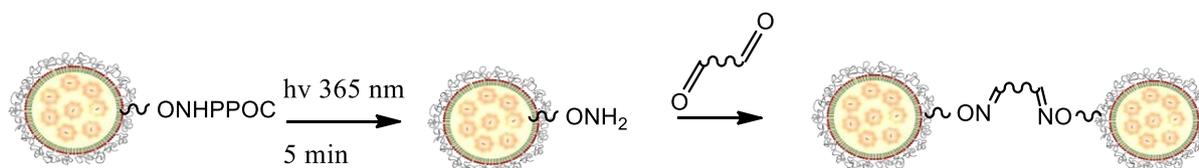


Figure 4.3 : Schéma de photoformation du gel.

1) Synthèse du surfactant SA_{CONH}-PEG₁₀₀-ONH-PPOC

C'est un surfactant de type polyéthylène glycol (100 unités), qui est lié à une chaîne grasse (C18) via une fonction amide et de l'autre côté possède une autre fonction amide liée à la fonction oxyamine protégée par un groupement NPPOC (2-(2-nitrophényl) -propyl). Sa structure et son schéma de synthèse sont décrits Figure 4.4. Le protocole de synthèse du produit SA_{CONH}-PEG₁₀₀-ONH-PPOC (noté PEG-ONH-PPOC) est détaillé dans le chapitre 8.

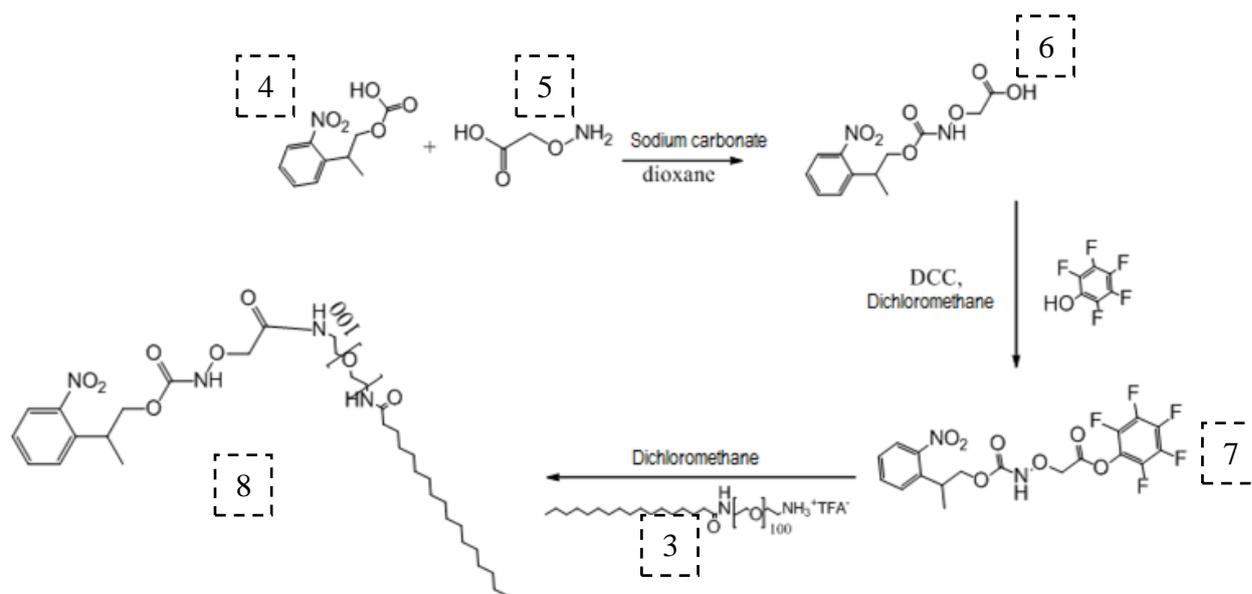


Figure 4.4 : Schéma de synthèse du surfactant SA_{CONH}-PEG₁₀₀-ONH-PPOC.

La première étape est une réaction de protection de la fonction oxyamine du carboxyméthoxylamine (5) par le groupement photolabile NPPOC (2-(2-nitrophényl) -propyl) de 4 qui est un produit commercial. Ensuite, la fonction acide du produit résultant 6 est activée par le pentafluorophénol pour un meilleur rendement de couplage peptidique dans l'étape qui suit (produit 7). Enfin, le couplage peptidique avec le surfactant PEG-NH₂ (produit 3) est réalisé, dont la synthèse a été décrite dans le chapitre 3. La réaction dure 2 heures et permet d'obtenir le produit final (8) avec un rendement de 89 % (produit purifié par dialyse).

2) Synthèse des LNP fonctionnalisées oxyamines à la surface

Les nanoparticules fonctionnalisées par le groupement oxyamine protégé sont obtenues par incorporation du surfactant PEG-ONH-PPOC à leur surface lors de leur formulation (protocole détaillé chapitre 8).

La composition du premix huileux ne change pas par rapport aux nanoparticules de référence. Un fluorophore y est rajouté pour permettre la visualisation des particules. Quant à la phase aqueuse, le surfactant PEG-ONH-PPOC y est ajouté à hauteur de 20 % massique par rapport à la masse totale de surfactants PEGylés. D'après les résultats obtenus au chapitre 3, ce pourcentage de 20 % est optimisé pour l'obtention d'une dispersion homogène de nanoparticules ayant un nombre maximal de fonctions à leur surface, sans toutefois former de gel physique. La masse globale de surfactants PEGylés reste constante à 345 mg. La dissolution complète des surfactants PEGylés nécessite de chauffer la solution à 55°C (Tableau 4.1).

Prémix lipidique			
Huile	Cire	Lécithine	DiD
68 mg	272 mg	65 mg	0,04 mg
Phase aqueuse			
PBS	Myrj s40	PEG-ONH-PPOC	
2,5 mL	276 mg	69 mg	

Tableau 4.1 : Constituants du premix lipidique et de la phase aqueuse.

3) Caractérisation et stabilité des LNP-ONH-PPOC

a) Taille et potentiel Zêta

La taille, l'indice de polydispersité et le potentiel Zêta des LNP-ONH-PPOC sont mesurés par DLS. Les mesures sont faites dans le tampon PBS. Des LNP de référence (0 % PEG-ONH-PPOC qui correspond à 20 % de Myrj s100) sont élaborées et leur tailles et potentiels Zêta sont également mesurés pour comparaison (Tableau 4.2 et Tableau 4.3).

Les mêmes mesures ont été faites après 3 mois de formulation pour suivre la stabilité de ces nanoparticules au cours du temps.

Echantillon	Diamètre moyen en nm	Indices de polydispersité	Diamètre moyen en nm après 2 semaines	Indice de polydispersité après 2 semaines	Diamètre moyen en nm après 3 mois	Indice de polydispersité après 3 mois
F50-réf (100 % Myrj s40)	49 ±1	0,1 ±0,01	50 ±1	0,1 ±0,01	50 ±1	0,11 ±0,01
0% PEG-ONH-PPOC	59 ±1	0,16 ±0,01	60 ±1	0,17 ±0,01	60 ±1	0,18 0,01
20% PEG-ONH-PPOC	54 ±1	0,2 ±0,01	55 ±1	0,19 ±0,01	56 ±1	0,2 ±0,01

Tableau 4.2 : Tailles et indices de polydispersité des LNP-ONH-PPOC.

Potentiel Zêta (mV)		
t = 0	t = 2 semaines	t = 1 mois
-3,3 ±1	-3 ±1	-3,5 ±1

Tableau 4.3 : Potentiels Zêta des LNP-ONH-PPOC.

On voit bien que l'incorporation du PEG-ONH-PPOC à la surface des LNP n'a pas pour effet d'augmenter la taille des particules. Néanmoins, une augmentation des indices de polydispersité est constatée. Les LNP-ONH-PPOC gardent leurs tailles et potentiels Zêta stables après 3 mois de formulation (Figure 4.5, 4.6 et 4.7).

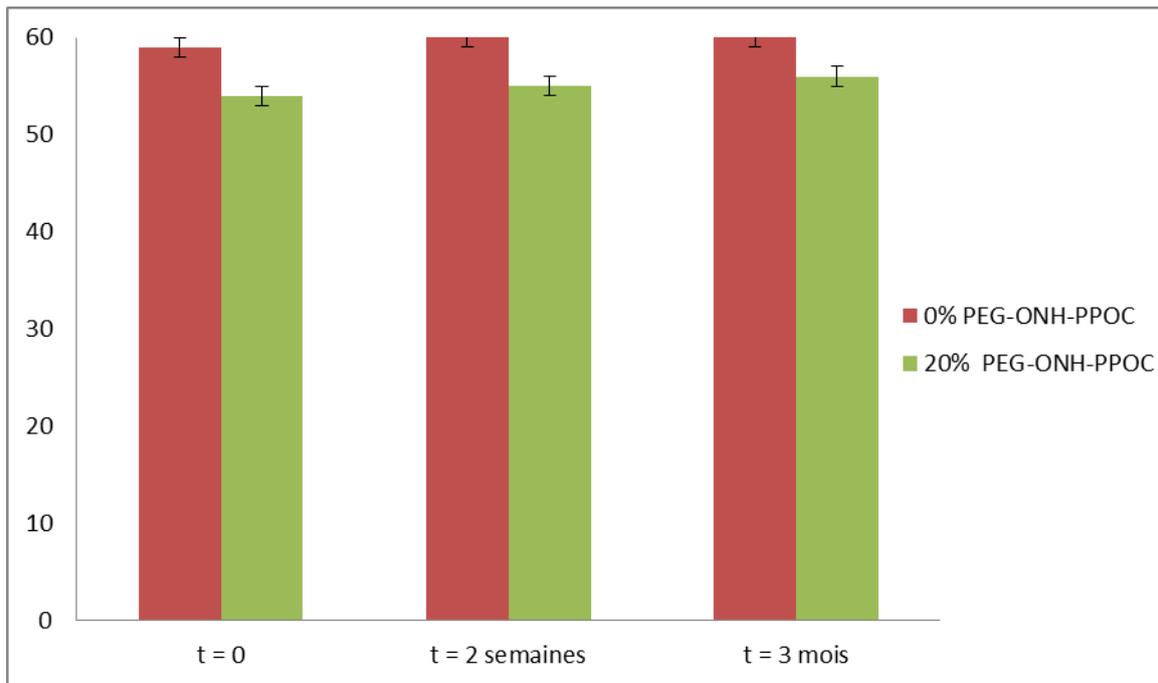


Figure : 4.5 : Tailles de LNP de référence et de LNP fonctionnalisées oxyamines.

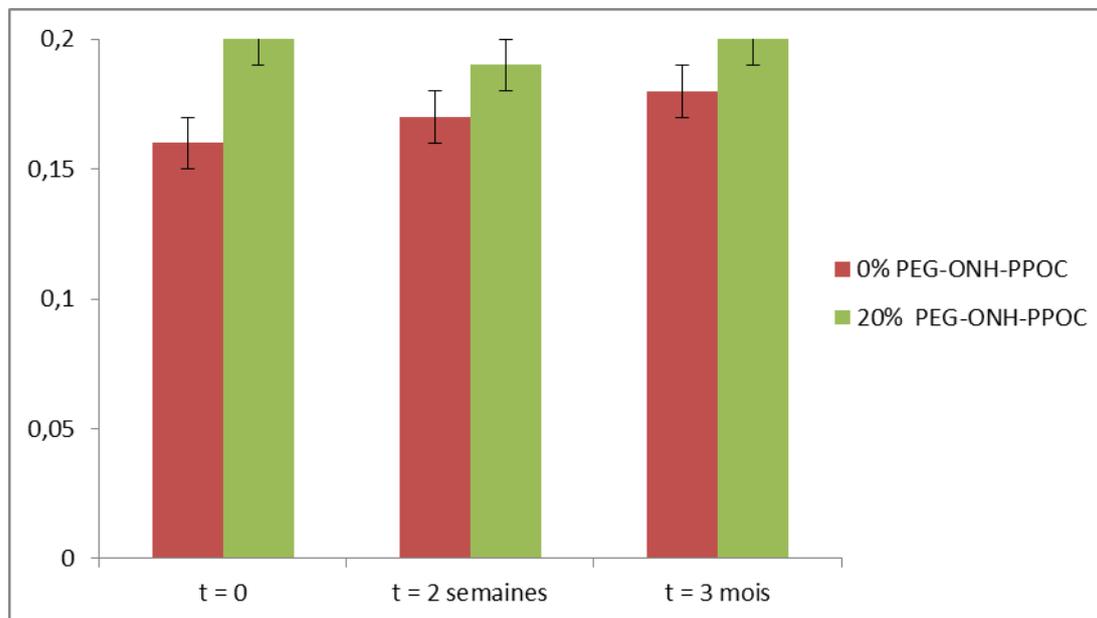


Figure : 4.6 : Indices de polydispersité des LNP de référence et de LNP fonctionnalisées oxyamines.

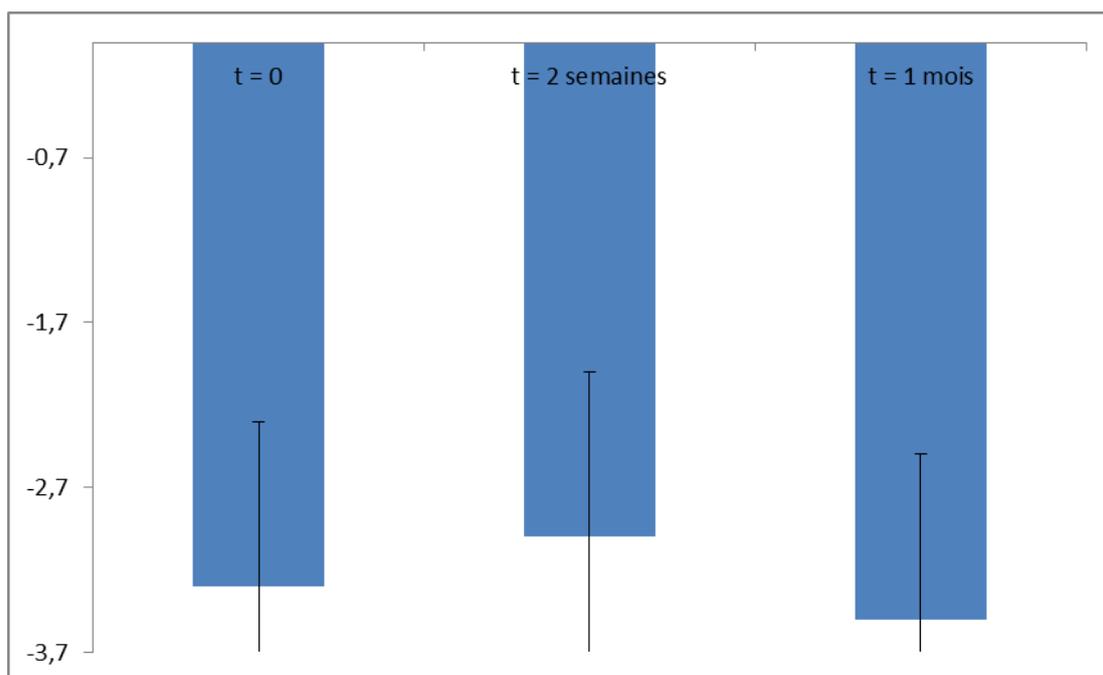


Figure : 4.7 : Potentiels Zêta des LNP fonctionnalisées oxyamines.

b) Mise en évidence des fonctions oxyamines à la surface des LNP

Comme il a été expliqué dans le chapitre 3 (mise en évidence des fonctions amines), il est difficile de caractériser la fonctionnalisation des LNP, car en RMN la présence de pics correspondant aux constituants des LNP empêchent la visibilité de ceux correspondant aux fonctions présentes en surface.

Pour montrer le principe de photodéprotection des fonctions oxyamines, quelques gouttes d'une solution concentrée d'hydroxyde de sodium sont ajoutées à la formulation de nanoparticules pour rendre le milieu plus basique (pH 9), ce qui favorise la déprotection des oxyamines sous irradiation UV (Figure 4.8). La taille et le potentiel zêta des particules sont mesurés après irradiation pour voir l'effet du pH et de la lumière sur les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules (Tableau 4.4). Aucune modification significative de taille, polydispersité ou de potentiel Zêta n'est observée.

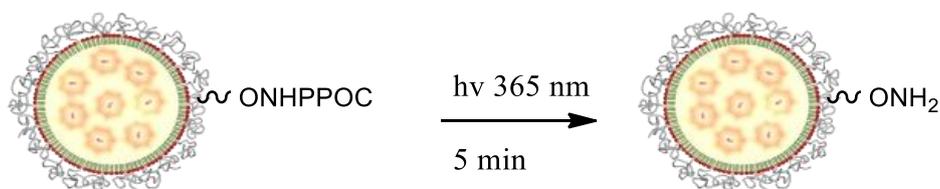


Figure 4.8 : Schéma de photodéprotection des fonctions oxyamines présentes en surface de LNP.

	Diamètre moyen (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel Zêta (mv)
LNP-ONH-PPOC pH 7,4	54 ± 1	0,2 ± 0,01	-3,3 ± 1
LNP-ONH-PPOC pH 9, hv 365 nm	55 ± 1	0,16 ± 0,01	-1,9 ± 1

Tableau 4.4 : Tailles et potentiel zêta des LNP-ONH-PPOC avant et après la déprotection des fonctions oxyamines.

Puisque les fonctions oxyamines (O-NH₂) réagissent très vite avec les fonctions aldéhydes, la formation des fonctions -ONH₂ après photodéprotection peut être mise en évidence par fluorescence par un réactif fluorescéine-aldéhyde (Figure 4.9). Cette molécule avait été synthétisée en 1997-1998 au département de chimie moléculaire de l'université de Joseph Fourier, démontrant ainsi sa stabilité et surtout celle de l'aldéhyde dans les conditions de stockage (environ 15 ans).

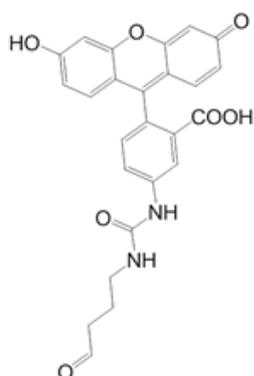


Figure 4.9 : structure de la fluorescéine-aldéhyde.

Les LNP-Oxyamines déprotégées 5 min par irradiation sont mises à réagir avec la fluorescéine-aldéhyde (voir détails chapitre 8).

Une purification par colonne d'exclusion stérique (Sephadex G-25 Medium, GE Healthcare) est réalisée pour séparer les nanoparticules (LNP-ONH₂ ayant réagi avec la fluorescéine-aldéhyde) de la fluorescéine-aldéhyde libre. Les fractions d'élution recueillies ont été analysées par spectrofluorimétrie sur un lecteur de plaques Tecan (Tecan Infinite M1000). Les analyses ont été réalisées dans deux plages de longueurs d'onde : 1) avec une excitation à 490 nm et le recueil de l'émission à 520 nm (signaux dus à la fluorescéine du réactif CHO-fluorescéine) ; 2) avec une excitation à 640 nm et le recueil de l'émission à 690 nm (signaux dus au DiD inclus dans le cœur des nanoparticules).

Le même protocole a été réalisé avec des LNP-Myrj S100 qui n'ont donc pas de fonctions ONH-POC à leur surface. Un deuxième contrôle négatif consistait à faire réagir des LNP-ONHPOC qui n'ont pas été irradiées et donc pas déprotégées, avec la Fluorescéine-aldéhyde (même proportions que précédemment). Le troisième contrôle négatif est constitué par des LNP-ONH₂, dont les fonctions oxyamines (-ONH₂), déprotégées par la lumière, sont neutralisées par l'acétone, avant de les mettre en contact avec la fluorescéine-aldéhyde.

Les profils d'élution obtenus au cours de ces différents essais sont présentés Figure 4.10 et 4.11. Les nanoparticules sont éluées dans les premières fractions (3-10 mL) alors que la fluorescéine-aldéhyde de faible poids moléculaire est éluée dans les fractions 19-26 mL (colonne d'exclusion stérique).

On constate que les fonctions -ONH-POC présentes à la surface des nanoparticules qui ont été irradiées (donc déprotégées pour aboutir aux fonctions -O-NH₂) réagissent avec la fonction aldéhyde du fluorophore qui vient se greffer en surface des LNP (co-élution de la fluorescéine-greffée à la surface des nanoparticules et du DiD inclus dans leur cœur). Au contraire, la fluorescéine-aldéhyde ne se greffe à la surface d'aucune des autres nanoparticules.

De même qu'au chapitre 3, un pic supplémentaire est obtenu dans les chromatogrammes des particules non dialysées par rapport à ceux des particules dialysées (fraction 11-15 mL). Il est attribué au PEG-ONH₂ non incorporé à la surface des nanoparticules lors de la formulation.

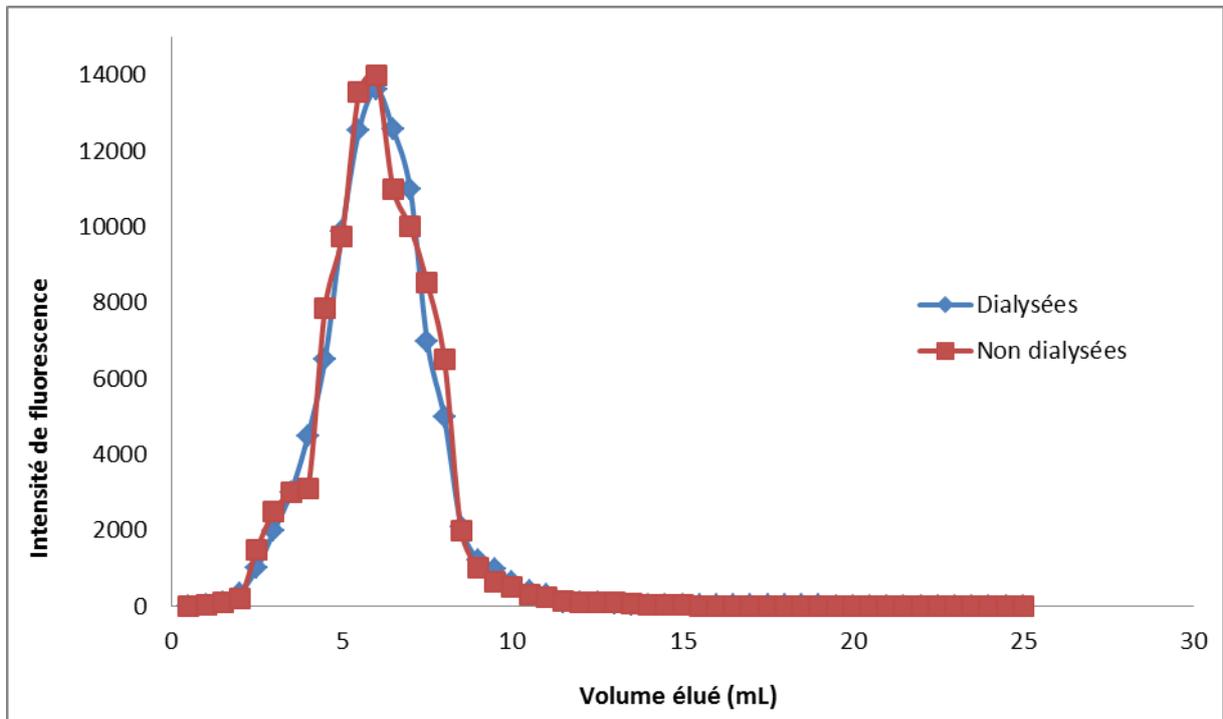
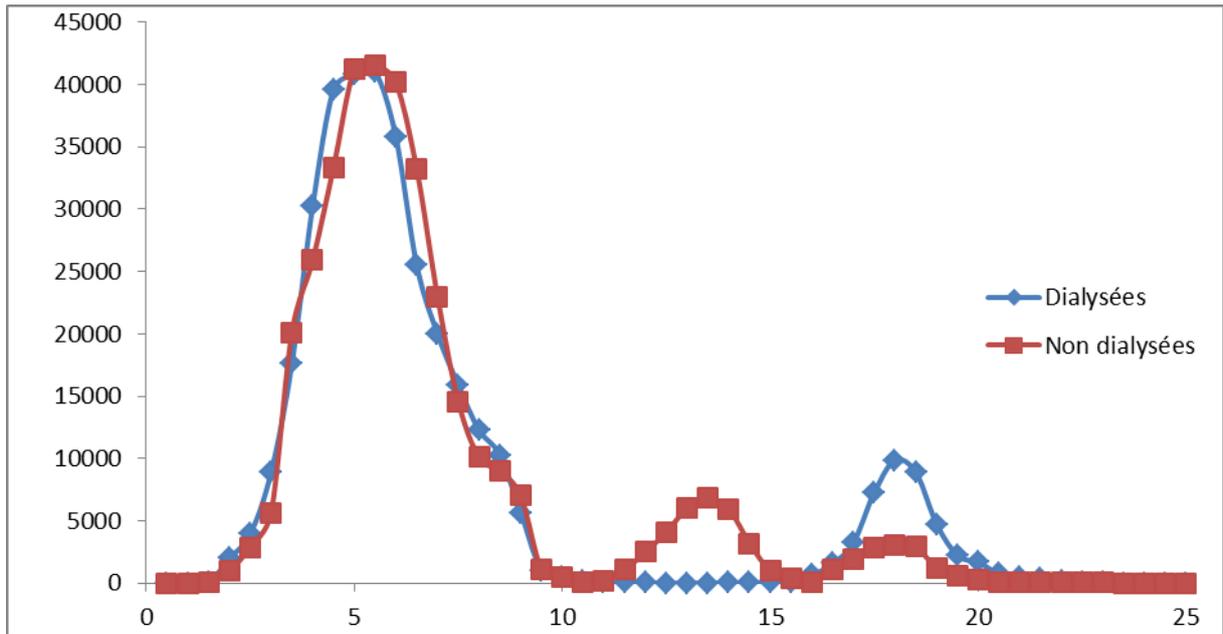


Figure 4.10 : Profils d'élutions des particules LNP-ONH2 + fluorescéine-aldéhyde (dialysées et non-dialysées), en lecture Fluorescéine (en haut) et en lecture DiD (en bas).

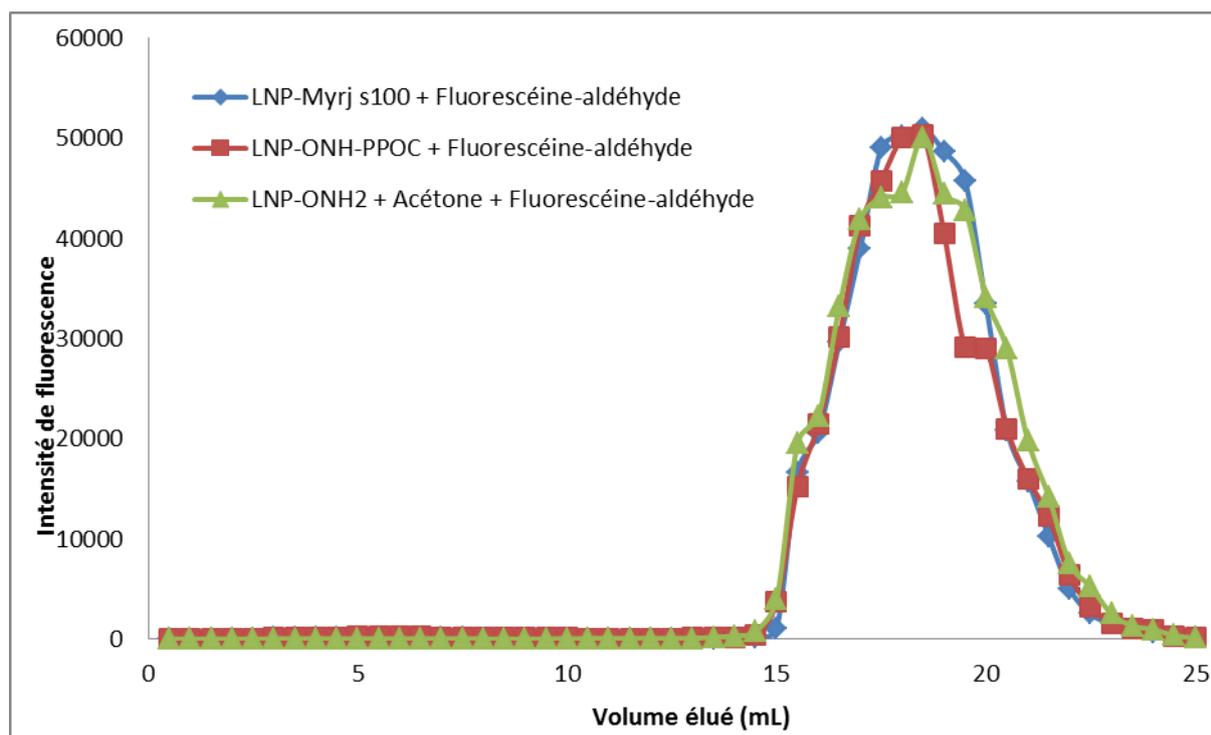


Figure 4.11 : Profils d'élutions des particules contrôles négatifs + fluorescéine-aldéhyde en lecture Fluorescéine.

L'aire sous les courbes des bandes d'élution peut être quantifiée. Les résultats sont regroupés Tableau 4.5.

	% fluorescéine-LNP (Fraction 3-10 mL)	% fluorescéine-PEG (Fraction 11-15 mL)	% Fluorescéine libre (Fraction 16-21 mL)
LNP-ONH ₂ dialysées	81	–	19
LNP-ONH ₂ non dialysées	81	13	6

Tableau 4.5 : Pourcentage de fluorescence pour chaque série de fractions.

A partir de ces résultats, le rendement d'incorporation des PEG-ONH₂ à la surface des LNP peut être calculé. Le rendement de greffage du fluorophore aldéhyde sur les surfactants PEG-ONH₂ déprotégés est aussi calculé (c'est la somme des % fluorescéine-LNP + % fluorescéine-PEG (particules non dialysées)). (Tableau 4.6).

LNP-ONH ₂	Rendement d'incorporation de PEG-ONH ₂	Rendement de greffage du fluorophore
	86 %	94 %

Tableau 4.6 : Rendements d'incorporation et de greffage.

Le taux d'incorporation des PEG-ONH₂ à la surface des LNP est élevé : seulement 14 % de ces PEG introduits dans la formulation au départ ne restent pas en surface des LNP et sont éliminés pendant la dialyse. Le rendement de greffage fluorescéine-aldéhyde est quasi-quantitatif (95 %).

4) Stabilité des fonctions oxyamines présentes en surface de LNP au cours du temps

Maintenant que les fonctions oxyamines présentes en surface de LNP sont mises en évidence, nous nous intéressons à savoir si ces fonctions sont stables en surface et si une partie des PEG-ONH₂ présents en surface y restent toujours après un mois de formulation. Après la formulation, les LNP-ONH-PPOC sont stockées à 4 °C. Après un mois, des LNP-ONH-PPOC sont mises à réagir avec la fluorescéine-aldéhyde (même protocole que dans le paragraphe précédent) (Figure 4. 12).

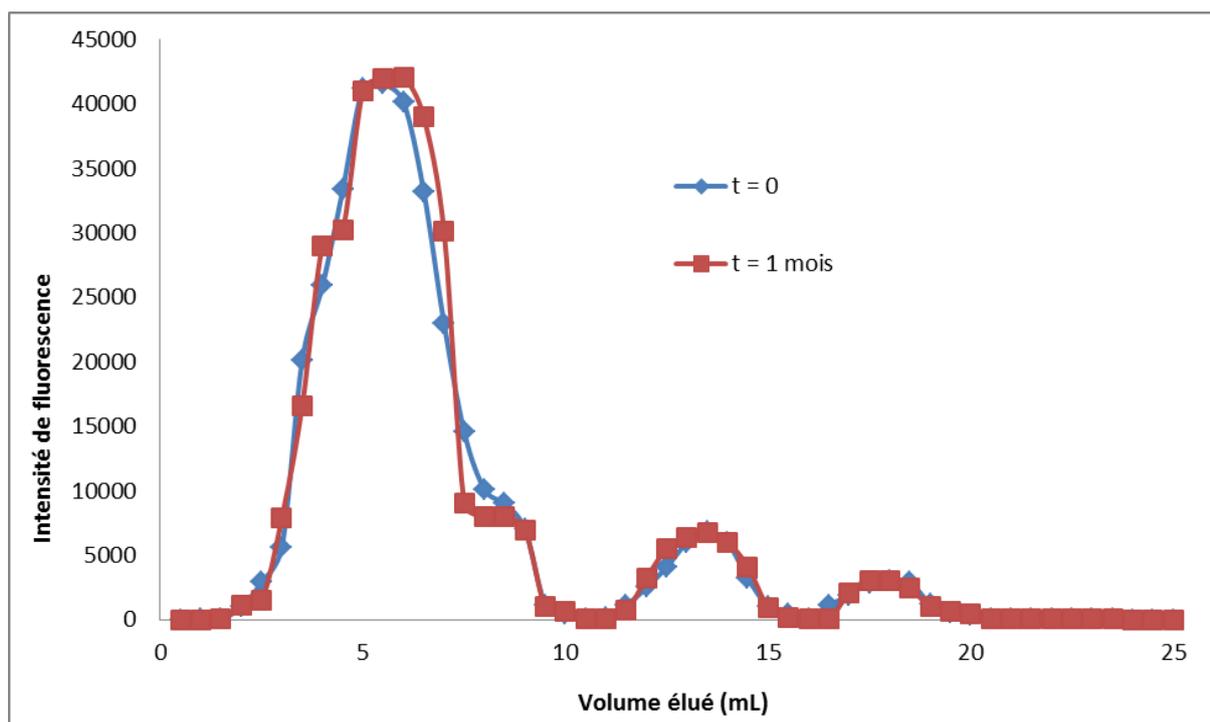


Figure 4.12 : Profils d'élutions des LNP-ONH₂ (non dialysées) + fluorescéine-aldéhyde juste parès formulation et après un mois, en lecture fluorescéine.

L'aire sous les courbes des bandes d'élution est calculée. On constate que pour la mesure faite après un mois aucun changement significatif n'est observé, aussi bien sur la bande de fluorescence correspondant aux LNP que sur celles correspondant aux PEG et fluorescéine libre. Ce résultat signifie, d'un part, que les PEG-ONH-PPOC présentes en surface des particules sont toujours présentes après un mois (pas de fuite depuis la surface), d'autre part que les fonctions oxyamines présentes en surface sont toujours actives vis-à-vis des fonctions aldéhydes. Les rendements d'incorporation et de greffage restent donc constants (Tableau 4.7).

LNP-ONH ₂	Rendement d'incorporation		Rendement de greffage	
	t = 0	t = 1 mois	t = 0	t = 1 mois
	86 %	86 %	94 %	94 %

Tableau 4.7 : Rendements d'incorporation et de greffage, à la formulation et après un mois.

5) Photoformation du gel chimique Oxyamine-aldéhyde

La fonctionnalisation des LNP par des groupements oxyamines protégés étant maintenant mise en évidence, ces nanoparticules sont utilisées pour former des gels chimiques. Les mêmes conditions de réactions que celles utilisées pour mettre en évidence les fonctions à la surface des particules sont utilisées pour faire réagir les LNP-ONH-PPOC et un agent de couplage bis-aldéhyde pour former un gel chimique. Les agents de couplage bis-aldéhyde étudiés sont : le glutaraldéhyde et un PEG dialdéhyde.

a) Gélification en utilisant le glutaraldéhyde

Les LNP-ONH-PPOC (à pH 9) sont irradiées pendant 10 minutes à 365 nm avec une puissance de 15 mW/cm². Cette irradiation permet de déprotéger les fonctions oxyamines protégées par le groupement NPPOC. Du glutaraldéhyde est également introduit dès le départ dans la formulation pour démarrer la réaction de réticulation du gel dès que les groupements ONH₂ sont déprotégés. C'est seulement après 6 heures de réaction que l'on constate qu'un gel commence à se former. Un changement de couleur a également été constaté lors de l'irradiation (Figure 4.13). Ce changement de couleur est très probablement dû à une photodégradation du fluorophore, le DiD.

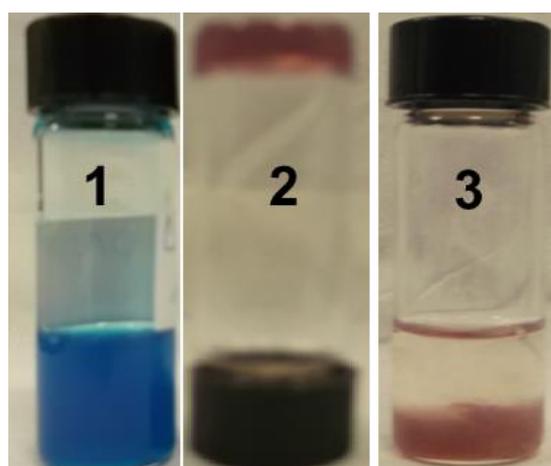


Figure 4.13 : 1) Suspension de LNP-ONHPOC avant déprotection des fonctions –ONH₂; 2) gel formé après la déprotection des fonctions –ONH-POC par irradiation et ajout du Glutaraldéhyde ; 3) Gel dans le tampon PBS 1X.

La réaction de gélification dure longtemps, les LNP changent de couleur et le gel obtenu n'est pas aussi dur que celui obtenu au chapitre 3 avec l'agent de couplage PEG.

b) Gélification en utilisant un PEG dialdéhyde

Pour obtenir un gel qui se forme plus rapidement sans que cela ait un impact sur la stabilité des LNP et afin d'obtenir un gel de rigidité similaire à celui qui avait été obtenu au chapitre 3, un composé Aldéhyde-PEG-Aldéhyde (produit commercialisé) est utilisé pour former le gel de LNP oxyamines.

La même procédure que celle utilisée avec le glutaraldéhyde (2 équivalents de fonctions oxyamines pour 1 équivalent de PEG dialdéhyde, pH 9) est employée. La réaction dure 15 minutes après lesquelles un gel commence à se former (Figure 4.14).



Figure 4.14 : Photo de gel obtenu (à droite) comparée à celle des LNP-ONHPOC de départ (à gauche).

On voit bien que le matériau formé est insoluble dans l'eau. En comparaison avec le gel obtenu avec le glutaraldéhyde, ce gel est beaucoup plus rigide d'aspect.

Le principe de photoformation du gel est maintenant mis en place. Ce gel est ensuite caractérisé par rhéologie.

6) Caractérisation du gel de LNP oxyamines par rhéologie

Pour voir la photoformation du gel chimique au cours du temps d'irradiation, des mesures de rhéologie sont réalisées sous irradiation à 365 nm, à l'aide d'un rhéomètre (AR2000 EX, TA Instruments) et les modules de viscosité et d'élasticité de l'échantillon sont enregistrés au cours du temps.

Les mesures sont réalisées au CERMAV dans l'équipe de R. Auzély et avec l'aide d'E. Bayma.

Un volume de LNP-ONH-PPOC (pH 9) est mélangé avec un volume de PEG dialdéhyde (respectivement, 2 équivalents de fonctions ONH-PPOC pour 1 équivalent de PEG-dialdéhyde, en nombre de moles). La mesure est réalisée en utilisant une irradiation avec une puissance de 60 mW/cm^2 et une fréquence de 1 Hz. En partant du LNP-ONH-PPOC et de PEG dialdéhyde, on observe, au cours du temps d'irradiation, une augmentation à la fois du module de viscosité (G'') et du module d'élasticité (G') de l'échantillon. Après 30 minutes d'irradiation, on constate que G' commence à dominer sur G'' , indicatif de la gélification (Figure 4.15). La gélification continue, et ce après 1h30 d'irradiation.

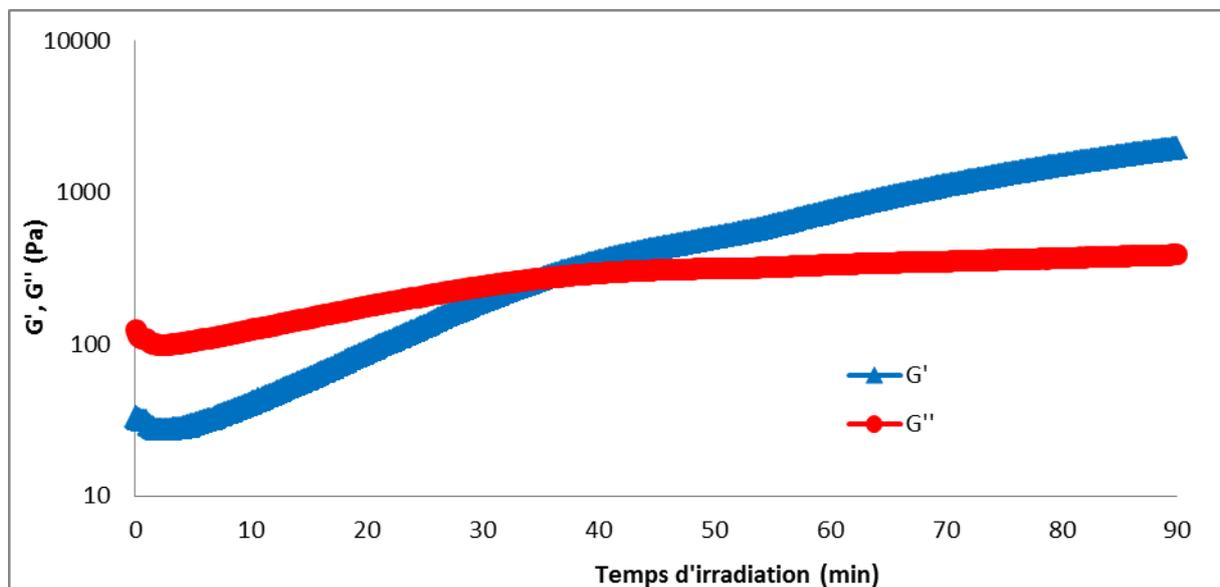


Figure 4.15 : G' et G'' des LNP-ONH-PPOC en fonction du temps d'irradiation.

La photoformation du gel est maintenant confirmée par la rhéologie (domination du module d'élasticité sur celui de viscosité après 30 minutes d'irradiation).

Le gel chimique photoformé via le couplage LNP-ONH₂/PEG dialdéhyde est aussi caractérisé par le rhéomètre AR2000 EX (TA Instruments). Cette fois-ci, le gel obtenu par l'irradiation des LNP-ONH-PPOC, est soumis à une contrainte et l'appareil mesure la déformation du matériau en régime dynamique à une fréquence variable.

La mesure permet donc de définir les propriétés viscoélastiques du gel. La mesure dure environ 20 minutes et la contrainte appliquée est fixée à 3 Pa (valeur à laquelle les modules G' et G'' sont dans le domaine linéaire, d'après les mesures faites au préalable. Voir chapitre 8). La figure 4.16 regroupe les modules d'élasticité et de viscosité en fonction de la fréquence, pour les LNP-ONH-PPOC de départ ainsi que pour le gel photoformé. Ainsi, on voit sur la figure la grande différence existant entre les modules d'élasticité des LNP de départ et du gel obtenu. Celui du gel atteint des valeurs de l'ordre de 3100 Pa alors que celui des LNP-ONH-PPOC est seulement de ~60 Pa. Cette différence est le résultat de la photoformation du gel chimique oxyamine/aldéhyde.

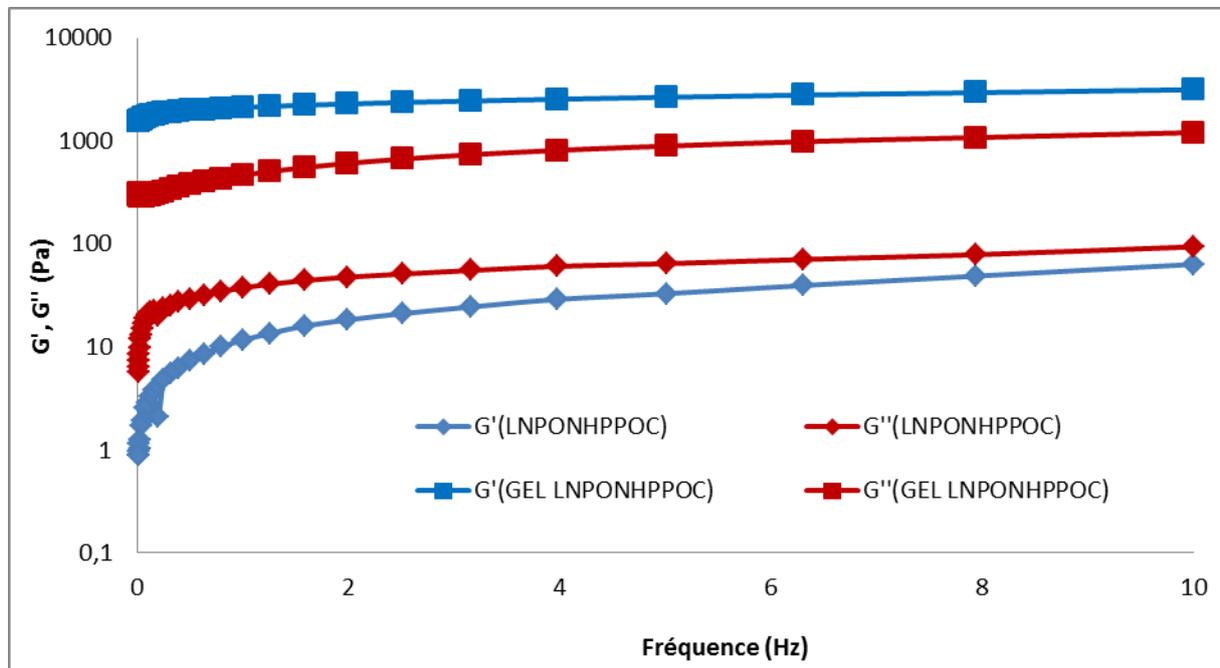


Figure 4.16 : G' et G'' en fonction de la fréquence pour les LNP-ONH-PPOC et le gel obtenu.

4.3 Conclusion

Le groupement photolabile -ONH-PPOC a déjà été utilisé dans une thèse au laboratoire pour la fonctionnalisation de microcomposants par voie photochimique. Nous avons développé par similarité la synthèse surfactants PEG fonctionnalisés par un groupement -ONH-PPOC afin de disposer de nanoparticules à surface photoactivable. Les LNP fonctionnalisées oxyamines sont très stables (elles peuvent être stockées sous forme protégées à 4 °C pendant au moins trois mois).

Nous avons mis en évidence le principe de LNPs avec un groupement photolabile sans influencer les propriétés physicochimiques des particules (taille, polydispersité..).

La photodéprotection de ces LNP oxyamines se fait rapidement (environ 5 à 10 minutes) et ne demande pas l'ajout de réactifs chimiques. La seule contrainte est de se placer à pH 9. Aussi, l'irradiation UV, permettant de déprotéger ces fonctions n'affecte pas les caractéristiques des LNPs (taille, polydispersité). Par contre, elle entraîne une photodégradation du fluorophore encapsulé dans le cas d'une longue irradiation.

Nous avons montré que la gélification des LNP-ONH-PPOC se fait plus rapidement et efficacement avec un agent de couplage de type PEG dialdéhyde plutôt qu'avec la glutaraldéhyde. Cela est très probablement dû à la grande différence de poids moléculaire entre le PEG et le glutaraldéhyde, 6000 g/mol et 100 g/mol, respectivement reflétant des longueurs de chaîne très différentes. Ainsi, le glutaraldéhyde a plus tendance à réagir avec deux fonctions oxyamines portées par la même nanoparticule, à cause de sa courte chaîne, alors que le PEG, avec une très longue chaîne, a plus tendance à réagir avec deux fonctions oxyamines portées par deux nanoparticules différentes, construisant ainsi des liens entre les LNP et donc conduisant à la formation du gel.

La rhéologie montre que le gel que l'on obtient est bien le résultat d'une irradiation des LNP-ONH-PPOC qui se déprotègent et réagissent ensuite avec le PEG dialdéhyde (augmentation des modules d'élasticité au cours du temps d'irradiation).

CHAPITRE 5

GELS NANO/NANO A PARTIR DE LNP- THIOL

5.1 Introduction

Dans les deux précédents chapitres, les gels chimiques ont été synthétisés en utilisant un agent de couplage PEGylé bifonctionnel permettant de crosslinker deux nanoparticules.

Dans ce chapitre, nous allons mettre en œuvre la synthèse de gels chimiques par le couplage covalent direct entre deux nanoparticules différentes.

La chimie de couplage utilisée dans ce chapitre repose sur la formation de ponts disulfures. Seront réalisées :

1) La formation de ponts disulfures par réaction de fonctions thiol (SH) avec le groupement SSPYR (thiol protégé par un groupement thiopyridine S-PYR) (Figure 5.1).

Les réactions qui aboutissent à l'échange thiol-disulfure ont un rôle essentiel dans la biologie. La réaction thiol/disulfure est très rapide dans un milieu aqueux. Le pH idéal de la réaction est de 6-8. Un certain nombre d'études ont montré que la réaction se déroule avec un mécanisme de substitution nucléophile de type S_N2 simple. Le mécanisme S_N2 est compatible avec une réaction en une étape unique par l'intermédiaire d'un complexe d'état de transition sans formation d'un intermédiaire (130).

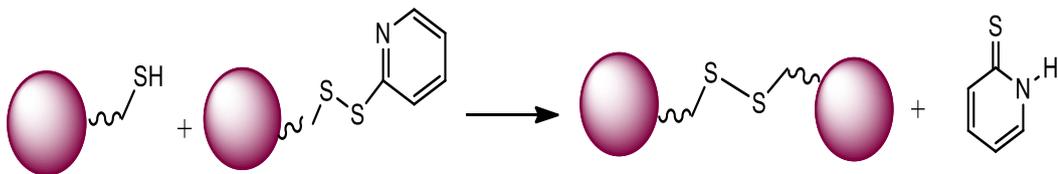


Figure 5.1 : Schéma de couplage thiol-thiol protégé.

2) La photoformation de ponts disulfure (Figure 5.2). Elle est réalisée en irradiant des LNP fonctionnalisées thiol et en utilisant le couplage entre 2 radicaux thiyles $S\cdot$ photoformés (Figure 5-2). Les thiols irradiés sont très utilisés dans les réactions de polymérisation thiol-ène. Ils ne présentent pas d'odeur désagréable et sont caractérisés par de très bonnes

propriétés d'absorption de la lumière à $\lambda > 300$. L'irradiation des thiols conduit à la formation des radicaux thiyles qui sont très instables et réagissent très rapidement les uns avec les autres. Cette réaction ne nécessite l'ajout d'aucun réactif et peut se faire très facilement dans un milieu aqueux (131).

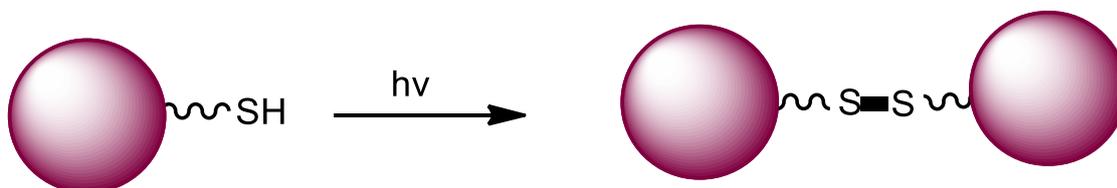


Figure 5.2 : Photoformation du pont disulfure en irradiant les LNP-SH.

Ces deux stratégies reposent sur la formulation de nanoparticules fonctionnalisées par des groupements SSPYR, pouvant ensuite être déprotégés pour conduire à des fonctions thiols.

5.2 Gels chimiques obtenus par formation d'un pont disulfure

1) Synthèse du surfactant SA_{CONH}-PEG₁₀₀-S-S-PYR

Le surfactant 10 est synthétisé comme décrit Figure 5.3 (détaillé chapitre 8).

C'est un surfactant PEG à 100 unités d'éthylène glycol, dont une extrémité est liée à l'acide stéarique (C18) par une liaison amide et l'autre extrémité à la fonction thiol protégée par le groupement SSPYR, par une deuxième liaison amide (Figure 5.3).

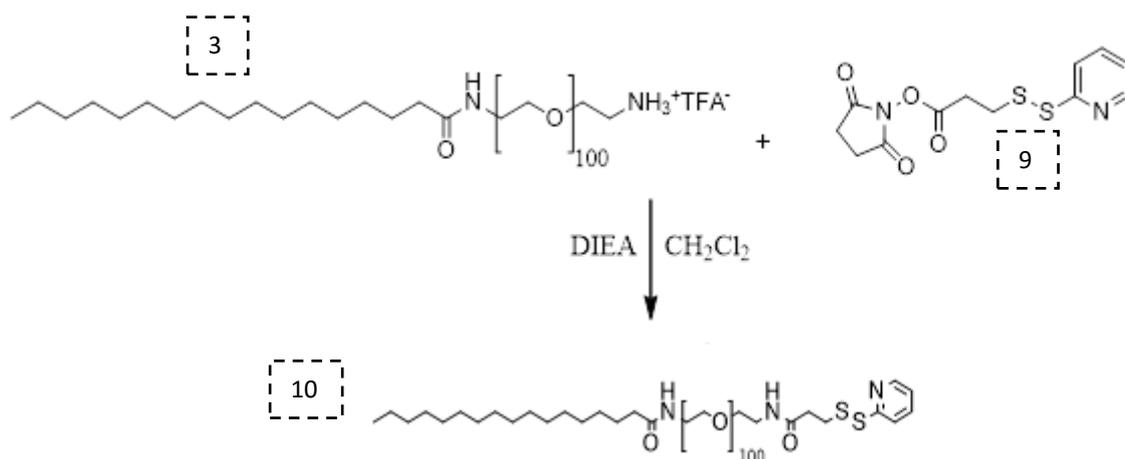


Figure 5.3 : Schéma de synthèse du surfactant SA_{CONH}-PEG₁₀₀-S-S-PYR.

La synthèse du composé 10 est donc réalisée à partir du surfactant SA_{CONH}PEG₁₀₀-NH₂ (PEG-NH₂, produit 3) dont la synthèse a été décrite dans le chapitre 3. Une substitution nucléophile du PEG-NH₂ sur le réactif SPDP (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate) 9 conduite en présence du DIEA à température ambiante dans le dichlorométhane conduit au produit final SA_{CONH}PEG₁₀₀-S-S-PYR 10 (abrégié PEG-SS-PYR). Le produit final étant soluble dans l'eau, il est dialysé dans l'eau puis lyophilisé. Le rendement de la réaction est de 76 %.

2) Synthèse de LNP fonctionnalisées SSPYR et thiols à leur surface

Les phases huileuses et aqueuses sont préparées de la même façon que dans les chapitres précédents. L'ajout du surfactant PEG-SS-PYR est toujours à hauteur de 20 % massique par rapport à la masse totale des surfactant PEGylés (Tableau 5.1).

Prémix lipidique			
Huile	Cire	Lécithine	DiD
68 mg	272 mg	65 mg	0,04 mg
Phase aqueuse			
Volume PBS	Myrj S40	PEG-SS-PYR	
2.5 mL	276 mg	69 mg	

Tableau 5.1 : Constituants de la formulation de LNP-SS-PYR.

Les phases aqueuses et lipidiques sont homogénéisées à 50°C puis soniquées à 55 °C selon les paramètres du programme d'émulsification détaillés au chapitre 8. Les nanoparticules sont ensuite purifiées par dialyse.

Pour obtenir les nanoparticules fonctionnalisées par les groupements thiols, les LNP-SS-PYR sont mises à réagir avec le DTT pour déprotéger les fonctions thiols avant dialyse (Figure 5.3).

Le DTT est un agent réducteur fort, dont l'efficacité résulte de sa propension à former un cycle à six atomes avec un pont disulfure interne. Le DTT est très utilisé pour réduire les ponts disulfures des protéines (246). Il est plus efficace que d'autres réducteurs de pont disulfure, tel que le 2-mercaptoéthanol, surtout en milieu aqueux et à pH aux environs de 7. L'action réductrice du DTT s'exerce essentiellement à pH supérieur à 7, ce qui est idéal pour les nanoparticules préparées dans un tampon PBS 1X (pH 7,4).

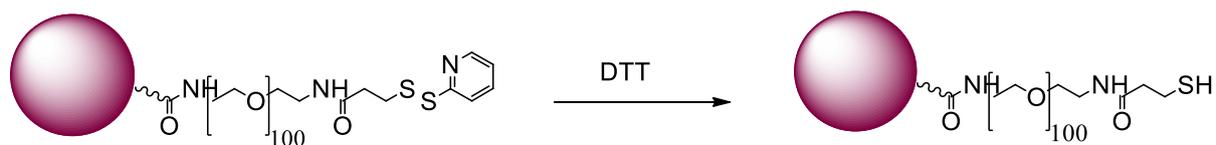


Figure 5.3 : Schéma de déprotection des LNP-SH.

Après déprotection des LNP-SH, ces dernières sont dialysées de la même façon que les LNP-SSPYR pour se débarrasser des PEG non incorporés mais aussi pour éliminer les molécules DTT n'ayant pas réagi.

3) Caractérisation et stabilité des LNP-SS-PYR

a) Taille et potentiel Zêta

Les LNP-SS-PYR sont caractérisées par DLS. Les mesures sont faites dans le tampon PBS. De façon similaire aux particules LNP-NH₂, des LNPs de référence (0 % PEG-SS-PYR) sont élaborées en incorporant 20 % de Myrj s100 dans la formulation et leur taille et potentiel Zêta sont également mesurés pour comparaison avec les LNP-SS-PYR. Sont également ajoutées au Tableau 5.2 les mesures faites sur les nanoparticules après déprotection (LNP-SH). Pour étudier la stabilité des LNPs fonctionnalisées au cours du temps, les tailles et potentiels Zêta des LNP-SS-PYR et LNP-SH sont mesurés trois mois après leur formulation (Tableau 5.3 et 5.4).

Echantillon	Diamètre moyen en nm	Indice de polydispersité	Diamètre moyen en nm après 2 semaines	Indice de polydispersité après 2 semaines	Diamètre moyen en nm après 3 mois	Indice de polydispersité après 3 mois
F50-réf (100 % Myrj s40)	49 ±1	0,1 ±0,01	50 ±1	0,1 ± 0,01	50 ±1	0,11 ± 0,01
0% PEG-SS-PYR	59 ±1	0,16 ±0,01	60 ±1	0,17 ± 0,01	60 ±1	0,18 ± 0,01
20% PEG-SS-PYR	64 ±1	0,17 ±0,01	66 ±1	0,16 ± 0,01	69 ±1	0,17 ± 0,01
20% PEG-SH	57 ±1	0,14 ±0,01	60 ±1	0,15 ±0 ,01	64 ±1	0,17 ± 0,01

Tableau 5.2 : Tailles et indices de polydispersité des LNP-SH avant et après déprotection.

Potentiel Zêta (mV)		
t = 0	t = 2 semaines	t = 3 mois
-2 ± 1	-2 ± 1	0,5 ± 1

Tableau 5.4 : Potentiel Zêta des LNP-SH.

Par rapport aux LNPs de référence, les changements les plus importants sont constatés sur les tailles des LNP-SH protégées par le groupement SSPYR dont la taille augmente très légèrement (vers 65 nm). Les LNP-SH non protégées ont des tailles légèrement inférieures à

celles des LNP-SSPYR probablement à cause de la présence du groupement pyridyl dans la structure de ces dernières (Figure 5.4, 5.5 et 5.6).

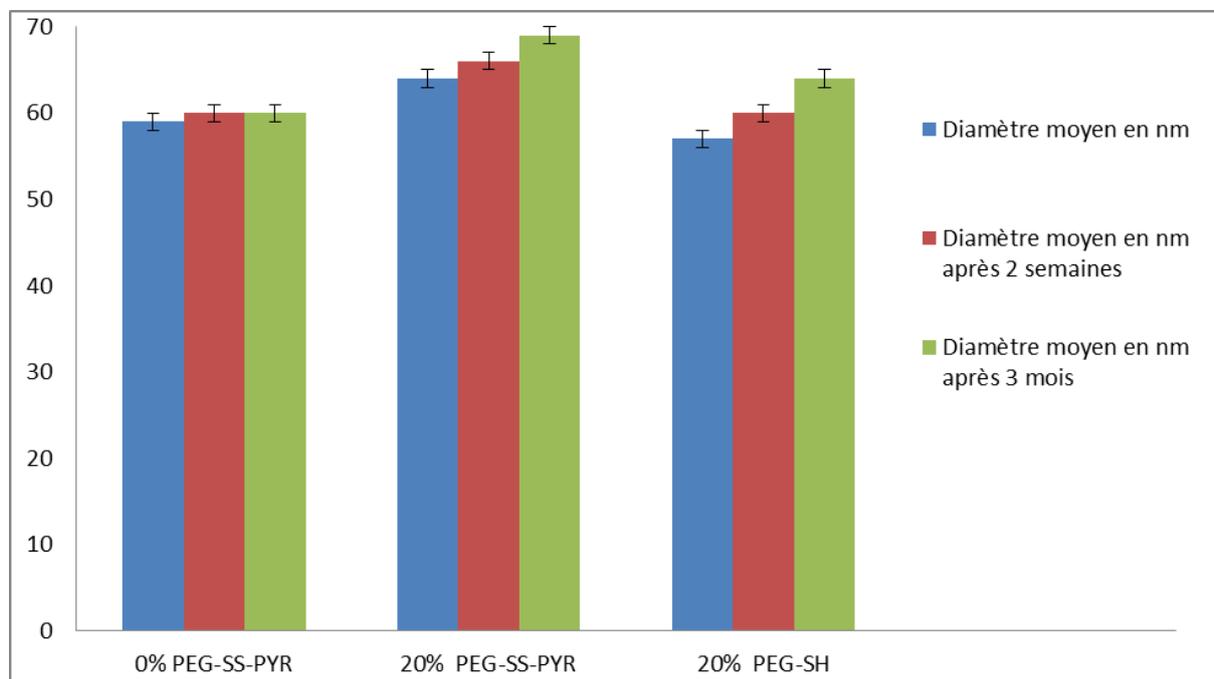


Figure 5.4 : Tailles des LNP-SH avant et après déprotection (à la formulation, après 2 semaines et 3 mois) comparées à celles des LNP de référence.

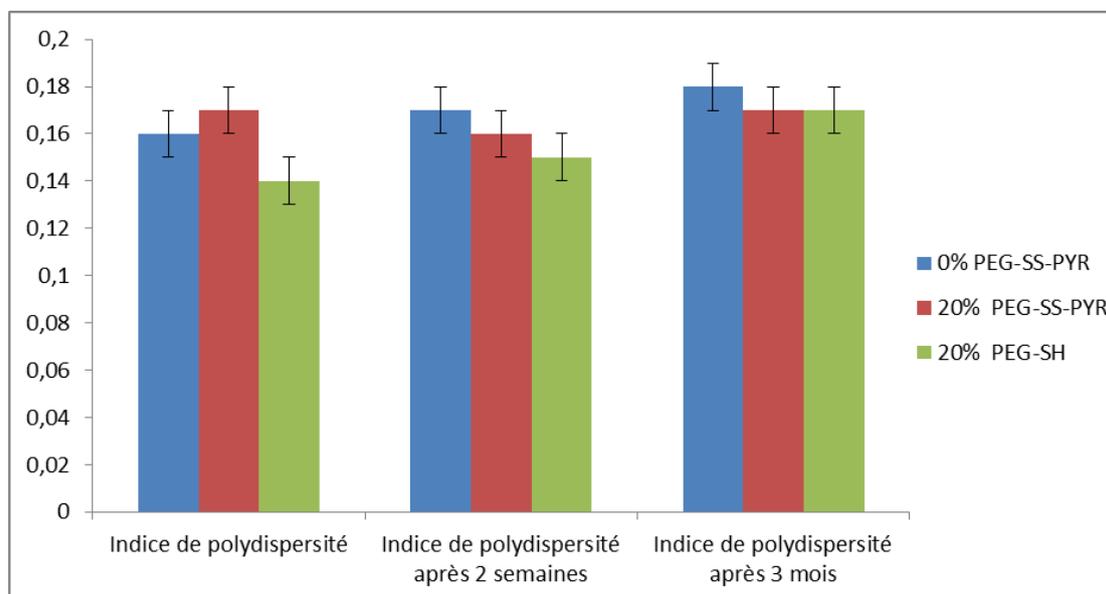


Figure 5.5 : Indices de polydispersité des LNP-SH à la formulation, après 2 semaines et 3 mois.

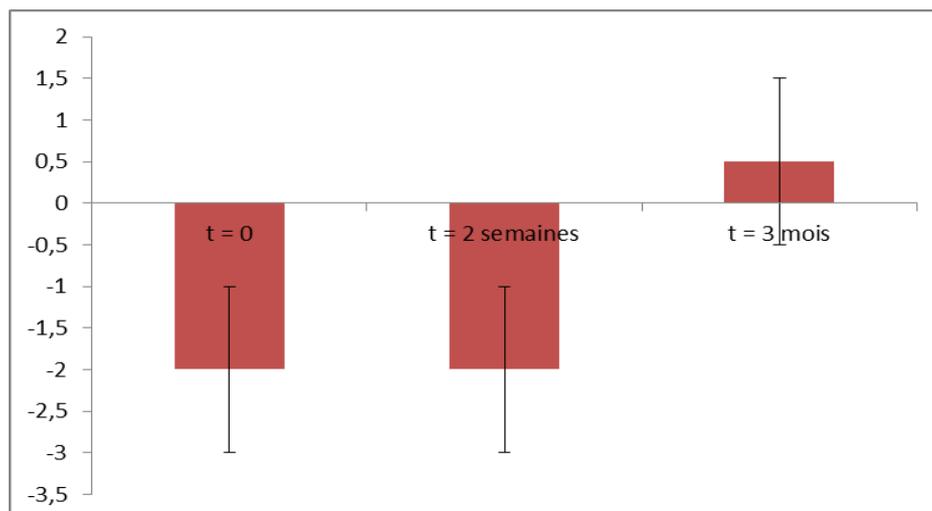


Figure 5.6 : Potentiel Zêta des LNP-SH à la formulation, après 2 semaines et 3 mois.

b) Mise en évidence des fonctions thiols à la surface des LNP

Comme dans les chapitres précédents, la présence des groupes fonctionnels à la surface des nanoparticules est mise en évidence par réaction avec un réactif fluoresçant.

Dans ce cas le fluorophore utilisé pour mettre en évidence les fonctions thiol est un fluorophore maléimide (Cy5 maléimide). La réactivité des groupements thiols vis-à-vis des maléimides est bien établie dans la littérature (247). La réaction est conduite dans le PBS à pH 7,4. Une purification par colonne d'exclusion stérique (Sephadex G-25 Medium, GE Healthcare) est réalisée pour séparer les nanoparticules (LNP-SH ayant réagi avec le Cy5 maléimide) du Cy5 maléimide libre. Les fractions d'élution recueillies sont analysées par spectrofluorimétrie sur un lecteur de plaques Tecan (Tecan Infinite M1000). Les analyses sont réalisées dans la plage de longueurs d'onde du Cy5 maléimide : excitation à 646 nm et émission à 662 nm.

Le même protocole a été réalisé avec des particules LNP-SH n'ayant pas été dialysées dans les membranes possédantes un seuil de coupure de 12–14 kDa mais avec les membranes possédantes un seuil de coupure de 1000 Da pour se débarrasser seulement du DTT en excès. Cela permet de quantifier, par comparaison, le nombre de PEG-SH incorporés à la

surface des nanoparticules et estimer si la perte de ces PEG pendant la dialyse est importante. Cette mesure permet également de remonter au nombre réel de fonctions thiols qui réagissent avec la Cy5 maléimide et donc en déduire le rendement de la réaction de greffage du fluorophore sur les nanoparticules.

Des nanoparticules de référence (LNP-Myrj s100) sont également mises à réagir avec le Cy5 maléimide. Ces LNP n'étant pas fonctionnalisées thiols constituent un contrôle négatif.

Les profils d'élution obtenus avec les 2 types de nanoparticules (LNP-thiol et LNP-Myrj s100) sont respectivement présentés Figure 5.7 et Figure 5.8. Les LNP supposées porter les fonctions thiols à leur surface réagissent bien avec le Cy5 maléimide (élution du Cy5 greffé à la surface des nanoparticules). Au contraire, le contrôle négatif (LNP-Myrj s100) n'a pas montré de réactivité vis-à-vis du Cy5 maléimide.

Les LNP non dialysées présentent une troisième bande que l'on n'observe pas avec les nanoparticules dialysées. Cette bande pourrait correspondre aux surfactants PEG-SH non incorporés à la surface des LNP et ayant réagi avec le Cy5 maléimide. Le produit de couplage PEG-S-Mal-Cy5 éluerait bien après les LNP car il a un poids moléculaire bien plus bas que celui des particules (~5 KDa pour les PEG et ~800 KDa pour les LNP) et avant le Cy5-maléimide n'ayant pas réagi (0,6 KDa).

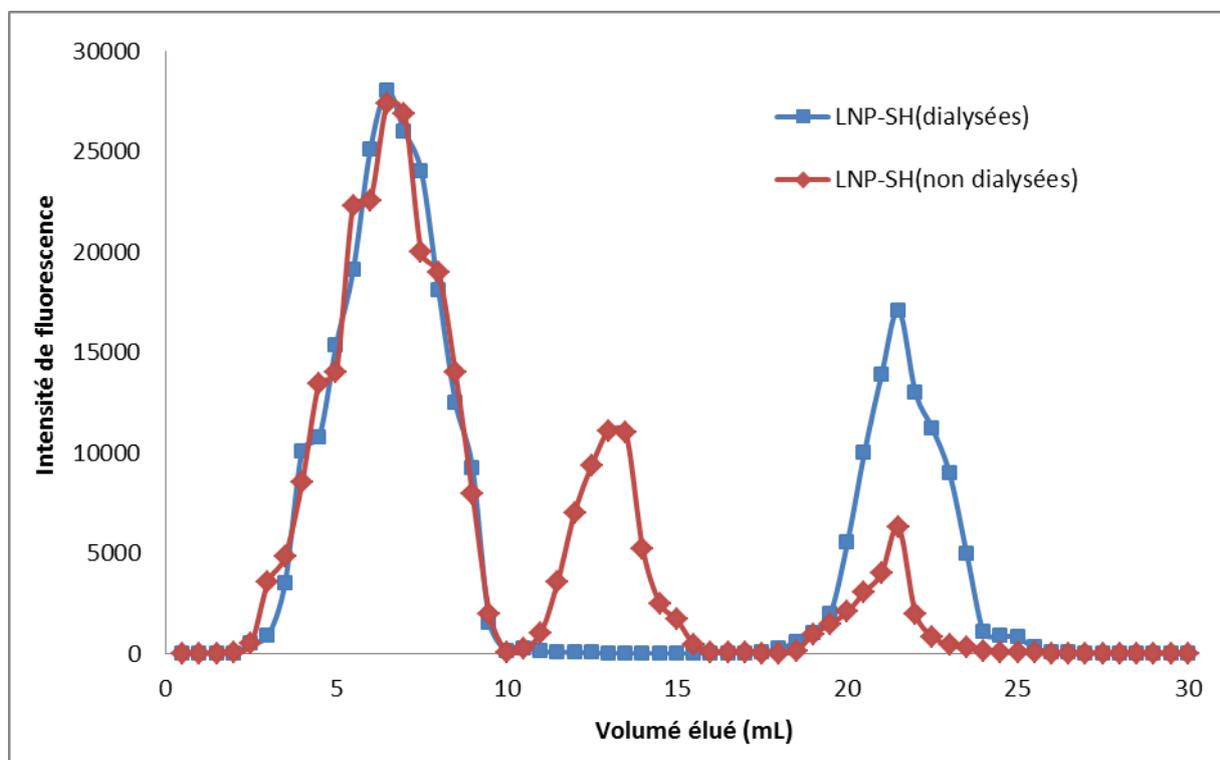


Figure 5.7 : Profils d'élutions des particules LNP-SH (dialysées et non dialysées) + Cy5 Maléimide, en lecture Cy5.

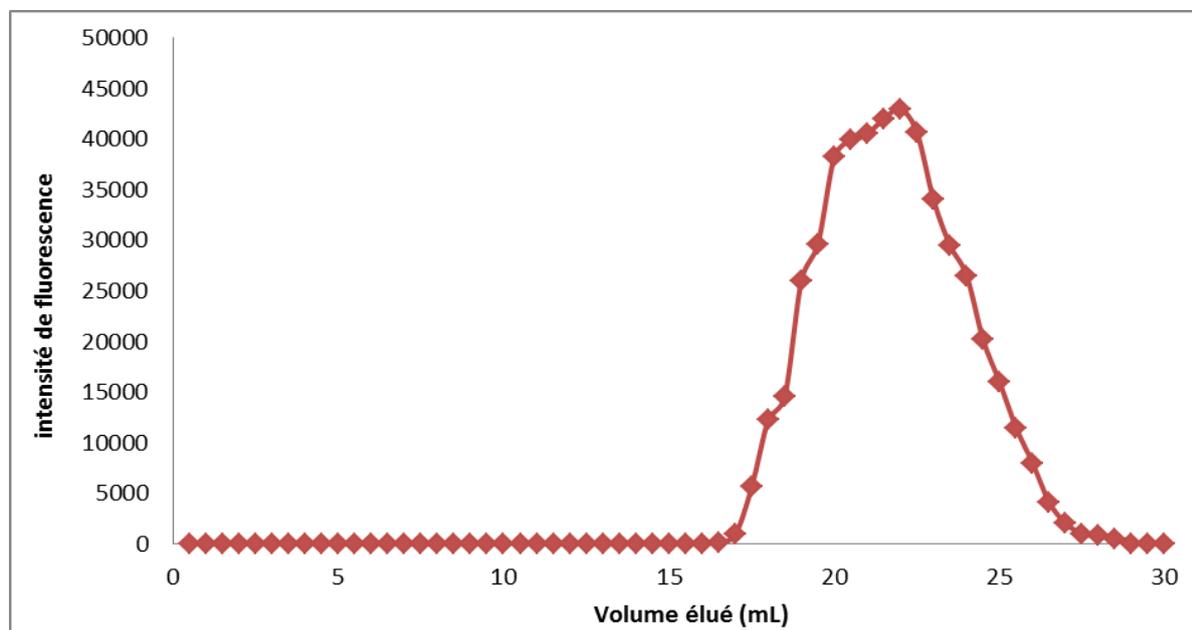


Figure 5.8 : Profil d'élution des particules LNP-Myrj s100 + Cy5 Maléimide, en lecture Cy5.

L'aire sous la courbe des bandes d'élution peut être quantifiée. Les résultats sont regroupés Tableau 5.5. Les profils d'élution permettent donc de calculer le nombre de PEG-SH incorporés à la surface des LNP et d'estimer le rendement de couplage SH/maléimide.

Le rendement d'incorporation de PEG-SH dans la nanoparticule est calculé en faisant le rapport entre l'aire de la bande de PEG non incorporés à celles des LNP (pour les LNP non dialysées) (Tableau 5.6).

	% Cy5-LNP (fraction 3-10 mL)	% Cy5-PEG (fraction 11-16 mL)	% Cy5 libre (fraction 19-26 mL)
LNP-SH dialysées	62	–	38

LNP-SH non dialysées	61	25	14
----------------------	----	----	----

Tableau 5.5 : Pourcentages de fluorescence pour chaque série de fraction.

	Rendement d'incorporation du PEG-SH	Rendement de greffage du fluorophore
LNP-SH	71 %	86 %

Tableau 5.6 : Rendement d'incorporation du (PEG-SH à la surface des LNP) et de greffage du Cy5 maléimide.

4) Stabilité des fonctions thiols présentes à la surface des LNP au cours du temps

Les LNP-SH sont stockées dans des flacons bien fermés (pour éviter que les fonctions thiols s'oxydent) et à 4°C. Le rendement de greffage du Cy5 maléimide sur ces LNP est de 86 %. Pour suivre la réactivité des fonctions thiols présentes à la surface des particules et vérifier si les PEG-SH restent toujours incorporés dans les LNP, les rendements d'incorporation et de greffage sont calculés un mois après la formulation des LNP-SH. Pour cela, ces LNP-SH sont mises à réagir avec le Cy5 maléimide même protocole que précédemment. Le profil d'élution obtenu est représenté Figure 5.9.

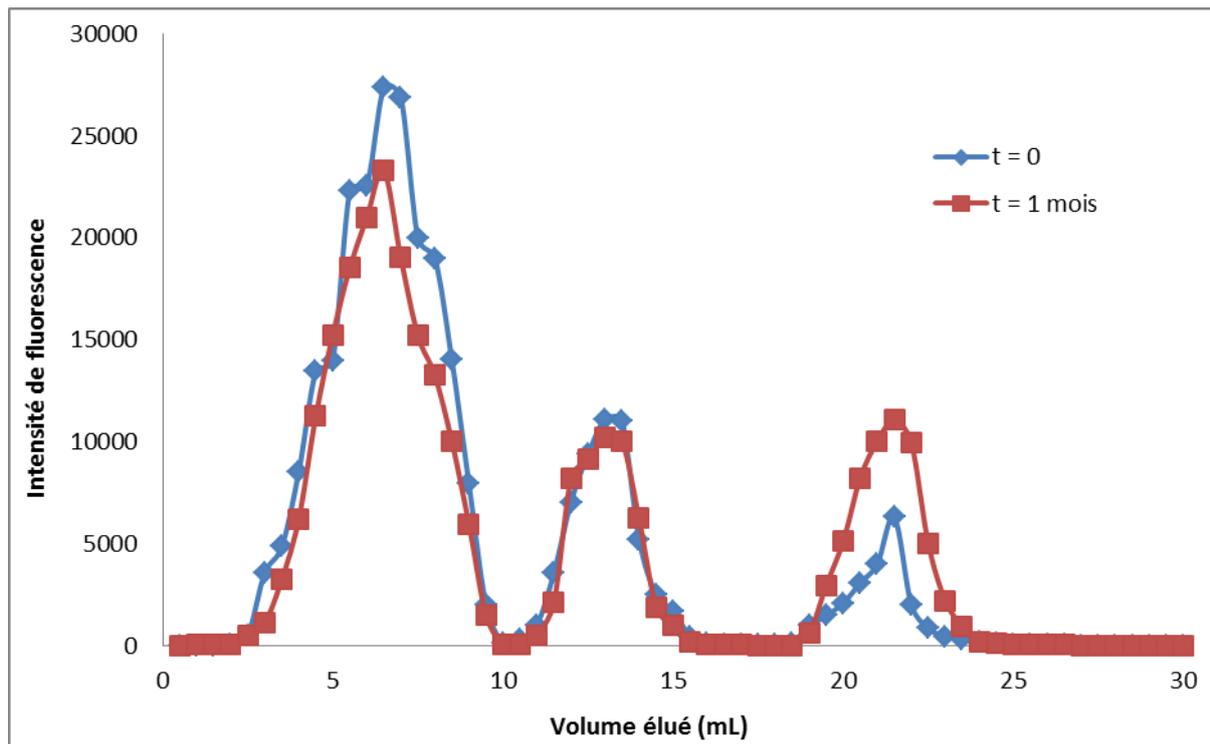


Figure 5.9 : Profils d'éluions des particules LNP-SH (non dialysées) + Cy5 maléimide, en lecture Cy5, à la formulation et après un mois de stockage à 4°C.

Les rendements d'incorporation et de greffage sont calculés et comparés avec ceux trouvés lors de la formulation (Tableau 5.7).

LNP-SH	Rendement d'incorporation		Rendement de greffage	
	t = 0	t = 1 mois	t = 0	t = 1 mois
	71 %	70 %	86 %	75 %

Tableau 5.7 : Rendements d'incorporation et de greffage à la formulation et après un mois.

On constate que pour la mesure faite après un mois, le pourcentage de fluorescence correspondant aux LNP a diminué, et de l'autre côté, le pourcentage de fluorescence correspondant au Cy5 maléimide libre a largement augmenté.

Cette diminution de nombre de fonctions thiols réagissant avec le Cy5 n'est pas due à une chute du nombre de PEG-SH incorporés à la surface, car dans ce cas le pourcentage de fluorescence correspondant au PEG-SH aurait augmenté, tel n'est pas le cas. Donc, la diminution du taux de fluorescence correspondant aux LNP est attribuable au fait que les fonctions thiols présentes en surface des LNPs ne sont pas très stables après un mois de stockage à 4°C. Cette instabilité relative est, peut-être, le résultat d'une oxydation des fonctions thiols conduisant à la réaction de ces fonctions les unes avec les autres pour former des ponts disulfure (cette réaction se passe éventuellement sur la même nanoparticule portant les deux fonctions à réagir, car si c'était deux fonctions sur deux nanoparticules cela aurait conduit à la formation d'un gel chimique, chose qui n'est pas constatée).

5) Gels chimiques de LNP obtenus par couplage thiol/disulfure

a) Formation du gel

Dans cette partie, nous décrivons la possibilité de former des gels chimiques stables et insolubles dans l'eau par réaction entre des LNPs portant des fonctions thiols (forme réduite) et des LNPs portant les fonctions SS-PYR (forme oxydée) pour former un pont disulfure liant les deux nanoparticules.

Pour obtenir le gel de nanoparticules désiré, on mélange une quantité équivalente de LNP-SH et de LNP-SS-PYR à 55 °C (particules portant le même nombre de fonctions) sous agitation. La solution est ensuite homogénéisée en utilisant un vortex (2 minutes d'agitation). La Figure

5.10 présente les schémas de synthèse de ce gel ainsi que les photos obtenues pour les LNP de départ et le gel.

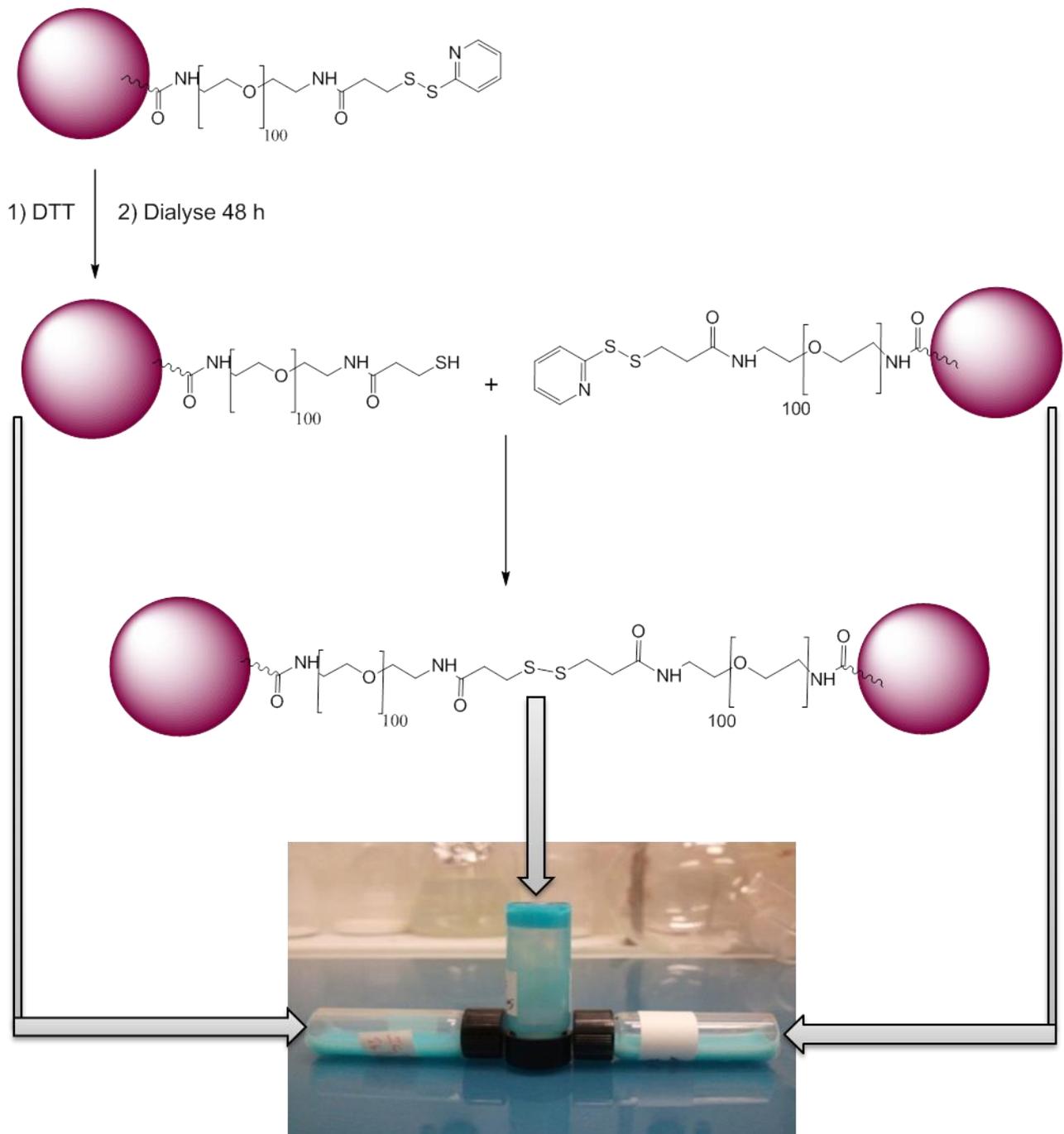


Figure 5.10 : Schéma de synthèse du gel et photos des LNP de départ et du gel obtenues.

La résistance à la dilution du gel est totale, le gel gardant sa structure même après dilution. La densité du gel est inférieure à celle de l'eau (celui-ci flotte). Si une forte agitation est appliquée, le gel se fragmente en petits morceaux pour ensuite finir par se resolidariser par processus de crémage.

Si un fluorophore tel que le DiD est incorporé dans le cœur des nanoparticules, la coloration de la solution de PBS reste faible même après 5 mois de stockage, montrant ainsi que les LNP restent intactes dans le gel.

Pour mettre en évidence que la formation du gel est causée par la création de ponts disulfures, ce gel est mis à réagir avec un réducteur de pont disulfure, en l'occurrence le DTT. Pour cela, à une solution de gel en suspension dans du PBS, on ajoute du DTT (10 équivalents en nombre de moles par rapport au nombre de fonctions thiols) afin de cliver les ponts disulfures reliant les nanoparticules. Après mélange, on observe une dissolution immédiate du gel. Ceci confirme bien que la formation du gel chimique constatée est le résultat d'une formation des ponts disulfures entre les nanoparticules.

b) Rhéologie du gel chimique SSPYR/SH

Le gel chimique formé (SH-SSPYR) est, comme les gels obtenus précédemment, caractérisé par le rhéomètre AR2000 EX (TA Instruments) au CERMAV. Les propriétés viscoélastiques du gel sont donc définies par des mesures des modules élastiques et visqueux en fonction de la fréquence d'oscillation.

La mesure dure environ 20 minutes et la contrainte appliquée est fixée à 3 Pa (valeur à laquelle les modules G' et G'' sont dans le domaine linéaire, d'après les mesures faites au préalable. Voir chapitre 8). La Figure 5.11 regroupe les modules d'élasticité et de viscosité en fonction de la fréquence des LNP-SH et LNP-SSPYR ainsi que pour le gel formé.

La gamme de fréquence exploitée est toujours (0,01-10 Hz). Le module élastique G' qui reflète le caractère "solide" élastique de l'échantillon est faible et similaire pour les deux types de LNP (LNP-SH et LNP-SSPYR, respectivement 150 et 170 Pa). Les valeurs des modules

G' et G'' des LNP (SH et SSPYR) sont comparées avec celles obtenues avec le gel SH-SSPYR ($G' = 1900$ Pa). Cette différence est le résultat de la formation du gel (formation des liaisons disulfure entre les LNP-SH et LNP-SSPYR, créant ainsi des ponts entre les nanoparticules pour conduire au gel insoluble, Figure 5.11).

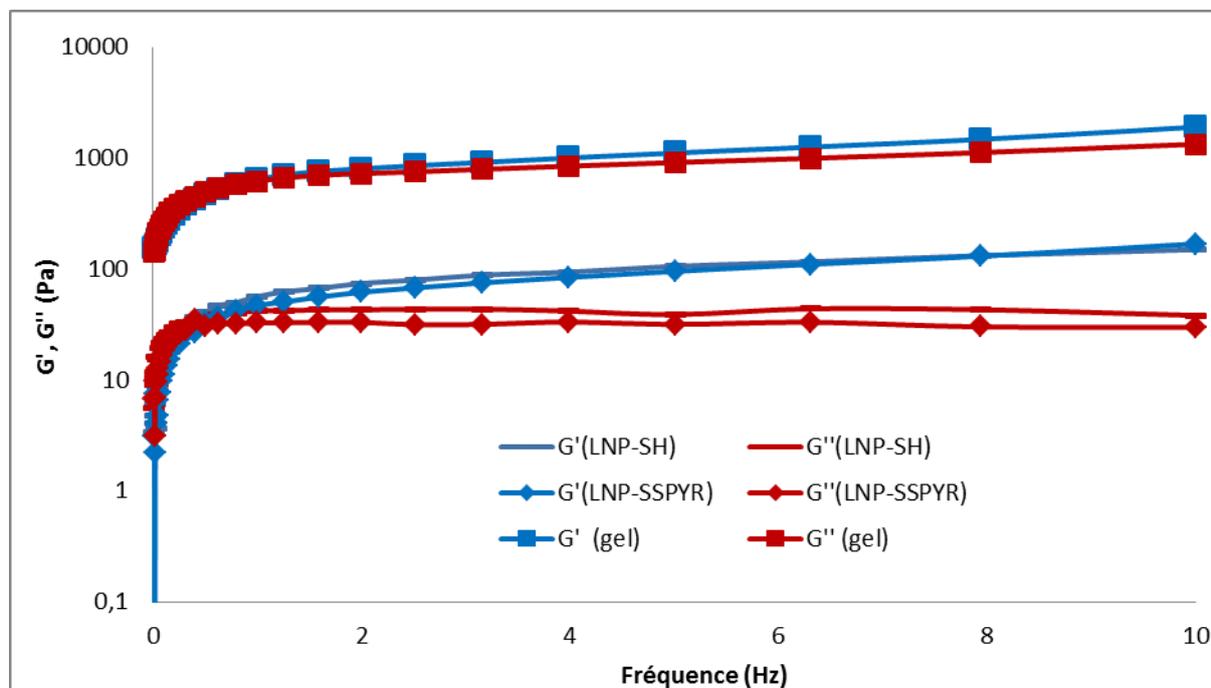


Figure 5.11 : Modules d'élasticité et de viscosité des LNP-SH, LNP-SS-PYR (courbes en bas) et du gel SH-SS-PYR (courbes en haut), en fonction de la fréquence.

6) Gels chimiques de LNP obtenus par irradiation des LNP-SH

Dans un 2nd temps, nous avons exploré la possibilité de photoformation de gel partir des LNP-SH par couplage entre deux radicaux thiyles S[•].

a) Formation du gel

Les LNP fonctionnalisées thiol sont d'abord déprotégées (sous l'action du DTT). Elles sont ensuite dialysées pour se débarrasser des molécules DTT présentes en excès ainsi que les PEG n'ayant pas été incorporés à leur surface.

Ces LNP-SH sont utilisées pour photoformer des gels chimiques. Le principe consiste à irradier 1 mL de LNP-SH à 365 nm avec une puissance de 15 mW/cm². Après 1h30 d'irradiation, un gel insoluble dans le PBS est formé (Figure 5.12).

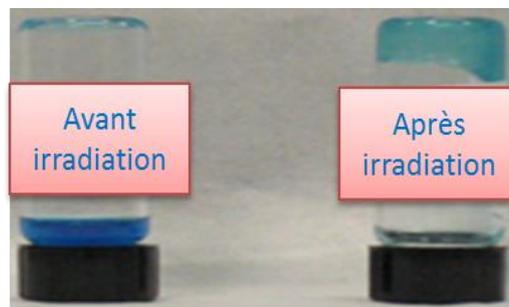


Figure 5.12 : Photo du gel chimique photoformé ainsi que celle des LNP-SH de départ.

Les contrôles négatifs montrent que cette gélification est bien due à la présence des fonctions thiols à la surface des nanoparticules lipidiques. En effet, l'irradiation dans les mêmes conditions d'une solution de nanoparticules standards (LNP avec juste le Myrj s100 à hauteur de 20 % par rapport à la masse totale de surfactants PEG) ne conduit pas à la gélification de la solution (Figure 5.13).

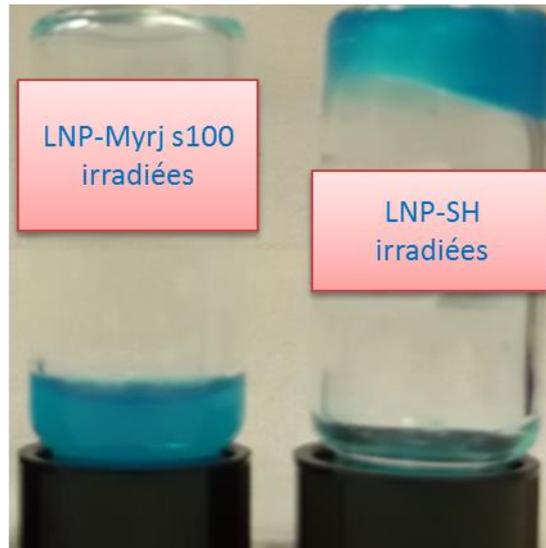


Figure 5.13 : Photo du contrôle négatif (LNP-Myrj s100 irradiées) comparée à celle des LNP-SH irradiées.

En présence de DTT, un réducteur connu notamment pour la réduction des ponts disulfures, on observe que le gel redevient liquide après 2 minutes d'agitation (Figure 5.14 et 5.15).

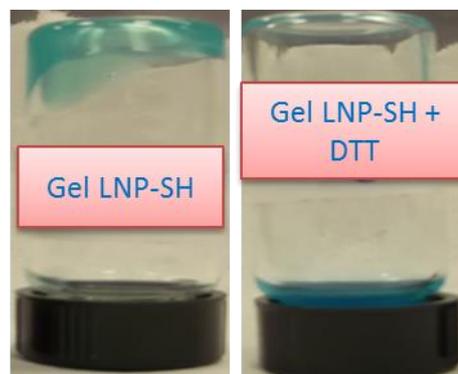


Figure 5.14 : Gel de LNP-SH + DTT.

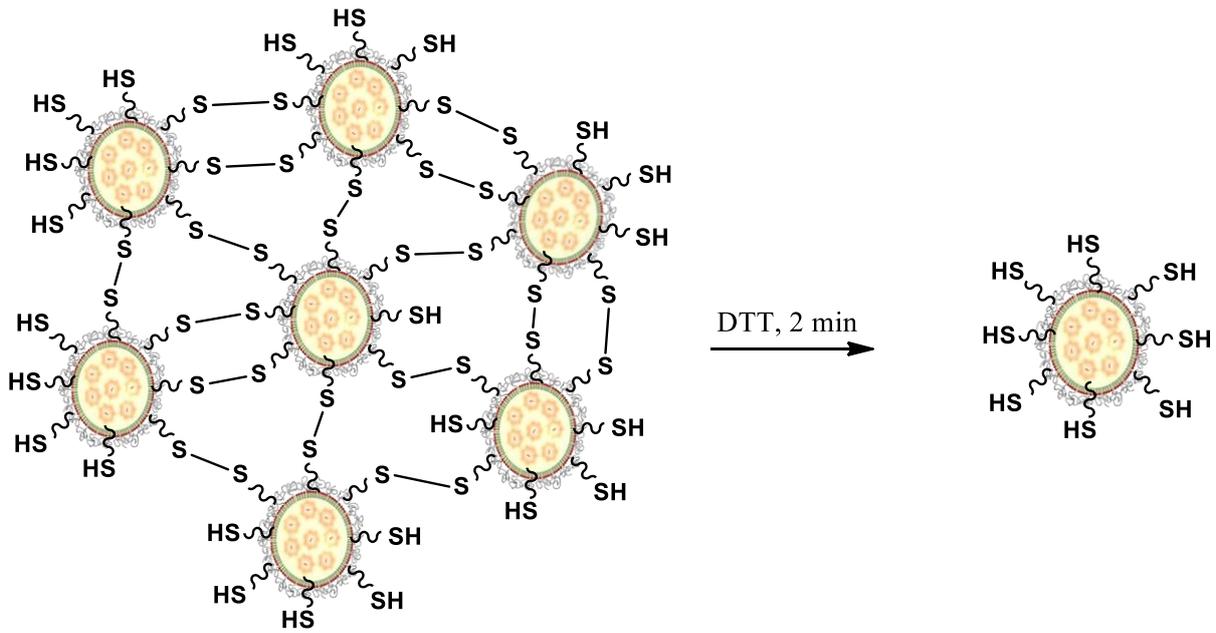


Figure 5.15 : Destruction du gel sous l'action d'un réducteur (DTT).

Comme la réaction de gélification est relativement longue (1h30), nous avons essayé de l'accélérer en ajoutant à la formulation LNP-SH un photoinitiateur de radicaux, en l'occurrence le 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA) (Figure 5.16). Comme on le voit sur la photo, le DMPA n'accélère pas la formation du gel, mais au contraire il déstabilise les formulations (les mesures de tailles faites montrent qu'il y a eu une destruction des nanoparticules).

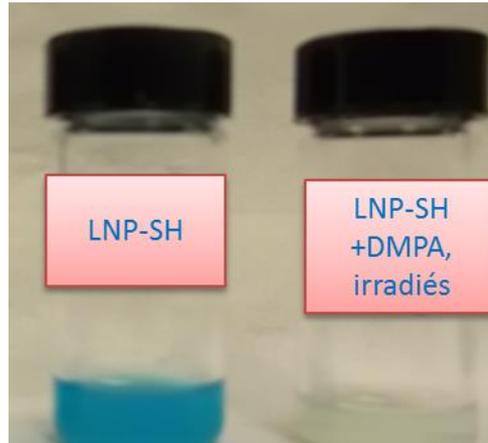


Figure 5.16 : LNP-SH irradiées en présence du DMPA, comparées avec celles de départ.

b) Rhéologie du gel

Pour voir l'évolution de la formation du gel chimique au cours du temps d'irradiation, des mesures de rhéologie sont réalisées sous irradiation à 365 nm, à l'aide d'un rhéomètre (AR2000 EX, TA Instruments) et les modules de viscosité et d'élasticité de l'échantillon sont enregistrés au cours du temps. La mesure est réalisée en utilisant une irradiation avec une puissance de 60 mW/cm^2 et une fréquence de 1 Hz.

Au cours du temps d'irradiation, on observe une augmentation à la fois du module de viscosité (G'') et du module d'élasticité (G') pour l'échantillon de nanoparticules SH, indicatif de la gélification. Après 80 minutes d'irradiation, G' devient supérieur de G'' , et delta, défini tel que $\tan(\delta) = G'/G''$, devient inférieur à 45° , ce qui indique le passage d'un liquide viscoélastique à un solide viscoélastique (Figure 5.17).

La même procédure est réalisée avec des LNP sans fonctions thiols, mais des fonctions hydroxyles terminales (LNP-Myrj s100) : aucune évolution des propriétés rhéologiques n'est alors observée au cours de l'irradiation (Figure 5.18).

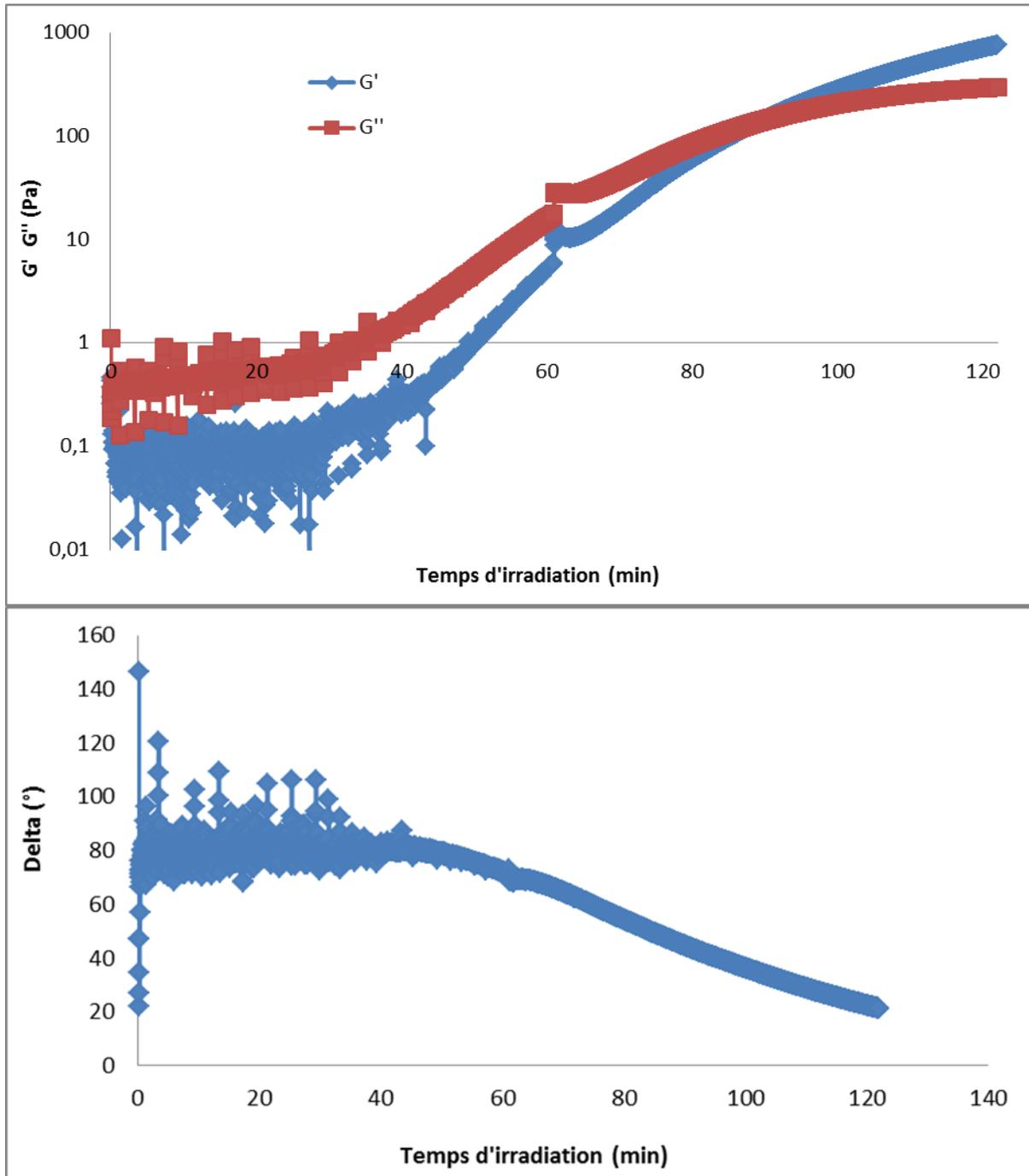


Figure 5.17 : Evolution des modules de viscosité et d'élasticité au cours du temps d'irradiation (en haut) ; et delta (en bas), pour les LNP-SH.

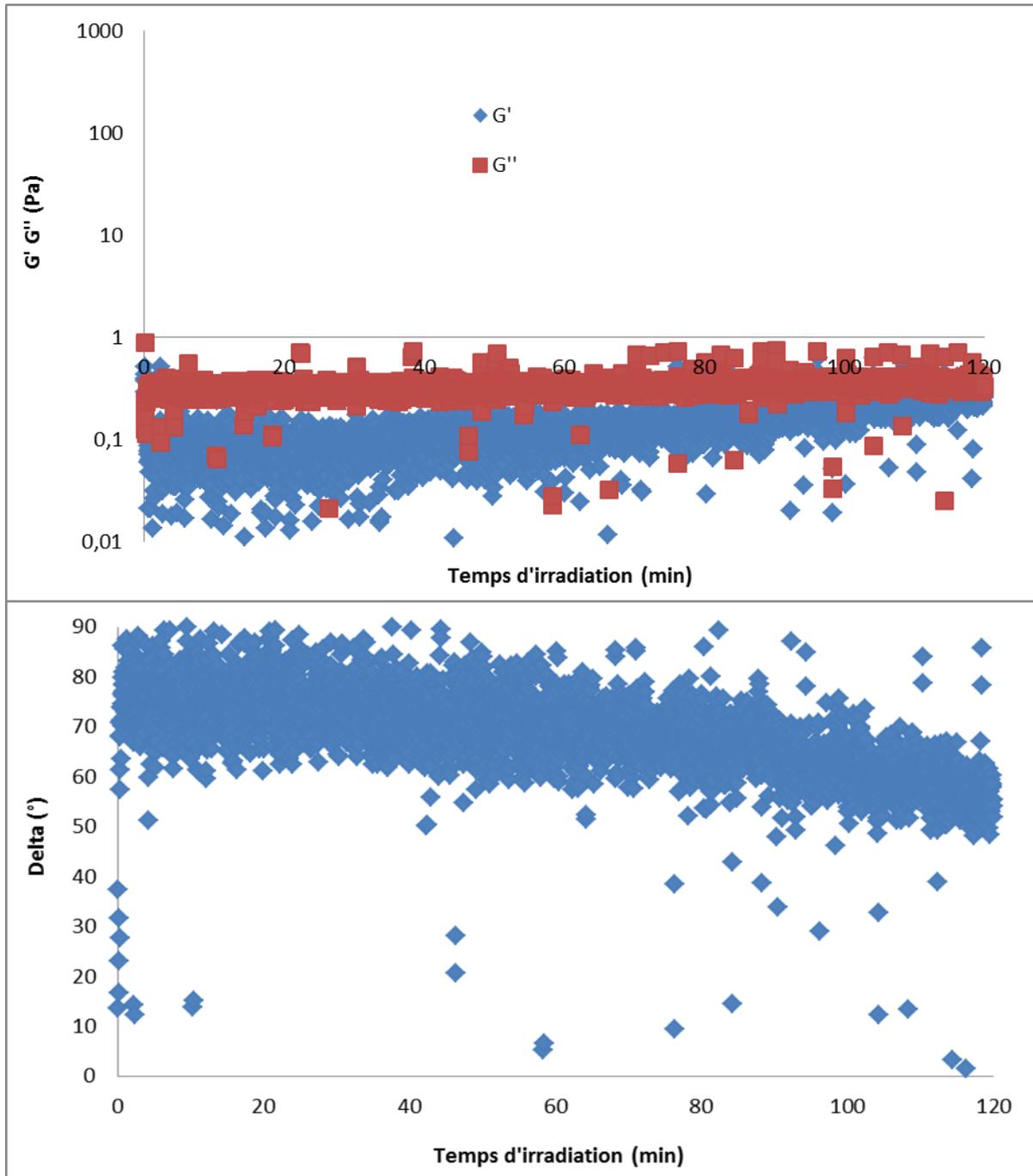


Figure 5.18 : Evolution des modules de viscosité et d'élasticité au cours du temps d'irradiation (en haut) ; et delta (en bas), pour les LNP-Myrj s100.

Maintenant que le principe de photoformation du gel est confirmé par la rhéologie (domination du module d'élasticité sur celui de viscosité après 80 minutes d'irradiation), ce gel chimique photoformé, via l'irradiation des LNP-SH, est caractérisé par le rhéomètre AR2000 EX (TA Instruments). Ce gel est soumis à une contrainte et l'appareil mesure la déformation du matériau en régime dynamique à une fréquence variable.

La mesure permet donc de définir les propriétés viscoélastiques du gel. La mesure dure environ 20 minutes et la contrainte appliquée est fixée à 3 % (pourcentage auquel les modules G' et G'' sont dans le domaine linéaire, d'après les mesures faites au préalable. Voir chapitre 8). La Figure 5.19 regroupe les modules d'élasticité et de viscosité en fonction de la fréquence, pour les LNP-SH de départ ainsi que pour le gel photoformé. La figure met en évidence la grande différence entre les modules d'élasticité des LNP de départ ($G' \sim 150$ Pa) et du gel obtenu ($G' \sim 4200$ Pa). Cette différence est le résultat de la photoformation du gel chimique.

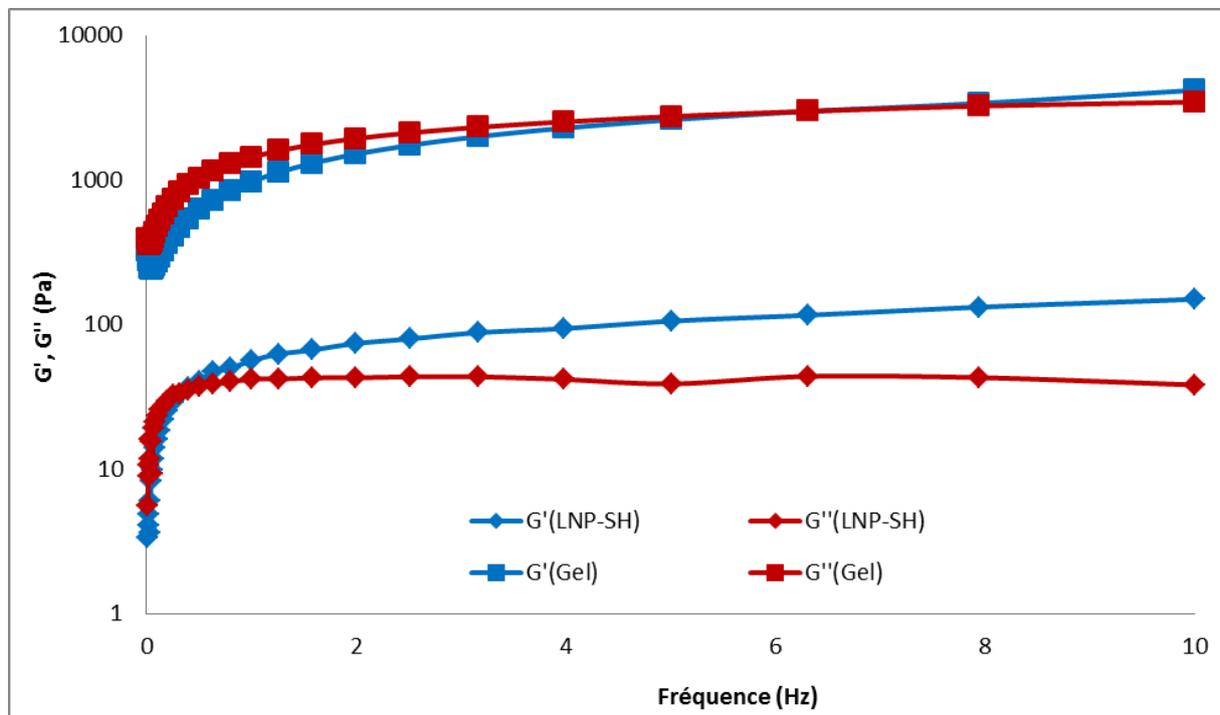


Figure 5.19 : G' et G'' en fonction de la fréquence, pour les LNP-SH et le gel photoformé.

7) Conclusion

- 1) Nous avons synthétisé et caractérisé des LNP fonctionnalisées par une fonction thiol protégée par le groupement thiopyridyl (LNP-SSPYR), et leur réaction de déprotection par un réducteur, le DTT, pour conduire à des nanoparticules NP-SH.
- 2) Nous avons mis en forme, à partir de ces LNP thiols et des LNP-SSPYR, des gels chimiques très stables et se formant très rapidement (5 min) sans ajouter aucun réactif.
- 3) La possibilité de former un gel par irradiation des LNP-SH a été démontrée. Cette méthode est cependant beaucoup plus longue que la méthode de couplage chimique SH/SSPYR
- 4) Les gels obtenus dans les deux cas (par réaction thiol/thiol protégé ou par irradiation des LNP-SH) présentent les mêmes caractéristiques d'aspect et de résistance à la dilution. Les gels avec un pont disulfure sont très stables (à 4 °C) et ce pendant plusieurs mois. Cependant, nous constatons que les valeurs des modules d'élasticité sont beaucoup plus élevées dans le cas du gel obtenu par irradiation : 4200 Pa pour le gel obtenu photochimiquement et 1900 Pa pour le gel obtenu chimiquement.
- 5) Dans les deux cas, le gel obtenu est facilement attribuable à la formation du pont disulfure. Ainsi, l'ajout d'une petite quantité d'un réducteur, en l'occurrence le DTT, conduit, après agitation, à la reformation des LNP-SH.

CHAPITRE 6

**GELS NANO/NANO A PARTIR DE
NANOPARTICULES THIOLS ET MALEIMIDES,
ET PHOTOCIVAGE DES GELS**

6.1 Introduction

Dans ce chapitre, comme dans le précédent, nous allons développer des gels chimiques formés par liaisons covalentes directes entre deux LNP fonctionnalisées. Les LNPs fonctionnalisées qui serviront pour la formation des gels chimiques, portent des fonctions maléimides et thiols.

En utilisant la chimie thiol-maléimide, nous préparons deux sortes de gels qui se différencient par la présence d'un groupe photocuvable introduit lors de la synthèse du PEG. Ce groupe photocuvable rendra l'un des gels photosensible et permettra donc de le désolidariser à la demande.

Le groupement photocuvable qui sera utilisé est : l'orthonitrobenzyle, abrégé ONB. Les dérivés des o-nitrobenzyle sont des molécules organiques sensibles à la lumière. Ils sont très connus et ont été utilisés comme des groupements protecteurs de certaines fonctions en synthèse organique ou comme linker en biochimie. Ils absorbent la lumière UV souvent la substitution sur le noyau aromatique qui décale l'absorption vers le visible (133). La structure générale d'un dérivé d'ONB est illustrée dans la Figure 6.1.

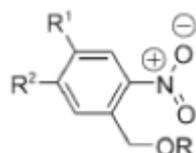


Figure 6.1 : Structure générale d'une molécule ONB.

Les différentes étapes de la formation de ces gels chimiques (photocuvables et non photocuvables) sont :

- La synthèse de deux surfactants PEG fonctionnalisés maléimide et ONB-maléimide ;
- L'incorporation de ces surfactants à la surface des nanoparticules pour obtenir des LNP-Maléimide et LNP-ONB-Maléimide.
- La mise en évidence de la faisabilité des gels, en faisant réagir les LNP-Mal et LNP-ONB-Mal en présence de LNP-Thiols, et de leur clivage à la lumière.

Le couplage chimique utilisé pour former ces gels est la réaction d'addition nucléophile d'un groupe thiol vis-à-vis d'une fonction maléimide (Figure 6.2). Le couplage thiol-maléimide est une réaction 'click-chemistry' et est très utilisé en biochimie (134). Le groupe maléimide réagit spécifiquement et rapidement avec des groupes thiol, lorsque le pH du mélange réactionnel est compris entre pH 6,5 et 7,5 (ce qui convient pour le pH des nanoparticules lipidiques, qui est de 7,4) Le résultat de ce couplage est la formation d'une liaison thioéther stable. La réaction n'est pas réversible.

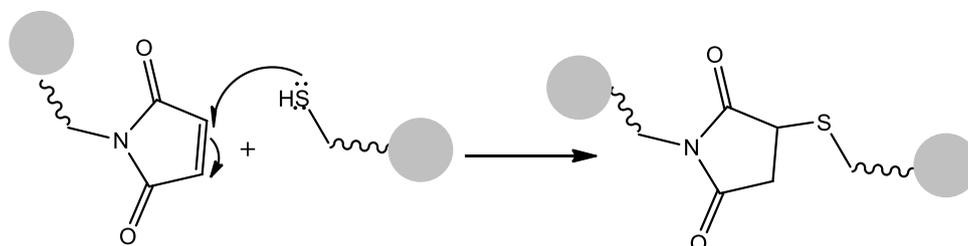


Figure 6.2 : Schéma de couplage thiol-maléimide.

Le photocuvage du groupement ONB est utilisé pour cliver les gels ainsi formés (gels de LNP-ONB-Mal) (Figure 6.3). En effet, l'irradiation à 300 nm des groupements ONB conduit à la formation d'une cétone et, souvent le substituant sur le carbone en position ortho, un alcool ou une amine se forme (135). La Figure 6.4 illustre le mécanisme de photocuvage d'un ONB substitué éther en position ortho.

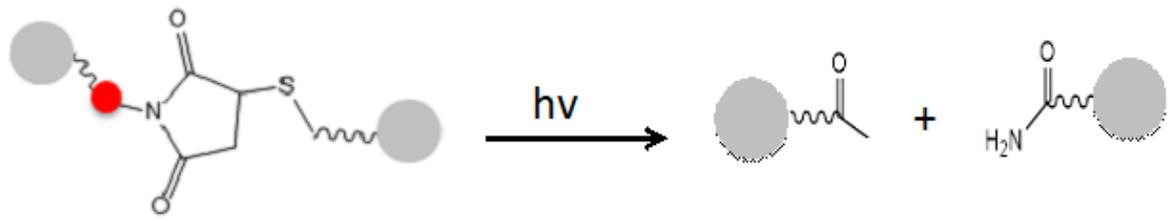


Figure 6.3 : Schéma de photoclivage d'un gel contenant un ONB.

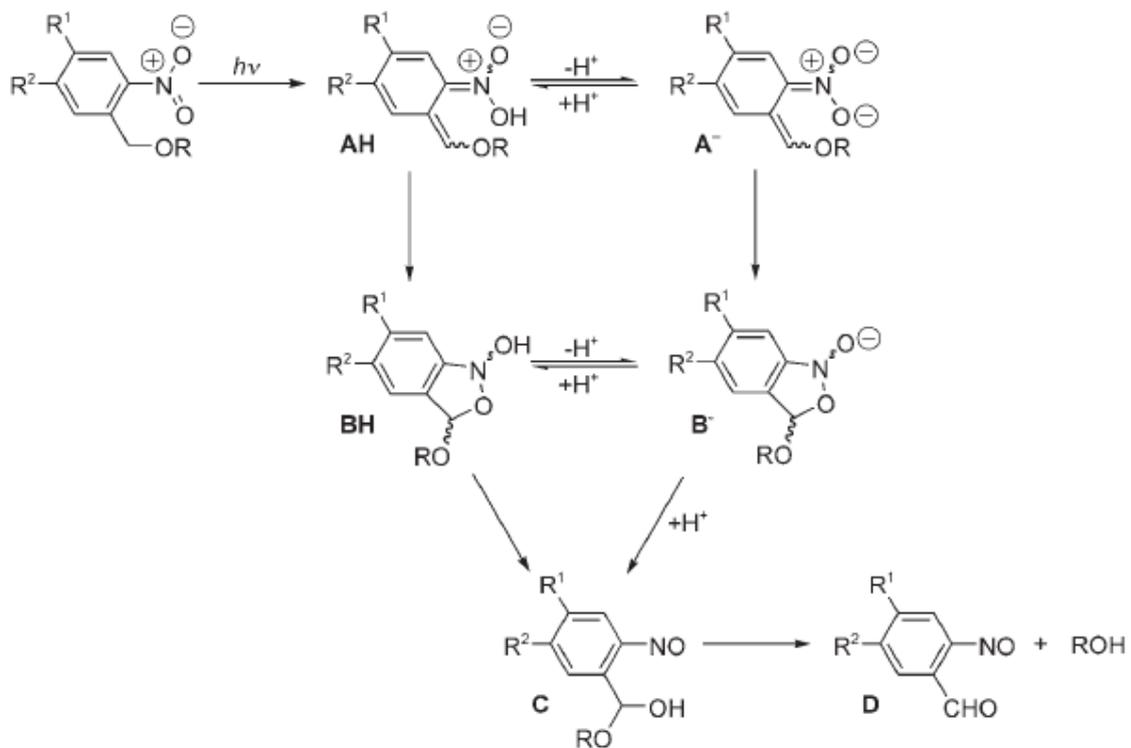


Figure 6.4 : Schéma de photoclivage d'un ONB.

6.2 Synthèse des surfactants PEG-Mal et PEG-ONB-Mal

1) Synthèse du surfactant PEG-Mal

Ce produit est un surfactant PEG à 100 unités d'éthylènes glycol, dont une extrémité est liée à l'acide stéarique (C18) par une liaison amide et l'autre extrémité à la fonction maléimide par une deuxième liaison amide (Figure 6.5).

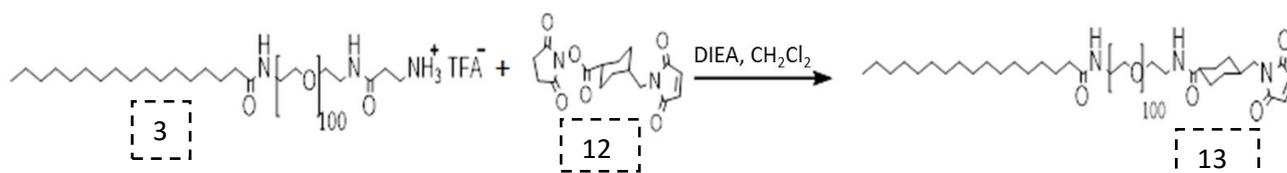


Figure 6.5 : Schéma de synthèse du PEG-Mal.

La synthèse de ce composé se fait à partir du surfactant PEG-NH₂ (3) dont la synthèse a été décrite au chapitre 3. La substitution nucléophile du groupement NH₂ du PEG-NH₂ en milieu basique sur le réactif SMCC, 4-(N-Maleimidométhyl)acide cyclohexanoïque N-hydroxysuccinimide ester, (12) conduit au produit désiré SA_{CONH}PEG100-Mal (PEG-Mal). La réaction dure 2 heures et permet d'obtenir le produit final avec un rendement de 70 % (produit purifié par dialyse).

2) Synthèse du surfactant PEG-ONB-Mal

Le surfactant PEG-ONB-Mal est un surfactant de type polyéthylène glycol (100 unités) qui est lié à une chaîne grasse (C18) via une fonction amide et de l'autre côté possède une autre fonction amide liée à une maléimide via un groupe photoclivable de type orthonitrobenzyle (ONB). Sa structure et son schéma de synthèse sont représentés Figure 6.6 (détails chapitre 8).

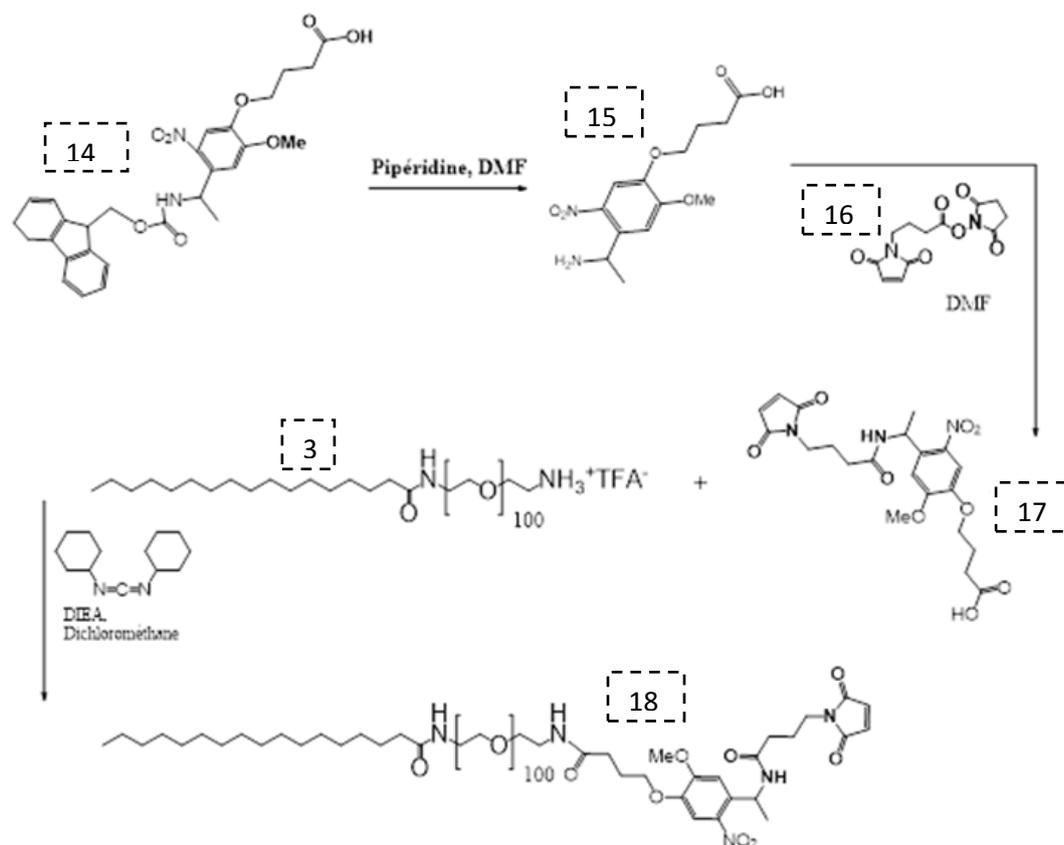


Figure 6.6 : Schéma de synthèse du PEG-ONB-Mal.

La synthèse de ce composé se fait à partir de l'acide 4-{4-[1-(9 Fluorenylmethoxy carbonylamino)ethyl]-2-methoxy-5-nitrophenoxy} butanoïque, abrégé Fmoc-Photo-Linker (14).

La première étape est une déprotection de la fonction amine (protégé par le groupement Fmoc). La pipéridine est utilisée pour cette déprotection dans le DMF.

Le produit 15 est obtenu sous forme d'huile jaune difficile à purifier, Il a été engagé tel quel dans l'étape suivante. Ce produit 15 est mis à réagir avec l'ester 4-maléimidobutyric acid N-hydroxysuccinimide (16) pour obtenir la fonction maléimide désirée à l'extrémité de la molécule. Le rendement des deux étapes est de 67 %.

Le produit 17 peut réagir par un couplage peptidique avec le PEG-NH₂ (3) dont la synthèse a été détaillée dans le chapitre 3 pour conduire au produit final PEG-ONB-Mal (18), purifié par dialyse. Le rendement global est de 72 %.

6.3 Synthèse des LNP fonctionnalisées maléimide ou ONB-maléimide

Les nanoparticules de références (F50-réf) sont modifiées par incorporation du surfactant PEG-Mal ou PEG-ONB-Mal à leur surface lors de la formulation.

La composition du premix huileux ne change pas par rapport aux nanoparticules de référence. Quant à la phase aqueuse, le surfactant PEG-Mal ou PEG-ONB-Mal y est ajouté à hauteur de 20 % massique par rapport à la masse totale de surfactants PEGylés. La masse globale de surfactants PEGylés reste constante à 345 mg. La dissolution complète des surfactants PEGylés nécessite de chauffer la solution à 55°C (Tableau 6.1).

Premix lipidique			
Huile	Cire	Lécithine	DiD
68 mg	272 mg	65 mg	0,04 mg
Phase aqueuse			
Volume PBS	Myrj S40	PEG-Mal ou PEG-ONB-Mal	
2.5 mL	276 mg	69 mg	

Tableau 6.1 : Constituants du premix huileux et de la phase aqueuse des formulations.

6.4 Caractérisation et stabilité des LNP-Mal et LNP-ONB-Mal

1) Taille et potentiel Zêta

Le rayon hydrodynamique, l'indice de polydispersité et le potentiel Zêta des nanoparticules LNP-Mal et LNP-ONB-Mal sont mesurés par DLS. Les mesures sont faites dans le tampon PBS. Les LNP de référence sont élaborées et leur taille et potentiel Zêta ont été également mesurés pour comparaison (Tableau 6.2 et Tableau 6.3).

Les mêmes mesures ont été faites après 3 mois de formulation pour suivre la stabilité de ces nanoparticules au cours du temps.

Echantillon	Diamètre moyen en nm	Indice de polydispersité	Diamètre moyen en nm après 2 semaines	Indice de polydispersité après 2 semaines	Diamètre moyen en nm après 3 mois	Indice de polydispersité après 3 mois
F50-réf (100 % Myrj s40)	49 ±1	0,1 ±0,01	50 ±1	0,1 ±0,01	50 ±1	0,11 ±0,01
0% PEG-Mal	59 ±1	0,16 ±0,01	60 ±1	0,17 ±0,01	60 ±1	0,18 ±0,01
20% PEG-Mal	57 ±1	0,15 ±0,01	58 ±1	0,16 ±0,01	58 ±1	0,17 ±0,01
20% PEG-ONB-Mal	77 ±1	0,21 ±0,01	80 ±1	0,22 ±0,01	81 ±1	0,24 ±0,01

Tableau 6.2 : Tailles et indices de polydispersité des LNP-Mal et LNP-ONB-Mal.

	t= 0	t=2 semaines	t= 3 mois
LNP-Mal	-2 ±1	-3 ±1	-1 ±1
LNP-ONB-Mal	-6 ±1	-5 ±1	-4 ±1

Tableau 6.3 : Potentiels Zêta des LNP-Mal et LNP-ONB-Mal à la formulation et après 2 semaines, et 3 mois.

On constate que l'incorporation du PEG-Mal à la surface des LNP ne change presque pas la taille et l'indice de polydispersité des particules. Les nanoparticules F-50 (classiquement utilisées au laboratoire : 100 % Myrj s400 avec 40 unités d'éthylène glycol) présentent pour leur part des diamètres hydrodynamiques plus proches de 50 nm de diamètre. Aussi, pas d'augmentation considérable de taille après 3 mois de formulation.

Quant au PEG-ONB-Mal, son incorporation à la surface des LNP rend les tailles de ces dernières beaucoup élevées par rapport aux LNP standard et aussi par rapport aux LNP-Mal. La taille moyenne des LNP-ONB-Mal est de 77 nm alors que celui des LNP sans ONB-Mal est de 57 nm. La même chose est constatée sur les indices de polydispersité (Figure 6.6, 6.7 et 6.8). Malgré ces changements de tailles et d'indice de polydispersité, ces LNP-ONB-Mal garde un aspect physique similaire à celles fonctionnalisées maléimide tout court.

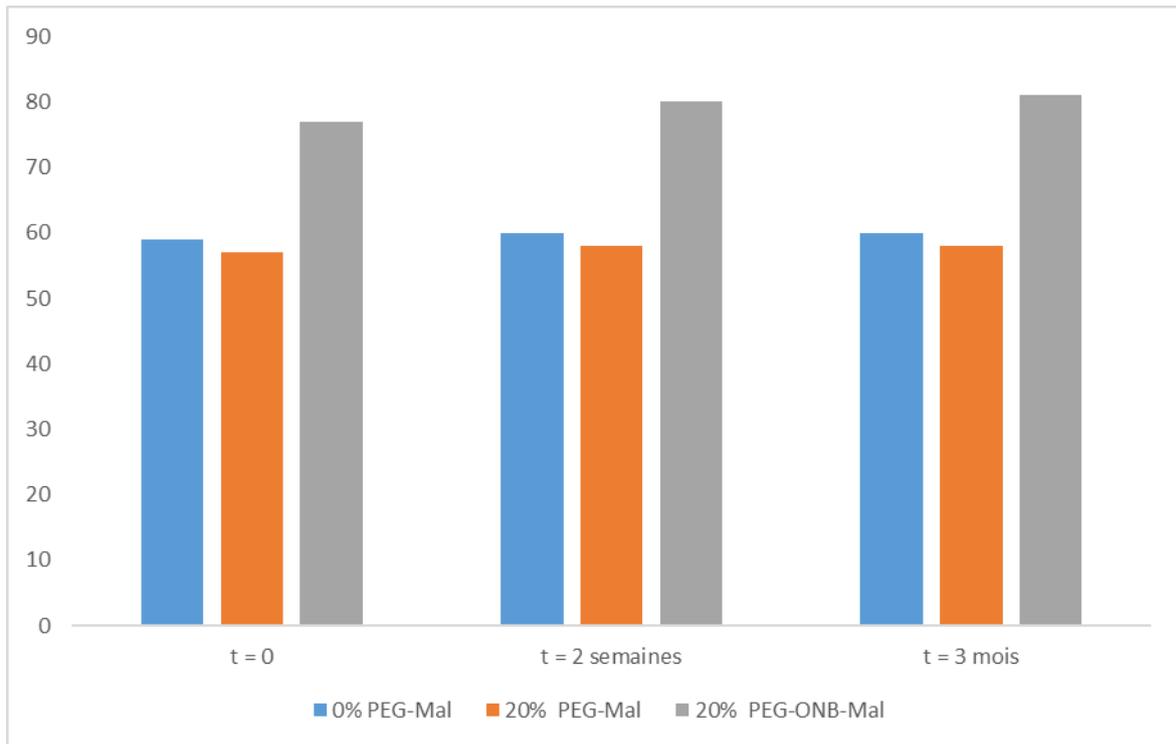


Figure 6.7 : Tailles de LNP de référence et de LNP-Mal ou LNP-ONB-Mal.

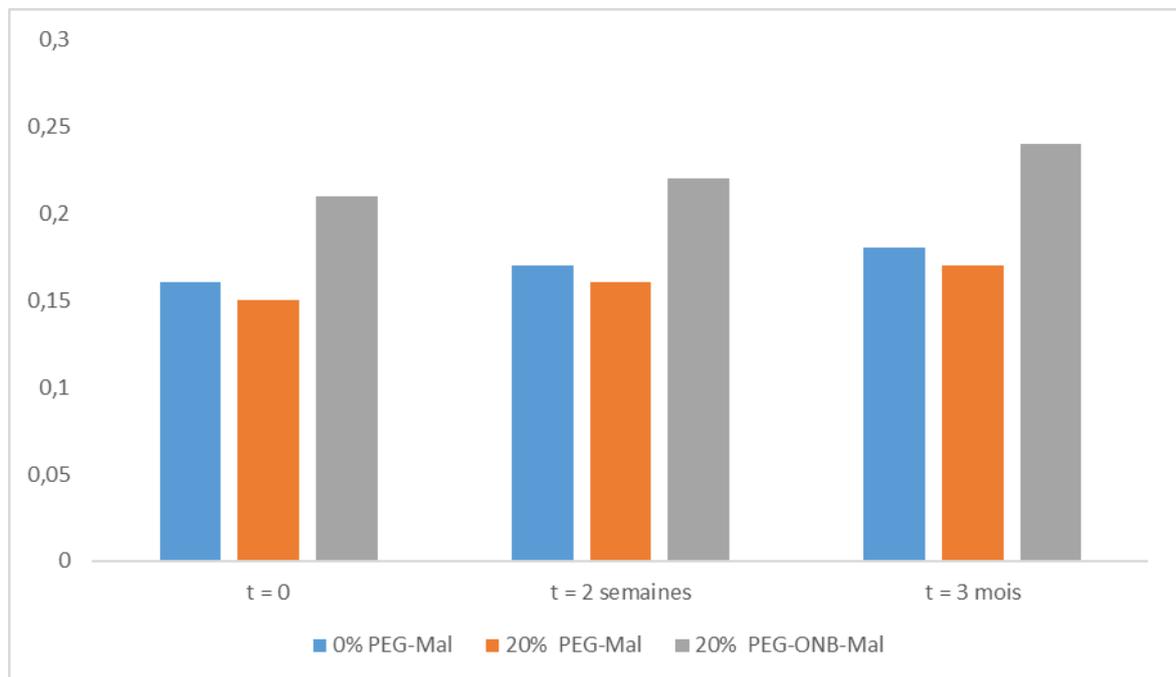


Figure 6.8 : Indices de polydispersité de LNP de référence et LNP-Mal ou LNP-ONB-Mal.

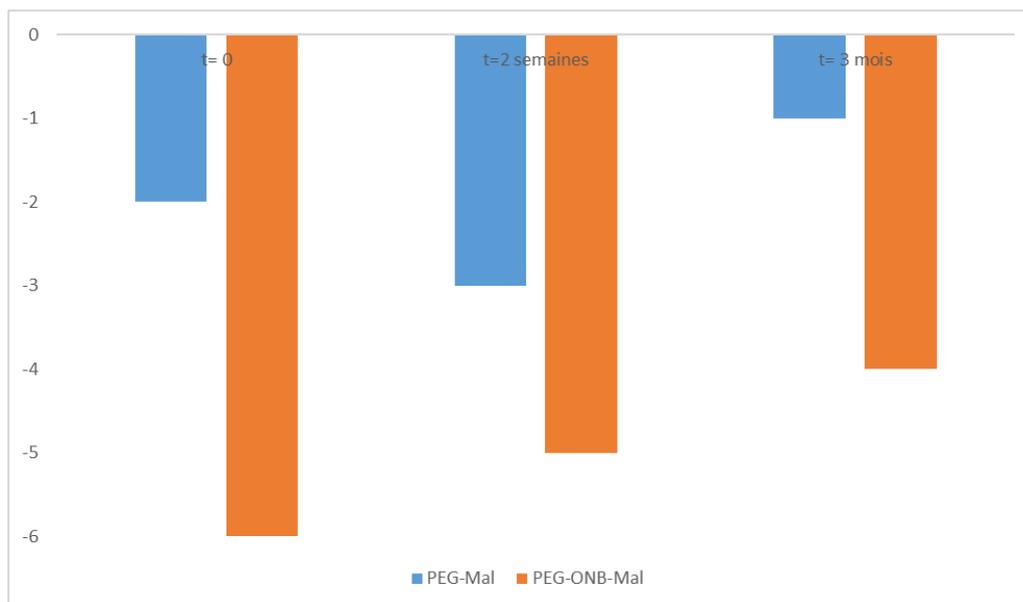


Figure 6.9 : Potentiel Zêta de LNP-Mal et LNP-ONB-Mal.

2) Mise en évidence des fonctions maléimides à la surface des nanoparticules

Comme a été détaillé dans les précédents chapitres, il ne nous est pas possible de caractériser la fonctionnalisation des LNP en RMN, la présence de pics correspondant aux constituants des LNP empêchent la visibilité de ceux correspondant aux fonctions présentes à la surface.

La mise en évidence des fonctions maléimides à la surface des LNP est donc faite par fluorescence. Le principe consiste à faire réagir les LNP fonctionnalisées maléimides avec un fluorophore portant une fonction SH (en l'occurrence le SAMSА-fluorescéine qui porte une fonction thiol protégée) car les thiols sont très réactifs vis-à-vis des maléimides. La réaction est conduite dans le PBS à pH 7.4.

Une purification par colonne d'exclusion stérique (Sephadex G-25 Medium, GE Healthcare) est réalisée pour séparer les nanoparticules (LNP-Mal et LNP-ONB-Mal ayant réagi avec le

SAMSA-fluorescéine) de la fluorescéine libre. Les fractions d'élution recueillies sont analysées par spectrofluorimétrie sur un lecteur de plaques Tecan (Tecan Infinite M1000). Les analyses sont réalisées dans deux plages de longueurs d'onde : 1) excitation à 490 nm et émission à 520 nm, et 2) une excitation à 640 nm et émission à 690 nm, qui correspondent respectivement à la fluorescéine et au DiD.

a) Mise en évidence des fonctions maléimides des LNP-Mal

Le même protocole est réalisé avec des particules LNP-Mal dialysées et des LNP-Mal n'ayant pas été dialysées pour quantifier par comparaison le nombre de PEG-Mal incorporés à la surface des particules et estimer si la perte de ces PEG pendant la dialyse est importante. Cette mesure permet également de remonter au nombre réel de fonctions maléimides qui réagissent avec la SAMSA-fluorescéine et donc en déduire le rendement de la réaction de greffage du fluorophore sur les nanoparticules.

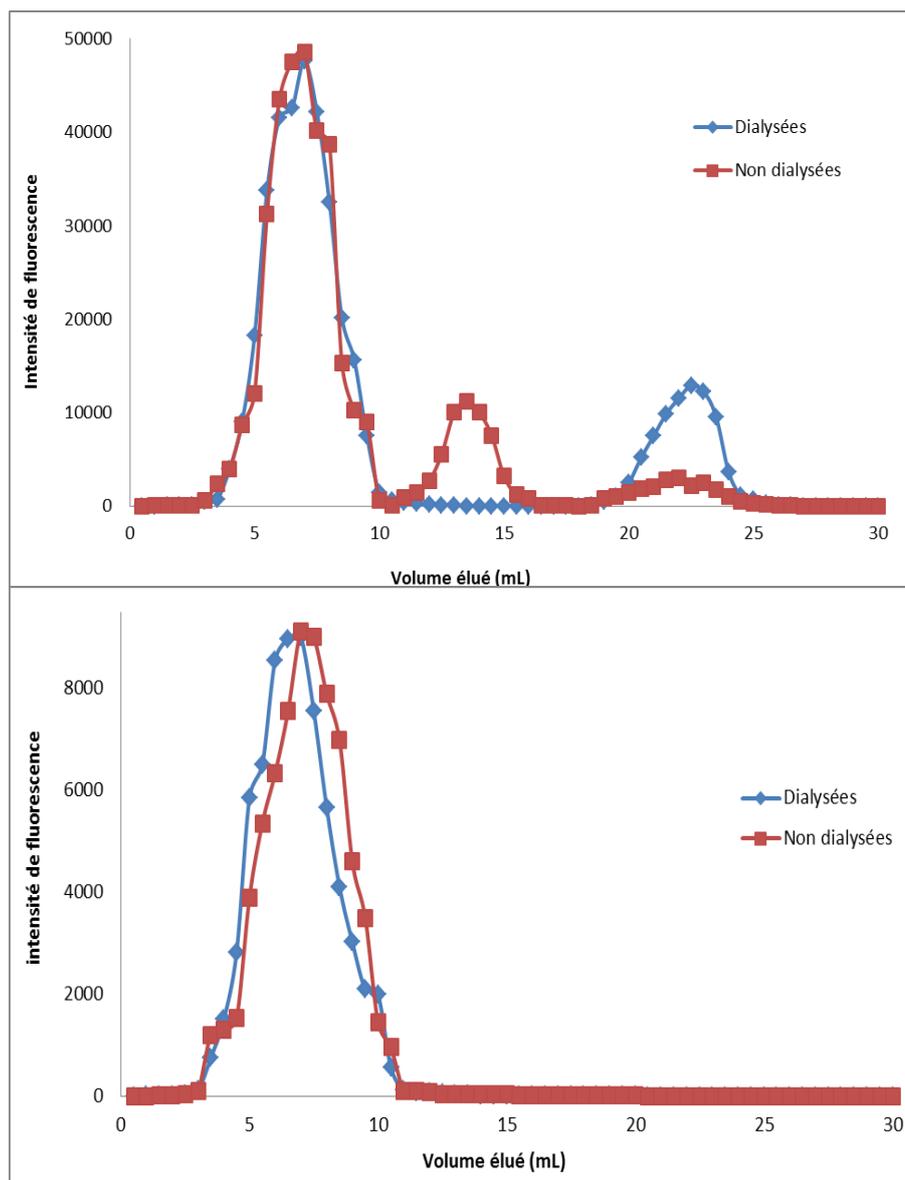
Des nanoparticules maléimides traitées au préalable avec le mercaptoéthanol (1 équivalent par rapport au nombre de fonctions maléimides) ont également été mises à réagir avec le SAMSA-fluorescéine dans les mêmes conditions. Ces nanoparticules dont les fonctions maléimides ont été inhibées par le mercaptoéthanol constituent un contrôle négatif et permettent de vérifier que les résultats obtenus correspondent bien au couplage maléimide-thiol.

Les profils d'élution obtenus avec les 2 types de particules (LNP-maléimide et LNP-Maléimide ayant réagi avec le mercaptoéthanol) sont respectivement, présentés Figure 6.10 et Figure 6.11. Les LNP supposées porter les fonctions maléimides à leur surface réagissent bien avec le SAMSA-fluorescéine (co-élution de la fluorescéine-greffée à la surface des nanoparticules et du DiD inclus dans leur cœur dans les premières fractions). Au contraire, le contrôle négatif (LNP-Maléimide ayant réagi avec le mercaptoéthanol) n'a pas montré de réactivité vis-à-vis du SAMSA-fluorescéine (Figure 6.12 et 6.13).

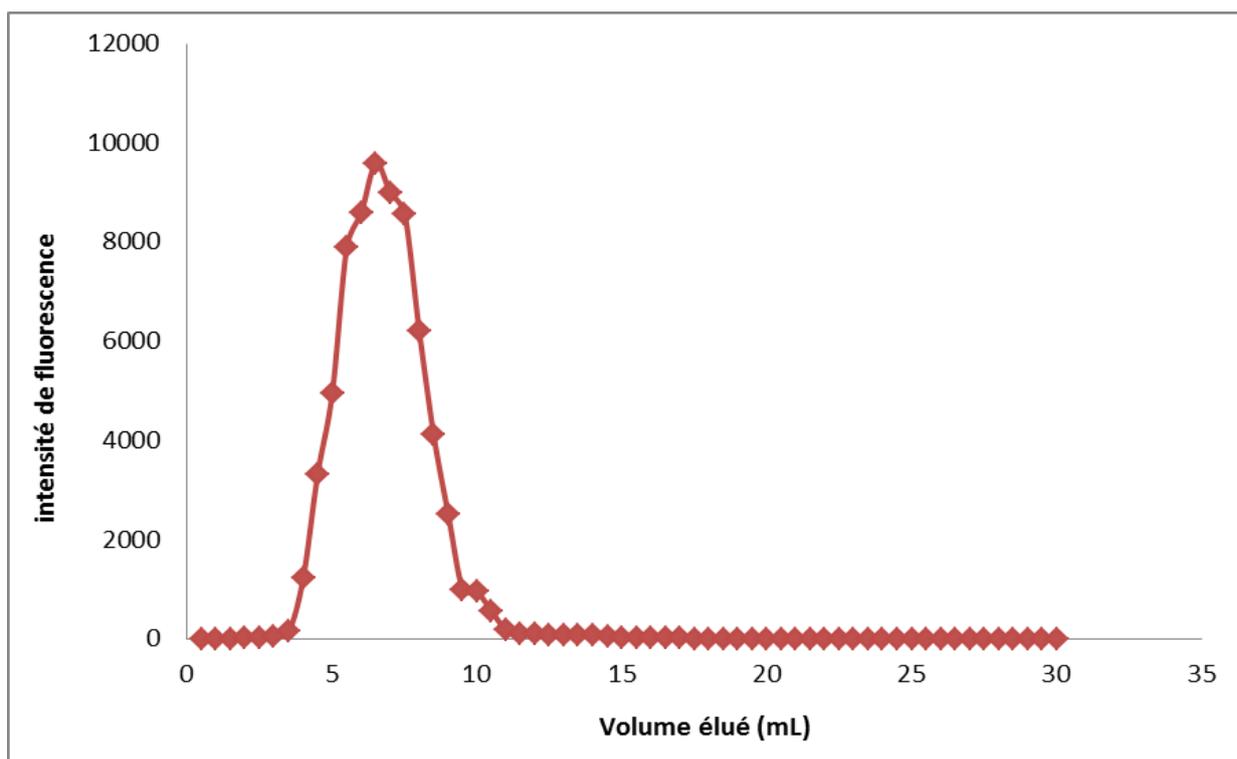
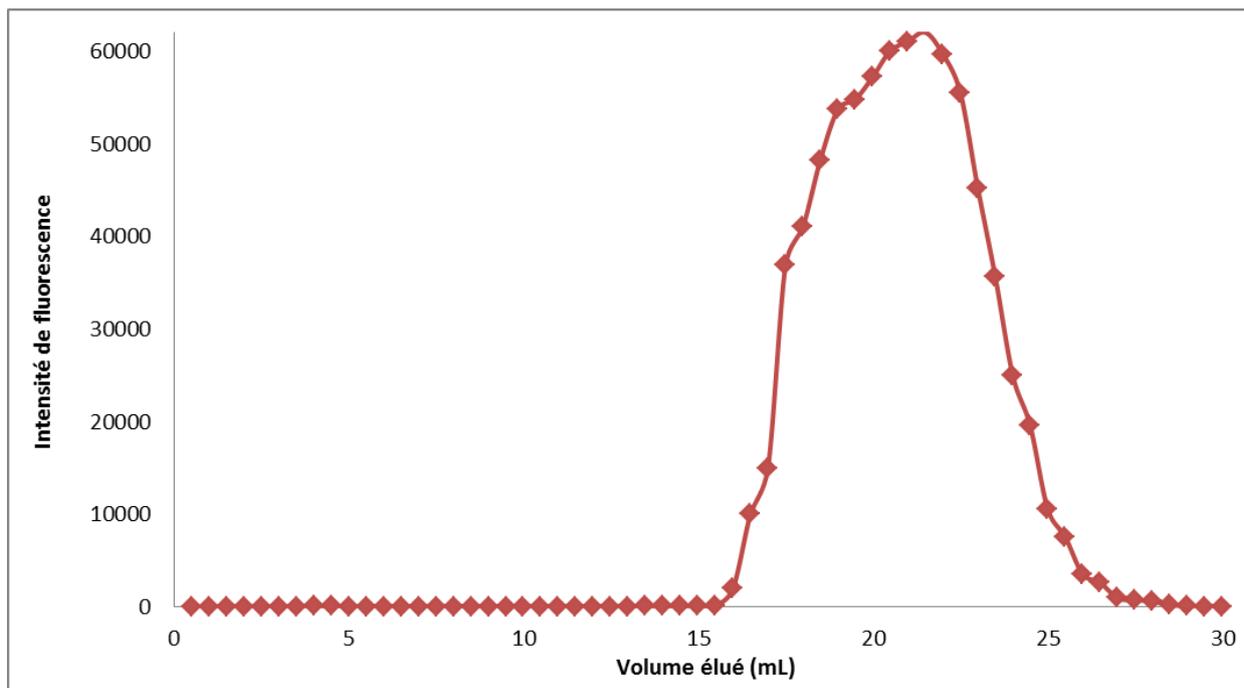
Les LNP non dialysées présentent une troisième bande dans la plage de longueurs d'ondes de la fluorescéine que l'on n'observe pas avec les nanoparticules dialysées. Cette bande pourrait correspondre aux surfactants PEG-Mal non incorporés à la surface des LNP et ayant réagi avec le SAMSA-fluorescéine. Le produit de couplage PEG-Mal-S-Fluorescéine éluerait bien après les LNP car il a un poids moléculaire bien plus bas que celui des particules (~5 KDa

pour les PEG et 800 KDa pour les LNP) et avant le SAMSA-fluorescéine n'ayant pas réagi (0,5 KDa). Les profils d'élution permettent donc de calculer le nombre de PEG incorporés à la surface des LNP et d'estimer le rendement de couplage SH/Maléimide.

Le rendement d'incorporation de PEG-maléimide dans la nanoparticule est calculé en faisant le rapport entre l'aire de la bande de PEG non incorporés à celles des LNP (pour les LNP non dialysées).



Figures 6.10 et 6.11 : Profils d'élutions des particules LNP-Mal + SAMSA-fluorescéine (dialysées et non-dialysées), en lecture Fluorescéine (en haut) et en lecture DiD (en bas).



Figures 6.12 et 6.13 : Profils d'élutions des particules LNP-Mal (inhibées par le mercaptoéthanol) + SAMSA-fluorescéine, en lecture Fluorescéine (en haut) et en lecture DiD (en bas).

L'aire sous la courbe des bandes d'éluion peut être quantifiée. Les résultats sont regroupés
Tableau 6-2.

	% fluorescéine-LNP (Fraction 3-10 mL)	% fluorescéine-PEG (Fraction 11-16 mL)	% Fluorescéine libre (Fraction 19-26 mL)
LNP-Maléimide dialysées	79	–	21
LNP-Maléimides non dialysées	78	18	4

Tableau 6.4 : Pourcentage de fluorescence pour chaque série de fractions.

Ces résultats permettent de calculer le rendement d'incorporation des PEG-Mal à la surface des LNP. Le rendement de greffage est aussi calculé (c'est la somme des % fluorescéine-LNP + % fluorescéine-PEG (particules non dialysées)). (Tableau 6-3).

	Rendement d'incorporation de PEG- Maléimide	Rendement de greffage du fluorophore
LNP-Maléimide	81 %	96 %

Tableau 6.5 : Pourcentage d'incorporation et de greffage obtenus sur les LNP-Maléimide.

On constate le taux très important d'incorporation des PEG-Maléimides à la surface des LNP (81 %). Le rendement de greffage des SAMSA-fluorescéines est quasi-total.

Les LNP-Maléimides sont stockées à 4 °C. Leur stabilité au cours du temps est étudiée pour vérifier si les fonctions maléimides sont toujours réactives et présentes en surface.

Après un mois de stockage à 4°C, comme précédemment, les LNP-maléimides sont mises à réagir avec le SAMSA-fluorescéine (Figure 6.14).

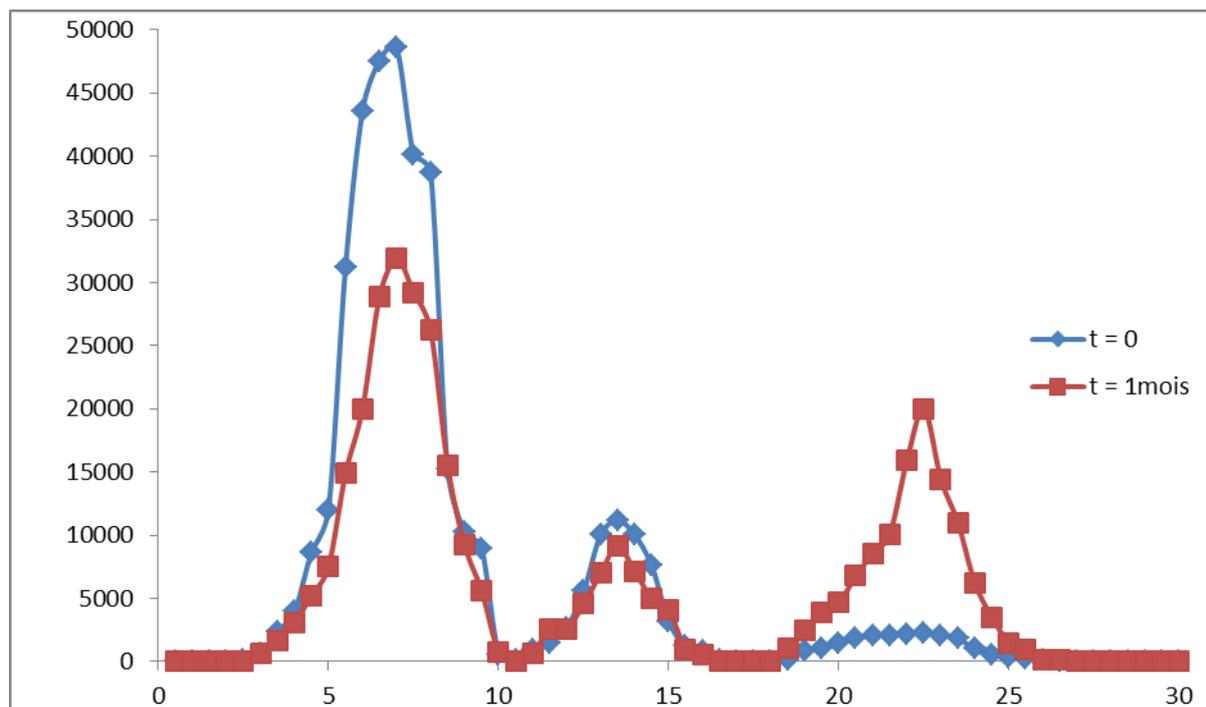


Figure 6.14 : Profils d'élution des particules LNP-Mal (non dialysées) + SAMSA-fluorescéine, en lecture Fluorescéine, à la formulation et après un mois.

Après calcul de l'aire sous la courbe des bandes d'élution, on constate que pour la mesure faite après un mois : d'un côté les pourcentages de fluorescence correspondant aux LNP et au PEG ont nettement diminué, et de l'autre côté le pourcentage de fluorescence correspondant au SAMSA-fluorescéine libre a largement augmenté. Le rendement de greffage du SAMSA-Fluorescéine a donc diminué (Tableau 6.6).

LNP-Maléimide	Rendement d'incorporation		Rendement de greffage	
	t = 0	t = 1 mois	t = 0	t = 1 mois
	81 %	78 %	96 %	67 %

Tableau 6.6 : Pourcentage d'incorporation et de greffage obtenus sur les LNP-Maléimide, à t=0 et à t= 1mois.

L'hypothèse d'un relargage des PEG-Maléimide de la surface des LNP est écartée, car dans ce cas le pourcentage de fluorescence correspondant au PEG-Maléimide aurait augmenté, tel n'est pas le cas. Donc, la diminution du taux de fluorescence correspondant aux LNP peut être expliquée par le fait que les fonctions maléimides présentes en surface de LNP ne sont pas très stables après un mois de formulation et en les stockant à 4°C. Une partie des fonctions maléimides est probablement hydrolysée et n'est plus réactive vis-à-vis des fonctions thiols du SAMSA-Fluorescéine. Bien que les fonctions maléimides soient généralement stables pour des pH de 6,4 à 8 et que le cyclohexane présent dans la structure du PEG-Maléimide lui confère une certaine stabilité. Les fonctions maléimides sont sensibles à l'hydrolyse en milieu basique, pH 8,5-14.

b) Mise en évidence des fonctions ONB-maléimides à la surface des LNP

Comme réalisé avec les LNP-Mal, un fluorophore portant une fonction SH (en l'occurrence le SAMSA-fluorescéine qui porte une fonction thiol protégée), est mis à réagir avec les LNP-ONB-Mal dialysées et les particules LNP-ONB-Mal n'ayant pas été dialysées pour quantifier par comparaison le nombre de PEG-ONB-Mal réellement incorporés à la surface des particules et estimer si la perte de ces PEG-ONB-Mal pendant la dialyse est importante. Cette mesure permet également de remonter au nombre réel de fonctions maléimides qui

réagissent avec la SAMSA-fluorescéine et donc en déduire le rendement de la réaction de greffage du fluorophore sur les nanoparticules.

Des LNP-ONB-Mal irradiées au préalable (365 nm), ont également été mises à réagir avec le SAMSA-fluorescéine dans les mêmes conditions. Ces nanoparticules dont les fonctions ONB ont été clivées par la lumière (et dont le groupement maléimide est donc détaché de la surface des particules) constituent un contrôle négatif et permettent de vérifier que les résultats obtenus correspondent bien au couplage maléimide-thiol et aussi que le groupe ONB est toujours en surface des LNP.

Les profils d'élution obtenus avec les 2 types de particules (LNP-ONB-maléimide et LNP-ONB-Maléimide ayant subi une irradiation de 5 min) sont, respectivement, présentés Figure 6.15 et Figure 6.16. Les LNP supposées porter les fonctions maléimides à leur surface réagissent bien avec le SAMSA-fluorescéine (co-élution de la fluorescéine-greffée à la surface des nanoparticules et du DiD inclus dans leur cœur dans les premières fractions). Au contraire, le contrôle négatif (LNP-ONB-maléimide ayant été irradiées au préalable) n'a pas montré de réactivité vis-à-vis du SAMSA-fluorescéine (Figure 6.15, 6.16, 6.17 et 6.18).

Les LNP non dialysées présentent une troisième bande dans la plage de longueurs d'ondes de la fluorescéine que l'on n'observe pas avec les nanoparticules dialysées. Cette bande pourrait correspondre aux surfactants PEG-ONB-Mal non incorporés à la surface des LNP et ayant réagi avec le SAMSA-fluorescéine. Le produit de couplage PEG-ONB-Mal-S-Fluorescéine éluerait bien après les LNP car il a un poids moléculaire bien plus bas que celui des particules (~5 KDa pour les PEG et ~800 KDa pour les LNP) et avant le SAMSA-fluorescéine n'ayant pas réagi (0,5 KDa). Les profils d'élution permettent donc de calculer le nombre de PEG incorporés à la surface des LNP et d'estimer le rendement de couplage SH/Maléimide.

Le rendement d'incorporation de PEG-ONB-maléimide dans la nanoparticule est calculé en faisant le rapport entre l'aire de la bande de PEG non incorporés à celles des LNP (pour les LNP non dialysées).

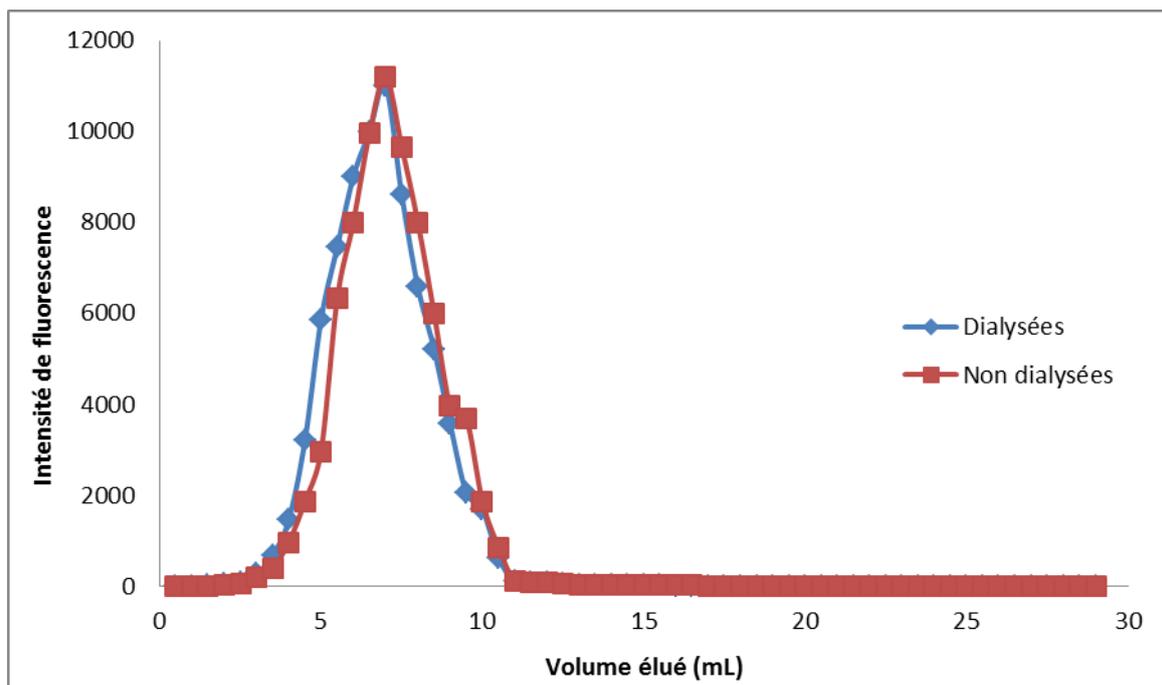
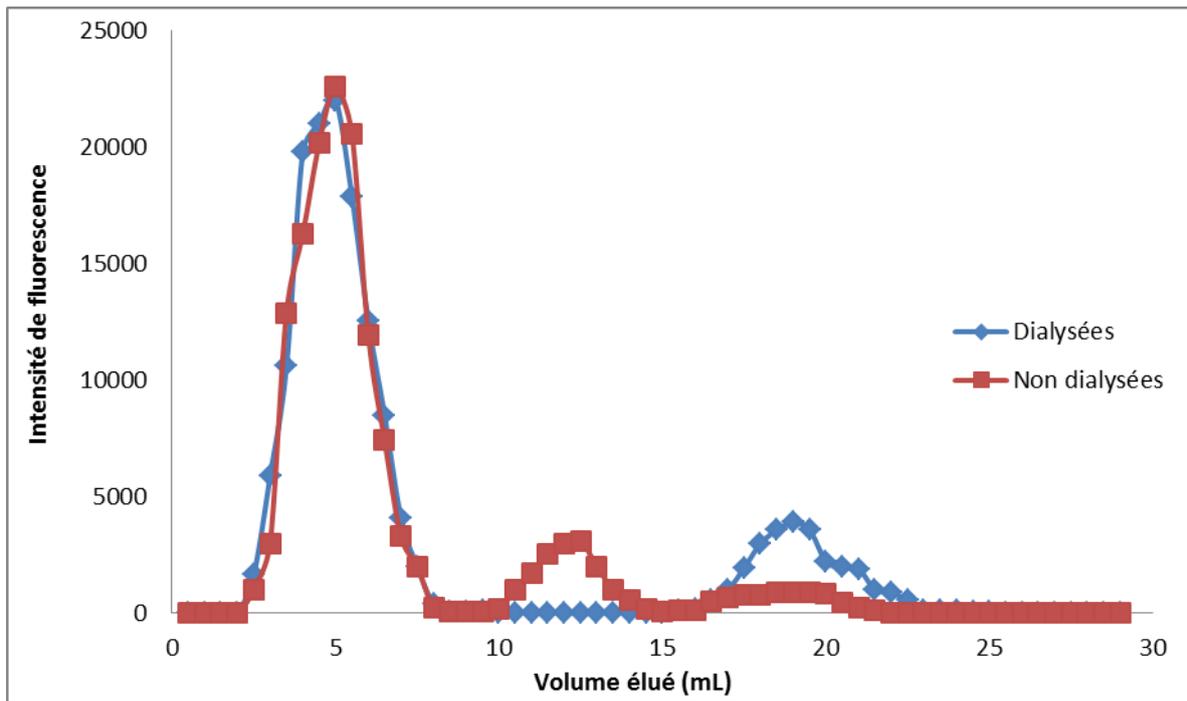


Figure 6.15 et 6.16 : Profils d'élutions des particules LNP-ONB-Mal + SAMSA-fluorescéine (dialysées et non-dialysées), en lecture Fluorescéine (en haut) et en lecture DiD (en bas).

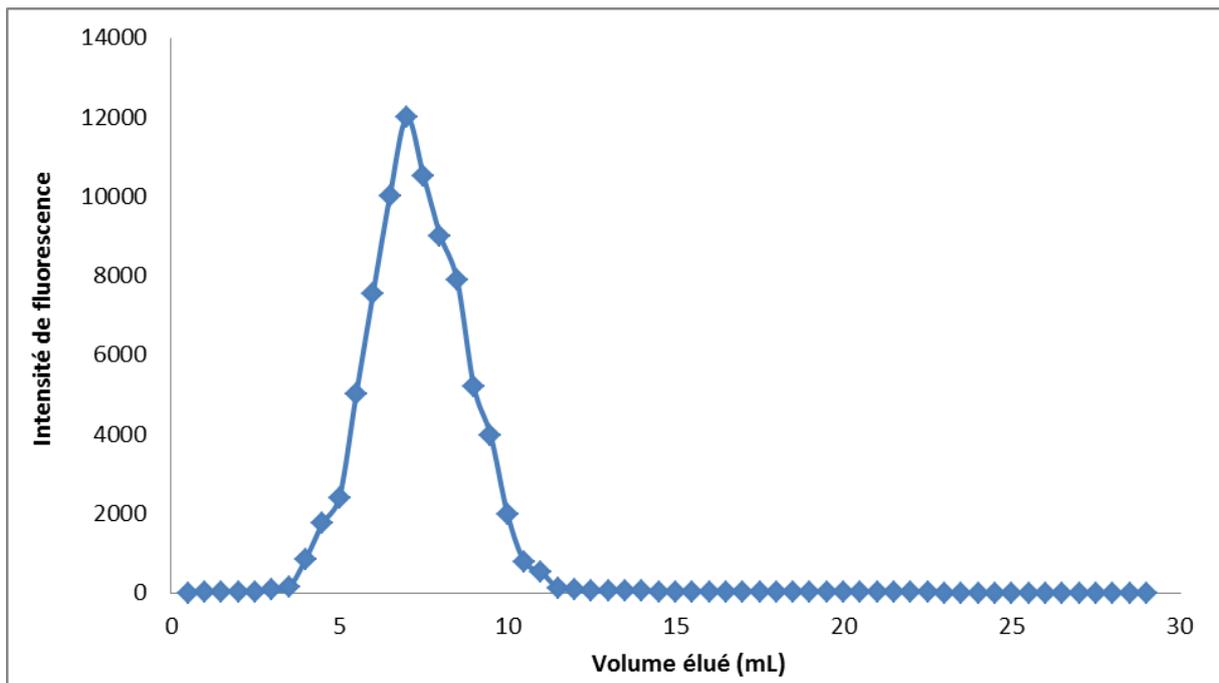
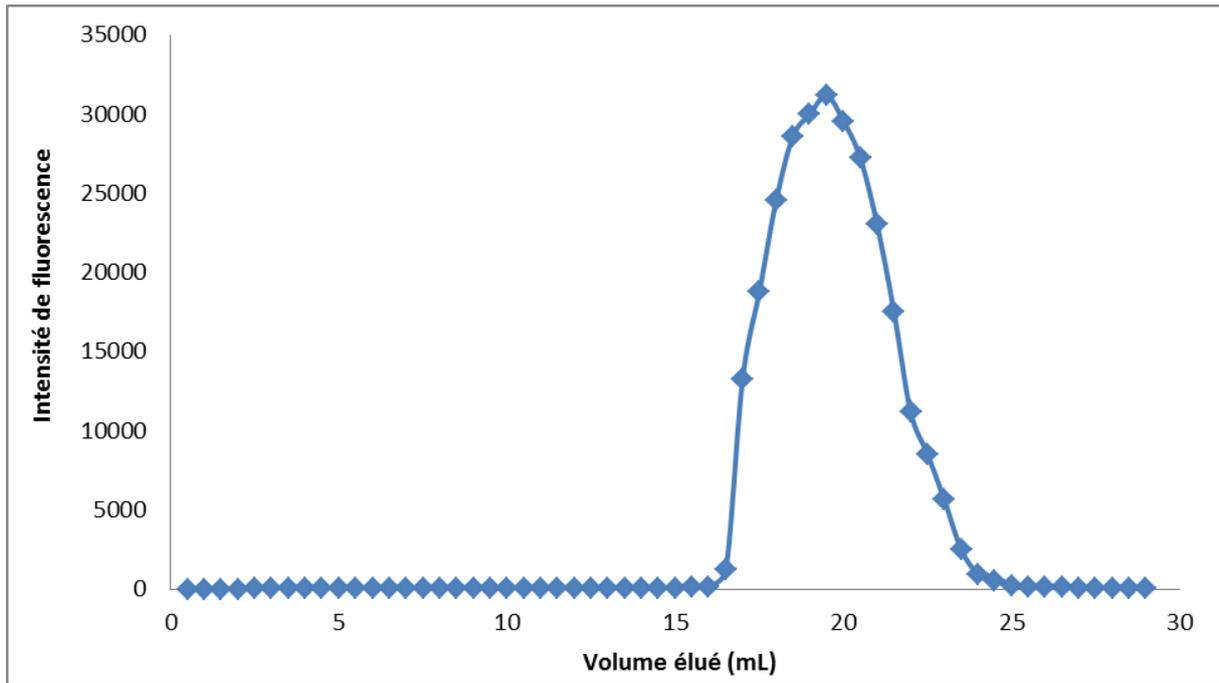


Figure 6.17 et 6.18 : Profils d'élutions des particules LNP-ONB-Mal (inhibées par irradiation) + SAMSA-fluorescéine, en lecture Fluorescéine (en haut) et en lecture DiD (en bas).

L'aire sous la courbe des bandes d'éluion peut être quantifiée. Les résultats sont regroupés
Tableau 6.7.

	% fluorescéine-LNP (Fraction 3-10 mL)	% fluorescéine-PEG (Fraction 11-16 mL)	% Fluorescéine libre (Fraction 19-26 mL)
LNP-ONB-Maléimide dialysées	85	-	15
LNP-ONB-Maléimides non dialysées	85	12	3

Tableau 6.7 : Pourcentage de fluorescence pour chaque série de fractions.

Ces résultats permettent de calculer le rendement d'incorporation des PEG-ONB-Mal à la surface des LNP. Le rendement de greffage est aussi calculé (c'est la somme des % fluorescéine-LNP + % fluorescéine-PEG (particules non dialysées)). (Tableau 6.8).

	Rendement d'incorporation de PEG-ONB- Maléimide	Rendement de greffage du fluorophore
LNP-ONB- Maléimide	87 %	97 %

Tableau 6.8 : Pourcentage d'incorporation et de greffage obtenus sur les LNP-Maléimide.

On constate le taux très important d'incorporation des PEG-ONB-Mal à la surface des LNP (87 %). Le rendement de greffage des SAMSA-fluorescéines est quasi-total.

Les LNP-ONB-Mal sont stockées à 4 °C. Leur stabilité au cours du temps est étudiée pour vérifier si les fonctions maléimides incorporées à la surface des LNP sont toujours réactives et présentes en surface des particules.

Après un mois de formulation, les LNP-ONB-Mal sont donc mises à réagir avec le SAMSA-fluorescéine (même protocole utilisé que pour la formulation de départ) (Figure 6.19).

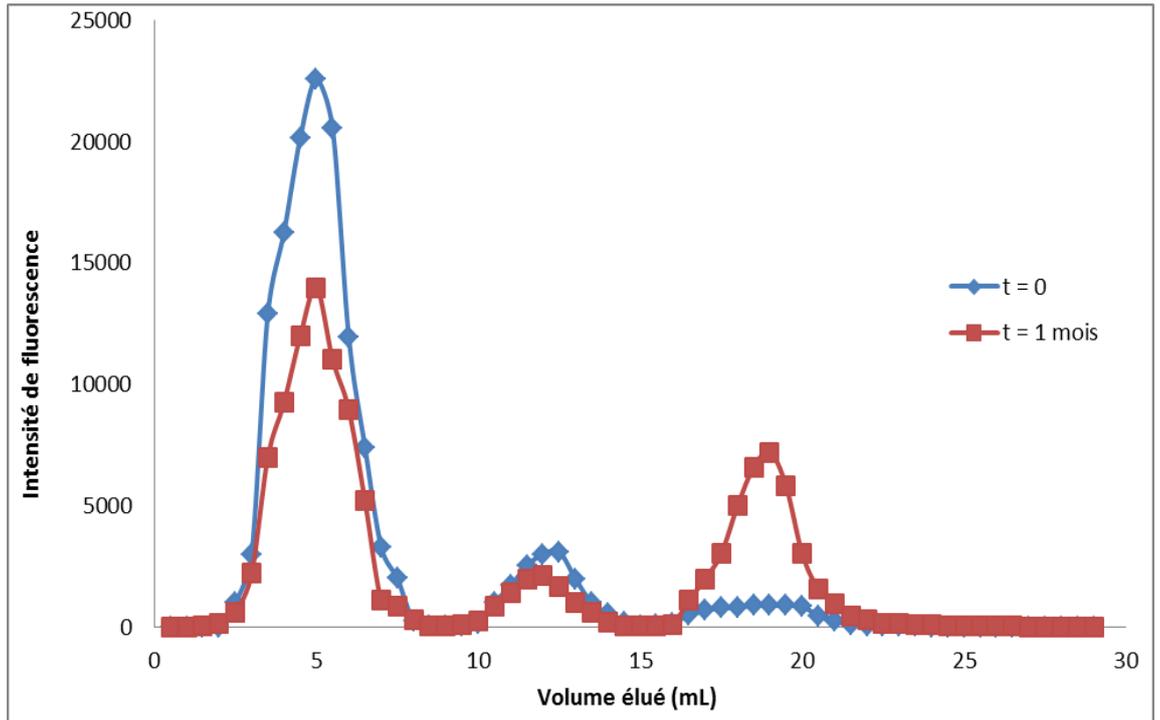


Figure 6.19 : Profils d'élutions des particules LNP- ONB-Mal (non dialysées) + SAMSA-fluorescéine, en lecture Fluorescéine, à la formulation et après un mois.

Après calcul de l'aire sous la courbe des bandes d'élution, on constate que comme pour les LNP-Mal, après un mois, d'un côté les pourcentages de fluorescence correspondant aux LNP et au PEG ont nettement diminué, et de l'autre côté le pourcentage de fluorescence correspondant au SAMSA-fluorescéine libre a largement augmenté (Tableau 6.9).

LNP-ONB-Maléimide	Rendement d'incorporation		Rendement de greffage	
	t = 0	t = 1 mois	t = 0	t = 1 mois
	87 %	87 %	97 %	68 %

Tableau 6.9 : Pourcentage d'incorporation et de greffage obtenus sur les LNP-Maléimide, à t = 0 et à t= 1 mois.

L'hypothèse d'un relargage des PEG-Maléimide de la surface des LNP est écartée, car dans ce cas le pourcentage de fluorescence correspondant au PEG-Maléimide aurait augmenté, et tel n'est pas le cas : ce pourcentage a plutôt diminué. Donc, la diminution du taux de fluorescence correspondant aux LNP peut être expliquée par le fait que les fonctions maléimides présentes en surface de LNP se sont hydrolysées après un mois de formulation et de stockage à 4°C. Une partie des fonctions maléimides a probablement été inhibée par une éventuelle hydrolyse, de façon similaire à ce qu'a été observé pour les LNP-Mal.

6.5 Gels chimiques de LNP obtenus par couplage thiol/maléimide

1) Formation des gels

Deux gels chimiques sont formés et étudiés :

- Un gel chimique résultant du couplage covalent entre les nanoparticules LNP-Mal décrites dans ce chapitre avec les LNP-thiol décrites dans le chapitre 5 (LNP-SSPYR déprotégées par le DTT pour conduire aux LNP-SH ;
- Un gel chimique résultant de couplage covalent entre les nanoparticules LNP-ONB-Mal décrites dans ce chapitre et les LNP-SH décrites dans le chapitre 5. Ce dernier gel devrait pouvoir être dissocié par action de la lumière clivant les liens covalents établis entre particules lors du photocuvage du groupement ONB.

Les LNP fonctionnalisées SSPYR sont déprotégées par le DTT et dialysées pour conduire aux LNP-SH juste avant réaction avec les LNP-Mal et LNP-ONB-Mal fraîchement préparées (instabilité des fonctions maléimides au cours du stockage).

La réaction de gélification est réalisée en mélangeant à température ambiante deux volumes égaux de LNP-Mal et LNP-SH pour le gel chimique et LNP-SH + LNP-ONB-Mal pour le gel chimique photocuvable. La solution est ensuite homogénéisée au vortex pendant quelques secondes en utilisant un mixer.

Les gels sont obtenus en 2 minutes en chauffant à 50 °C quelques secondes tout en mélangeant les solutions et mixant la solution. Les gels se forment sur la partie supérieure du flacon, emprisonnant ainsi le tampon. Ils sont insolubles dans le PBS (Figure 6.20).

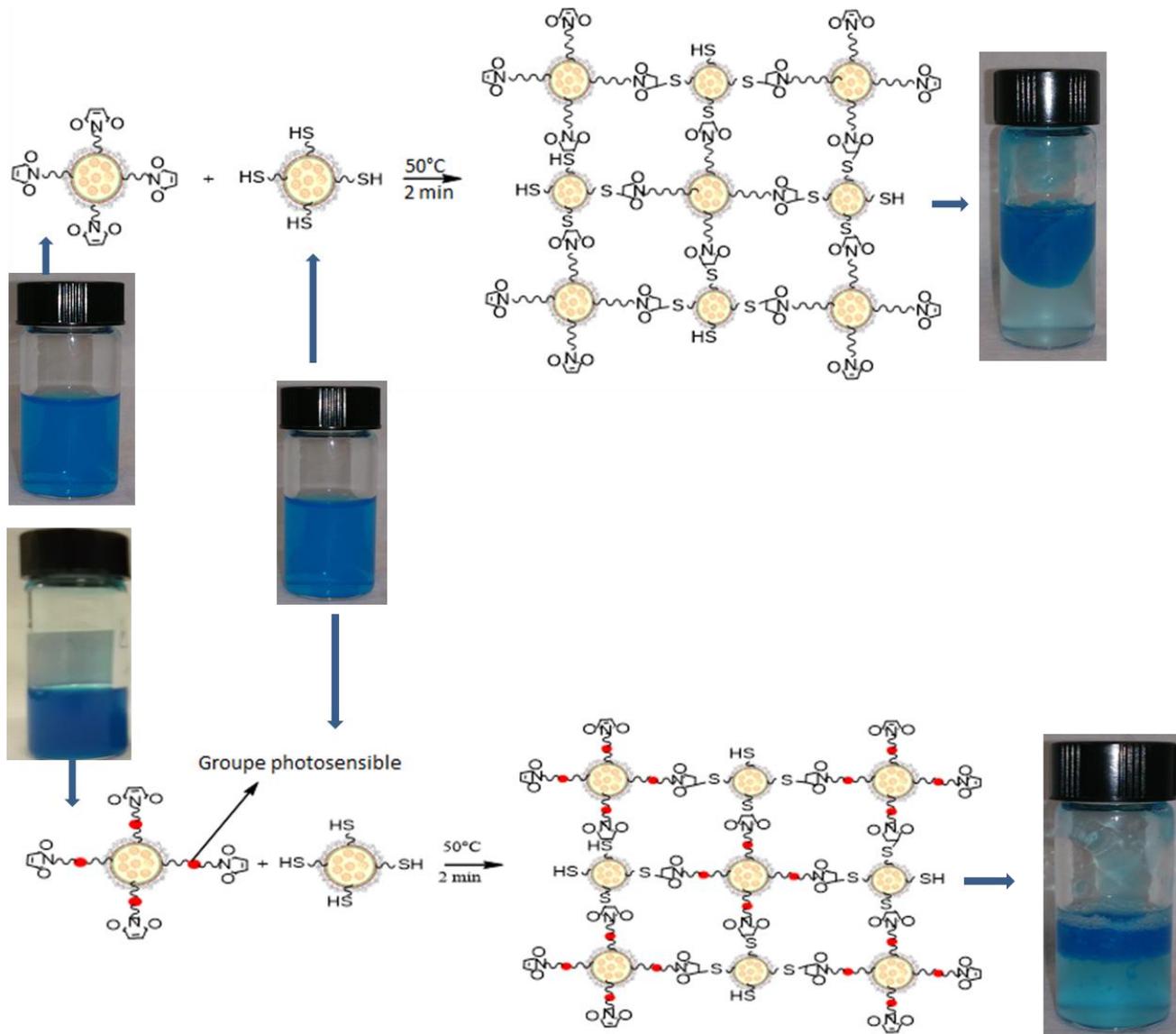


Figure 6.20 : Mécanismes de formation et photos des gels chimiques (photocrosslinkables et non photocrosslinkables) obtenus.

Les deux gels sont très stables au cours du temps. Ils sont conservés à 4°C. La résistance à la dilution des deux gels est totale, les gels gardent leur structure même après dilution. Leur densité est inférieure à celle de l'eau (ils flottent). Si une forte agitation est appliquée, les gels se fragmentent en petits morceaux pour ensuite finir par se resolidifier par processus de crémage.

La coloration de la solution de PBS reste faible même après 5 mois de stockage, montrant ainsi que les LNP restent intactes dans le gel.

2) Rhéologie des gels

Les gels (LNP-SH + LNP-Mal et LNP-SH + LNP-ONB-Mal) sont caractérisés par rhéologie en utilisant un rhéomètre AR2000 EX (TA Instruments). Les gels sont soumis à une contrainte et l'appareil mesure la déformation des matériaux en régime dynamique à une fréquence variable.

La mesure permet donc de définir les propriétés viscoélastiques des gels. La mesure dure environ 20 minutes et la contrainte appliquée est fixée à 2 Pa (valeur à laquelle les modules G' et G'' sont dans le domaine linéaire, après les mesures faites au préalable. Voir chapitre 8). La figure 6.21 regroupe les modules d'élasticité et de viscosité en fonction de la fréquence, pour les LNP-SH de départ, les LNP-Mal, les LNP-ONB-Mal ainsi que pour les deux gels photocuvable et non photocuvable. Ainsi, on voit sur la figure la grande différence qui a lieu entre les modules d'élasticité des LNP de départ et des gels obtenus. Cette différence est le résultat de la formation des gels chimiques. Il est aussi observé que le gel chimique photocuvable présente des valeurs de module d'élasticité et de viscosité largement supérieures à ceux du gel non photocuvable ($G' = 2100$ Pa et $G'' = 1600$ Pa pour le gel non photocuvable ; $G' = 3800$ Pa et $G'' = 2500$ Pa pour le gel photocuvable). Cette différence est aussi mise en évidence lors de la manipulation des gels : le gel photocuvable est plus visqueux que le gel non photocuvable.

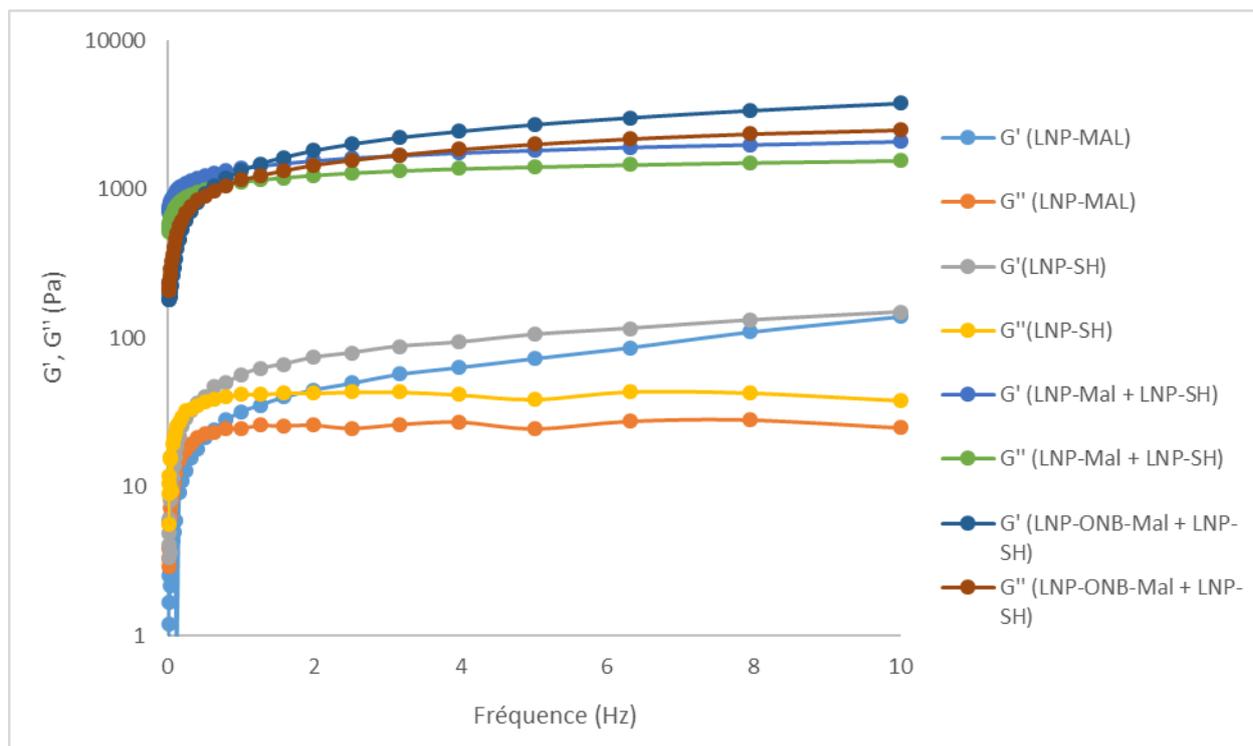


Figure 6.21 : G' et G'' en fonction de la fréquence, pour les LNP-SH et le gel photoformé.

3) Photocuvage du gel LNP-ONB-Mal-S-LNP

Il est attendu que le gel chimique formé par lien covalent entre les particules LNP-thiol et LNP-ONB-Mal soit un gel chimique photocuvable car le groupe ONB (orthonitrobenzyle) se clive à la lumière (irradiation à 365 nm).

Un morceau de ce gel a été mis dans un flacon contenant du PBS 1X. Le mélange a été irradié pendant 15 minutes en vortexant.

Après irradiation, le gel s'est dispersé pour redonner des LNP de diamètre 70 nm (figure 6.22). La taille de ces nanoparticules se situe entre les tailles des nanoparticules utilisées pour l'assemblage du gel : 77 nm pour les LNP-ONB-Mal et 57 nm pour les LNP-SH

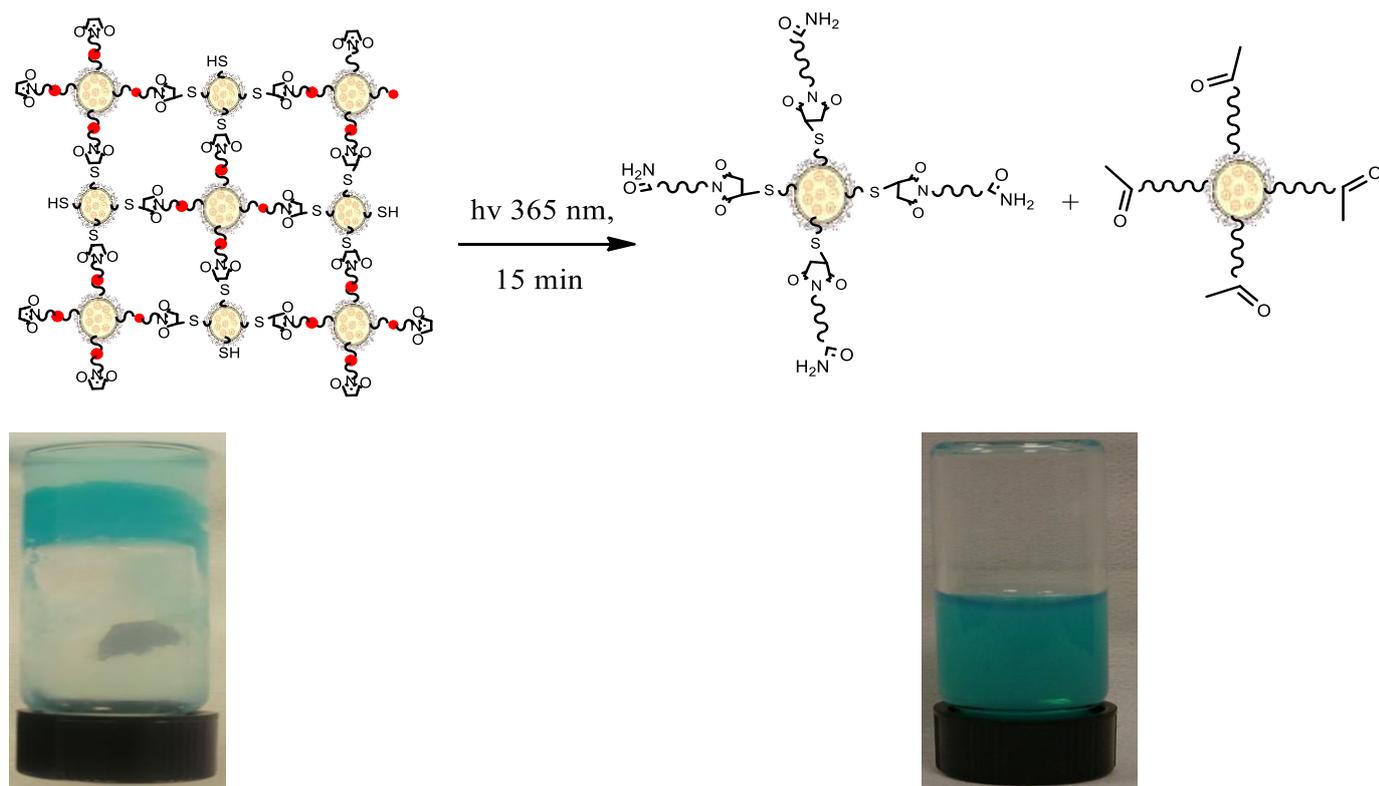


Figure 6.22 : Mécanisme et photos du photocuvage du gel.

Il attendu que le gel chimique formé par lien covalent entre les particules LNP-SH et LNP-Mal, qui ne contient pas le groupement photolabile ONB, ne soit pas photoclivable. Il a été exposé à la lumière (même conditions que celles du gel avec groupement ONB), mais aucun changement d'aspect n'a été observé. Cela confirme que la dissociation du gel photoclivable (LNP-ONB-Mal et LNP-SH) observé plus haut, est bien le résultat de la présence du groupement photolabile ONB à la surface des LNP.

Pour voir l'évolution de la destruction du gel chimique (contenant le groupement ONB) au cours du temps d'irradiation, des mesures de rhéologie sont réalisées sous irradiation à 365 nm à l'aide d'un rhéomètre (AR2000 EX, TA Instruments), et les modules de viscosité et d'élasticité de l'échantillon sont enregistrés au cours du temps. La mesure est réalisée en utilisant une irradiation avec une puissance de 60 mW/cm^2 et une fréquence de 1 Hz.

Au cours du temps d'irradiation, on observe une très forte diminution à la fois du module de viscosité (G'') et du module d'élasticité (G') pour l'échantillon de gel, indicatif du passage de l'état élastique vers l'état visqueux. Après 15 minutes d'irradiation, les deux modules, G' et G'' commencent à être stables et ne dépendent plus du temps (Figure 6.23). On retrouve des modules semblables à ceux observés pour les dispersions fluides de départ.

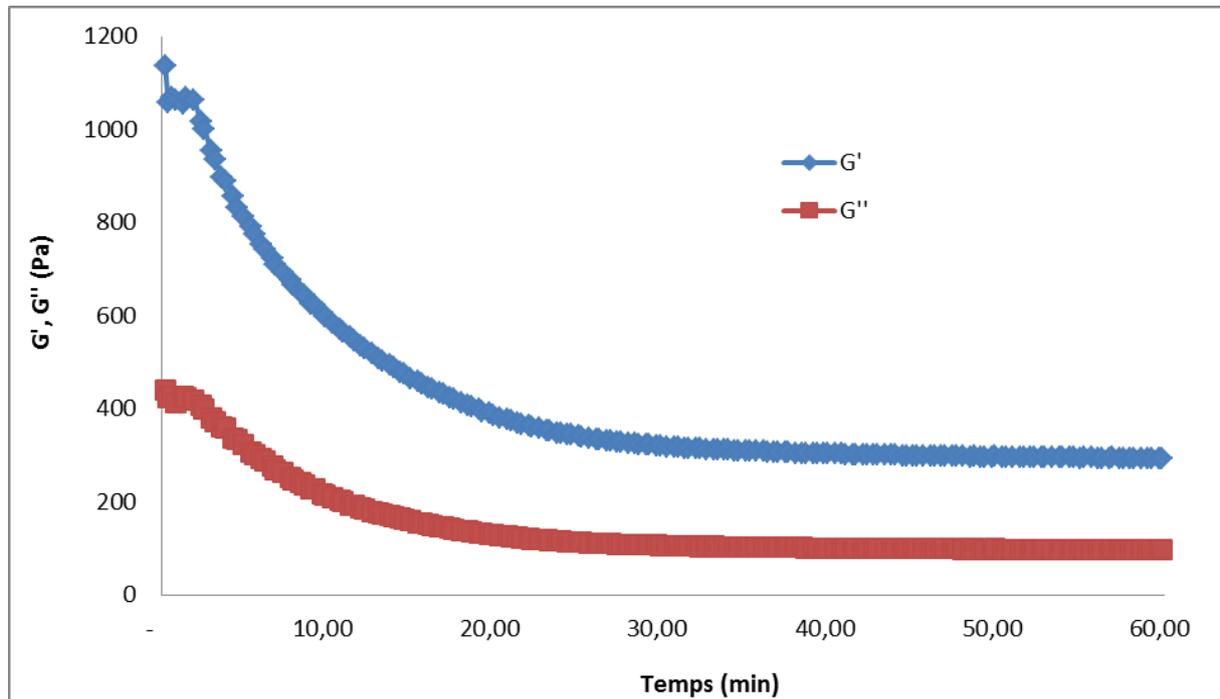


Figure 6.23 : Evolution des modules de viscosité et d'élasticité au cours du temps d'irradiation, du gel photocuvable.

6.6 Conclusion

- Nous avons montré la faisabilité de fonctionnaliser les nanoparticules lipidiques par des fonctions maléimides et un groupement photocuvable ONB-Mal. La photocuvage de ce groupe fonctionnel n'affecte pas les particules.
- Les particules LNP-ONB-Mal présentent une taille plus élevée (77nm) que celles des LNP-Mal (57 nm). Le même constat avec les indices de polydispersité : 0,21 pour les LNP-ONB-Mal et 0,15 pour les LNP-Mal.
- Les taux d'incorporation et de greffage des PEG-Mal et PEG-ONB-Mal sont très importants : taux d'incorporation de 81 % et 87 % et taux de greffage 96 % 97 %, respectivement pour les LNP-Mal et les LNP-ONB-Mal. Toutefois, le rendement de greffage a diminué dans les deux cas d'environ 20 %, un mois après la formulation : hydrolyse du groupement maléimide.
- Le groupement ONB reste intact dans les LNP après formulation et gélification.
- La présence du groupement ONB rend le gel plus solide par rapport à la même formulation sans ce groupement, d'après les résultats rhéologiques : $G' = 2100$ Pa pour le gel non photocuvable, $G' = 3800$ Pa pour le gel photocuvable.
- Mise en œuvre des LNP incorporant un groupement photolabile (pourrait être intéressant dans l'avenir pour faire du relargage contrôlé).

CHAPITRE 7
DISCUSSION GENERALE,
CONCLUSION ET
PERSPECTIVES

Il s'agit d'un surfactant à chaîne polyéthylène glycol de 40 unités. Les surfactants fonctionnalisés que nous avons synthétisés ont une chaîne PEG plus longue, 100 unités éthylène glycol. Etant plus longues que celles à la surface des LNPs standards, ces chaînes PEG à 100 unités devraient être plus accessibles à la surface des particules pour réagir lors des réactions de couplage.

Pour réaliser des réactions de couplage, nous avons synthétisé différents surfactants porteurs de différents groupes fonctionnels (thiol, maléimide, amine, oxyamine et ONB-maléimide). Plusieurs voies de synthèse ont été abordées avant d'aboutir à des protocoles de synthèse adaptés, affinés et reproductibles. La Figure 7.2 récapitule les schémas de synthèse des surfactants PEG fonctionnalisés. Le surfactant PEG-NH₂ (produit 3) a servi de produit de départ pour obtenir les différentes fonctions désirées.

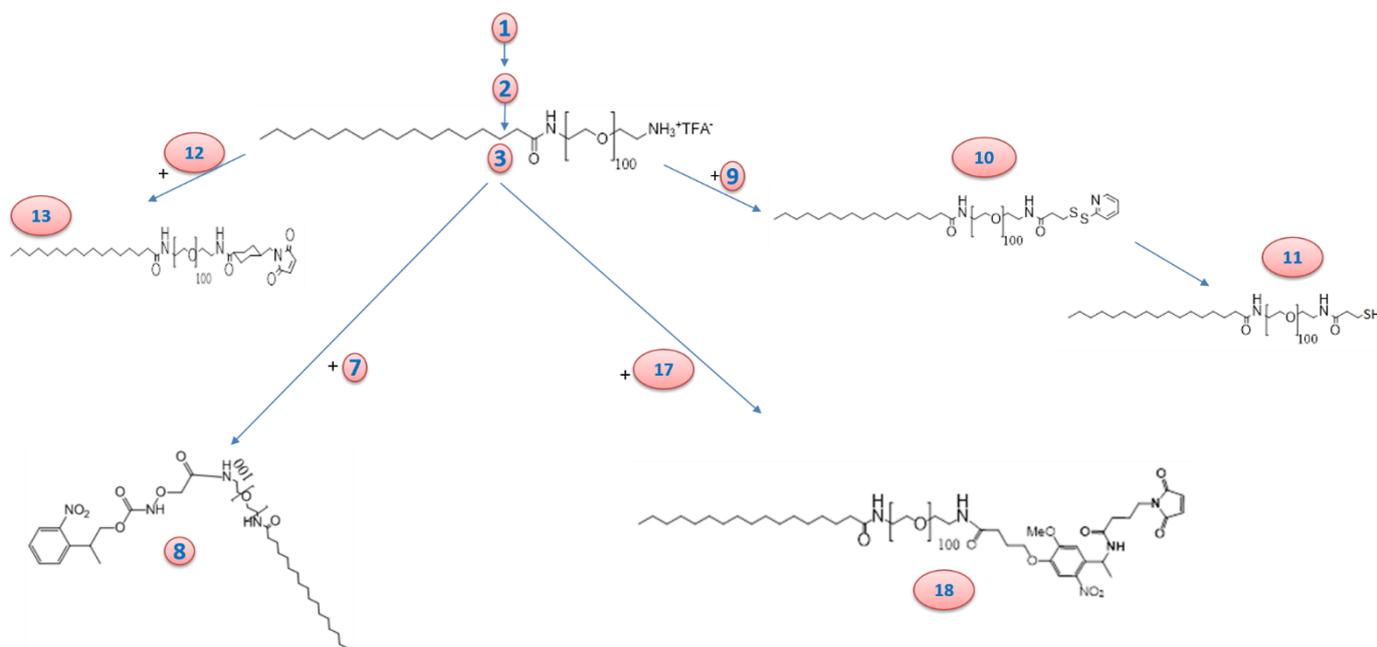


Figure 7.2 : Schémas de synthèse des surfactants PEG fonctionnalisés.

Le Tableau 7.1 résume les différents rendements obtenus pour la synthèse de chaque surfactant. Les rendements des surfactants 8, 10, 13 et 18 sont calculés en considérant que le produit 3 est celui de départ.

Il est à noter ici que tous les surfactants ont été purifiés de la même façon, en l'occurrence par dialyse. La dialyse est certes plus longue que la chromatographie sur gel de silice mais elle est efficace en terme de séparation de produits et donne un produit sous forme de poudre volatile facile à stocker et à manipuler.

Tous ces surfactants sont stockés à -18 °C et sont très stables (plus de douze mois de stabilité ont été constatés par RMN).

Surfactant	Rendement total de synthèse (%)
PEG-NH ₂ 3	79
PEG-SS-PYR 10	76
PEG-Mal 13	81
PEG-ONH-PPOC 8	89
PEG-ONB-Mal 18	82

Tableau 7.1 : rendements de synthèse de tous les surfactants fonctionnalisés.

On constate que les rendements de synthèse des différents surfactants sont dans la gamme 76-82 %, sauf celui du PEG-ONH-PPOC où une des étapes intermédiaires a donné un rendement quantitatif, d'où son rendement plus élevé.

7.3 Formulation des nanoparticules fonctionnalisées

Avant de synthétiser les différentes nanoparticules fonctionnalisées, nous avons optimisé la quantité idéale de surfactant à incorporer. Cette optimisation a été faite sur les LNP-NH₂, pour lesquelles des formulations contenant un pourcentage de PEG-NH₂ croissant (5 %, 10 %, 20 % et 40 %) par rapport au nombre total de surfactants PEGylés (PEG-NH₂ + Myrj S40). Les tailles des particules LNP-NH₂ sont restées dans une fourchette entre 50 et 60 nm, sauf pour celles avec 40 % de PEG-NH₂ où le diamètre est plus important (74 nm). Les dispersions de particules formulées de 40% PEG-NH₂ présentent également un aspect gélifiant et sont

difficiles à manipuler à cause de leur viscosité élevée par rapport aux dispersions des autres particules. Nous avons donc choisi de travailler avec des formulations à 20 % de surfactant PEG-NH₂ car nous avons voulu avoir le plus grand nombre de fonctions à la surface des particules sans que cela ait une influence sur leurs propriétés. Etant donné qu'à 40 % de PEG, les LNPs se gélifient déjà et présentent des tailles élevées (74 nm), les LNPs à 20 % de PEG modifiés étaient donc les plus appropriées.

Un suivi de stabilité colloïdale de toutes les nanoparticules fonctionnalisées au cours de leur stockage à 4°C a été effectué. Les rendements d'incorporation des PEG à la surface des nanoparticules ont aussi été calculés. Les Figures 7.3 et 7.4 récapitule les diamètres des particules et les indices de polydispersité.

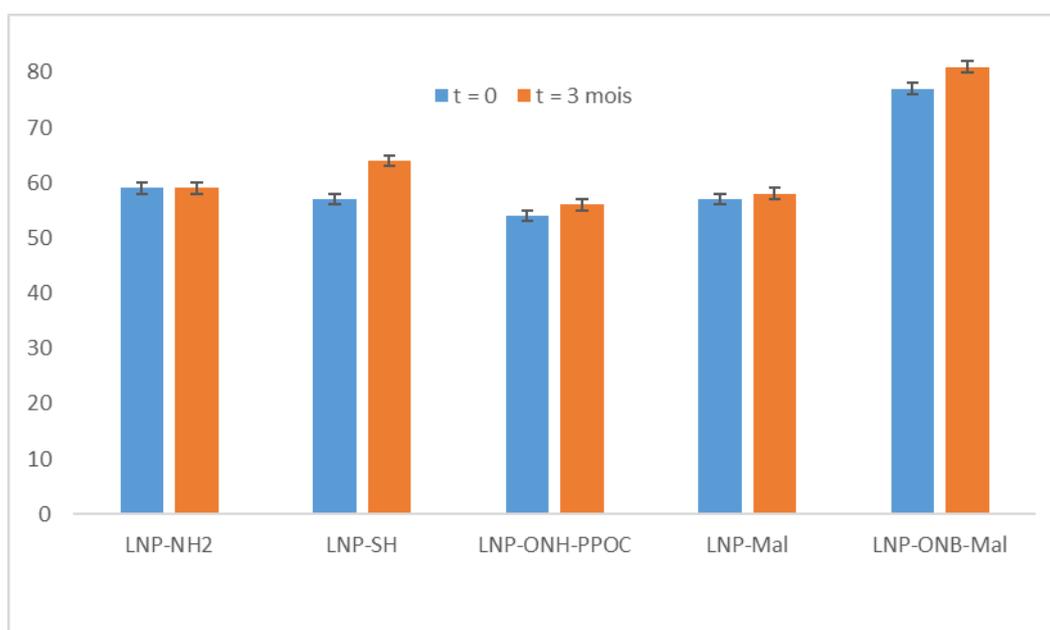


Figure 7.3 : Diamètres (nm) des différentes LNPs fonctionnalisées, à la formulation et après 3 mois.

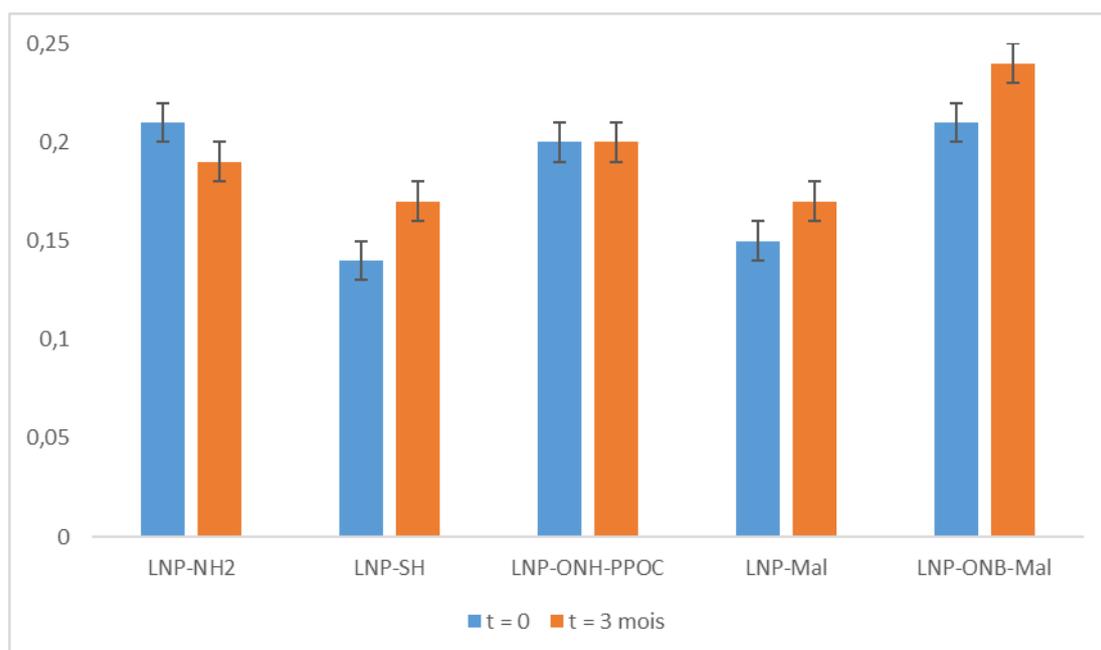


Figure 7.4 : Indices de polydispersité des différentes LNPs fonctionnalisées, à la formulation et après 3 mois.

On constate que pour toutes les nanoparticules fonctionnalisées, les changements de tailles et de polydispersité au cours des trois mois après leur préparation sont minimes : elles gardent toutes une bonne stabilité colloïdale.

Parmi toutes les nanoparticules, celles formulées avec le surfactant ONB-maléimide présentent des tailles supérieures aux autres (~80 nm). Cela pourra probablement être dû à la rigidité du groupe aromatique présent dans la structure de l'ONB diminuant les possibilités de repliement de la chaîne PEG : ce qui donne des diamètres plus grands.

Les rendements d'incorporation des surfactants fonctionnalisés lors de la formulation sont supérieurs à 80 % sauf pour le PEG-SH et PEG-NH₂ qui présentent respectivement des rendements d'incorporation de 71 et 74 % (Figure 7.5).

Concernant le PEG-SH, il est le seul à avoir un mécanisme différent : il est d'abord incorporé à la surface des particules sous forme protégé (PEG-SSPYR), puis il est déprotégé, ensuite les particules sont dialysées. Ce mécanisme différent de ceux des autres PEG fonctionnalisés pourrait être la cause de cette différence des taux d'incorporation.

De plus, tous ces surfactants sont ancrés de façon stable à la surface des nanoparticules puisque le nombre de surfactants fonctionnels ne varie pas au cours du temps.

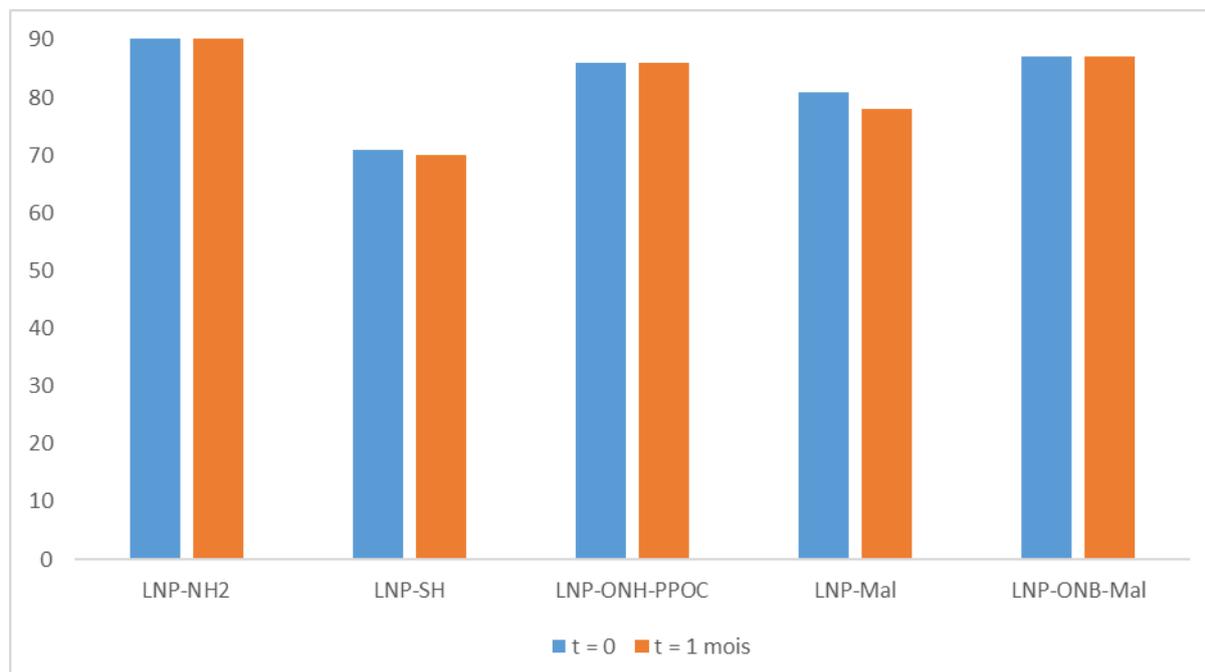


Figure 7.3 : Rendements d'incorporation des différents PEG fonctionnalisés.

7.4 Réactivité des fonctions en surface des nanoparticules

Pour mettre en évidence les fonctions présentes en surface de chaque nanoparticule et déterminer les conditions de couplage idéales pour la formation des gels, nous avons utilisé des fluorophores fonctionnels appropriés pour pouvoir qualifier et quantifier les fonctions chimiques en surface.

Le Tableau 7.2, résume les différents fluorophores utilisés lors de la mise en évidence des fonctions à la surface des LNPs et les rendements de greffage obtenus juste après préparation des nanoparticules fonctionnalisées et 1 mois après leur préparation et leur stockage à 4°C.

LNP	Réactif fluorophore	Rendement de greffage (%)	
		t = 0	t = 1 mois
LNP-NH ₂ 3	Fluorescéine NHS	94	92
LNP-SH 11	Cy5-maléimide	86	75
LNP-Mal 13	SAMSA-fluorescéine	96	67
LNP-ONH-PPOC 8	Fluorescéine Aldéhyde	94	94
LNP-ONB-Mal 18	SAMSA-fluorescéine	97	68

Tableau 7.2 : Rendements de greffage des fluorophores fonctionnels sur les nanoparticules (calculé par rapport au nombre de fonctions présentes à la surface de la nanoparticule).

Nous constatons que juste après formulation des nanoparticules, les groupements fonctionnels introduits à leur surface présentent une bonne réactivité avec des rendements de greffage compris entre 94 et 97 % sauf pour les LNP-SH qui ont donné un rendement de greffage de fluorophore inférieur : 86 %.

Néanmoins, après 1 mois de stockage des nanoparticules à 4°C, certaines fonctions deviennent significativement moins réactives : c'est le cas des fonctions maléimides et des fonctions SH. Ainsi, les LNP-Mal et LNP-ONB-Mal perdent 30 % de leur réactivité. Quant aux LNP-SH, elles en perdent 11 %.

Dans les cas différents (LNP-Mal, LNP-ONB-Mal d'une part, et LNP-SH d'autre part), la diminution de la réactivité de la nanoparticule n'est pas attribuée à un relargage des surfactants fonctionnels (SA-CONH-PEG₁₀₀-X) introduits à la surface de la nanoparticule (les rendements d'incorporation des surfactants restent constants, Figure 7.3), mais bien à une perte de réactivité du groupement réactionnel (maléimide ou thiol).

Dans le cas des fonctions maléimides, la perte de réactivité est certainement attribuable à une réaction d'hydrolyse en milieu aqueux.

Dans le cas des LNP-SH, la perte de réactivité est probablement le résultat d'une oxydation des fonctions thiols conduisant à la réaction de ces fonctions les unes avec les autres pour former des ponts disulfures. Cette réaction se produirait entre fonctions portées par la

même nanoparticule. Aucune formation de gel n'est constatée, ce qui serait le cas si des liaisons covalentes interparticulaires étaient créées.

7.5 Formation des gels chimiques

Le Tableau 7.3 récapitule tous les gels synthétisés, leurs caractéristiques et propriétés rhéologiques.

Les gels synthétisés ont été réalisés :

- a) Soit à partir de LNP fonctionnalisées assemblées en réseau par un agent de couplage (gels A et B) ;
- b) Soit par couplage direct de LNP fonctionnalisées réagissant avec d'autres LNP fonctionnalisées (gels C, D, E, F).

Dans le cas B et D, la réaction de couplage est une photoréaction, conduite sous irradiation à 365 nm.

Tous les gels se forment très rapidement (entre 2 et 15 minutes) sauf le gel D de LNP-SH (photoformé par irradiation) dont la réaction de gélification dure environ 90 minutes. Les différents processus de gélification ne demandent l'ajout d'aucun catalyseur.

Dans le cas F, le gel formé peut être désassemblé sous l'action de la lumière

La Figure 7.4 représente les modules d'élasticité G' et de viscosité G'' des gels en fonction de la fréquence d'oscillation.

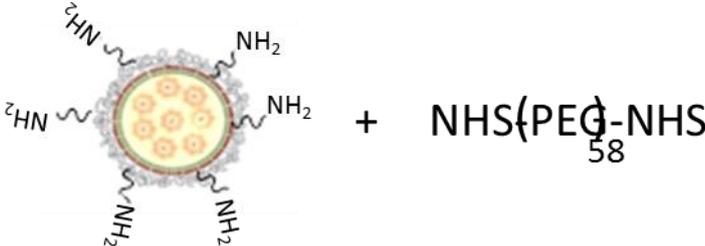
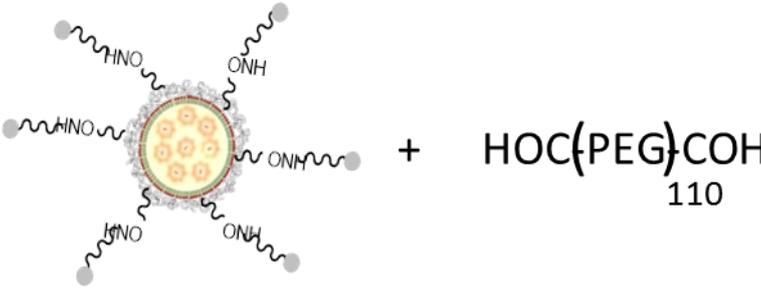
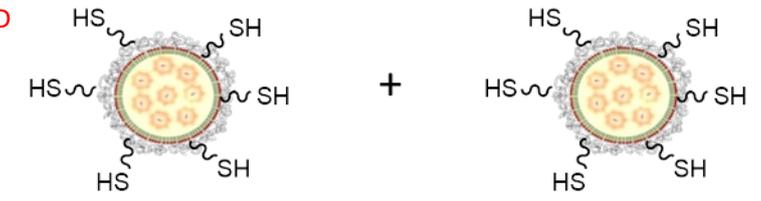
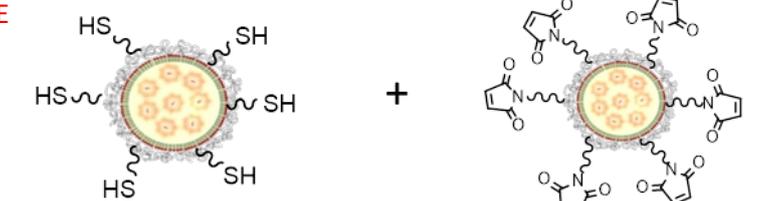
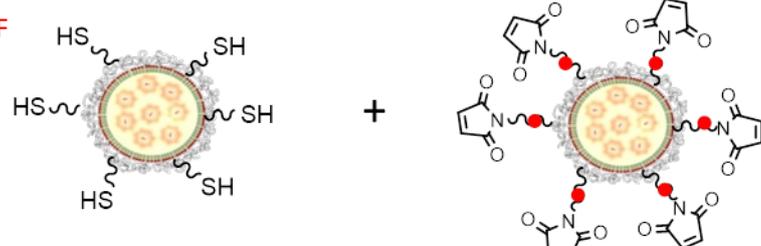
Gels	Caractéristique	Temps de formation (min)	G' (Pa)	G'' (Pa)
<p>A</p>  <p>+ NHS(PEG-NHS) 58</p>	-	10	4800	3100
<p>B</p>  <p>+ HOC(PEG-COH) 110</p>	Photoformable	15	3100	1200
<p>C</p>  <p>+ RYPSS-SSPYR</p>	-	2	1900	1300
<p>D</p>  <p>+ HS-SSPYR</p>	Photoformable	90	4200	3500
<p>E</p>  <p>+ Maleimide cross-linker</p>	-	2	2100	1600
<p>F</p>  <p>+ Maleimide cross-linker with photolabile protecting groups</p>	Photoclivable	2	3800	2500

Tableau 7.3 : Caractéristiques et propriétés rhéologiques.

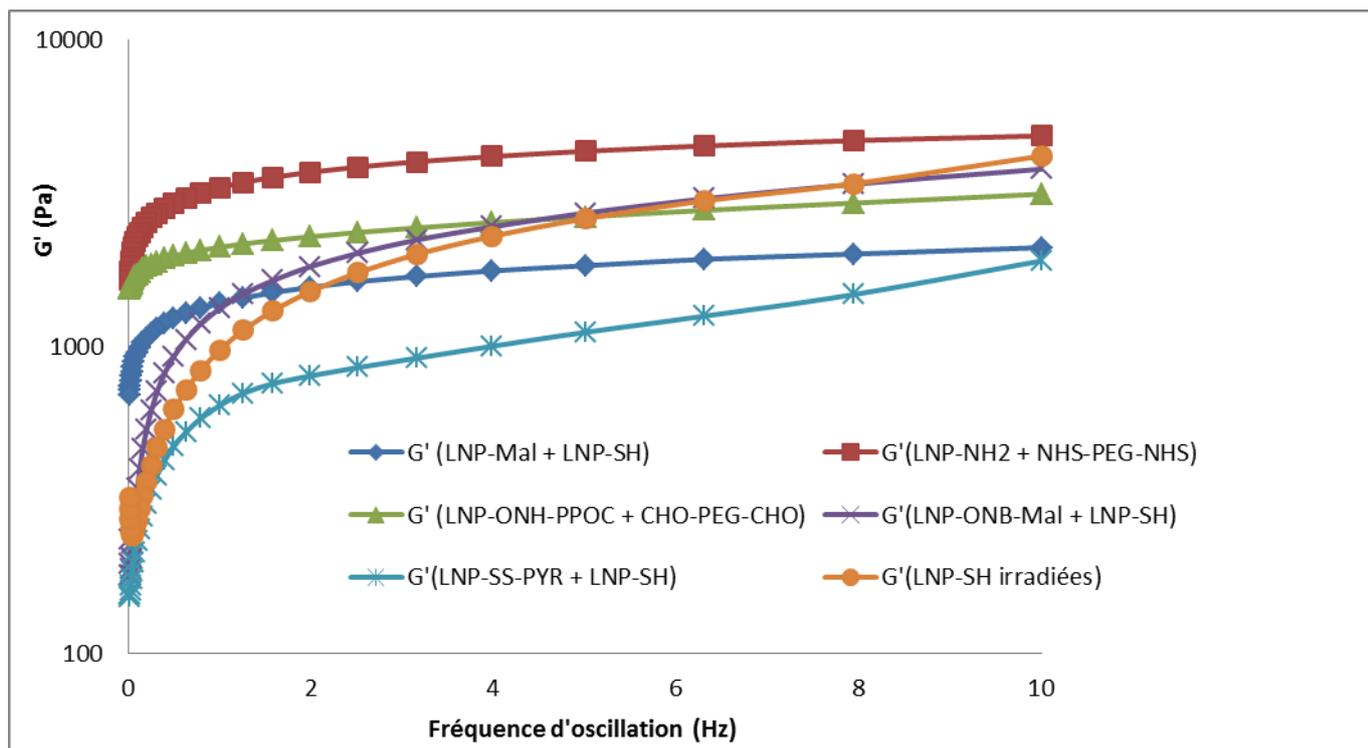


Figure 7.4 : G' en fonction de la fréquence d'oscillation pour les gels de LNPs.

Nous constatons que les modules d'élasticité des gels de nanoparticules obtenus présentant au final peu de variabilité, ceux-ci étant compris entre 1900 et 4800 Pa. Le fait que la gélification soit due au couplage direct entre deux particules (G' de 1900 à 4200 Pa) ou à l'utilisation d'un crosslinker (G' de 3100 à 4800 Pa) permet d'obtenir des gels de rigidité similaire.

Pour les gels A et B formés par l'utilisation d'un crosslinker PEGylé, on obtient le gel A ($G' = 4800$ Pa) plus solide que le gel B ($G' = 3100$ Pa). Pourtant, les 2 groupes fonctionnels $-NH_2$ et $-ONH_2$ ont démontré les mêmes réactivités vis-à-vis respectivement de la fluorescéine-NHS et fluorescéine-aldéhyde : ils ont le même rendement de greffage (Tableau 7.2). Par contre, les deux groupes présentent des taux d'incorporation différent : 74 % pour le PEG- NH_2 et 86 % pour le PEG- ONH_2 rendant probablement la rigidité du gel obtenu plus faible.

Pour les gels C-F formés par couplage covalent direct des LNP-SH, des variabilités d'un facteur de 2 existe entre les gels. Par exemple, G' du gel D formé par les LNP-SH irradiées est

de l'ordre de 4200 Pa, alors que celui du gel C formé par les LNP-SH + LNP-SS-PPYR est de 1900 Pa. Pourtant dans les deux cas, la réticulation repose sur la formation d'un pont disulfure que nous avons pu mettre en évidence par l'utilisation d'un réducteur, le DTT. Le temps de gélification est aussi très différent : 2 minutes pour le gel de LNP-SH + LNP-SS-PPYR et 90 minutes pour celui des LNP-SH irradiées.

Aussi, nous constatons que pour des LNPs portant le même type de fonctions, en l'occurrence maléimide, la présence du groupement photolabile orthonitrobenzyle fait doubler le module d'élasticité ; malgré que la gélification soit, dans les deux cas, le résultat de la réaction thiol-maléimide et que les deux groupes présentent les mêmes réactivités : ils ont des rendements de greffage très similaires (Tableau 7.2). Aussi, les deux groupes fonctionnels, -Mal et -ONB-Mal, sont portés par des PEG ayant le même nombre d'unités, 100. Ce qui pourrait expliquer la différence de rigidité constatée est probablement le taux d'incorporation de PEG-ONB-Mal qui est de 87 % et de 81 % pour le PEG-Mal.

7.6 Perspectives

Nous avons élaboré différentes sortes de gels chimiques stables, résistant à la dilution, rapides à fabriquer et contrôlables.

Les perspectives de ces travaux est dans un premier temps l'étude de la cytotoxicité de ces gels. Ensuite, l'étude de la possibilité d'encapsulation de protéines, d'anticorps et molécules actives au cœur des gels et l'étude des vitesses de relargage de ces molécules.

CHAPITRE 8

PARTIE EXPERIMENTALE

8.1 Synthèse et caractérisation des PEG fonctionnalisés

1) Les produits chimiques

Tous les réactifs utilisés pour la synthèse des surfactants fonctionnalisés ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Seul le Fmoc-Photo-Linker (acide (4-{4-[1-(9-Fluorenylmethoxycarbonylamino) ethyl]-2-methoxy-5-nitrophenoxy}butanoïque)), numéro 14 et BocNH-PEG100-NH₂ (numéro1) proviennent de chez Iris Biotech, Allemagne.

2) Synthèse du surfactant SA-CONH-PEG₁₀₀-NH₂ 3

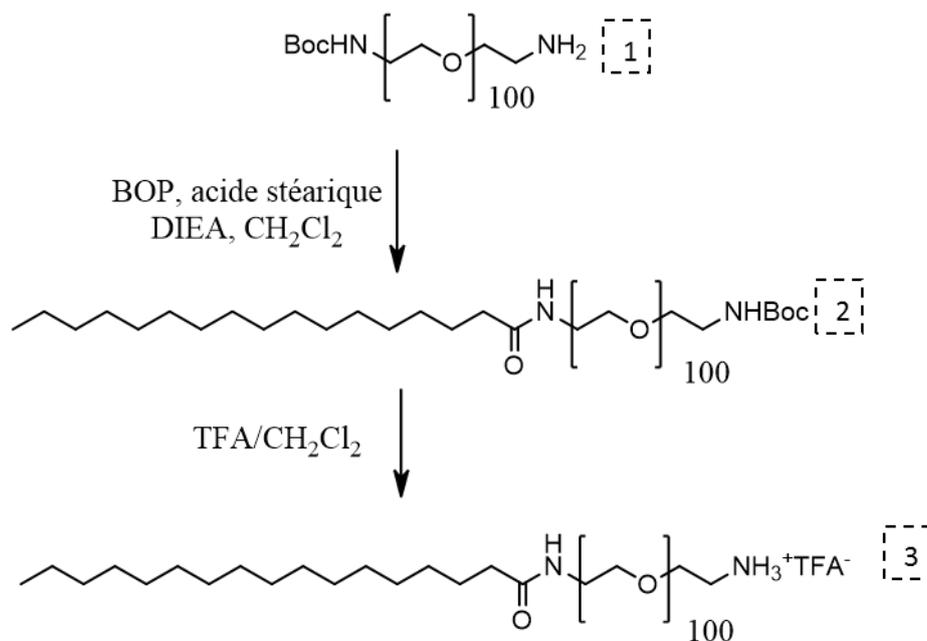


Figure 8.1 : Schéma de synthèse du SA-CONH-PEG₁₀₀-NH₂.

Synthèse du SA_{CONH}PEG100-NHBoc 2

De l'acide stéarique (284 g/mol; 2 g; 0,6 mmol) et du (Benzotriazol-1-yloxy) tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (442 g/mol; 265 mg; 0,6 mmol) sont dissous dans du CH₂Cl₂ (15 mL). Après 10 minutes d'agitation, le tert-

butoxycarbonyle amino poly (éthylène glycol) amine (BocNH-PEG100-NH₂) 1 (4928 g/mol ; 2 g ; 0,4 mmol) et de la diisopropyléthylamine (DIEA) (129 g/mol ; 104,5 μ L ; 0,6 mmol) sont ajoutés au milieu réactionnel. La disparition de l'amine de départ est vérifiée par CCM (CH₂Cl₂/MeOH). Après 2 heures sous agitation, le produit est précipité dans l'éther à froid, dissous dans un minimum d'eau puis dialysé contre de l'eau milli Q (MW Cut off 1000 Da, ZelluTrans/RothT4). La solution est ensuite récupérée et l'eau est enlevée par lyophilisation pour donner 1,5 g de SA-CONH-PEG100-NHBoc 2 (poudre blanche), avec un rendement de 70 %.

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) : δ (ppm) : 0,87 (t ; J=6,5 Hz ; 3H ; CH₃-CH₂) ; 1,24 (m ; 28H ; 14CH₂) ; 1,44 (s ; 9H ; C(CH₃)₃) ; 1,67 (quin ; 2H ; CH₂-CH₂-CONH) ; 2,42 (t ; J=7,5 Hz ; 2H ; CH₂-CONH) ; 3,3 (t ; J=5,0 Hz ; 2H ; BocNH-CH₂) ; 3,45-3,8 (m ; 362H ; xCH₂(PEG), CH₂CONH-CH₂).

Synthèse du SA_{CONH}PEG100-NH₃⁺TFA⁻ 3

Le SA-CONH-PEG100-NHBoc 2 (5194 g/mol ; 1,5 g ; 0,29 mmol) est dissous dans 10 mL de dichlorométhane et 4 mL d'acide trifluoroacétique. La conversion du produit de départ en SA_{CONH}-PEG₁₀₀-NH₂ 3 est suivie par CCM (révélateur ninhydrine). Après 1 heure sous agitation, le solvant est évaporé par coévaporation avec du toluène (élimine le TFA). Le produit est dialysé contre de l'eau milli Q (MW Cut off 1000 Da, ZelluTrans/RothT4). La solution est ensuite récupérée et l'eau est enlevée par lyophilisation pour donner 1,3 g de SA-CONH-PEG₁₀₀-NH₃⁺TFA⁻ (poudre blanche) soit un rendement de 87 %

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) : δ (ppm) : 0,87 (t ; J=6,5 Hz ; 3H ; CH₃-CH₂) ; 1,24 (m ; 28H ; 14CH₂) ; 1,60 (quin ; 2H ; CH₂-CH₂-CONH) ; 2,15 (t ; J=7,5 Hz ; 2H ; CH₂-CONH) ; 3,17 (bt ; 2H ; CH₂-NH₃⁺) ; 3,4 (m ; 2H ; CH₂CONH-CH₂) ; 3,5-3,8 (m ; 360H ; xCH₂(PEG)) ; 6,14 (bs ; 1H ; NHCO) ; 7,9 (bs ; 2H ; NH₂/NH₃⁺)

3) Synthèse du surfactant SA-CONH-PEG₁₀₀-SS-PYR 10

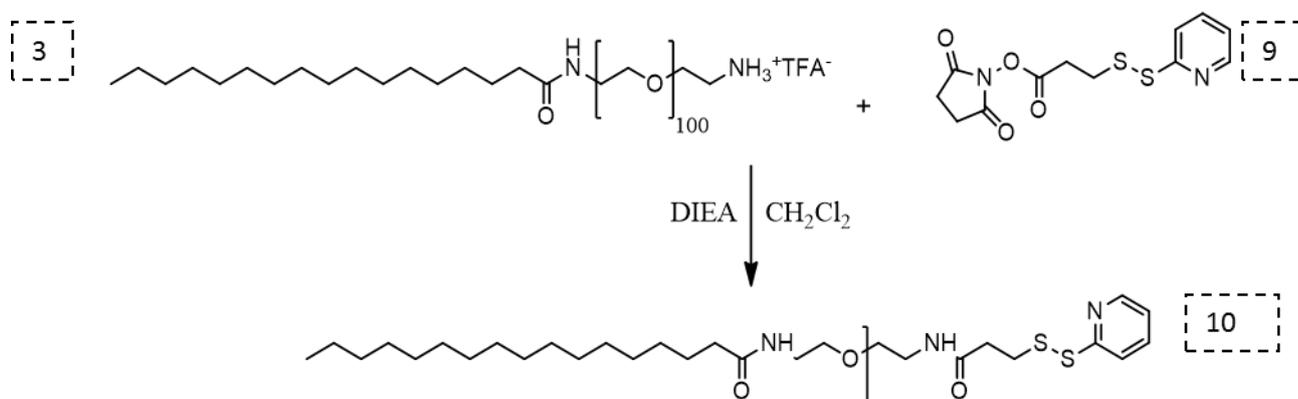


Figure 8.2 : Schéma de synthèse du SA-CONH-PEG₁₀₀-SS-PYR.

Sous argon, du SA_{CONH}PEG₁₀₀-NH₃⁺TFA⁻ 3 (5191 g/mol ; 0,5 g ; 0,1 mmol) et de la DIEA (129 g/mol ; 52 μ L ; 0,3 mmol) sont dissous dans du dichlorométhane (10 mL). Après 5 minutes sous agitation du SPDP (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate) 9 (PM: 312,37 ; 93 mg ; 0,3 mmol) est ajouté dans le milieu réactionnel. La disparition de l'amine est suivie par CCM (CH₂Cl₂/MeOH 9/1). Après 1 heure de réaction, le produit final 10 est précipité à deux reprises dans l'éther puis dialysé contre de l'eau milli Q (MW Cut off 1000 Da, ZelluTrans/RothT4). La solution est ensuite récupérée et l'eau est enlevée par lyophilisation. Son rendement est de 76 %.

RMN ¹H (300 MHz; CDCl₃) : δ (ppm) : 0,88 (t ; J=6,5 Hz ; 3H ; CH₃-CH₂) ; 1,25 (m ; 28H ; 14CH₂) ; 1,63 (quin ; 2H ; CH₂-CH₂-CONH) ; 2,17 (t ; J=7,5 Hz ; 2H ; CH₂-CONH) ; 2,62 (t ; J=7 Hz ; 2H ; CH₂-SS) ; 3,09 (t ; J=7 Hz ; 2H ; NHCO-CH₂-CH₂-SS) ; 3,42 (m ; 2H ; CH₂-NHCO) ; 3,48-3,8 (m ; 360H ; xCH₂(PEG) ; CH₂-NHCO) ; 6,11 (bt ; 1H ; NH) ; 6,79 (bt ; 1H ; NH) ; 7,11 (m ; 1H ; CHpyr) ; 7,67 (m ; 2H ; 2CHpyr) ; 8,49 (m ; 1H ; CHpyr).

4) Synthèse du surfactant SA-CONH-PEG₁₀₀-ONH-PPOC

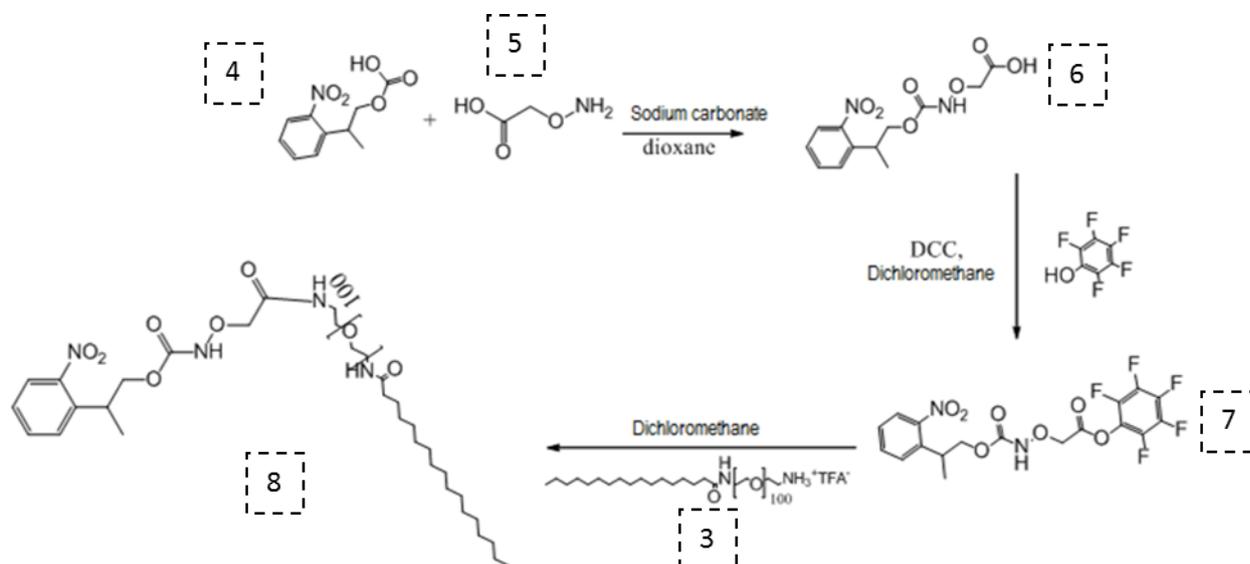


Figure 8.3 : Schéma de synthèse du SA-CONH-PEG₁₀₀-ONH-PPOC.

Synthèse du carboxyméthoxylamine de chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyl 6

Du chlorure de carboxyméthoxylamine 5 (1 g, 4,57 mmol) a été dissout dans une solution aqueuse de carbonate de sodium à 10 % (25 mL). La solution a été refroidie à 0°C et l'on a ajouté, goutte à goutte, une solution de chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyl (Cl-NPPOC) 4 (2,20 g, 9.1 mmol) dans du dioxane (20 mL). L'agitation a été maintenue pendant 3 heures à température ambiante, le milieu réactionnel a été évaporé à sec. Au résidu obtenu, de l'eau (250 mL) a été additionnée et la phase aqueuse lavée avec l'éther diéthylique (200 mL). La phase aqueuse a été acidifiée avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH 3 et extraite avec du dichlorométhane (3 × 250 mL). Enfin, les phases organiques ont été réunies et séchées sur sulfate de sodium anhydre, et évaporées.

Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane puis dichlorométhane/ méthanol 97/3, v/v). Le produit 6 a été obtenu sous forme d'une poudre blanche (1.17 g, 3.9 mmol, 88 %).

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1,34 (3 H, d, CH_3); 3,5 (1H, m, CH); 3,76 (2 H, d, CH_2O); 4,37 (s, 2 H, COCH_2O); 7,3-7,6 (4 HAr, m); 8.8 (1 H, s, COOH).

Synthèse du produit pentafluorophénoxyaméthoxyamine de chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyl 7

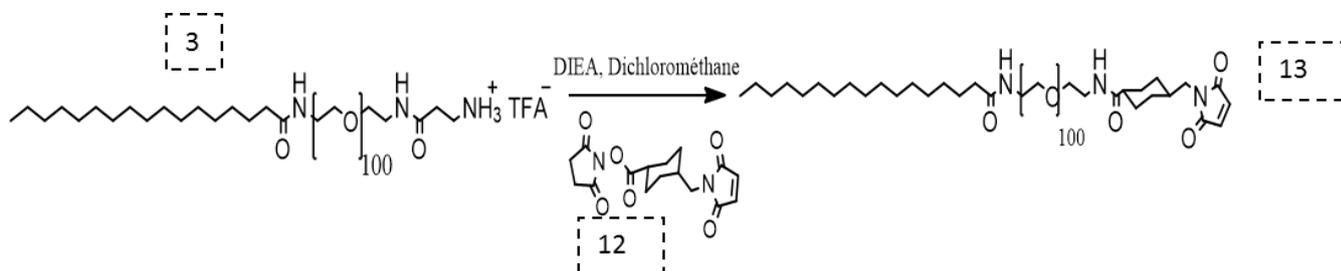
Le produit 6 (1,17 g, 3.9 mmol) a été dissout dans le dichlorométhane (5 mL) et on a ajouté du pentafluorophénol (906,5 mg, 4,63 mmol), puis goutte à goutte une solution de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (877 mg, 4,63 mmol) dans le dichlorométhane. Le mélange a été agité pendant 4 heures et ensuite filtré. Après évaporation, le produit 2 a été obtenu sous forme d'huile jaune (1.8 g, 4.63 mmol, quantitatif).

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) : 1,34 (3 H, d, CH_3); 3,5 (1H, m, CH); 3,76 (2 H, d, CH_2O); 4,37 (s, 2 H, COCH_2O); 7,3-7,6 (4 HAr, m).

Synthèse du produit SA-CONH-PEG₁₀₀-ONH-PPOC 8

Sous argon, du SA-CONH-PEG₁₀₀-NH³⁺TFA⁻ 3 (519 mg ; 0,1 mmol) et de la DIEA (25 μL , 0.2 mmol) ont été dissout dans du dichlorométhane (10 mL). Après 5 mn d'agitation, on a ajouté au milieu réactionnel le produit 2 (50.54 mg, 0.13 mmol). Après 2 heures de réaction, le solvant a été évaporé. Le produit brut a été purifié par dialyse dans l'eau distillée (MW Cut off 1000 Da, ZelluTrans/RothT4, ; 2 L ; 48 heures). Enfin, le produit 3 a été lyophilisé pour conduire à l'obtention d'une poudre blanche (428 mg, , 0.08 mmol, 80 %).

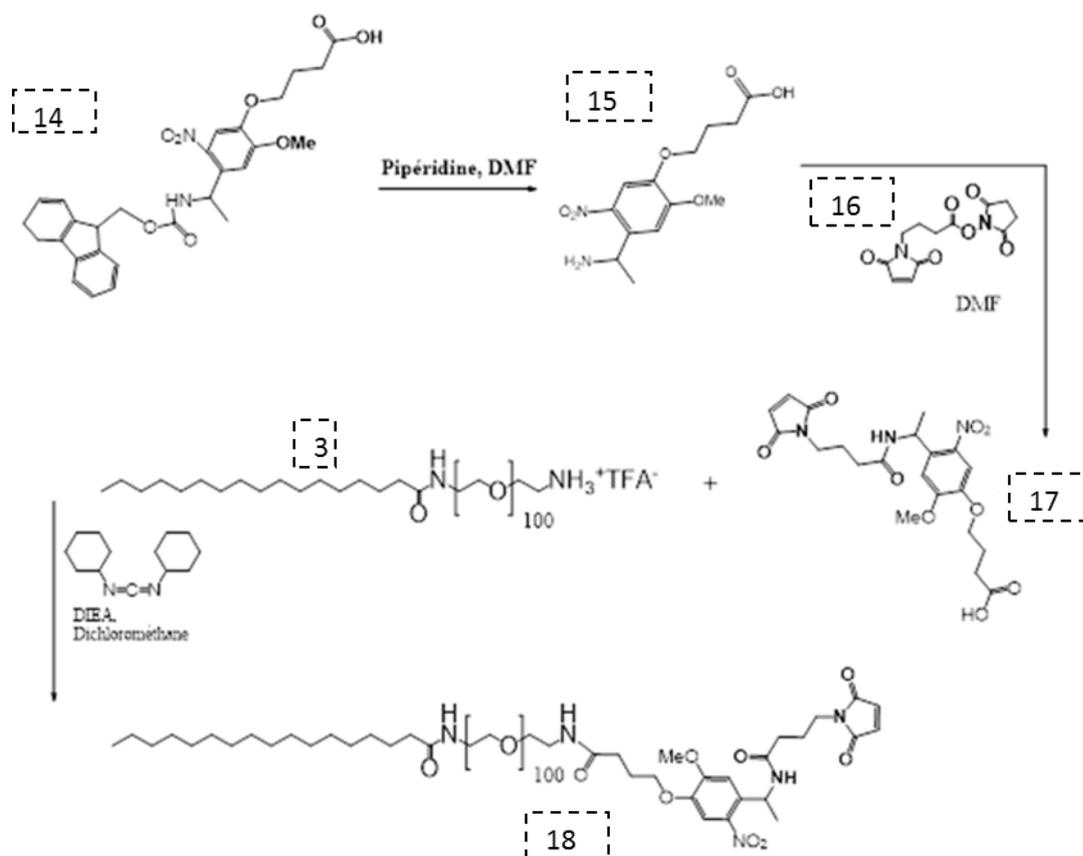
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ : (ppm) 0,88 (3 H, t, CH_3); 1,25 (28 H, m, 14 CH_2); 1,34 (3 H, d, CH_3); 1,89 (2 H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$); 2,17 (2 H, t, $\text{CH}_2\text{-CONH}$); 3,34 (2 H, m, $\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$); 3,4 (1H, m, CH); 3,5-3,70 (400 H, m, CH_2 PEG) ; 3,76 (2 H, d, CH_2O); 4.37 (s, 2 H, COCH_2O); 6,17 (1 H, s, NH) ; 7,3-7,6 (4 HAr, m).

5) Synthèse du surfactant SA-CONH-PEG₁₀₀-MalFigure 8.4 : Schéma de synthèse du SA-CONH-PEG₁₀₀-Mal.

Sous argon, du SA-CONH-PEG₁₀₀-NH₃⁺TFA⁻ 3 (5191 ; 0,5 g ; 0,1 mmol) et de la DIEA (129 ; 52 μ L ; 0,3 mmol) sont dissous dans du DMF (10 mL). Après 5 minutes sous agitation, du 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (SMCC) 12 (334 ; 100 mg ; 0,3 mmol) est ajouté dans le milieu réactionnel. La disparition de l'amine est suivie par CCM (CH₂Cl₂/MeOH 9/1). Après 2 heures de réaction, le mélange est évaporé. Le produit brut a été purifié par dialyse contre de l'eau milli Q (MW Cut off 1000 Da, ZelluTrans/RothT4). La solution est ensuite récupérée et l'eau est enlevée par lyophilisation. Le produit final, SA-CONH-PEG₁₀₀-Mal 13, a été obtenu sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 81 %.

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) : δ (ppm) : 0,88 (3H ; t ; CH₃-CH₂) ; 1,25 (2H ; m ; CH₂ stéarate) ; 1,50 (2H ; m ; CH₂ du cyclohexane) ; 1,60 (CH₂-CH₂-CONH, m ;) ; 1,9 (1H ; cyclo-CH-CH₂-) ; 2,20 (2H ; t ; CH₂-CONH) ; 3,42 (2H ; m ; CH₂-NHCO) ; 3,45 (m ; 2H ; CH₂-Mal) ; 3,48-3,8 (4H ; m ; xCH₂ (PEG) ; CH₂-NHCO) ; 6,11 (1H ; bt ; NH) ; 6,70 (2H ; s ; HC=CH du maléimide)

6) Synthèse du surfactant PEG-ONB-Mal

Figure 8.5 : Schéma de synthèse du SA-CONH-PEG₁₀₀-ONB-Mal.**Synthèse du produit ethylamine 2-methoxy-5-nitrophenoxy acide butanoïque 15**

Le 4-{4-[1-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino) ethyl]-2-methoxy-5-nitrophenoxy acide butanoïque (Fmoc-Photo-Linker) 14 (950 mg, 1,82 mmol, Iris Biotech) a été mis à réagir avec la pipéridine (237 μ l, 2.36 mmol) dans 12 mL de DMF. On a maintenu l'agitation pendant 3 heures sous argon. Le milieu réactionnel a été évaporé à sec. La réaction a été suivie par CCM en utilisant l'éluant dichlorométhane/méthanol (9/1). Le produit 15 a été obtenu sous forme d'une huile jaune. Difficile à purifier, il a été engagé tel quel dans l'étape suivante.

Synthèse du produit ethylamide l'ester 4-maléimidobutyric 2-methoxy-5-nitrophenoxy acide butanoïque 17

Le produit 15 a été dissout dans le diméthylformamide (15 mL) auquel a été ajouté l'ester 4-maléimidobutyric acid N-hydroxysuccinimide 16 (666 mg, 2,4 mmol). Le mélange a été agité pendant 3 heures sous argon et la réaction a été suivie par CCM (éluant dichlorométhane/méthanol (9/1)). Après l'évaporation du DMF, le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle puis dichlorométhane/méthanol 9/1). Le produit 17 a été obtenu sous forme d'une huile jaune (571 mg, 1,22 mmol, 67% rendement des 2 étapes).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 1.51 (3H, d, CH₃) ; 1.89 (2H, m, N-CH₂-CH₂-CH₂) ; 2.05-2.21 (4H, m, NH-CO-CH₂ et O-CH₂-CH₂) ; 2.51 (2H, t, COOH-CH₂) ; 3.52 (2H, t, O-CH₂) ; 3.92 (3H, s, O-CH₃) ; 4.11 (2H, t, N-CH₂) ; 5.52 (1H, m, CH-CH₃) ; 6.69 (2H, s, 2CH maléimide) ; 7-7.55 (2H_{Ar}, 2s) ; 8.02 (1H, NH).

Synthèse du produit SA-CONH-PEG₁₀₀-ONB-Mal 18

Sous argon, du SA-CONH-PEG₁₀₀-NH₃⁺TFA⁻ 3 (165 mg, 0,033 mmol) et de la DIEA (17,3 μL, 0,1 mmol) ont été dissout dans du dichlorométhane (5 mL). Après 5 minutes d'agitation, le produit 17 (48 mg, 0.1 mmol) et du DCC (20 mg, 0.1 mmol) ont été ajoutés au milieu réactionnel. Après 3 heures de réaction, le solvant est évaporé puis le mélange réactionnel est dialysé contre de l'eau milli Q (MW Cut off 1000 Da, ZelluTrans/RothT4). La solution est ensuite récupérée et l'eau est enlevée par lyophilisation. Le produit 18 a été obtenu sous forme de poudre jaune.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) 0,88 (3 H, t, CH₃) ; 1,07 (2 H, m, CH₂-CH₂-CONH) ; 1,11 (2 H, t, CH₂-CONH) ; 1,19 (28 H, m, 14 CH₂) ; 1,63 (2H, m, N-CH₂-CH₂-CH₂) ; 1,86 (3H, d, CH₃) ; 2,1-2,2 (6H, m, NH-CO-CH₂, O-CH₂-CH₂ et COOH-CH₂) ; 3.46 (2H, t, O-CH₂) ; 3,5-3,70 (400 H, m, CH₂ PEG) ; 3,96 (3H, s, O-CH₃) ; 4,11 (2H, t, N-CH₂) ; 5,14 (1H, m, CH-CH₃) ; 5,65 (2H, s, 2CH maléimide) ; 6,97-7,53 (2H_{Ar}, 2s) ; 8,32 (1H, NH).

8.2 Synthèse et caractérisation des nanoparticules

Les nanoparticules lipidique (LNP) sont développées au laboratoire depuis 8 ans, et les protocoles de synthèse de ces nanoparticules sont bien établis. Ainsi, les compositions (quantités de lipides, phospholipides et PEG) sont optimisées pour obtenir des nanoparticules de 5 diamètres différents : 30 nm, 50 nm, 80 nm, 100 nm et 120 nm ont été mis en place (88). Dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés aux nanoparticules de 50 nm de diamètre et nous avons modifié la formulation standard en incorporant de nouveaux surfactant PEGylés fonctionnalisés à la surface des particules. Tout en gardant le même rapport masse/volume des LNP standard stable.

Dans un premier temps, l'ensemble des produits chimiques nécessaires à la préparation des nanoparticules sont listés, puis le protocole de fabrication décrits et enfin les moyens de caractérisation des LNPs détaillés.

1) Les produits chimiques

La Suppocire NCTM est offerte par Gattefosse (Saint-Priest, France). Le stéarate de polyéthylène glycol (MyrjS40TM) et l'huile de soja Super-refined Soybean oilTM sont approvisionnés chez Croda (Chocques, France). Le fluorophore DiD (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tétraméthylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate) est acheté chez Invitrogen. Le Lipoid s75TM (lécithine de soja) est acheté chez Lipoid (Ludwigshaffen, Allemagne).

Les autres produits chimiques proviennent de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2) Synthèse des nanoparticules et purification

La préparation de nanoparticules est réalisée en 5 étapes : préparation de la phase huileuse, précipitation de la phase aqueuse, mélange des phases, émulsification et purification.

a) Préparation de la phase huileuse

Les composés de la phase huileuse (huile 68 mg, cire 272 mg, lécithine 65 mg) sont pesés puis mélangés avant d'être chauffés à 60°C afin d'obtenir une solution visqueuse homogène. Du

dichlorométhane est ajouté pour faciliter l'homogénéisation du mélange. Il est ensuite éliminé par évaporation. Le premix huileux peut être conservé au congélateur (-20°C) pour utilisation ultérieure.

Si une molécule amphiphile ou lipophile doit être encapsulée, elle va être rajoutée au premix huileux. Généralement, on ajoute du DiD (80 µL, 10 mM dans l'éthanol) dans le premix pour pouvoir visionner les particules. L'éthanol est ensuite évaporé sous argon.

b) Préparation de la phase aqueuse

En parallèle à la préparation de la phase huileuse, les surfactants PEGylé MyrjS40™ 276 mg et un surfactant fonctionnalisé 69 mg (PEG-NH2 ou PEG-ONH-PPOC ou PEG-SSPYR ou PEG-Mal ou PEG-ONB-Mal) sont dissous dans du tampon phosphate 2,5 mL (PBS 1X : [phosphate] = 0,01 M, [NaCl] = 0,154 M, filtré à 0,2 µM, pH 7,4) dans un bain à 50°C. Le mélange doit à la fin être homogène et chaud avant le procédé de sonication.

c) Mélange des phases et sonication

La phase aqueuse, encore chaude, est mélangée au premix huileux fondu. L'embout de la sonotrode est alors soigneusement positionné dans le flacon en verre contenant le mélange (3,25 mL) de façon à ce qu'il ne touche pas côtés du flacon, comme représenté Figure 8.6.

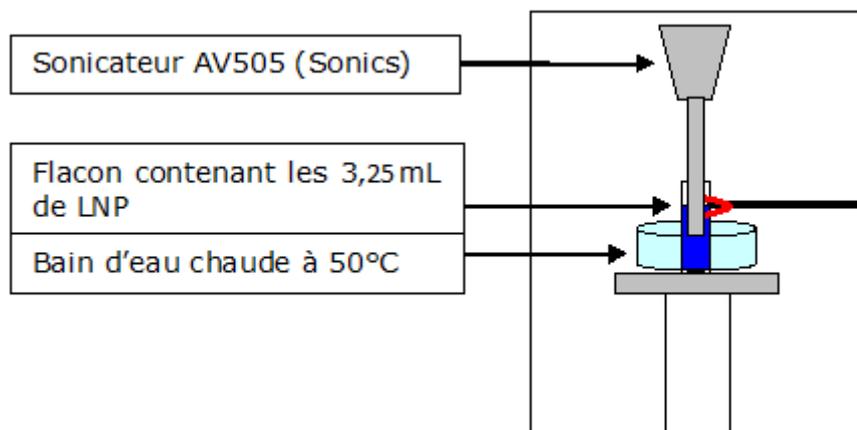


Figure 8.6 : Enceinte de sonication contenant le sonicateur AV505 (Sonics, Newtown USA) permettant la fabrication des nanoparticules.

Les nanoparticules sont préparées par un processus d’ultrasonication avec une sonotrode de 3 mm de diamètre (sonicateur AV505, Sonics, Newtown USA), selon les paramètres résumés Tableau 8.1. Le temps effectif de sonication est de 20 min.

Volume du lot	Sonde	Puissance de P_{max}	Temps de sonication	Pulse	
				on	Off
3,25 mL	Ø 3 mm	30 %	20 min	10 s	30 s

Tableau 8.2 : Paramètres d’émulsification.

A la fin, on obtient une dispersion de 3,25 mL (750 mg de (cire + huile + lécithine + surfactants) dans 2,5 mL de PBS 1X). La dispersion finale obtenue est donc à 23 % de pourcentage massique de lipides.

d) Purification

La purification de la dispersion de nanoparticules se fait par dialyse contre un grand volume de PBS 1X (500 mL) pendant 24 h. La membrane utilisée possède un seuil de coupure de 12–14 kDa (ZelluTrans/RothT4 12000-14000, 25 mm, ROTH, France) laissant passer à travers ses pores les molécules de faible poids moléculaire n’ayant pas été incorporées dans la synthèse (stéarate de PEG, fluorophores) tout en gardant en son sein les particules lipidiques.

Une fois purifié, l’échantillon est stérilisé par filtration sur filtre 0,22 µm (Acrodisc® Supor® - 0,2 µm, Fisher Bioblock). Les échantillons peuvent être conservés à l’abri de la lumière à 4°C jusqu’à leur utilisation.

3. Caractérisation des nanoparticules

a) Taille, polydispersité et potentiel zêta

Une fois le lot de nanoparticules purifié, il doit être caractérisé par sa taille, sa polydispersité et sa charge de surface. Ces paramètres sont déterminés par la diffusion quasi-élastique de la lumière (DLS) grâce à un NanoSizer ZS (Malvern, Royaume-Uni) (Figure 8.7). Environ 20 μL de solution de particules (à 23 % de pourcentage massique) sont dispersés dans 1980 μL de PBS 0,1X. Les mesures sont réalisées à température ambiante.



Figure 8.7 : Photo du Zêtasizer.

b) Caractérisation par fluorescence des nanoparticules fonctionnalisées

Pour mettre en évidence la fonctionnalisation des nanoparticules, celles-ci sont mises à réagir avec un réactif fluorescent portant une fonction active vis-à-vis de celle portée par la nanoparticule.

Les volumes et nombres de moles sont détaillés Tableau 8.3.

Particules à 23 % de pourcentage massique	LNP		Fluorophore	Volume de PBS 0.1X
	Volume des particules (mL)	Nombre de moles de fonctions introduites au départ (nmol)	Volume du réactif Fluorescent à 0,27 mM dans le DMSO	
LNP-NH ₂ + Fluorescéine-NHS	0,1	0,41	1,55 µL	1
LNP-ONH-PPOC + Fluorescéine- aldéhyde	0,1	0,4	1,5 µL	1
LNP-SH + Cy5- Maléimide	0,1	0,41	2,1 µL	1
LNP-Mal + SAMSA- Fluorescéine	0,1	0,4	1,7 µL	1
LNP-ONB-Mal + SAMSA- Fluorescéine	0,1	0,38	1,7 µL	1

Tableau 8.3 : Volumes des particules et réactifs fluorophores utilisés pour la mise en évidence des fonctions en surface des particules.

Après 2 heures de réaction, le mélange (nanoparticules fonctionnalisées + molécule fluorescente + PBS 0.1X) est passé dans une colonne d'exclusion stérique (Sephadex G-25 Medium, GE Healthcare).

1 mL de solution est déposé au sommet de la colonne et élué par du PBS 1X (10 mL). Les nanoparticules sont éluées en premier alors que les petites molécules (fluorophore en excès) sont retenues sur la colonne.

Les fractions d'éluion recueillies (volume de 0,5 mL) sont analysées par spectrofluorimétrie sur un lecteur de plaques Tecan (Tecan Infinite M1000) (Figure 8.8).



Figure 8.7 : Photo du Tecan.

8.3 Synthèse et caractérisation des gels

Tous les agents de couplage utilisés pour la gélification ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

1) Synthèse des gels

a) Gel de LNP-NH₂ + NHS-PEG-NHS

1 mL de solution de particules LNP-NH₂ à 23 % de pourcentage massique (soit 3,03 μ mol de fonctions réactives : fonctions réellement en surface après le calcul du taux d'incorporation) sont ajoutées à 1 mL d'une solution de NHS-PEG-NHS à 1,52 μ M dans le PBS 0,1X (soit 0,5 équivalent en nombre de moles par rapport aux nombres de fonctions de nanoparticules). Ensuite, 0,2 mL de l'EDC à 10,13 μ M dans le DMSO est ajouté à la solution. Le mélange est laissé sous agitation pendant 10 minutes et un gel commence à se former une fois le mélange laissé se reposer.

b) Gel de LNP-ONH-PPOC + aldéhyde-PEG-aldéhyde (ou glutaraldéhyde)

Même procédure pour les gels formés avec glutaraldéhyde ou aldéhyde-PEG-aldéhyde.

1 mL de solution de particules LNP-ONH-PPOC à 23 % de pourcentage massique et à pH 9 (soit 3,41 μmol de fonctions ONH-PPOC réactives en surface) sont ajoutées à 0,16 μL d'une solution de glutaraldéhyde à 50 % ou à 1 mL d'une solution d'aldéhyde-PEG-aldéhyde à 1,7 μM dans le PBS 0.1X (soit 0,5 équivalent en nombre de moles par rapport aux nombres de fonctions de nanoparticules).

Le mélange est ensuite irradié pendant 10 minutes par une lampe UV à 365 nm et avec une puissance 15 mW/cm^2 . Ensuite, la solution est laissée se reposer.

Dans le cas du glutaraldéhyde, ce n'est qu'après 6 heures de repos qu'un gel commence à se former. Alors que dans le cas de l'aldéhyde-PEG-aldéhyde, 5 minutes de repos suffise pour qu'un gel commence à se former.

c) Gel de LNP-SH + LNP-SSPYR

1 mL d'une solution de LNP-SSPYR à 23 % de pourcentage massique (soit 2,87 μmol de fonctions SSPYR présentes en surface) sont mélangées avec 1 mL d'une solution de LNP-SH également à 23 % (soit 2,93 μmol de fonctions SH réactives en surface). La solution est ensuite chauffée à 55 °C et homogénéiser en utilisant un vortex pendant 2 minutes. Enfin, la solution est laissée se reposer et un gel commence à se former.

d) Gel de LNP-SH irradiées

1 mL d'une solution de LNP-SH à 23 % de pourcentage massique (soit 2,93 μmol de fonction thiols en surface) est irradiée par une lampe UV à 365 nm et avec une puissance de 15 mW/cm^2 . Après chaque 15 minutes, la solution est homogénéisée par un vortex, mais ce n'est qu'au bout de 90 minutes que l'on constate la formation d'un gel chimique insoluble.

e) Gel de LNP-SH + LNP-Mal

1 mL d'une solution de LNP-Mal à 23 % de pourcentage massique (soit 3,25 μmol de fonctions maléimides disponibles en surface) est mélangée avec 1 mL d'une solution de LNP-SH à 23 % également (soit 2,93 μmol de fonction thiols en surface). La solution est mélangée à température ambiante puis chauffée à 50 °C pendant 2 minutes. Puis le mélange est laissé se reposer et un gel commence à se former.

f) Gel de LNP-SH + LNP-ONB-Mal

1 mL d'une solution de LNP-ONB-Mal à 23 % de pourcentage massique (soit 3,28 μmol de fonction ONB-Mal réactives) est additionné à une solution de LNP-SH également à 23 % (soit 2,93 μmol de fonction thiols en surface). Le mélange est vortexé puis chauffé à 50 °C puis laissé se reposer pour former un gel au bout de deux minutes.

2) Photoclivage du gel (LNP-SH + LNP-ONB-Mal)

300 mg de ce gel est mis dans un flacon contenant 2 mL d'une solution de PBS 1X. Le mélange a été irradié (365 nm, 15 mW/cm²) pendant 15 minutes en vortexant. Après, on constate que le gel s'est dispersé pour redonner une solution homogène.

3) Dégradation du gel (LNP-SH irradiées ou LNP-SH + LNP-SSPYR)

Dans un flacon contenant 300 mg du gel avec un pont disulfure (LNP-SH irradiées ou LNP-SH + LNP-SSPYR), on ajoute 2 mL de PBS 1X et 10 mg de DTT. La solution est ensuite mélangée à l'aide d'un vortex. Au bout de 2 minutes, le gel se disperse et la solution devient homogène.

4) Caractérisation des gels

L'élasticité et la viscosité des gels sont déterminées par rhéologie.

Ces caractérisations ont été faites au CERMAV-CNRS (centre de recherche sur les macromolécules végétales).

C'est un rhéomètre (AR2000 EX, TA Instruments) qui permet de mesurer les modules d'élasticité des nanoparticules et des gels. Il permet aussi de mesurer ces deux modules tout en irradiant les nanoparticules ou les gels à 365 nm, ce qui permet de suivre l'évolution de l'élasticité ou de la viscosité des gels au cours du temps (Figure 8.8).



Figure 8.8 : le Rhéomètre AR2000 EX.

a) Choix du plan de mesure

Les nanoparticules et gels que nous avons synthétisés sont huileux (ils glissent). Le plan sur lequel sont déposés pendant l'application d'une contrainte, est donc important.

Pour cela, Deux plans ont été utilisés lors des mesures rhéologiques sur les gels de nanoparticules pour voir lequel est le plus adapté à ces mesures (Figures 8.9 et 8.10).

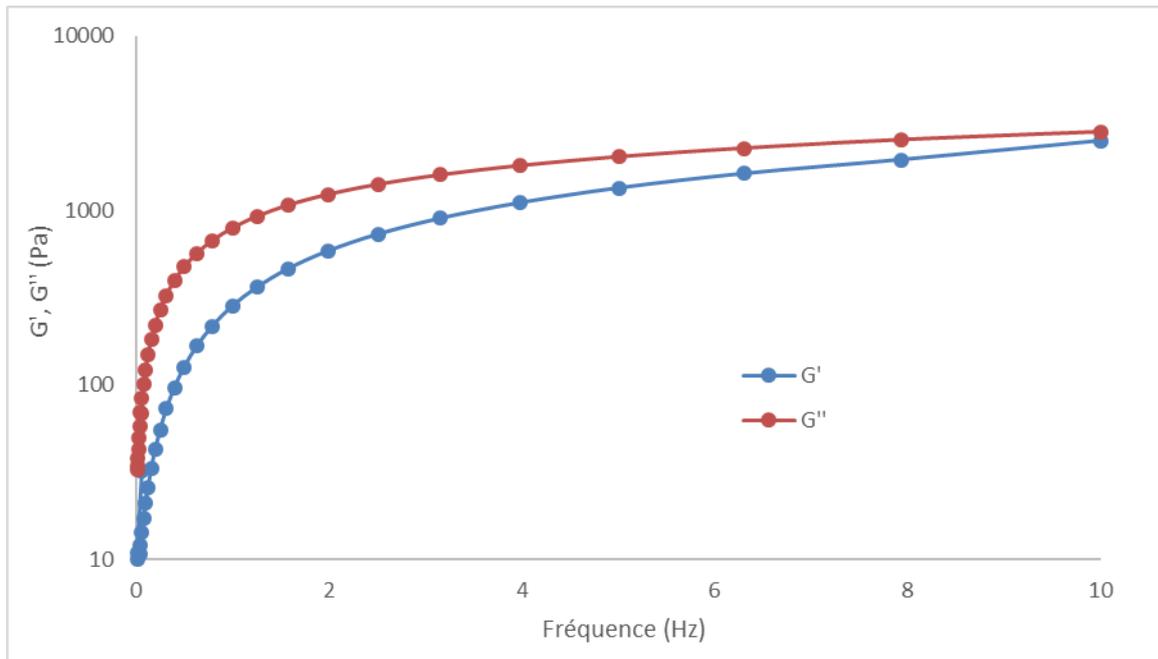


Figure 8.9 : G' et G'' en fonction de la fréquence en utilisant un plan strié.

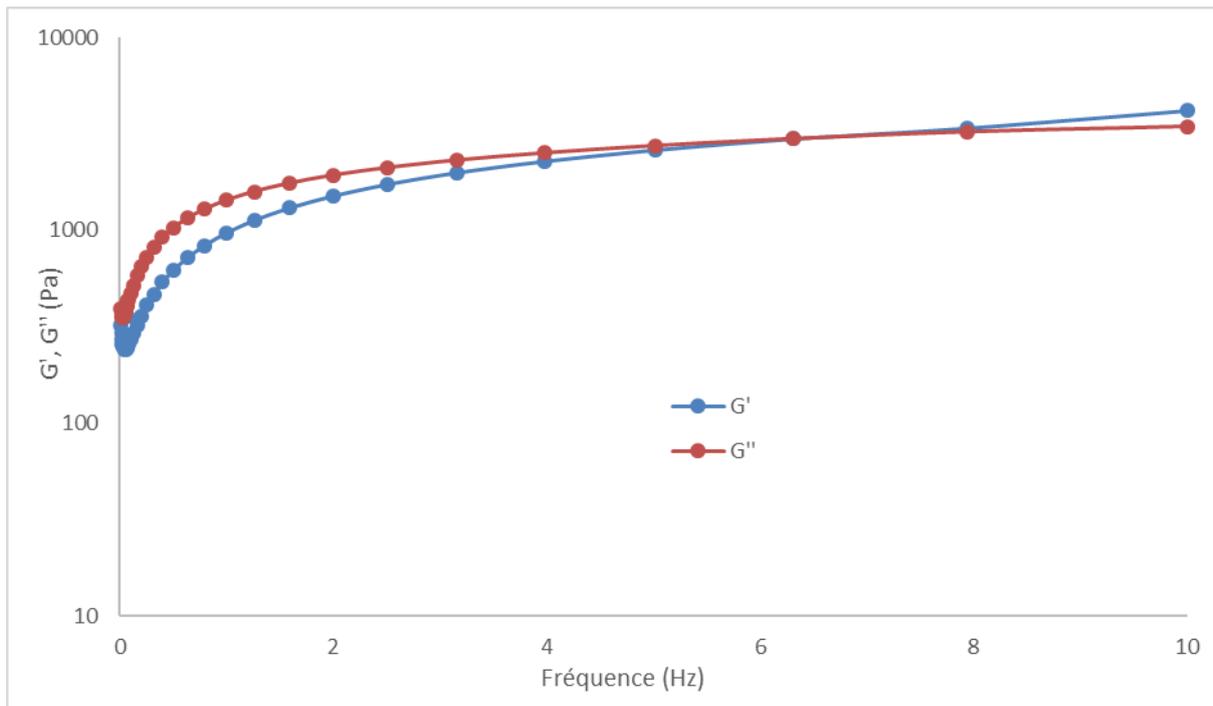


Figure 8.10 : G' et G'' en fonction de la fréquence en utilisant le plan sablé.

On constate qu'avec un plan sablé, les valeurs du module d'élasticité sont plus élevées ($G' = 4177$ Pa pour le plan sablé et 2504 Pa pour le plan strié). Toutes les mesures rhéologiques faites dans ce manuscrit ont donc été faites sur un plan sablé.

b) Détermination du domaine linéaire

Le domaine linéaire est le domaine dans lequel les modules d'élasticité et de viscosité sont stables et ne dépendent pas de la fréquence d'oscillation. La détermination de ce domaine renseigne donc sur le pourcentage de contrainte à appliquer sur les gels.

Pour ce faire, on fixait à chaque fois la fréquence à une valeur comprise entre 0,1-10 Hz et on mesurait G' et G'' en fonction du pourcentage de contrainte (0-22 %). Les Figures 8.11, 8.12 et 8.13 montrent les résultats obtenus.

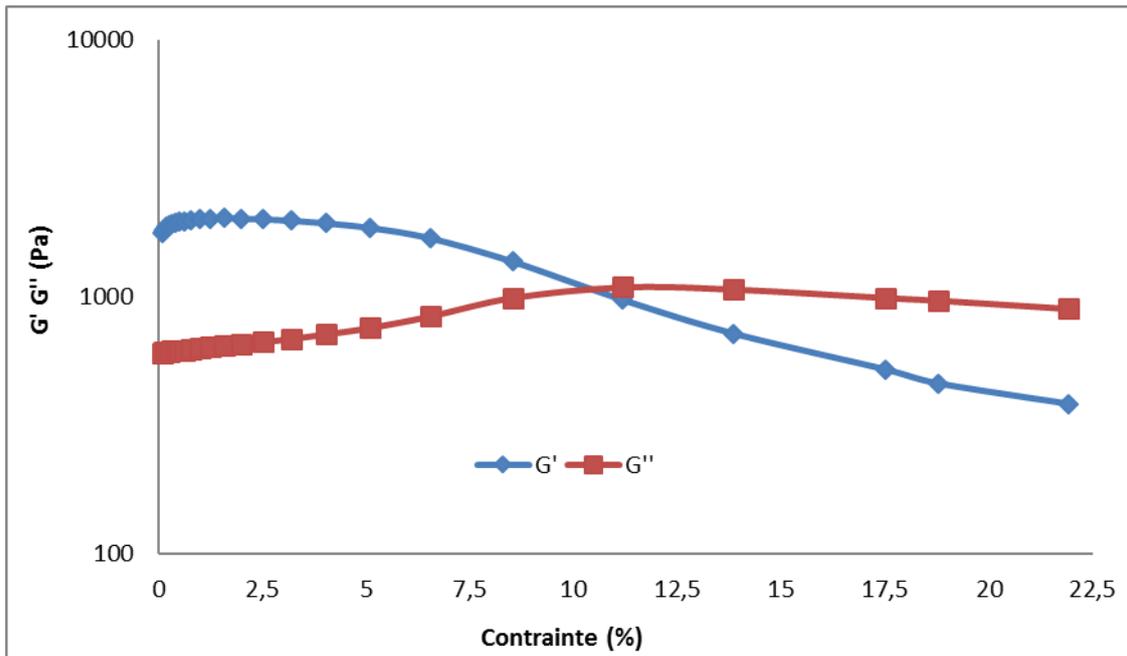


Figure 8.11 : G' et G'' en fonction du pourcentage de contrainte appliquée sur le gel à une fréquence de 0,1 Hz.

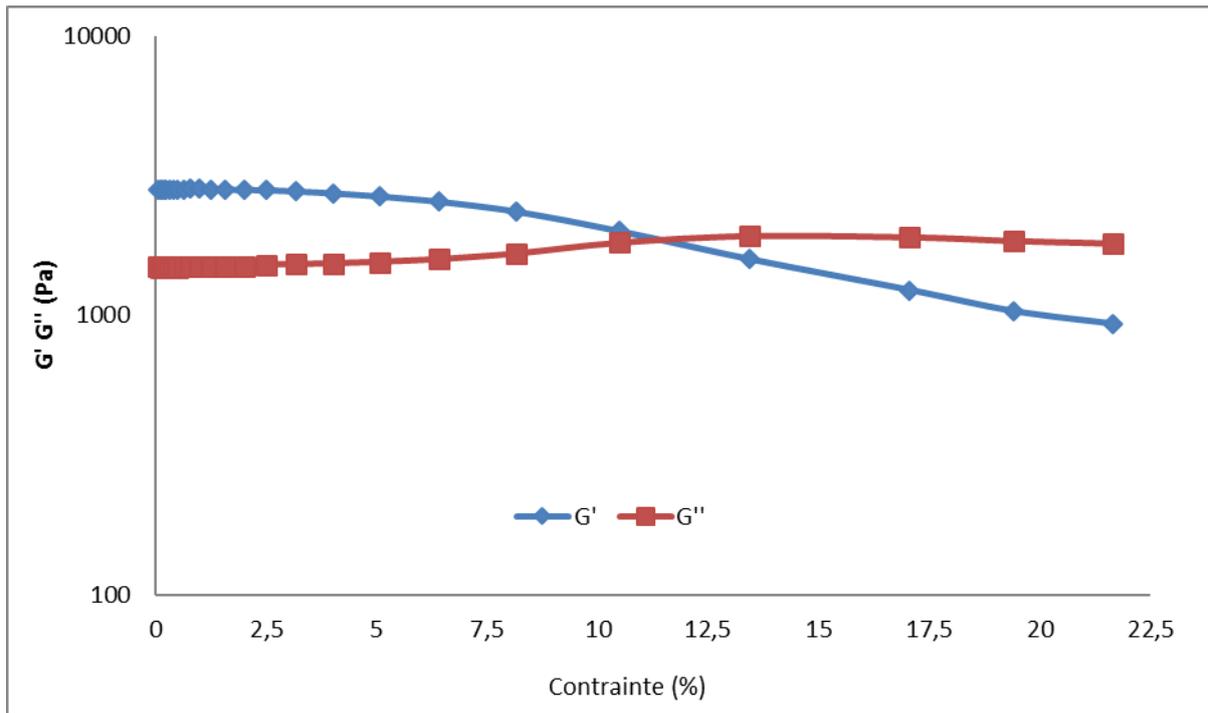


Figure 8.12 : G' et G'' en fonction du pourcentage de contrainte appliquée sur le gel à une fréquence de 1 Hz.

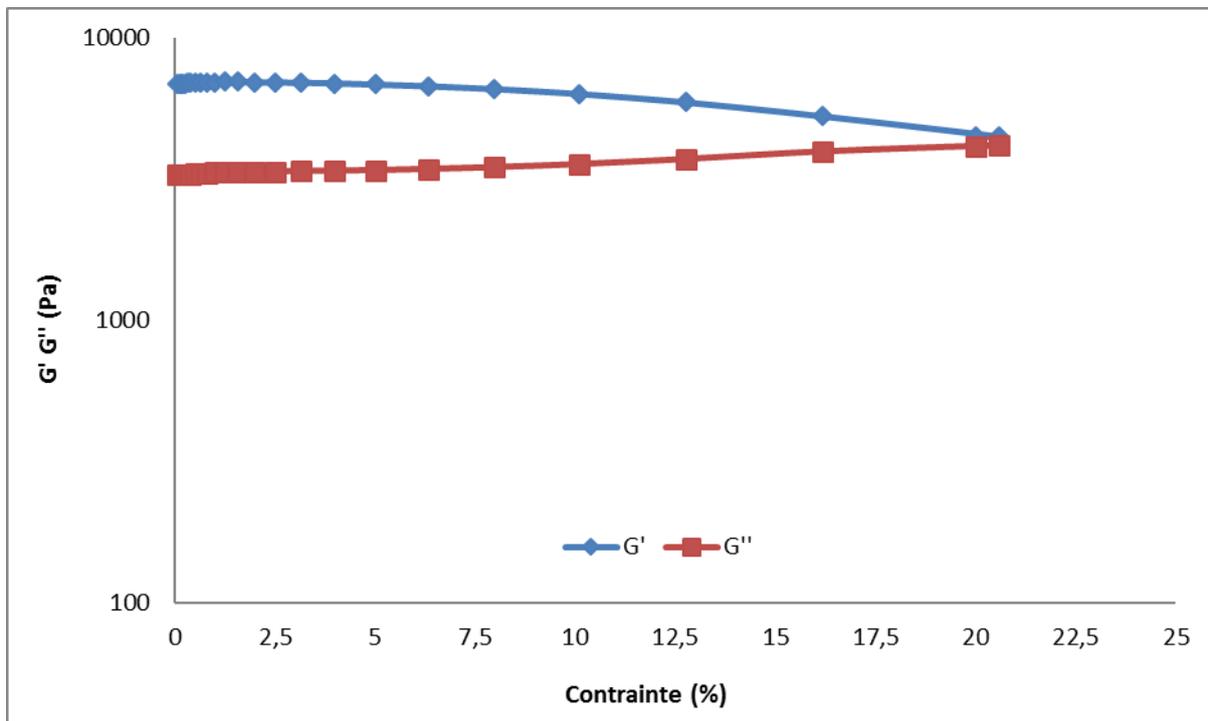


Figure 8.13 : G' et G'' en fonction du pourcentage de contrainte appliquée sur le gel à une fréquence de 10 Hz.

Après ces mesures, on constate que G' est plus linéaire vers 1-2% de pourcentage de contrainte, quel que soit la fréquence.

Dans toutes les expériences rhéologiques réalisées dans ce manuscrit, le pourcentage de contrainte a été fixé à 2 % pour mesurer les modules d'élasticité et de viscosité en fonction de la fréquence d'oscillation.

c) Mesures rhéologiques sur les nanoparticules et gels

Pour mesurer les modules d'élasticité et de viscosité des particules et des gels, la procédure est la même :

On prélève 300 μL d'un échantillon de nanoparticules ou 100 mg d'un échantillon de gel. L'échantillon est ensuite mis dans le rhéomètre sur un plan sablé. Enfin, une contrainte de 2 % est appliquée et l'appareil mesure les modules d'élasticité et de viscosité en fonction de la fréquence (0-10 Hz). L'expérience dure 20 minutes.

d) Mise en évidence de la photoformation ou la dégradation des gels de nanoparticules

Pour mesurer les modules d'élasticité et de viscosité au cours du temps d'irradiation, la procédure est la suivante :

On prélève 300 μL d'un échantillon de nanoparticules ou 100 mg d'un échantillon de gel que l'on met sur la surface en Quartz au-dessus de la lampe UV intégrée dans le rhéomètre. L'échantillon est donc irradié d'au-dessous. Une contrainte de 2 % est ensuite appliquée et la fréquence est fixée à 1 Hz. Enfin, la lampe UV est allumée (360 nm, 60 mW/cm²) et l'appareil mesure les modules d'élasticité et de viscosité en fonction du temps d'irradiation. L'expérience dure 1 heure pour le gel photoclivable (LNP-ONB-Mal + LNP-SH) et 1 heure et demi pour la photoformation du gel (LNP-ONH-PPOC + aldéhyde-PEG-aldéhyde ; LNP-SH irradiées).

REFERENCES

1. Wennerstrom H, Linman B. Micelles. Physical chemistry of surfactant association. Rev Sec Phys Lett 1979;52; 1.
2. Nelson PH, Rutledge GC, Hatton TA. On the size and shape of self-assembled micelles. J Chem Phys 1997;107:10777.
3. Zhang J, Dubay MR, Houtman CJ, Severtson SJ. Sulfonated amphiphilic block copolymers: syntheses, self-assembly in water, and applications as stabilizer in emulsion polymerization. Macromolecules 2009;42:5080.
4. Candau F, Biggs S, Hill A, Selb J. Synthesis, structure and properties of hydrophobically associating polymers. Prog Org Coat 1994;24:11.
5. Zhu J, Zhou Z, Yang C, Kong D, Wan Y, Wang Z. Folate-conjugated amphiphilic starshaped block copolymers as targeted nanocarriers. J Biomed Mater Res A 2011;97A:498.
6. Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. Nanomedicine 2010;6:714.
7. Hassan PA, Raghavan SR, Kaler EW. Microstructural changes in SDS micelles induced by hydrotropic salt. Langmuir 2002;18:2543.
8. Deutschle T, Porkert U, Reiter R, Keck T, Riechelmann H. In vitro genotoxicity of benzalkonium chloride. Toxicol In Vitro 2006;20:1472.
9. Brault PA, Kariapper MS, Pham CV, Flowers RA, Gunning WT, Shah P, et al. Protein micelles from lipoxygenase 3. Biomacromolecules 2002;3:649.
10. Davies TS, Ketner AM, Raghavan SR. Self-assembly of surfactant vesicles that transform into viscoelastic wormlike micelles upon heating. J Am Chem Soc 2006;128:6669.
11. Imura T, Yanagishita H, Ohira J, Skai H, Abe M, Kitamoto D. Thermodynamically stable vesicle formation from glycolipid biosurfactant sponge phase. Colloids Surf B Biointerfaces 2005;43:115.
12. Hope MJ, Bally MB, Mayer LD, Janoff AS, Cullis PR. Generation of multilamellar and Unilamellar phospholipid vesicles. Chem Phys Lipids 1986;40:89.
13. Jung HT, Coldren B, Zasadzinski JA, Lampietro DJ, Kaler EW. The origins of stability of spontaneous vesicles. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:1353.
14. Courbin L, Panizza P. Shear-induced formation of vesicles in membrane phases: kinetics and size selection mechanism, elasticity versus surface tension. Phys Rev E 2004;69:021504.

15. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13:238.
16. Kim S, Jacobs RE, White SH. Preparation of multilamellar vesicle of defined size-distribution by solvent-spherule evaporation. *Biochim Biophys Acta* 1985;812:793.
17. Hunter DG, Frisken BJ. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. *Biophys J* 1998;74:2996.
18. Maguire LA, Zhang H, Shamlou PA. Preparation of small unilamellar vesicles (SUV) and biophysical characterization of their complexes with poly-L-lysine-condense plasmid DNA. *Biotechnol Appl Biochem* 2003;37:73.
19. Hamilton RL, Goerke JJ, Guo LSS, Williams MC, Havel RJ. Unilamellar liposomes made with French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. *J Lipid Res* 1980;21:981.
20. Batzri S, Korn E. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim Biophys Acta* 1973;298:1015.
21. Pidgeon C, McNeely S, Schmidt TS, Johnson JE. Multilayered vesicles prepared by reversephase evaporation: liposome structure and optimum solute entrapment. *Biochemistry* 1987;26:17.
22. Schubert R. Liposome preparation by detergent removal. *Methods Enzymol* 2003;367:46.
23. Segota S, Tezak Đ. Spontaneous formation of vesicles. *Adv Colloid Interface Sci* 2006;121:51.
24. Camelo S, Lajavardi L, Bochot A, Goldenberg B, Naud MC, Brunel N. Protective effect of intravitreal injection of vasoactive intestinal peptide-loaded liposomes on experimental autoimmune uveoretinitis. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25:9.
25. Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *J Liposome Res* 2008;18:309.
26. Vuilleumard JC. Recent advances in the large-scale production of lipid vesicles for use in food products: microfluidization. *J Microencapsul* 1991;8:547.
27. Lasic DD. Chapter 10: applications of liposomes. *Handbook Biol Phys* 1995;1:491.
28. Discher DE. Polymersomes. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8:323.

29. Christian DA, Cai S, Bowen DM, Kim Y, Pajeroski JD, Discher DE. Polymersome carriers: from self assembly to siRNA and protein therapeutics. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;71:463.
30. Tokarczyk KK, Grumelard J, Haefele T, Meier W. Block copolymers vesicles-using concepts from polymer chemistry to mimic biomembranes. *Polymers* 2005;46:3540.
31. Ghoroghchian PP, Li G, Levine DH, Davis KP, Bates FS, Hammer DA, et al. Bioresorbable vesicles formed through spontaneous self-assembly of amphiphilic poly (ethylene oxide)-block-polycaprolactone. *Macromolecules* 2006;39:1673.
32. Christian NA, Milone MC, Ranka SS, Li G, Frail PR, Davis KP, et al. Tat-functionalized near-infrared emissive polymersomes for dendritic cell labelling. *Bioconjug Chem* 2007;18:31.
33. Kapakoglou NI, Giokas DL, Tsogas GZ, Vlessidis AG. Coacervation of surface-functionalized polymerized vesicles derived from ammonium bromide surfactants. Applications to the selective speciation of chromium in environmental samples. *Anal Chem* 2008;80:9787.
34. Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J Polym Sci Polym Symp* 1975;51:135.
35. Grover GN, Maynard HD. Protein-polymer conjugates: synthetic approaches by controlled radical polymerizations and interesting applications. *Curr Opin Chem Biol* 2010;14:818.
36. Canalle LA, Lowik D, Van-Hest JCM. Polypeptide-polymer bioconjugates. *Chem Soc Rev* 2010;39:329.
37. Duncan R, Vicent MJ, Greco F, Nicholson RI. Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:S189.
38. Haag R, Kratz F. Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew Chem Int Ed* 2006;45:1198.
39. Vicent MJ, Duncan R. Polymer conjugates: nanosized medicines for targeting cancer. *Trends Biotechnol* 2006;24:39.
40. Duncan R, Ringsdorf H, Satchi-Fainaro R. Polymer therapeutics: polymer as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery: past, present and future opportunities. *Adv Polym Sci* 2006;192:1.

41. Wang YS, Youngster S, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss D. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon- α -2b and its therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:547.
42. Molineux G. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta). *Curr Pharm Des* 2004;10:1235.
43. Langer CJ, Socinski MA, O'Byrne KJ. Paclitaxel polyglumex (PPX)/carboplatin vs paclitaxel/carboplatin for treatment of PS2 patients with chemotherapy-naïve advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase III study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005;96:7011.
44. Sigh P. Dendrimers and their applications in immunoassays and clinical diagnosis. *Biotechnol Appl Biochem* 2007;48:1.
45. Kobayashi H, Kawamoto S, Jo SK, Bryant HL, Brechbiel MW, Star RA. Macromolecular MRI contrast agents with small dendrimers: pharmacokinetic differences between sizes and cores. *Bioconjug Chem* 2003;14:388.
46. Gillies ER, Fréchet JM. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov Today* 2005;10:35.
47. Wu G, Barth RF, Yang W, Chatterjee M, Tjarks W, Ciesielski MJ, et al. Site-specific conjugation of boron-containing dendrimers to anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225) and its evaluation as potential delivery agent for neutron capture therapy. *Bioconjug Chem* 2004;15:185.
48. Dufes C, Uchegbu IF, Schatzlein AG. Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:2177.
49. Oliveira JM, Salgado AJ, Sousa N, Mano JF, Reis RL. Dendrimers and derivatives as potential therapeutic tool in regenerative medicine strategies—a review. *Prog Polym Sci* 2010;35:1163.
50. Karakhanov EA, Maximov AL, Skorkin VA, Zolotukhina AV, Smerdov AS, Tereshchenko AY. Nanocatalysis based on dendrimers. *Pure Appl Chem* 2013;2009:81.
51. Tanaka K, Inafuku K, Naka K, Chujo Y. Enhancement of entrapping ability of dendrimers by a cubic silsesquioxane core. *Org Biomol Chem* 2008;6:3899.
52. Kim D, Kim E, Lee J, Hong S, Sung W, Lim N, et al. Direct syntheses of polymer nanocapsules: self-assembly of polymer hollow spheres through irreversible covalent bond formation. *J Am Chem Soc* 2010;132:9908.

53. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine* 2006;2:8.
54. Moraes CM, de Matos AP, de Paula E, Rosa AH, Fraceto LF. Benzocaine loaded biodegradable poly-(d, l-lactide-co-glycolide) nanocapsules: factorial design and characterization. *Mater Sci Eng B* 2009;165:243.
55. Moraes CM, de Matos AP, Grillo R, de Melo NF, de Paula E, Dias Fiho NL, et al. Screening of formulations variables for the preparation of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing the local anesthetic benzocaine. *J Nanosci Nanotechnol* 2011;11:2450.
56. Olvera-Martínez BI, Ca´zares-Delgadillo J, Calderilla-Fajardo SB, Villalobos-Garcia R, Ganem-Quintanar A, Quintanar-Guerrero D. Penetration of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum. *J Pharm Sci* 2005;94:1552.
57. Garti N, Bisperink C. Double emulsions: progress and applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 1998;3:657.
58. Zhu Y, Zhang G, Yang H, Hong X. Influence of surfactants on the parameters of polylactide nanocapsules containing insulin. *J Surfactants Deterg* 2005;8:353.
59. Khoee S, Yaghoobian M. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *Eur J Med Chem* 2009;44:2392.
60. Liu J, Qiu Z, Wang S, Zhou L, Zhang S. A modified double-emulsion method for the preparation of daunorubicin-loaded polymeric nanoparticles with enhanced in vitro anti-tumor activity. *Biomed Mater* 2010;5:065002.
61. Donath E, Sukhorukov GB, Caruso F, Davis SA, Mo´hwald H. Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes. *Angew Chem Int* 1998;37:2202.
62. Caruso F, Caruso RA, Mo´hwald H. Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating. *Science* 1998;282:1111.
63. Reibetanz U, Claus C, Typlt E, Hofmann J, Donath E. Defoliation and plasmid delivery with layer-by-layer coated colloids. *Macromol Biosci* 2006;6:153.

64. Gao C, Moya S, Lichtenfeld H, Casoli A, Fiedler H, Donath E, et al. The decomposition process of melamine formaldehyde cores: the key step in the fabrication of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules. *Macromol Mater Eng* 2001;286:355.
65. Gao C, Moya S, Donath E, M \ddot{u} hlwald H. Melamine formaldehyde core decomposition as the key step controlling capsule integrity: optimizing the polyelectrolyte capsule fabrication. *Macromol Chem Phys* 2002;203:953.
66. Caruso F, Yang W, Trau D, Renneberg R. Microencapsulation of uncharged low molecular weight organic materials by electrolyte multilayer self-assembly. *Langmuir* 2000;16:8932.
67. Park MK, Xia C, Advincula RC, Schu \ddot{u} tz P, Caruso F. Cross-linked, luminescent spherical colloidal and hollow-shell particles. *Langmuir* 2001;17:7670.
68. Yu AM, Wang Y, Barlow E, Caruso F. Mesoporous silica particles as templates for preparing enzyme-loaded biocompatible microcapsules. *Adv Mater* 2005;17:1737.
69. Gittins DI, Caruso F. Multilayers polymer nanocapsules derived from gold nanoparticles templates. *Adv Mater* 1947;2000:12.
70. Cuomo F, Lopez F, Miguel MG, Lindman B. Vesicle-templated layer-by-layer assembly for the production of nanocapsules. *Langmuir* 2010;26:10555.
71. Georgieva R, Moya S, Hin M, Mitlo \ddot{h} ner R, Donath E, Kiesewetter H, et al. Permeation of macromolecules into polyelectrolyte microcapsules. *Biomacromolecules* 2002;3:517.
72. Balabushevitch NG, Sukhorukov GB, Moroz NA, Volodkin DV, Larionova NI, Donath E, et al. Encapsulation of proteins by layer-by-layer adsorption of polyelectrolytes onto protein aggregates: factors regulating the protein release. *Biotechnol Bioeng* 2001;76:207.
73. Volodkin DV, Petrov AI, Prevot M, Sukhorukov GB. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation. *Langmuir* 2004;20:3398.
74. Zhu Y, Shi J, Shen W, Dong X, Feng J, Ruan M, et al. Stimuli-responsive controlled drug release from a hollow mesoporous silica sphere/polyelectrolyte multilayer core-shell structure. *Angew Chem Int Ed* 2005;44:5083.
75. Khopade AJ, Caruso F. Surface-modification of polyelectrolyte multilayer coated particles for biological applications. *Langmuir* 2003;19:6219.

76. Heuberger R, Sukhorukov GB, Voïro's J, Textor M, Moïhwald H. Biofunctional polyelectrolyte multilayers and micro capsules: control of non-specific and biospecific protein adsorption. *Adv Funct Mater* 2005;15:357.
77. Moya S, Donath E, Sukhorukov GB, Auch M, Baïumlner H, Lichtenfeld H, et al. Lipid coating on polyelectrolyte surface modified colloidal particles and polyelectrolyte capsules. *Macromolecules* 2000;33:4538.
78. Zhao Q, Mao Z, Gao C, Shen J. Assembly of multilayer microcapsules on CaCO₃ particles from biocompatible polysaccharides. *J Biomater Sci Polym Ed* 2006;17:997.
79. Balkundi SS, Veerabadran NG, Matthew ED, Johnson GR, Lvov YM. Encapsulation of bacterial spores in nanoorganized polyelectrolyte shells. *Langmuir* 2009;25:14011.
80. Angelatos AS, Radt B, Caruso F. Light responsive polyelectrolyte/gold nanoparticle microcapsules. *J Phys Chem B* 2005;109:3071.
81. Zelikin A, Quinn JF, Caruso F. Disulfide cross-linked polymer capsules: en route to biodeconstructible systems. *Biomacromolecules* 2006;7:27.
82. Antipov AA, Sukhorukov GB, Donath E, Moïhwald H. Sustained release properties of polyelectrolyte multilayer capsules. *J Phys Chem B* 2001;105:2281.
83. Delcea M, Moïhwald H, Skirtach AG. Stimuli responsive LbL capsules and nanoshells for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:730–47.
84. Wang Z, Feng Z, Gao C. Stepwise assembly of the same poly electrolytes using host-guest interaction to obtain microcapsules with multiresponsive properties. *Chem Mater* 2008;20:4194.
85. Liu X, Gao C, Shen J, Moïhwald H. Multilayer microcapsules as anti-cancer drug delivery vehicle. Deposition, sustained release, and in vitro bioactivity. *Macromol Biosci* 2005;5:1209.
86. Itoh Y, Matsusaki M, Kida T, Akashi M. Enzyme-responsive release of encapsulated proteins from biodegradable hollow capsules. *Biomacromolecules* 2006;7:2715.
87. Urbina MC, Zinoveva S, Miller T, Sabilov CM, Monroe WT, Kumer CSSR. Investigation of magnetic nanoparticles-polymer composites for multiple-controlled drug delivery. *J Phys Chem C* 2008;112, 11102.
88. Delmas T, Couffin AC, Bayle PA, de Crécy F, Neumann E, Vinet F, Bardet M, Bibette J, Texier I. Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *J Colloid Interface Sci.* 2011. 15;360, 471-81.

89. Rosiak, J. M. & Yoshii, F. (1999) Hydrogels and their medical applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 151, 56-64.
90. Nho, Y.-C., Park, S.-E., Kim, H.-I. & Hwang, T.-S. (2005) Oral delivery of insulin using pHsensitive hydrogels based on polyvinyl alcohol grafted with acrylic acid/methacrylic acid by radiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 236 283–288.
91. Jarry, C., Leroux, J. C., Haeck, J. & Chaput, C. (2002) Irradiating or autoclaving chitosan/polyol solutions: Effect on thermogelling chitosan-beta-glycerophosphate systems. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 50, 1335-1340.
92. Aikawa, K., Matsumoto, K., Uda, H., Tanaka, S., Shimamura, H., Aramaki, Y. & Tsuchiya, S.(1998) Hydrogel formation of the pH response polymer polyvinylacetal diethylaminoacetate (AEA). *International Journal of Pharmaceutics* 167, 97-104.
93. Aouada, F. A., de Moura, M. R., Fernandes, P. R. G., Rubira, A. F. & Muniz, E. C. (2005) Optical and morphological characterization of polyacrylamide hydrogel and liquid crystal systems. *European Polymer Journal* 41, 2134-2141.
94. El Fray, M., Pilaszkievicz, A., Swieszkowski, W. & Kurzydowski, K. J. (2007) Morphology assessment of chemically modified cryostructured poly(vinyl alcohol) hydrogel. *European Polymer Journal* 43, 2035-2040.
95. Pourjavadi, A. & Kurdtabar, M. (2007) Collagen-based highly porous hydrogel without any porogen: Synthesis and characteristics. *European Polymer Journal* 43, 877-889.
96. Lazareva, T. G. & Vashuk, E. V. (1995) Features of rheological and electrophysical properties of compositions based on polyvinyl alcohol and carboxymethylcellulose. *Mechanics of Composite Materials* 31, 524-532.
97. Singh, B. & Vashishth, M. (2008) Development of novel hydrogels by modification of sterculia gum through radiation cross-linking polymerization for use in drug delivery. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 266 2009-2020.
98. Janik, I., Kasprzak, E., Al-Zier, A. & Rosiak, J. M. (2008) Radiation crosslinking and scission parameters for poly(vinyl methyl ether) in aqueous solution. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 208, 374-379.
99. Rosiak, J. M. (1998) Gel / sol analysis of irradiated polymers. *Radiation Physics and Chemistry* 51, 13-17.

100. Wach, R. A., Mitomo, H., Nagasawa, N. & Yoshii, F. (2003b) Radiation crosslinking of methylcellulose and hydroxyethylcellulose in concentrated aqueous solutions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 211, 533-544.
101. Xu, G. Y., Chen, A. M., Liu, S. Y., Yuan, S. L. & Wei, X. L. (2002) Effect of C12NBr on the viscoelasticity of gel containing xanthan gum/Cr(III). *Acta Physico-Chimica Sinica* 18, 1043-1047.
102. Hoare, T. R. & Kohane, D. S. (2008) Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 49, 1993-2007.
103. Benamer, S., Mahlous, M., Boukrif, A., Mansouri, B. & Youcef, S. L. (2006) Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly(vinyl pyrrolidone). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 248 284–290.
104. Rosiak, J. M., Ulanski, P. & Rzeinicki, A. (1995) Hydrogels for biomedical purposes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 105, 335-339.
105. Phillips, G. O., Plessis, T. A. D., SaphwanAl-Assaf & Williams, P. A. (2005) Biopolymers obtained by solid state irradiation in an unsaturated gaseous atmosphere, Vol. 6,841644, (ed. U. S. Patent), Phillips hydrocolloid research Limited, UK, USA.
106. Jeremic, K., Markov, S., Pekic, B. & Jovanovic, S. (1999) The influence of temperature and inorganic salts on the rheological properties of xanthan aqueous solutions. *Journal of the Serbian Chemical Society* 64, 109-116.
107. Yoshii, F. & Kume, T. (2003) Process for producing crosslinked starch derivatives and crosslinked starch derivatives produced by the same, Vol. 6,617,448, (ed. U. S. Patent), Japan Atomic Energy Research Institute (Tokyo, JP), USA.
108. Zhao, L., Mitomo, H., Zhai, M. L., Yoshii, F., Nagasawa, N. & Kume, T. (2003b) Synthesis of antibacterial PVA/CM-chitosan blend hydrogels with electron beam irradiation. *Carbohydrate Polymers* 53, 439-446.
109. Khoylou, F. & Naimian, F. (2009) Radiation synthesis of superabsorbent polyethylene oxide/tragacanth hydrogel. *Radiation Physics and Chemistry* 78, 195-198.
110. Razzak, M. T., Darwis, D., Zainuddin & Sukirno. (2001) Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogel for wound dressing. *Radiation Physics and Chemistry* 62, 107-113.

111. Palumbo, F. S., Pitarresi, G., Mandracchia, D., Tripodo, G. & Giammona, G. (2006) New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: Synthesis and characterization. *Carbohydrate Polymers* 66, 379-385.
112. Onuki, Y., Nishikawa, M., Morishita, M. & Takayama, K. (2008) Development of photocrosslinked polyacrylic acid hydrogel as an adhesive for dermatological patches: Involvement of formulation factors in physical properties and pharmacological effects. *International Journal of Pharmaceutics* 349, 47-52.
113. Yang, D., Zhang, J. Z., Fu, S., Xue, Y. & Hu, J. Evolution process of polymethacrylate hydrogels investigated by rheological and dynamic light scattering techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 353, 197-203.
114. Fei, B., Wach, R. A., Mitomo, H., Yoshii, F. & Kume, T. (2000) Hydrogel of biodegradable cellulose derivatives. I. Radiation-induced crosslinking of CMC. *Journal of Applied Polymer Science* 78, 278-283.
115. Liu, P., Zhai, M., Li, J., Peng, J. & Wu, J. (2002b) Radiation preparation and swelling behavior of sodium carboxymethyl cellulose hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry* 63 525–528.
116. Nho, Y.-C. & Lee, J.-H. (2005) Reduction of postsurgical adhesion formation with hydrogels synthesized by radiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 236 277–282.
117. Funami, T., Hiroe, M., Noda, S., Asai, I., Ikeda, S. & Nishimari, K. (2007) Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations. *Food Hydrocolloids* 21, 617-629.
118. Bajpai, A. K., Shukla, S. K., Bhanu, S. & Kankane, S. (2008) Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* 33, 1088-1118.
119. Zhao, Q. S., Ji, Q. X., Xing, K., Li, X. Y., Liu, C. S. & Chen, X. G. (2009) Preparation and characteristics of novel porous hydrogel films based on chitosan and glycerophosphate. *Carbohydrate Polymers* 76, 410-416.
120. Esteban, C. & Severian, D. (2000) Polyionic hydrogels based on xanthan and chitosan for stabilising and controlled release of vitamins, Vol. WO0004086 (A1) (ed. U. United States Patent), Kemestrie Inc [CA], USA.

121. Williams, P. A. & Phillips, G. O. (2006) Physicochemical characterisation of gum Arabic arabinogalactan protein complex. *Food and Food Ingredients Journal of Japan* 211, 181- 188.
122. Islam, A. M., Phillips, G. O., Slijivo, A., Snowden, M. J. & Williams, P. A. (1997) A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocolloids* 11, 493-505.
123. *Frontiers of Nanoscience*, Vol. 4. 2002
124. Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals—special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;78:1.
125. Horn D, Rieger J. Organic nanoparticles in aqueous phase—theory, experiment, and use. *Angew Chem Int Ed* 2001;40:4330.
126. Praveen Thoniyot , Mein Jin Tan , Anis Abdul Karim , David James Young , and Xian Jun Loh. Nanoparticle–Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials. *Adv. Sci.* 2015, 2, 1.
127. Elisa Pedone, Xiongwei Li, Neli Koseva, Oya Alpar et Steve Brocchini. An information rich biomedical polymer library. *Journal of Materials Chemistry*, vol. 13, no 11, 2003, 2825-2837.
128. Thèse N. Dendane. Mise au point d'une méthode de fonctionnalisation de microcomposants par voie photochimique. Université Joseph Fourier (Grenoble) 2007.
129. Kumar R. Bhushan, Charles DeLisia and Richard A. Laursen. Synthesis of photolabile 2-(2-nitrophenyl) propyloxycarbonyl-protected amino acids. *Tetrahedron Letters* 44 (2003) 8585–8588.
130. P. Nagy. Kinetics and Mechanisms of Thiol–Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways. *Antioxid Redox Signal.* 2013 ; 1; 18(13): 1623–1641.
131. Mohamad-Ali Tehfe, Shovan Mondal, Malek Nechab, Frédéric Dumur, Michèle P. Bertrand, Bernadette Graff, Didier Gigmes, Jean-Pierre Fouassier and Jacques Lalevée. New Thiols for Photoinitiator-Free Thiol-Acrylate Polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics*. Volume 214, Issue 12, pages 1302–1308, 25, 2013.

132. G. P. Raeber, M. P. Lutolf, and J. A. Hubbell. Molecularly Engineered PEG Hydrogels: A Novel Model System for Proteolytically Mediated Cell Migration. *Biophysical Journal* Volume 89 August 2005 1374–1388.
133. Specht A, Ursby T, Ursby M. Cryophotolysis of ortho-Nitrobenzyl Derivatives of Enzyme Ligands for the Potential Kinetic Crystallography of Macromolecules. *CHEMBIOCHEM* 2001, 11, 845-848.
134. Soumitra S. Ghosh, Philip M. Kao, Ann W. McCue, Hugh L. Chappelle. Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes. *Bioconjugate Chem.*, 1990, 1, pp 71–76.
135. Aujard I, Benbrahim C, Gouget M. o-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups with Red-Shifted Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-Sections for One- and Two-Photon Excitation. *Chem. Eur. J.* 2006, 12, 6865 – 6879.