



**HAL**  
open science

# Hydrogels injectables à base d'acide hyaluronique comme nouveaux biomatériaux pour la reconstruction osseuse : synthèse et caractérisations

Agathe Béline

► **To cite this version:**

Agathe Béline. Hydrogels injectables à base d'acide hyaluronique comme nouveaux biomatériaux pour la reconstruction osseuse : synthèse et caractérisations. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV057 . tel-01556405

**HAL Id: tel-01556405**

**<https://theses.hal.science/tel-01556405>**

Submitted on 5 Jul 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 L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Sciences des polymères**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Agathe BÉLIME**

Thèse dirigée par **Rachel AUZÉLY**

Codirigée par **Nadia EL-KISSI**

préparée au sein du **Centre de Recherche sur les  
Macromolécules Végétales (CERMAV)**  
dans l'**École Doctorale de chimie et sciences du vivant  
(EDCSV)**

# Hydrogels injectables à base d'acide hyaluronique comme nouveaux biomatériaux pour la reconstruction osseuse. Synthèse et caractérisations.

Thèse soutenue publiquement le **12 juillet 2013**

devant le jury composé de :

**M. Alain DURAND**

Professeur (INPL Nancy), Rapporteur

**M. Daniel GRANDE**

Chargé de recherche CNRS (ICMPE Paris-est), Rapporteur

**Mme Rachel AUZÉLY**

Professeur (UJF Grenoble), Directeur de thèse

**Mme Nadia EL-KISSI**

Directeur de recherche CNRS (LR Grenoble), Co-directeur de thèse

**Mme Christèle COMBES**

Professeur (ENSIACET Toulouse), Membre

**M. Marc BLOCK**

Professeur (UJF Grenoble), Président



# Introduction générale

La population vieillissante, l'augmentation de maladies dégénératives de l'os comme l'ostéoporose et d'accidents dus aux changements des conditions de vie du XX<sup>ème</sup> siècle ont conduit à une augmentation drastique du nombre de fractures et traumatismes de l'os, particulièrement dans les pays industrialisés où c'est devenu un problème de santé publique. Lorsque l'os d'un patient est manquant, défectueux ou s'il est atteint d'une maladie, la médecine a recours soit à des greffes osseuses, soit à des substituts afin de faciliter la réparation du tissu. L'autogreffe, qui consiste à transférer du tissu osseux d'un site à un autre sur un même patient, reste aujourd'hui la solution la plus efficace en termes de réparation osseuse. Cependant, la chirurgie qu'elle implique s'avère pénible et douloureuse et présente un risque d'infection important ajoutés un coût élevé. De plus, la quantité d'os disponible est limitée et, dans le cas de patient âgés surtout, sa qualité peut être altérée. La demande de substituts osseux est donc en constante augmentation et ce domaine représente un marché économique important. Dans la cadre de la chirurgie mini-invasive, les matériaux injectables sont une alternative attractive car ils améliorent grandement le confort du patient en réduisant le temps de l'opération et d'hospitalisation, le risque d'infection et les douleurs post-opératoires.

Les progrès réalisés dans la recherche fondamentale ces dernières décennies ont conduit à une augmentation considérable de la qualité des matériaux de substitution osseuse. En effet, la performance biologique souhaitée d'un biomatériau est passé d'un rôle passif, où son seul objectif est d'être accepté par le corps (c'est-à-dire qu'il ne doit pas déclencher de réponse immunitaire chez l'hôte), à un rôle actif dans lequel il interagit et instruit son environnement biologique, par exemple en y incorporant des molécules spécifiques impliquées dans certains processus biologiques. Ainsi, un biomatériau ne doit plus se contenter d'être inerte mais doit aussi être bioactif, c'est-à-dire entraîner une réponse positive en favorisant les interactions matériau-cellules pour faciliter la réparation tissulaire.

Les matériaux de substitution osseuse sont traditionnellement basés sur les biocéramiques. Celles-ci peuvent être optimisées en termes de composition, structure et porosité et ont démontré de très bonnes propriétés en termes de biocompatibilité et ostéoconductivité. Cependant, elles présentent de faibles propriétés mécaniques et se

dégradent trop lentement. Ainsi, les efforts se tournent aujourd'hui de plus en plus vers les polymères pour leur grande polyvalence. On les retrouve sous différentes formes : substitut polymère solide, mélangés avec des céramiques pour l'obtention de matériaux composites, éponge, hydrogel. Les hydrogels sont une alternative émergente et pertinente car leurs propriétés leur confèrent une viscoélasticité proche de celle des tissus biologiques et fournissent un microenvironnement physiologique approprié pour l'encapsulation de cellules. La recherche d'interactions biologiques entre le biomatériau et les cellules a encouragé l'utilisation de polymères d'origine naturelle et la modification chimique des substrats avec des motifs de reconnaissance cellulaire spécifiques.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail a été l'élaboration de biomatériaux biomimétiques à base d'acide hyaluronique (HA) pour la régénération osseuse. En effet, de par sa présence naturelle dans le corps humain et ses multiples possibilités de modification chimique pour la réticulation ou le greffage de molécules d'intérêt, le HA possède un fort potentiel pour l'élaboration d'hydrogels pour l'ingénierie tissulaire. Ces recherches ont été effectuées au sein de l'équipe « structure et modification des polysaccharides » au centre de recherche des macromolécules végétales (Cermav-CNRS), dans le cadre d'un projet ANR visant à élaborer de nouveaux ciments composites comme biomatériau pour la reconstruction osseuse. Notre rôle dans le projet ANR était d'élaborer un adjuvant biocompatible, qui thermogélifie à 37°C pour assurer la cohésion de la pâte dans le corps humain, et qui favorise l'adhésion et le développement de cellules osseuses.

La première étape de ce travail a été de développer une méthode de modification chimique simple et efficace de l'acide hyaluronique. Afin de pouvoir lui greffer simultanément un polymère thermogélifiant conférant les propriétés physiques requises et différents peptides d'adhésion cellulaire pour les propriétés biologiques, nous nous sommes inspirés de la chimie « clic » qui permet une haute sélectivité et de hauts rendements dans des conditions douces. Nous avons mis au point une méthode de couplage qui nous a permis de greffer de façon quantitative différentes molécules d'intérêts aux propriétés variables. Nous avons ensuite sélectionné des peptides d'adhésion cellulaire et un polymère thermosensible afin de les greffer au HA. Ces produits ont ensuite été caractérisés par rhéologie et dépôt de cellules.

Le premier chapitre de ce manuscrit situe ce travail dans son contexte bibliographique. Dans une première partie nous nous intéresserons au tissu osseux, notamment les cellules et la

matrice extracellulaire qui le constituent, afin de mieux comprendre les caractéristiques que doit présenter un biomatériau sensé le mimer. Nous présenterons ensuite les différents polymères utilisés pour la fabrication d'hydrogels injectables, notamment les polymères naturels, ainsi que leur fonctionnalisation avec des peptides d'adhésion cellulaire, notamment la séquence RGD. La dernière partie s'intéressera plus particulièrement aux quelques exemples d'hydrogels fonctionnalisés avec des peptides spécifiques au tissu osseux trouvés dans la littérature.

Le second chapitre sera consacré à la méthode de modification chimique de l'acide hyaluronique mise au point. Il présente dans un premier temps le concept de « chimie clic » afin d'expliquer le choix de la méthode employée. Il s'agit d'un couplage entre un motif maléimide préalablement greffé sur la chaîne de HA et une fonction thiol présente sur la molécule à greffer. Des dérivés de HA linéaires et réticulés ont été obtenus et caractérisés. L'influence des conditions de réactions telles que les masses molaires ou les quantités de réactifs ont été étudiées.

La préparation d'hydrogels de HA comportant des peptides d'adhésion cellulaire spécifiques à l'os est étudiée dans le chapitre 3. La stratégie adoptée consiste à greffer ces peptides sur des gels supports de HA-méthacrylate photopolymérisables. Ces gels ont été mis au point au laboratoire parallèlement à ce travail et nous ont offert un support idéal pour des tests biologiques. Une deuxième partie du chapitre 3 est consacrée à la fonctionnalisation des extrémités d'un polymère thermosensible, le Pluronic F-127 avec des fonctions thiols. Des dérivés de HA thermosensibles ont alors été obtenus grâce à une méthode de greffage thiol-ène qui s'opère sous UV. Ces produits ont été étudiés par rhéologie.

Enfin, le dernier chapitre est consacré à la description des méthodes expérimentales générales utilisées et des différentes synthèses chimique mise au point au cours de ce travail.

# Sommaire

<b>I. Etude bibliographique</b>	<b>2</b>
<b>I.1. Le tissu osseux</b>	<b>2</b>
I.1.1 La matrice extracellulaire du tissu osseux	2
I.1.2 Les cellules constitutives de l'os	3
I.1.3 Le remodelage osseux	4
<b>I.2. Caractéristiques d'un biomatériau injectable destiné à l'os</b>	<b>5</b>
<b>I.3. Les hydrogels biodégradables et injectables pour l'ingénierie tissulaire</b>	<b>7</b>
I.3.1 Introduction	7
I.3.2 Matériaux	9
<b>I.4. Les polymères modifiés avec des peptides pour l'ingénierie tissulaire</b>	<b>20</b>
I.4.1 La séquence RGD pour l'adhésion cellulaire	21
I.4.2 Fonctionnalisation de polymères avec le peptide RGD	23
<b>I.5. Les hydrogels modifiés avec des peptides spécifiques à l'os.</b>	<b>27</b>
<b>I.6. Objectifs de la thèse</b>	<b>32</b>
<b>Références</b>	<b>33</b>
<b>II. Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »</b>	<b>47</b>
Introduction : la chimie clic	47
<b>II.1. Etude bibliographique : la chimie clic et ses applications à la modification chimique de l'acide hyaluronique</b>	<b>49</b>
II.1.1. Les réactions de chimie clic sans catalyseur	49
II.1.2. Applications à l'acide hyaluronique	55
<b>II.2. Modification chimique du HA par couplage thiol-maléimide</b>	<b>59</b>
II.2.1. Description de la stratégie de synthèse	61
II.2.2. Synthèse de dérivés HA-maléimide : mise en évidence du greffage de la fonction maléimide	62

II.2.3.	Synthèse de dérivés HA fonctionnels linéaires	69
II.2.4.	Systèmes réticulés : Etude cinétique	76
<b>Conclusion</b>		<b>77</b>
<b>Références</b>		<b>79</b>
<b>III.</b>	<b>Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse</b>	<b>84</b>
<b>Introduction</b>		<b>84</b>
<b>III.1.</b>	<b>Etude bibliographique</b>	<b>84</b>
III.1.1.	Les hydrogels de HA-méthacrylate	84
III.1.2.	Choix d'un polymère thermosensible : le Pluronic F127	85
<b>III.2.</b>	<b>Hydrogels chimiques de HA fonctionnalisés par des peptides comme système modèles pour études biologiques</b>	<b>88</b>
III.2.1.	Stratégie	88
III.2.2.	Caractérisation	90
III.2.3.	Etude biologique	93
<b>III.3.</b>	<b>Synthèse d'un HA thermogélifiant pour l'obtention d'hydrogels physiques</b>	<b>97</b>
III.3.1.	Fonctionnalisation du Pluronic® F127	97
III.3.2.	Synthèse d'un HA thermosensible injectable	104
III.3.3.	Caractérisation	106
III.3.4.	Etude biologique	113
<b>Conclusion et perspectives</b>		<b>115</b>
<b>Références</b>		<b>117</b>
<b>IV.</b>	<b>Partie expérimentale</b>	<b>122</b>
<b>IV.1</b>	<b>Produits chimiques et solvants</b>	<b>122</b>
<b>IV.2</b>	<b>Matériels et méthodes générales</b>	<b>123</b>
IV.2.1	Purifications	123
IV.2.2	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire	124
IV.2.3	Rhéologie	125
IV.2.4	Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	128
<b>IV.3</b>	<b>Synthèses</b>	<b>129</b>

IV.3.1	Synthèse du dérivé HA-maléimide et addition du thiol _____	129
IV.3.2	Synthèse du dérivé HA-penténoate et addition du thiol _____	131
IV.3.3	Fonctionnalisation du Pluronic F127 _____	133
<b>Références</b>	_____	<b>141</b>

# **Chapitre 1**

*Etude bibliographique*

<b>I.</b>	<b>Etude bibliographique</b>	<b>2</b>
<b>I.1.</b>	<b>Le tissu osseux</b>	<b>2</b>
I.1.1	La matrice extracellulaire du tissu osseux	2
	La matrice organique	2
	La phase minérale	2
I.1.2	Les cellules constitutives de l'os	3
I.1.3	Le remodelage osseux	4
<b>I.2.</b>	<b>Caractéristiques d'un biomatériau injectable destiné à l'os</b>	<b>5</b>
<b>I.3.</b>	<b>Les hydrogels biodégradables et injectables pour l'ingénierie tissulaire</b>	<b>7</b>
I.3.1	Introduction	7
I.3.2	Matériaux	9
	Les polymères synthétiques	9
	Les polymères naturels	12
	Les polymères d'origine protéique	12
	Les polysaccharides	16
<b>I.4.</b>	<b>Les polymères modifiés avec des peptides pour l'ingénierie tissulaire</b>	<b>20</b>
I.4.1	La séquence RGD pour l'adhésion cellulaire	21
I.4.2	Fonctionnalisation de polymères avec le peptide RGD	23
	Chimie	23
	Impact de la densité de peptide RGD sur le comportement cellulaire	26
<b>I.5.</b>	<b>Les hydrogels modifiés avec des peptides spécifiques à l'os.</b>	<b>27</b>
	Hydrogels de Polyéthylène glycol (PEG)	28
	Hydrogels d'oligo(poly(éthylène glycol) fumarate)(OPF)	29
	Hydrogels de Poly(lactide-co-éthylèneoxyde-co-fumarate)(PLEOF)	30
<b>I.6.</b>	<b>Objectifs de la thèse</b>	<b>32</b>
	<b>Références</b>	<b>33</b>

## **I. Etude bibliographique**

### **I.1. Le tissu osseux**

Les os du squelette humain sont constitués d'un tissu conjonctif dont la matrice extracellulaire présente la particularité de se calcifier, lui conférant ainsi sa structure rigide. Les os assurent plusieurs fonctions prépondérantes dans l'organisme : de par leur capacité à supporter des contraintes mécaniques, ils protègent nos organes internes et nous permettent de bouger. Le remodelage permanent du tissu osseux entraîne la libération ou le stockage de sels minéraux, contrôlant ainsi dans une large mesure le métabolisme phosphocalcique. De plus, c'est dans la moelle osseuse que sont produites les cellules (globules blancs et rouges) et plaquettes sanguines. Ce paragraphe présente la matrice extracellulaire et les cellules constitutives de l'os<sup>1</sup>.

#### **I.1.1 La matrice extracellulaire du tissu osseux**

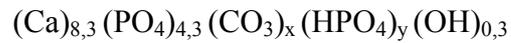
L'os est un matériau composite car sa matrice extracellulaire se compose d'une phase organique (environ 30% du volume de l'os) et d'une phase minérale (environ 43 %), le reste étant occupé par l'eau (25%, variable selon l'âge et le degré de minéralisation)<sup>2</sup>.

**La matrice organique** est composée à 90% de structures fibrillaires comprenant majoritairement du collagène de type I (97%), mais aussi du collagène de type V. Cette structure collagénique assure la viscoélasticité de l'os alors que le minéral qui se dépose à la surface et entre les fibres de collagène (parallèlement à celles-ci) est responsable de la rigidité du tissu. Les 10 % restant de la matrice organique englobent des glycosaminoglycanes, des protéoglycanes et des protéines non-collagéniques telles que l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine, la sialoprotéine osseuse et la thrombospondine. Il est probable que la composition exacte est plus complexe. En particulier, il existe dans cette matrice des facteurs de croissance qui jouent un rôle fondamental dans la régulation du remodelage osseux.

**La phase minérale** est constituée de cristaux d'hydroxyapatite (phosphate de calcium cristallisé) et de carbonate de calcium. Ces cristaux se situent entre les fibres de collagène et à

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

l'intérieur de celles-ci, sous la forme de petites aiguilles hexagonales. La composition moyenne du minéral osseux peut être représentée par la formule chimique suivante :



Avec  $x + y = 1,7$ , sachant que  $x$ , la teneur en carbonate augmente avec l'âge. La phase minérale contient 98 % du calcium du corps humain et joue un rôle primordial dans le métabolisme phosphocalcique. La minéralisation de la MEC rend compte de la dureté de l'os.

### I.1.2 Les cellules constitutives de l'os

Il existe 4 types de cellules osseuses. Elles peuvent être divisées en deux groupes :

- les cellules ostéoformatrices : les ostéoblastes, ostéocytes et cellules bordantes qui dérivent de cellules souches mésenchymateuses.
- les cellules ostéorésorbantes : les ostéoclastes qui dérivent de lignée hématopoïétique monocyttaire.

Les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules bordantes se trouvent à la surface du tissu osseux alors que les ostéocytes sont situés à l'intérieur de la matrice osseuse (cf. figure 1).

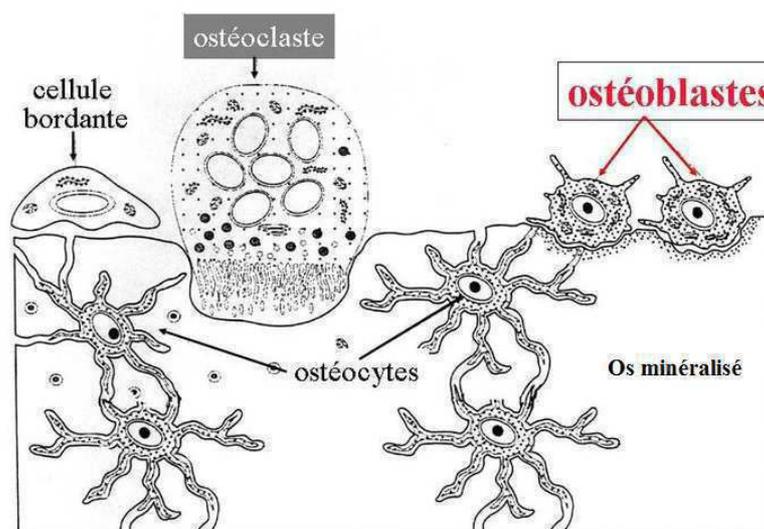


Figure 1<sup>1</sup> : Les cellules osseuses

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

Les **ostéoblastes** sont des cellules cubiques responsables de la formation du tissu osseux. Ils sont reliés entre eux et avec les ostéocytes par des jonctions communicantes. Lors de leur différenciation, les pré-ostéoblastes, qui deviennent progressivement des ostéoblastes matures, expriment différents facteurs (phosphatase alcaline, collagène de type I, ostéopontine, ostéocalcine, sialoprotéine osseuse) qui participent à la formation du tissu ostéoïde (la matrice organique de l'os) puis à sa minéralisation. Ils sont amenés à se différencier en ostéocytes ou en cellules bordantes de l'os, ou à être éliminés par apoptose.

Les **ostéocytes** sont des ostéoblastes différenciés incapables de se diviser, entièrement entourés par la MEC minéralisée. Ils siègent dans des ostéoplastes, d'où partent des prolongements cytoplasmiques reliés entre eux par des jonctions communicantes. Ils participent au maintien de la matrice osseuse.

Les **cellules bordantes** sont des ostéoblastes au repos capables, s'ils sont stimulés, de redevenir des ostéoblastes actifs. Ce sont des cellules aplaties et allongées qui revêtent les surfaces osseuses lorsqu'elles ne sont soumises ni à formation ni à résorption d'os.

Les **ostéoclastes** sont des cellules très volumineuses plurinucléées hautement mobiles issues de progéniteurs hématopoïétiques présents dans la moelle osseuse. Ils sont capables de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre. Les ostéoclastes matures sont des cellules polarisées capables de dégrader la matrice osseuse en sécrétant des acides organiques qui assurent la dissolution des minéraux osseux, ainsi que des enzymes qui vont digérer la matrice organique. Les lacunes laissées après l'action des ostéoclastes sont appelées « lacunes de Howship ».

### I.1.3 Le remodelage osseux

Le tissu osseux est en perpétuel remaniement. Ce remodelage est une succession de résorption et de formation de tissu opérée par les ostéoblastes et les ostéoclastes. Globalement, celui-ci s'opère en 5 phases<sup>1</sup> (cf. figure 2): La première **phase d'activation** débute par la rétraction des cellules bordantes de l'os afin de laisser l'accès aux ostéoclastes. Il s'ensuit alors le recrutement et la différenciation de cellules hématopoïétiques en pré-ostéoclastes qui, par fusion des uns avec les autres, deviennent des ostéoclastes plurinucléés qui peuvent alors entamer la **phase de résorption** de l'os. Survient ensuite une **phase**

**d'inversion** durant laquelle les ostéoclastes meurent par apoptose et sont remplacés par des macrophages qui lissent le fond de la lacune. Succède ensuite une **phase de formation** de tissu osseux au cours de laquelle les ostéoblastes présents à proximité de la matrice érodée se divisent et sécrètent des composants d'une MEC organique (collagène de type I, protéoglycanes, ostéocalcine) : l'ostéoïde. Une fois la matrice osseuse synthétisée, une partie des ostéoblastes subit alors un phénomène d'apoptose, le reste se laissant inclure dans la matrice qu'ils ont synthétisée pour devenir des ostéocytes.

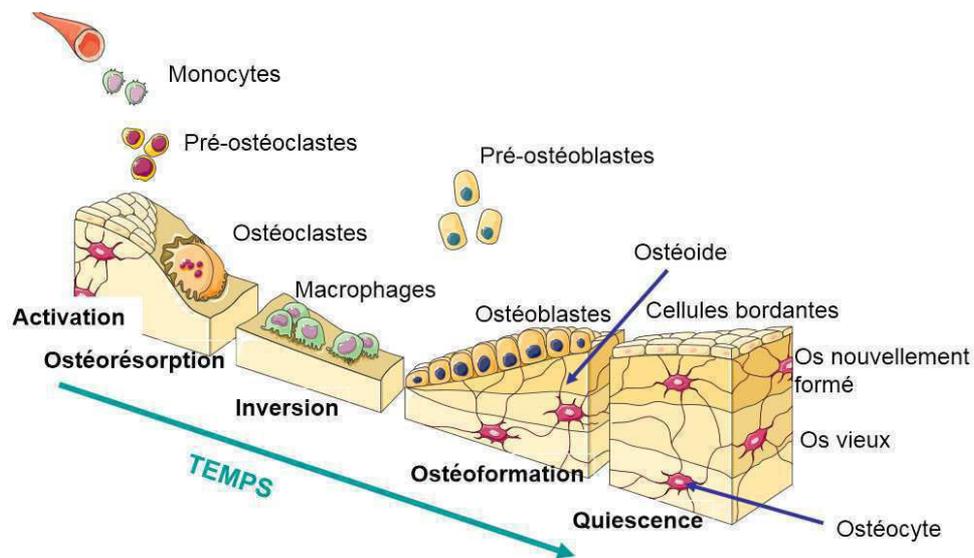


Figure 2<sup>3</sup> : le remodelage osseux.

## I.2. Caractéristiques d'un biomatériau injectable destiné à l'os

La **biocompatibilité** est la première exigence à remplir pour un biomatériau<sup>4,5</sup>. C'est sa capacité à supporter une activité cellulaire normale sans provoquer de réponse inflammatoire ni démontrer d'immunogénicité ou de cytotoxicité. Parce qu'il se dégrade *in vivo*, ceci doit être vrai non seulement pour le biomatériau intact et tous ces composants, mais aussi pour les produits issus de sa dégradation<sup>6</sup>.

Un substitut osseux idéal doit également favoriser l'**ostéoconduction**, c'est-à-dire l'adhésion, la prolifération et la fabrication de MEC par les cellules à sa surface et dans ses pores. Les propriétés de surface, chimiques et topologiques peuvent contrôler et affecter ce phénomène<sup>7</sup>. Les propriétés chimiques ont un impact sur la capacité des cellules à adhérer au

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

matériau ainsi que sur les interactions du matériau avec les protéines tandis que les propriétés topologiques jouent un rôle important concernant la migration des cellules. En effet, les cellules ostéogéniques migrent sur la surface du matériau à travers un caillot de fibrine établi juste après l'implantation du matériau. Il a été montré qu'une surface rugueuse emprisonne mieux la matrice de fibrine qu'une surface lisse, et facilite donc la migration des cellules ostéogéniques à la surface du matériau<sup>8</sup>.

On cherche également à stimuler l'**ostéoinduction**, processus par lequel les cellules souches et ostéoprogénitrices sont recrutées sur le site de réparation osseuse et stimulées pour subir une différenciation ostéogénique<sup>9</sup>. En effet, quand la portion d'os à réparer est grande, l'ostéoinduction naturelle combinée avec un substitut biodégradable peut s'avérer insuffisante.

Le biomatériau servant d'échafaudage aux cellules pour reconstruire le tissu, **la porosité** de sa structure doit être importante. Ses pores doivent être ouvertes et interconnectées afin de permettre une bonne diffusion des nutriments et gaz nécessaires à la survie des cellules et à l'élimination des déchets métaboliques résultant de leur activité. Ces pores permettent ainsi une bonne répartition des cellules au sein de la structure et facilitent la néo-vascularisation du tissu reconstruit<sup>10</sup>. La taille idéale des pores, spécifique à chaque type cellulaire<sup>11</sup>, se situe entre 200 et 900  $\mu\text{m}$ <sup>11-13</sup> et la présence d'une microporosité serait encore un plus. Cependant, une grande porosité affecte la stabilité mécanique du matériau, de telle sorte que celle-ci doit être adaptée aux propriétés mécaniques requises.

En effet, les **propriétés mécaniques** initiales du biomatériau sont particulièrement importantes pour les substituts osseux et doivent être aussi proches que possible de celles du tissu à régénérer. La résistance mécanique est principalement dépendante de la composition, du mode de fabrication et de la morphologie du biomatériau. A titre indicatif, le module d'Young de l'os cortical chez l'homme se situe entre 18 et 20 GPa et celui de l'os spongieux entre 70 et 80 MPa.

Le biomatériau doit également être **biorésorbable**, c'est-à-dire capable de subir une biodégradation qui aboutit à la disparition du matériau, les produits de dégradation étant éliminés par voie rénale ou métabolisés. Le substitut osseux idéal devrait être tel que la vitesse de dégradation de celui-ci soit égale à la vitesse de formation du nouveau tissu, de telle sorte que lorsque le site lésé est totalement régénéré, le substitut est totalement dégradé<sup>14</sup>.

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

Comme pour tous les matériaux implantables, un substitut osseux doit pouvoir être stérilisé. Cependant, la méthode de **stérilisation** ne doit pas interférer avec la bioactivité du matériau ou altérer sa composition chimique, ce qui pourrait au final affecter sa biocompatibilité ou ses propriétés de dégradation.

Enfin, les matériaux injectables doivent se mettre en place en quelques minutes afin de minimiser la longueur de la procédure, tout en laissant le temps suffisant aux chirurgiens pour l'injecter avant le durcissement. Leurs **propriétés viscoélastiques** sont donc de première importance pour un usage clinique, car elles influent sur l'injectabilité de la pâte, sa cohésion après injection et ses propriétés mécaniques après durcissement.

### **I.3. Les hydrogels biodégradables et injectables pour l'ingénierie tissulaire**

#### **I.3.1 Introduction**

Les hydrogels injectables à base de polymères sont une classe alternative émergente et physiologiquement pertinente de substrat pour le génie tissulaire. Ils possèdent une teneur importante en eau, proche de celles des tissus vivants, ainsi qu'un bon taux de transfert de masse. Ils permettent d'encapsuler des cellules de façon homogène et leurs propriétés physiques sont facilement modulables. Enfin, ils peuvent être délivrés de façon mini invasive. Les précurseurs de l'hydrogel, qui peuvent être chargés avec des facteurs de croissance et/ou des cellules spécifiques, sont injectés sur le site de la lésion où ils vont subir une transition « solution-to-gelation » (« sol-gel ») *in situ* due à des stimuli physiques ou chimiques. Le caractère injectable des hydrogels permet d'obtenir une distribution facile et homogène des cellules, tout en ayant un gel qui adopte la taille et la forme du site lésé. Les hydrogels hautement hydratés miment très bien l'environnement physique et chimique de la MEC et sont donc un microenvironnement idéal pour la prolifération et la différenciation cellulaire. Les cellules encapsulées se développent dans le gel et sécrètent une nouvelle MEC pour restaurer le tissu. La figure 3 décrit le procédé<sup>15</sup>.

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

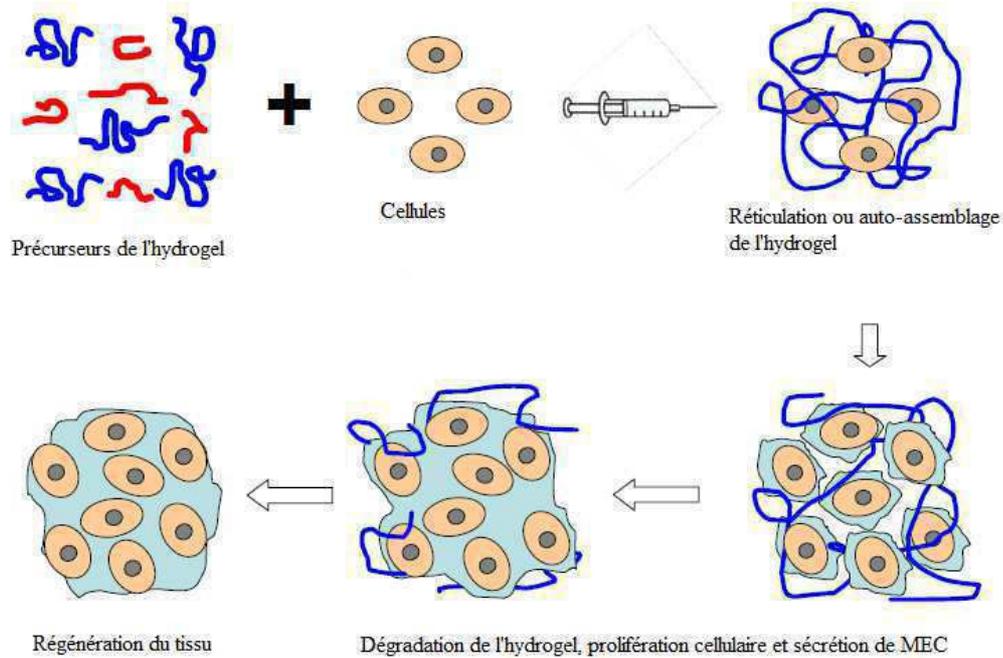


Figure 3<sup>15</sup> : Illustration schématique d'hydrogel injectable pour la régénération tissulaire. Les cellules sont isolées d'une biopsie, multipliées *in vitro*, et encapsulée avec les précurseurs de l'hydrogel, qui sont ensuite transplantés dans le patient par injection.

De nombreuses méthodes ont été employées pour la formation de gels injectables *in situ*. Selon leur mécanisme de gélification, les hydrogels peuvent être classés en 2 catégories :

- les hydrogels physiques, obtenus par auto-association physique entre les chaînes polymères (interactions hydrophobes, ioniques) sous l'effet d'un stimulus tel que la température ou le pH. Les plus courants sont les thermosensibles, stimulables en fonction de la température. Ils sont généralement obtenus en greffant un groupe thermosensible sur la chaîne principale du polymère.

- les hydrogels chimiques, obtenus par réticulation chimique (photopolymérisation par exemple) entraînant la création de liaisons covalentes entre les chaînes polymères.

La sélection de l'hydrogel approprié est gouvernée par<sup>16</sup> :

- Ses propriétés physiques, c'est-à-dire ses propriétés mécaniques et viscoélastiques, ses propriétés de dégradation mais aussi son mécanisme de formation. En effet, une caractéristique très recherchée est la possibilité de mélanger le polymère avec les cellules avant injection et formation du gel *in vivo*.

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

- Ses propriétés de transport de masse, c'est-à-dire sa capacité à transporter les gaz, nutriments, protéines et déchets de l'activité cellulaire dans ou en dehors de l'hydrogel. La taille du polymère ou son taux de réticulation, par exemple, peuvent affecter la structure poreuse du gel.

- Ses interactions biologiques spécifiques à chaque application.

### I.3.2 Matériaux

Au cours de la dernière décennie, de nombreux matériaux, d'origine naturelle ou synthétique ont été utilisés pour former des hydrogels injectables pour l'ingénierie tissulaire<sup>16-18</sup>. Les polymères synthétiques peuvent présenter des propriétés physiques et chimiques intéressantes tandis que les polymères naturels ont été largement étudiés pour leur excellente biocompatibilité. Cependant, une structure informationnelle favorable à une réponse biologique des cellules fait défaut aux polymères synthétiques, qui nécessitent donc généralement une modification supplémentaire.

#### Les polymères synthétiques

Les polymères synthétiques sont les plus utilisés dans le domaine de l'ingénierie biomédicale parce que leur chimie et leurs propriétés sont facilement contrôlables, reproductibles et donc prédictibles<sup>19-21</sup>. Ils peuvent être produits avec un poids moléculaire, une structure ou un lien dégradable spécifiques<sup>16</sup>. De plus, il est généralement plus facile de les produire à grande échelle que les polymères naturels<sup>22</sup>.

Parmi les hydrogels synthétiques, ceux à base de **polyéthylène glycol** (PEG) ont été abondamment étudiés et utilisés parce que ce polymère est approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) pour de nombreuses applications biomédicales<sup>23-25</sup>. Afin d'obtenir des hydrogels de PEG biodégradables, celui-ci a été copolymérisés avec de nombreux autres polymères biodégradables tels que l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA), le polypropylène fumarate (PPF)<sup>26-28</sup> ou

encore avec des polymères naturels tels que l'acide hyaluronique, la fibrine, le chitosane et l'héparine<sup>29-33</sup>.

Les polymères les plus fréquemment rencontrés pour les applications orthopédiques, approuvés par la FDA, sont les **polyesters aliphatiques saturés** notamment l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA) et leurs copolymères, les acides (polylactique-*co*-glycolique) ou encore la poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL)<sup>19,20,34</sup>. Ces polymères subissent une dégradation par hydrolyse de la liaison ester conduisant à des monomères pouvant être éliminés par voie naturelle, le corps contenant déjà un mécanisme régulé pour l'élimination totale des monomères d'acide lactique et glycolique. Cependant le relargage brusque des produits acides de dégradation peut causer une forte réponse inflammatoire<sup>35,36</sup>.

Un polyester linéaire insaturé dont les produits de dégradation sont aussi biocompatibles et facilement éliminables par l'organisme, a également été proposé : Le **polypropylène fumarate (PPF)**. La double liaison le long de la chaîne principale (cf. tableau 1) permet une photo-réticulation *in situ*, ce qui en fait un matériau modelable qui durcit en 10-15 minutes. Il n'est pas disponible commercialement et le contrôle de sa masse molaire ainsi que la préservation de la double liaison durant sa synthèse s'avèrent cruciales<sup>37</sup>. Il a été proposé comme phase polymère d'un composite injectable<sup>38</sup> ou comme substrat pour la culture d'ostéoblastes<sup>39</sup> mais il n'a pas été largement étudié, contrairement au PLA et PGA.

On rencontre aussi dans la littérature les **poly(hydroxyalcanoate) (PHA)**, des polyesters aliphatiques biosourcés produits par des bactéries. Les PHA, PHB (poly-3-hydroxybutyrate) et leurs copolymères<sup>40</sup> commencent à être largement utilisés comme biomatériaux destinés à l'os. Ils sont biodégradables par hydrolyse et démontrent une réponse favorable du tissu, sans réaction inflammatoire chronique indésirable. Un copolymère thermosensible (PEG/polypropylène glycol(PPG)/PHB) a notamment été synthétisé, présentant une température de transition sol-gel en solution aqueuse expliquée par un phénomène d'assemblage micellaire<sup>41,42</sup>. L'inconvénient majeur de ces matériaux est leur disponibilité limitée et la longueur de la procédure d'extraction depuis les cultures bactériennes qui représente un véritable challenge à l'échelle industrielle.

Les **polyanhydrides**, habituellement aromatiques, aliphatiques ou un mélange de 2 composants<sup>21</sup>, est la classe de polymères biodégradables la plus étudiée en détails. Ils sont biocompatibles et présentent d'excellentes propriétés notamment pour la libération contrôlée<sup>43</sup>.

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

Les **polyphosphazènes**, grâce à leurs propriétés physiques et chimiques d'ostéoconduction et de dégradation non-hasardeuse ont été étudié pour l'ingénierie tissulaire osseuse par Laurencin *et al.*<sup>44-46</sup>. Ils possèdent une chaîne principale alternant atomes d'azote et de phosphore à laquelle on peut ajouter une multitude de substituants pour en faire varier les propriétés finales. Ils sont biocompatibles et le choix des substituants de la chaîne principal permet de contrôler leur hydrolyse au cours du temps. Les produits de décomposition de ces polymères sont naturels et non toxiques.

Les différentes structures de ces polymères sont présentées dans le tableau 1.

Polymère	Structure	références
Polyéthylène glycol		
Polyesters aliphatiques saturés	Acide polylactique            Acide polyglycolique            Poly-ε-caprolactone	19,20,34,35,36
Polypropylène fumarate (PPF)	 Polypropylène fumarate (PPF)	37,38,39
Polyhydroxyalcanoate (PHA)	 Poly-(R)-3-hydroxybutyrate (P3HB), un polyhydroxyalcanoate	40
Polyanhydrides	 Polyanhydrides (R : groupe aromatique, aliphatique ou insaturé)	21, 47
Polyphosphazènes	 Polyphosphazènes	44-46

Tableau 1 : Les polymères synthétiques biodégradables pour l'ingénierie tissulaire osseuse

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

L'inconvénient majeur de ces polymères est qu'ils n'interagissent pas biologiquement avec les cellules. La recherche tend aujourd'hui à concevoir de nouveaux matériaux sophistiqués, qualifiés de « bio-inspirés », tentant d'imiter au mieux la MEC afin d'obtenir des substituts qui interagissent au mieux avec les systèmes biologiques.

### **Les polymères naturels**

Cette classe de polymère est largement utilisée pour leur similitude avec la matrice extracellulaire, leur haute versatilité chimique, leur bonne performance biologique, leur inhérente interaction avec les cellules et leur dégradabilité enzymatique contrôlable. Ces bio-caractéristiques classent les polymères d'origine naturelle comme l'une des options les plus attractives pour l'ingénierie tissulaire. Les polymères naturels comprennent les polymères d'origine protéique tels que le collagène, la gélatine, la fibrine et les polysaccharides tels que le chitosane, les alginates, l'amidon ou l'acide hyaluronique<sup>48</sup>. Ils sont en général utilisés comme hydrogel ou phase polymère injectable au sein d'un composite.

#### *Les polymères d'origine protéique*

Les polymères d'origine protéique ont l'avantage de mimer de nombreuses fonctionnalités de la matrice extracellulaire et de pouvoir guider la migration, la croissance et l'organisation des cellules durant la régénération du tissu. Ces polymères peuvent être produits par biosynthèse grâce à la technologie des protéines recombinantes.

#### Collagène

Le collagène est la protéine majeure composant la matrice extracellulaire de l'os. Dans son milieu d'origine, le collagène interagit avec les cellules dans les tissus conjonctifs et permet la transduction de signaux essentiels pour la régulation de l'ancrage des cellules, leur migration, prolifération, différenciation et survie<sup>49</sup>. Il en existe 27 sortes mais le collagène de

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

type 1 étant le plus abondant, il est aussi le plus étudié. Sa structure est composée de trois chaînes polypeptidiques agencées en triple hélice. Il confère aux tissus leur résistance mécanique à l'étirement. Il peut être dégradé par l'action d'enzymes spécifique telles que les collagénases ou métalloprotéinases<sup>50</sup>. Grâce à ces propriétés physico-chimiques, mécaniques et biologiques, il a été utilisé dans de nombreuses applications biomédicales. Le tableau 2 répertorie des exemples d'hydrogels à base de collagène pour l'ingénierie tissulaire.

Composition	Biomolécule active	Types de cellules encapsulées/déposées	Modèle animal	Réf.
Composite Collagène/hydroxyapatite	- Facteur de croissance des nerfs (NGF)	-	Défaut crânien du rat	51
Gel de collagène	- Protéine morphogénétique osseuse (BMP-2)	Cellules stromales de moelle osseuse (BMSC)	Muscle fémoral de souris	52
Hydrogel de collagène	facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)	-	Hypoderme de souris	53
Hydrogel de collagène I	- Facteur de croissance de transformation TGF- $\beta$ 1 - BMP-2	- Cellules souches mésenchymateuses humaines de moelle osseuse	-	54
Hydrogel de Collagène-hydroxyéthylméthacrylate	-	fibroblastes pulmonaires embryonnaires humaines	-	55

Tableau 2 : Exemples d'hydrogels de collagène pour l'ingénierie tissulaire.

Le collagène est en général extrait de tissus animaux puis rigoureusement purifié par traitement enzymatique afin d'éviter des problèmes de réactions aux corps étranger ou de contamination virale. L'alternative aux collagènes d'origine animale provenant des technologies recombinantes représente encore un coût très élevé.

### Fibrine

La fibrine est une protéine filamenteuse issue du fibrinogène, une protéine du plasma sanguin, qui polymérise sous l'action de la thrombine lors de la coagulation sanguine<sup>56</sup>. Elle est responsable de la formation d'un caillot sanguin lors du processus de cicatrisation des plaies. Elle est constituée de 3 paires de chaînes peptidiques homologues liées entre elles par des ponts disulfures. La fibrine contient naturellement des sites d'adhésion cellulaire et a donc été étudiée comme substrat pour l'adhésion, l'étalement, la migration et la prolifération des cellules. La fibrine fournit un matériau qui peut être rapidement envahi, remanié et remplacé par l'action des cellules et la dégradation protéolytique. Cependant, sa dégradation rapide peut représenter un problème pour son utilisation comme échafaudage dans l'ingénierie tissulaire. Il est donc indispensable d'optimiser la composition de la fibrine afin d'assurer la stabilité et l'intégrité du matériau. Quelques exemples d'hydrogels pour l'ingénierie tissulaire sont répertoriés dans le tableau 3.

Des fibrinogènes et thrombines de différentes sources sont disponibles commercialement afin de produire des gels de fibrines. Il est également possible de trouver de la fibrine préparée industriellement mais une étude montre que les propriétés sont nettement différentes selon la méthode employée pour les obtenir<sup>57</sup>.

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

Composition	Biomolécule active	Types de cellules encapsulées/déposées	Modèle animal	Réf.
Hydrogel de fibrine	- facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF-A165) - facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) - ADN plasmide	- Cellules endothéliales angiogéniques	-	58
Hydrogel de fibrine	- BMP-2	-	- Défaut crânien du rat - Fusion intra-carpienne du chien	59
Hydrogel de fibrine	- ADN plasmide	- Cellules musculaires lisses vasculaires	-	60
Hydrogel de fibrine	- BMP2	- cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs)	-	61
Hydrogel de fibrine	- ADN plasmide	- Cellules NIH/3T3 (fibroblaste embryonique murin)	-	62

Tableau 3 : Exemples d'hydrogels de fibrine pour l'ingénierie tissulaire.

D'autres polymères d'origine protéique ont été étudiés pour l'ingénierie tissulaire de l'os, notamment la gélatine qui dérive du collagène mais contrairement à lui ne présente pas d'antigénicité, la fibroïne de soie qui est produite par le ver à soie et connue pour ses excellentes propriétés mécaniques et une lente dégradation, et enfin l'élastine et le soja, qui n'ont été que très peu étudiés jusqu'à présent<sup>48</sup>.

*Les polysaccharides*

Les polysaccharides sont une classe de biopolymères constitués par des monomères de sucres<sup>63</sup>. Les monomères sont liés entre eux par des liaisons *O*-osidiques qui peut avoir lieu sur n'importe quel groupe hydroxyle du monosaccharide, conférant la possibilité aux polysaccharides d'être linéaires ou ramifiés. Selon leur rôle biologique dans les organismes vivants, ils sont dits « de réserve » lorsqu'ils sont sources d'énergie (comme le glucose par exemple) ou « structuraux » lorsqu'ils participent à la formation des structures organiques (comme la cellulose chez les végétaux ou la chitine chez certains animaux). Ces polymères biologiques ont été largement étudiés comme substrat pour l'ingénierie tissulaire, comme on va le voir dans ce paragraphe.

Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine liée en  $\beta$ -(1-4) (unité désacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée) (cf .figure 4). Il est produit par désacétylation chimique (en milieu alcalin) ou enzymatique de la chitine, le composant de l'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calmars...) ou encore de la paroi des champignons. Le degré d'acétylation (DA) (pourcentage d'unités acétylées par rapport au nombre d'unités totales) de chitosane commercial est généralement compris entre 5 et 30% et la masse molaire entre 10 et 1000 kg/mol<sup>65</sup>.

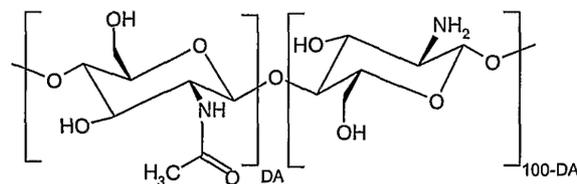


Figure 4 : Structure du chitosane

Il a été montré que le chitosane est biologiquement renouvelable, biodégradable, biocompatible, non-antigénique, non-toxique et biofonctionnel<sup>66</sup>. Ces propriétés biologiques et de dégradabilité sont dépendantes du DA<sup>67</sup>. Sa production est peu coûteuse et facile mais

on rencontre des problèmes de reproductibilité dans les lots. Il présente une bonne versatilité chimique puisqu'il peut être modifié sur ses fonctions hydroxyle ou amine. Il peut être métabolisé par certaines enzymes humaines comme les lysozymes. Il est également bio-adhésif et sensible au pH grâce aux nombreux groupes amine présents le long de sa chaîne. Il est soluble à bas pH et devient insoluble à haut pH. Toutes ces propriétés en ont fait un polymère très attractif pour des applications biomédicales. Des matrices poreuses de chitosane ont été proposées pour la régénération du tissu osseux et son activité biologique a ainsi été démontrée<sup>68,69</sup>. Toutefois, le chitosane est relativement limité dans sa capacité à induire une régénération rapide de l'os dans la phase initiale.

Les hydrogels à base de chitosane pour l'ingénierie tissulaire ont été déjà largement étudiés, sous forme de gels chimiques covalents<sup>70</sup> ou de gels physiques<sup>71</sup>.

### Amidon

L'amidon est un polymère naturel prometteur de par sa biodégradabilité, sa très grande abondance et parce que c'est une ressource renouvelable. C'est un polysaccharide composé d'un mélange de deux homopolymères, l' $\alpha$ -amylose (20-30%) et l'amylopectine (70-80%). L' $\alpha$ -amylose est un polymère linéaire composé d'unités de glucoses reliés entre elles par des liaisons  $\alpha(1-4)$  qui lui confèrent une structure en hélice. L'amylopectine est principalement constituée de glucoses liés par des liaisons  $\alpha(1-4)$  mais présente des ramifications *via* des liaisons  $\alpha(1-6)$  tous les 24 à 30 glucose en moyenne.

L'amidon est par nature un matériau fragile auquel il faut ajouter un plastifiant dans la plupart des applications, généralement de l'eau<sup>72</sup> ou d'autres polymères d'origine synthétiques<sup>73-76</sup> ou naturels<sup>77,78</sup>. Il peut être modifié chimiquement par oxydation<sup>79</sup> ou par greffage de groupe acryles réactifs<sup>80</sup>. Sa dégradation par les amylases produit des oligosaccharides facilement métabolisés par le corps humain pour produire de l'énergie et permet donc d'adapter la dégradation des matériaux à base d'amidon<sup>81,82</sup>.

L'équipe de Reis *et al.* a travaillé sur l'utilisation de l'amidon pour des applications dans l'ingénierie tissulaire osseuse<sup>81,83</sup>, les ciments<sup>84,85</sup> et la vectorisation de médicaments. Ces matériaux ont montré une bonne biocompatibilité *in vitro*<sup>86</sup> et possèdent une bonne performance *in vivo*<sup>87</sup>. Plus récemment, ces matériaux ont montré qu'ils permettaient

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

l'adhésion de cellules endothéliales, un indicateur de la capacité des substituts à base de fibres d'amidon à permettre la vascularisation. Le tableau 4 présente quelques exemples d'hydrogels à base d'amidon.

Composition de l'hydrogel	Références
Hydrogel d'amidon/polyméthacrylate	88
Hydrogel d'amidon/éthylène-co-vinylalcool avec acide acrylique et acrylamide	89
Hydrogel d'amidon-méthacrylate	90

Tableau 4 : Exemples d'hydrogels à base d'amidon

### Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA), aussi appelé hyaluronane car il est présent sous la forme d'un polyanion *in vivo* plutôt que sous la forme protonée, est un glycosaminoglycane (GAG) non-sulfaté et l'un des composants majeurs de la matrice extracellulaire de la plupart des tissus conjonctifs tels que le cartilage, l'humeur vitrée de l'œil, le liquide synovial ou le cordon ombilical<sup>91</sup>. C'est un polysaccharide linéaire composé d'une unité disaccharidique d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine, liés entre eux par des liaisons glycosidiques alternées  $\beta(1-4)$  et  $\beta(1-3)$ <sup>92</sup> (cf. figure 5). Le HA possède différents rôles physiologiques tels que la régulation de l'eau dans les tissus, notamment la peau,<sup>93</sup> des propriétés structurales (dans le cartilage notamment), de remplissage et de lubrification dans le liquide synovial. Il exerce encore de nombreuses fonctions macromoléculaires dans l'induction de la prolifération et de la migration des cellules ou encore dans le processus tumoral et métastatique<sup>94,95</sup>. Les interactions du HA avec les cellules se produisent à travers des récepteurs cellulaires de surface spécifiques comme le CD44 et influencent la formation du tissu, l'inflammation et la morphogenèse<sup>96-98</sup>.

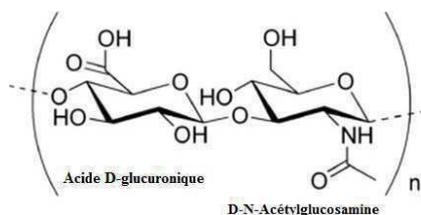


Figure 5 : Structure de l'acide hyaluronique

Le HA apparaît comme un candidat idéal pour des applications en ingénierie tissulaire. De plus, il peut être modifié chimiquement de façon covalente sur ses fonctions hydroxyle ou carboxylate afin notamment d'améliorer ses propriétés mécaniques par réticulation<sup>33,99-104</sup> et de diminuer sa vitesse de dégradation, celui-ci étant dégradé de façon enzymatique par la hyaluronidase et résorbable à travers de multiples voies métaboliques. Le HA a surtout été utilisé pour l'ingénierie tissulaire du cartilage et de l'os parce qu'il s'agit d'un composant majeur de la matrice extracellulaire. Une étude a montré sa capacité exogène à faciliter la réparation osseuse<sup>105</sup>. Quelques exemples d'applications pertinentes sont présentés dans le tableau 5.

Polymère/structure du substitut	Biomolécule active	Types de cellules encapsulées/déposées	Modèle animal	Réf.
Hydrogel de HA	Gène BMP-2	Cellules stromales de moelle osseuse	Muscle fémoral de souris	52
Hydrogel de HA/PEG-SH <sub>4</sub>	BMP-2	cellules souches mésenchymateuses humaines	Défaut de l'os crânien du rat	106
Hydrogel de HA	BMP-2	-	Défaut de l'os crânien du rat	107

Tableau 5 : Etudes et utilisations de l'acide hyaluronique dans l'ingénierie tissulaire osseuse

Le hyaluronane disponible dans le commerce est produit de façon contrôlée à grande échelle par fermentation bactérienne, à partir de souches de bactéries de type *streptococcus equi*<sup>108</sup> et *streptococcus zooepidemicus*<sup>109</sup>, ce qui permet d'éviter le risque d'agents pathogènes d'origine animale. L'acide hyaluronique est commercialisé pour de nombreuses applications à travers le monde, notamment pour le traitement de l'arthrose, sous forme de gel viscoélastique

pour la chirurgie et la guérison des plaies, pour l'implantation de lentille intraoculaire artificielle et comme milieu de culture pour l'utilisation en fécondation *in vitro*. Depuis quelques années, il est utilisé en médecine esthétique comme produit de comblement de rides. Des produits à base d'acide hyaluronique sont utilisés en remplacement du collagène car l'acide hyaluronique réduit les risques d'allergies et dure plus longtemps (6 à 12 mois). De plus, sa résorbabilité empêche tout accident définitif. Il est aussi utilisé comme marqueur tumoral pour le cancer de la prostate et celui du sein. Il peut également être utilisé pour suivre l'évolution de la maladie.

D'autres polysaccharides ont été étudiés pour l'ingénierie tissulaire de l'os, notamment les alginates extraits d'algues marines<sup>52</sup> et le sulfate de chondroïtine, un GAG sulfaté constitutif des tissus conjonctifs<sup>110,111</sup>.

### **I.4. Les polymères modifiés avec des peptides pour l'ingénierie tissulaire**

Comme on vient de le voir, de nombreux matériaux polymères présentant diverses propriétés sont aujourd'hui disponibles dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. L'utilisation de polymères naturels provenant ou non de la MEC montre cette volonté à optimiser les interactions biologiques entre les cellules et le matériau. Une autre approche allant dans le même sens consiste en l'utilisation de matériaux biomimétiques comprenant des facteurs favorisant la repousse des tissus. C'est en particulier la capacité du biomatériau à permettre l'attachement et la migration des cellules dans les premiers stades de la réparation du tissu qui est recherchée, car elle est cruciale pour la suite<sup>112</sup>, puis sa capacité à induire une différenciation cellulaire adéquate selon le tissu à réparer. L'intégration du substitut biomimétique dans le tissu se joue principalement à l'interface tissu-matériau, elle-même déterminée par l'interaction entre les cellules initiales et le substrat<sup>113</sup>. Il est donc nécessaire de concevoir des substituts modifiés par des protéines de la MEC qui servent de lien biologique aux interactions matrice-cellule afin de promouvoir la croissance du tissu.

Cependant, les premiers biomatériaux chargés avec des protéines ont présenté de nombreux inconvénients<sup>114</sup> : en effet, les protéines doivent dans un premier temps être extraites d'autres organismes et purifiées. Elles peuvent donc entraîner des réponses immunitaires indésirables et augmentent le risque d'infection. De plus elles sont sujettes à la

dégradation protéolytique et seulement une partie de la protéine présente une orientation correcte pour l'adhésion cellulaire<sup>115</sup>. De plus, la texture de la surface influence l'orientation et la conformation de la protéine, ce qui peut amener à sa dénaturation ou à différentes présentations du motif d'attachement cellulaire.

Tous ces problèmes peuvent être réduits en utilisant comme motif de reconnaissance cellulaire de petits peptides. Ils présentent une meilleure stabilité face à la stérilisation, au chauffage, au changement de pH, au stockage. Ils sont plus faciles à caractériser et moins coûteux. De par leur plus petite taille, on peut facilement augmenter leur densité en surface, ce qui permet de compenser une activité d'adhésion cellulaire éventuellement plus faible<sup>116</sup>. De plus, les protéines de l'ECM contiennent plusieurs sites de reconnaissance cellulaire alors que les peptides n'en représentent qu'un : on peut donc les sélectionner pour un type particulier de récepteurs d'adhésion cellulaire.

### **I.4.1 La séquence RGD pour l'adhésion cellulaire**

La séquence peptidique RGD (arginine-glycine-aspartate) est de loin la plus efficace et la plus utilisée pour stimuler l'adhésion des cellules sur des surfaces<sup>114</sup>. Ceci est dû au fait qu'on la retrouve abondamment et partout dans les protéines de l'organisme, qu'elle répond à plusieurs types de récepteurs d'adhésion cellulaire et qu'elle joue un rôle prépondérant dans l'ancrage, le comportement et la survie des cellules. En contrepartie, cette séquence n'est pas très sélective.

Dans les organismes multicellulaires, les contacts des cellules avec les cellules avoisinantes et la MEC se fait par l'intermédiaire de récepteurs d'adhésion cellulaire. Parmi eux, la famille des intégrines représente le groupe le plus nombreux et le plus versatile. Ils jouent un rôle majeur dans l'ancrage des molécules mais aussi dans des processus majeurs tels que l'embryogénèse, la différenciation cellulaire, la réponse immunitaire, la cicatrisation des plaies ou la coagulation sanguine<sup>117,118</sup>. Les intégrines consistent en 2 sous-unités transmembranaires associées de manière non covalente appelées  $\alpha$  et  $\beta$ . A ce jour 18 sous-unités  $\alpha$  et 8  $\beta$  ont été identifiées, ce qui forme 24 hétéro-dimères différents<sup>119</sup>. Certaines intégrines sont cependant très proches et peuvent donc se lier à plusieurs protéines. Par exemple la  $\alpha\beta3$  se lie à la fibronectine, la vitronectine, le facteur de Von Willebrand,

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

l'ostéopontine, la tenascine, la sialoprotéine osseuses et la thrombospondine. Inversement, certaines molécules de la MEC comme la fibronectine se lient à plusieurs intégrines<sup>120</sup>.

Dans le but de réduire les ligands macromoléculaires à de petites séquences de reconnaissance, le motif RGD a été identifié il y a 28 ans par Pierschbacher et Rouslaht comme la séquence peptidique d'adhésion cellulaire minimale et essentielle de la fibronectine<sup>121</sup>. Les peptides RGD inhibent l'adhésion des cellules à la fibronectine et permettent l'adhésion des cellules lorsqu'ils sont immobilisés sur une surface. Depuis lors, des sites RGD ont été identifiés dans de nombreuses autres protéines de la MEC comme la vitronectine, la fibrinogène, le facteur de Von Willebrand, le collagène, la laminine, l'ostéopontine, la ténascine et la sialoprotéine osseuse aussi bien dans des protéines membranaires, virales ou bactériennes et provenant de venin de serpent. La moitié des 24 intégrines se lient aux molécules de l'ECM par l'intermédiaire de la séquence RGD.

Le processus par lequel les intégrines permettent l'adhésion cellulaire comprend une cascade de 4 événements qui se chevauchent partiellement<sup>122</sup> : l'attachement de la cellule, son étalement, l'organisation de son cytosquelette d'actine, et la formation d'adhésions focales. Tout d'abord, dans l'étape d'attachement, la cellule entre en contact avec la surface et des liaisons par l'intermédiaire de ligands se produisent, permettant à la cellule de résister à de légères forces de cisaillement. Ensuite, le corps de la cellule s'aplatit et sa membrane plasmique s'étale sur le substrat. Cela entraîne alors l'organisation de l'actine en faisceaux de microfilaments appelés fibres de stress. Au cours de la quatrième étape, la formation d'adhésion focale se produit, permettant le lien de la MEC avec les molécules du cytosquelette d'actine. Les adhésions focales sont un groupement d'intégrines et de plus de 50 autres molécules transmembranaires, membranaires et cytosoliques.

Au cours de ces 4 étapes d'adhésion, les intégrines ont un rôle physique dans le processus d'attachement et un rôle de transduction de signaux à travers la membrane cellulaire<sup>119,123</sup>. Ces mécanismes ne sont pas tous clairement élucidés. Néanmoins, il est clairement établi que l'étalement cellulaire et la formation d'adhésion focale permis par les intégrines déclenche la survie et la prolifération des cellules ancrées<sup>124,125</sup>. Au contraire, la perte de l'attachement entraîne l'apoptose pour de nombreux types cellulaires. On l'observe par exemple en présence de molécules immobilisées sur la MEC lorsque des ligands solubles non-immobilisés tels que des peptides RGD sont ajoutés. Cela entraîne le détachement et l'apoptose de la cellule (cf. figure 6).

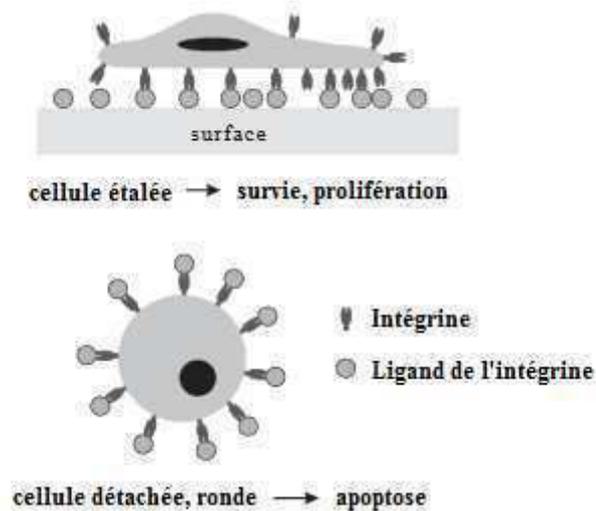


Figure 6<sup>114</sup> : Effets opposés des ligands des intégrines. Les ligands immobilisés sur une surface conduisent à l'adhésion et la survie cellulaire tandis que non immobilisés, les ligands conduisent au détachement et à l'apoptose de la cellule.

#### I.4.2 Fonctionnalisation de polymères avec le peptide RGD

Des liaisons stables entre les peptides RGD et la surface à laquelle ils sont greffés sont essentielles pour assurer une forte adhésion des cellules, parce que la formation d'adhésion focale ne se produit qu'à condition que les ligands résistent aux forces contractiles des cellules<sup>126-128</sup>. Ces forces sont capables de redistribuer des ligands faiblement adsorbés à la surface ce qui conduit à des adhésions fibrillaires faibles<sup>127,129,130</sup>. De plus, les cellules peuvent retirer les ligands des intégrines qui sont mobiles par le processus d'internalisation<sup>131,132</sup>. Ainsi, une simple adsorption de petits peptides RGD sur une surface ne conduit qu'à un faible attachement.

### Chimie

Dans la plupart des cas, les peptides RGD sont liés aux polymères par un lien covalent amide stable généralement obtenu par couplage peptidique en faisant réagir un groupe acide carboxylique activé avec l'extrémité nucléophile *N*-terminale du peptide<sup>114</sup>. Les groupes acide carboxyliques peuvent être activés en utilisant un agent de couplage peptidique tels que

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC, soluble dans l'eau), le dicyclohexyl-carbodiimide (DCC) ou le carbonyl diimidazole (CDI).

Cependant, cette méthode présente deux inconvénients majeurs. Premièrement, le peptide comporte plusieurs groupes réactifs (groupes carboxyles à l'extrémité C-terminale et dans la chaîne latérale de l'acide aspartique et le groupe guanidino nucléophile de la chaîne latérale de l'arginine). Deuxièmement, l'agent de couplage et le groupe carboxyle activé peuvent être rapidement hydrolysés (cf. figure 7).

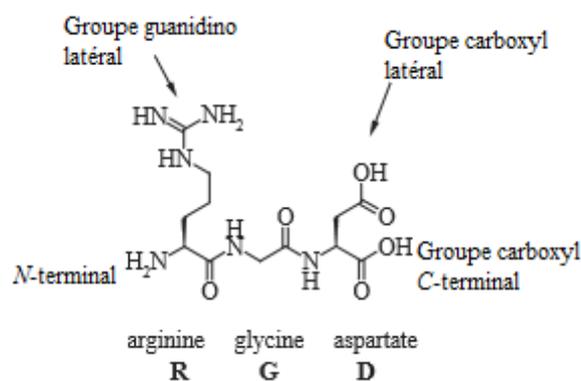


Figure 7 : Nomenclature et formule moléculaire de la séquence RGD.

Une des possibilités pour contourner ces problèmes est de bloquer les groupes réactifs des acides aminés avec des groupes protecteurs et utiliser d'autres solvants que l'eau (diméthylformamide (DMF), dichlorométhane ou acétone). Par cette méthode, des peptides RGD protégés ont pu être greffés aux polymères<sup>133-135</sup>. Cependant, l'étape de déprotection s'avère longue et requière des conditions sévères.

Une autre solution alternative pour le couplage de peptides RGD non-protégés dans l'eau est possible. Il s'agit d'une procédure en 2 étapes. Premièrement, l'activation de l'acide carboxylique en ester activé de *N*-hydroxysuccinimide (NHS), moins sujet à l'hydrolyse, suivi du couplage du peptide. Les esters activés de NHS sont généralement obtenus en présence de DCC ou EDC dans le DMF ou le dichlorométhane. Le couplage est complet au bout d'une à deux heures dans les meilleures conditions de couplage ( $8 < \text{pH} < 9$ )<sup>136,137</sup>. Ce protocole ne nécessite pas la protection des autres fonctions car le groupe carboxyle latéral n'est pas activé et de par la protonation du groupe guanidino dans l'eau, sa nucléophilicité est presque abolie.

Ces approches concernant le couplage peptidique ne permettent pas d'avoir une réaction quantitative car un excès de peptide est requis pour obtenir de bons rendements. De

plus, si elles s'avèrent intéressantes lorsqu'il s'agit de petits peptides comme le RGD, le problème de la présence de fonctions amine ou carboxyle latérales sur des peptides plus importants comportant d'autres acides aminés n'est pas résolu<sup>114</sup>.

Dans une approche plus récente appelée ligation chimiosélective ou chimie « clic », une paire de groupement fonctionnels choisis est utilisée pour former des liaisons stables sans l'utilisation d'agent d'activation et sans interférer avec d'autres groupes fonctionnels. La ligation chimiosélective a lieu en général en condition douce et offre de bons rendements.

La figure 8 représente les différentes approches de ligation chimiosélectives recensées. Un cyclopeptide RGD fonctionnalisé par un groupement bromoacétyle a été greffé avec succès sur des surfaces contenant des fonctions thiol<sup>138</sup>. Un cyclopeptide fonctionnalisé avec un groupement aminoxy a été greffé sur des surfaces contenant des fonctions aldéhydes<sup>139,140</sup>. Cependant, la liaison imine résultant de ce couplage doit être réduite en liaison amine plus stable avant application.

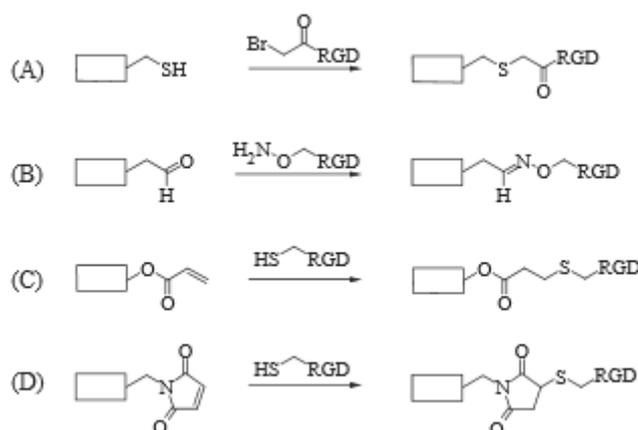


Figure 8 : Ligation chimiosélective de paires de groupes fonctionnels. (A) thiol et bromoacétyl-RGD. (B) aldéhyde et aminoxy-RGD. (C) acrylate et thiol-RGD. (D) maléimide et thiol-RGD

Des peptides portant une fonction thiol peuvent être greffés par addition de Michaël à des acrylates ou des acrylamides avec de très bons rendements<sup>115</sup>. Une réaction similaire consiste en l'addition de peptide-thiol sur des surfaces fonctionnalisées par des motifs maléimides en conditions douces<sup>141-143</sup>.

### Impact de la densité de peptide RGD sur le comportement cellulaire

Le nombre de cellules attachées sur une surface est clairement relié à la densité de surface de peptide RGD. L'attachement des cellules en fonction de la concentration en RGD montre une augmentation en courbe sigmoïde<sup>144-146</sup>. Ceci indique qu'il existe une densité critique minimum pour observer une réponse cellulaire. L'augmentation du nombre de cellules attachées, directement dépendant de la quantité en RGD, tend ensuite vers une asymptote soit un nombre maximal de cellules attachées. Ce nombre maximum est propre à chaque surface polymère et à chaque lignée cellulaire<sup>147,148</sup>. En règle générale, plus la densité de surface en RGD est élevée plus on observe l'étalement et la survie cellulaire, la formation de contacts focaux, et, dans une certaine mesure, la prolifération<sup>125,146,149-151</sup> (cf. figure 9).

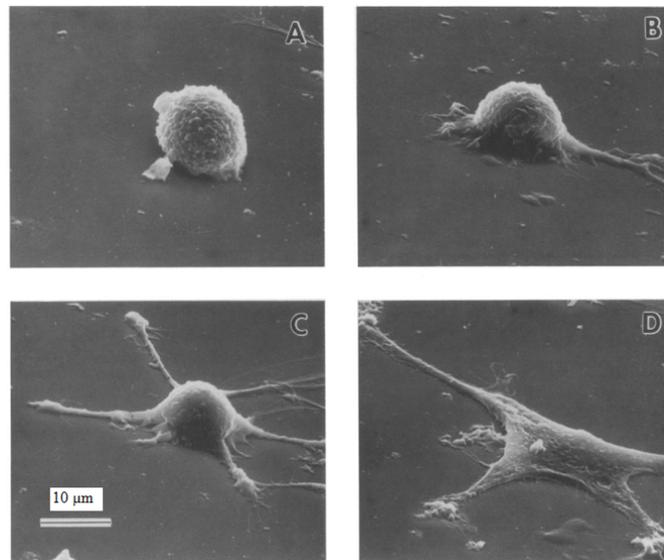


Figure 9<sup>152</sup> : Cellules adhérant sur un substrat contenant peptide GRGDY greffé de manière covalente. Les cellules, dont la morphologie varie en fonction de la concentration en peptide, ont été classées en 4 types correspondant à 4 densités de RGD (0,1, 1, 10 et 100 fmol/cm<sup>2</sup>) : (A) Type I : cellule sphérique sans extension filopodiale (B) Type II : cellule sphérique présentant 1 ou 2 extensions filopodiales (C) Type III : cellule sphérique présentant plus de 2 extensions filopodiales (D) Type 4 : morphologie aplatie représentative d'une cellule bien étalée.

Depuis la découverte de l'adhésion cellulaire par l'intermédiaire de peptides RGD, la question de savoir quelle quantité de peptide est nécessaire pour induire l'attachement cellulaire mais aussi l'étalement et la formation de contacts focaux a été et est encore étudiée. Une analyse comparative menée par Massia et Hubbell<sup>152</sup>, a trouvé qu'une quantité minimale en peptide RGD de 1 fmol/cm<sup>2</sup> était suffisante pour l'étalement cellulaire et 10 fmol/cm<sup>2</sup> pour

la formation de contacts focaux et de fibres de stress sur une surface du verre. Depuis ce jour, des quantités généralement plus élevées de peptides RGD ont été reportées pour obtenir le même comportement cellulaire sur des polymères<sup>115,136,151,153-157</sup>. Cela a été expliqué en partie par la pénalité entropique qui résulte de la fixation du peptide à une chaîne polymère flexible comparé à une surface rigide. De plus, la transmission des forces à travers le polymère souple est inefficace. D'autres explications portent sur l'accessibilité des peptides RGD copolymérisés. La région supérieure de l'hydrogel (arbitrairement 5 ou 10 nm) est censée être atteinte par les cellules et a donc été choisie pour calculer la densité de RGD en surface.

Il est important de noter que la comparaison de l'effet de la densité de peptide sur l'adhésion cellulaire n'est valable qu'à condition que tout autre effet pouvant y contribuer soit exclu. Ce n'est probablement pas le cas dans les exemples cités notamment à cause des différentes lignées cellulaires étudiées. De plus, différents peptides sont utilisés avec différentes affinités et sélectivités envers les intégrines. Par exemple, le GRGDY s'adresse plutôt à l'intégrine  $\alpha\beta3$  tandis que le GRGDSP s'adresse plutôt à l'intégrine  $\alpha5\beta1$ <sup>115,152</sup>. Enfin la distribution du peptide sur la surface serait également à prendre en compte car elle a une immense influence sur le comportement cellulaire. Or dans tous les cas, une répartition plus ou moins égale du peptide a été supposée mais jamais prouvée.

Afin de comprendre le rôle de la quantité, de la spécificité et de la répartition des peptides RGD sur une surface, il est donc nécessaire de développer en amont des méthodes de chimie propres, quantitatives et contrôlées afin d'obtenir des polymères bien définis et caractérisés. Si la chimie développée jusqu'ici permet de greffer de petits peptides d'environ 5 acides aminés, il reste à développer de nouvelles alternatives permettant de greffer de plus longues chaînes spécifiques au tissu à réparer.

### **I.5. Les hydrogels modifiés avec des peptides spécifiques à l'os.**

Comme on a pu le voir précédemment dans ce chapitre, la formation de l'os est le résultat d'une succession d'évènements, qui commence avec le recrutement et la prolifération des cellules ostéoprogénitrices des tissus environnants, suivis par leur différenciation ostéoblastique, puis la formation et enfin la minéralisation de la matrice osseuse.

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

De nombreuses protéines de la matrice extracellulaire (MEC) sont exprimées pendant la formation de l'os. Certaines jouant un rôle prépondérant ont été identifiées, notamment la sialoprotéine osseuse<sup>158</sup> (BSP), une protéine non-collagénique de la matrice osseuse, la « bone-morphogenic protein-2<sup>159,160</sup> » (BMP-2), un élément de la superfamille des facteurs de croissance de transformation beta (TGF- $\beta$ ) ou encore l'ostéopontine. Plusieurs études se sont donc penchées sur l'utilisation de peptides issus de ces protéines pour la reconstruction osseuse. Ainsi, plusieurs séquences peptidiques ont été greffées de manière covalente à des polymères afin d'obtenir des hydrogels destinés à l'ingénierie tissulaire osseuse. En voici quelques exemples.

### *Hydrogels de Polyéthylène glycol (PEG)*

Les hydrogels de PEG peuvent être photo-réticulés en modifiant leurs extrémités avec des acrylates ou des méthacrylates<sup>161,162</sup>. Ce sont des substrats aux propriétés inhérentes répulsives pour les cellules (résultat d'une faible adsorption des protéines). Pour ces raisons, les hydrogels de PEG ont été fonctionnalisés avec des peptides d'adhésion cellulaire afin de moduler l'adhésion, la morphologie et la migration<sup>25,136</sup>. La méthode utilisée consiste à obtenir un peptide-PEG-acrylate (cf. figure 11) afin de le copolymériser sous UV avec des PEG-diacrylate.

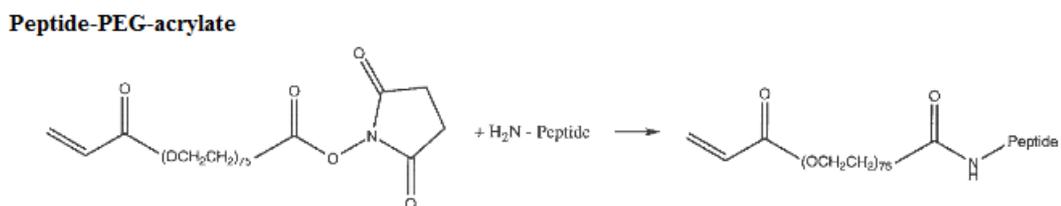


Figure 11 : Couplage d'un peptide-NH<sub>2</sub> avec un Acryloyl-PEG-N-hydroxysuccinimide ester

Cette chimie a été développée par Hubell *et al.*<sup>136</sup> puis étudiée pour l'étalement d'ostéoblaste par Burdick *et al.*<sup>25</sup>. Cette étude a montré qu'une concentration de 0,5 mM en peptide RGD (séquence YRGDS) permettaient d'observer un meilleur attachement et un étalement des cellules sur ces hydrogels, et que ce phénomène était encore accru avec une concentration plus élevée en peptide (5 mM).

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

Cette approche (photo-polymérisation) nécessite une source de lumière qui peut être fournie sous arthroscopie pour certaines procédures. Cependant, dans certains cas, la photo-polymérisation transdermique peut s'avérer impossible, notamment dans le cas de crevasses profondes de l'os.

### *Hydrogels d'oligo(poly(éthylène glycol) fumarate)(OPF)*

Une alternative possible au problème de la photo-polymérisation est la fabrication d'hydrogels qui réticulent chimiquement *in situ*. C'est dans cet objectif que Mikos *et al.* ont développé des hydrogels à base d'OPF (cf. figure 12) fonctionnalisés avec un peptide de séquence RGD<sup>163</sup> et un peptide ODP, dérivé de l'ostéopontine (séquence DVDVPDGRGDSLAYG)<sup>163,164</sup>. La réticulation de ces hydrogels s'opère entre l'OPF et un PEG-diacrylate en présence d'un initiateur redox et du peptide-acrylate, à 45°C pendant 30 minutes.

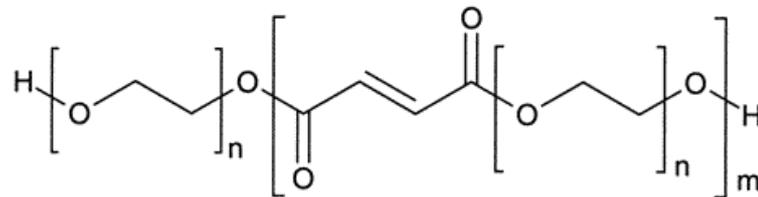


Figure 12 : Structure de l'oligo(poly(éthylène glycol) fumarate)

Les hydrogels d'OPF ont été fonctionnalisés par les peptides à différentes concentrations. L'effet de la densité des deux peptides (GRGDS et ODP) sur la différenciation et la minéralisation des cellules stromales de moelle (CSM) a été étudié. La prolifération des ostéoblastes sur ces hydrogels s'est avérée dépendante de la concentration en peptide. Les plus hautes concentrations favorisaient la prolifération cellulaire aux premiers temps de la culture. La différenciation et la minéralisation des ostéoblastes induite par les hydrogels fonctionnalisés avec les peptides a été mise en évidence par l'expression de la phosphatase alcaline (PAL), de l'ostéopontine (OPN) et de la déposition du calcium. Cette étude a montré que, dans ce cas précis, la concentration en peptide, plus que la nature du

peptide, influençait le comportement des cellules et permettaient de moduler l'attachement cellulaire.

*Hydrogels de Poly(lactide-co-éthylèneoxyde-co-fumarate)(PLEOF)*

Dans une récente étude, une séquence RGD et un peptide dérivé de la protéine morphogénique osseuse rhBMP2 ont été greffés sur un hydrogel de PLEOF (cf. figure 13) dans le but d'obtenir une action synergique entre les différents peptides<sup>165</sup>.

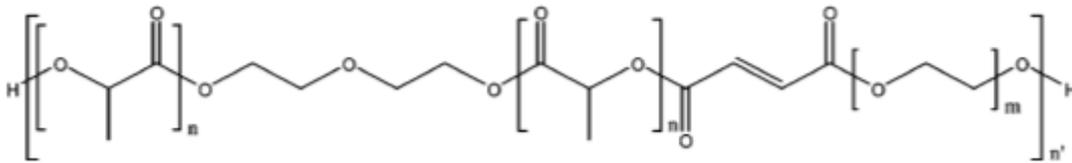


Figure 13 : Structure du Poly(lactide-co-éthylèneoxyde-co-fumarate)(PLEOF)

Le peptide RGD est impliqué dans l'étalement cellulaire et la création de contact focal d'adhésion à l'ECM alors que le peptide BMP (séquence KIPKASSVPTLSAISTLYL) initie la différenciation ostéogénique des cellules stromales de moelle osseuse (BMS). Le peptide RGD a été fonctionnalisé par l'acrylamide et conjugué à l'hydrogel PLEOF pendant la polymérisation aboutissant à une densité de surface de RGD de  $1,62 \pm 0,37$  pmol/cm<sup>2</sup>. Un bras espaceur « mini-PEG » a été fixé au peptide BMP pour améliorer sa solubilité et réduire l'encombrement stérique, suivie d'une réaction avec du 4-carboxybenzenesulfonazide pour produire un peptide fonctionnalisé azoture (Az-mPEG-BMP). Ce peptide n'a pas montré de toxicité pour les cellules BMS et a amélioré la différenciation des cellules ostéogéniques. Le peptide Az-mPEG-BMP a été greffé à l'hydrogel par « chimie clic » entre l'azoture du peptide et le propargyle de l'hydrogel. La densité de peptide BMP sur la surface de l'hydrogel a été de  $5,2 \pm 0,6$  pmol/cm<sup>2</sup>. Le greffage des peptides RGD + BMP sur l'hydrogel PLEOF a augmenté le degré de minéralisation de cellules BMS de 4,9 et 11,8 fois après 14 et 21 jours, respectivement.

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

D'autres études se sont penchées sur la recherche de séquences peptidiques spécifiques aux cellules de l'os, favorisant leur attachement à l'ECM, étalement, migration et prolifération (ostéoconduction) ainsi que leur différenciation (ostéo-induction). Le tableau 7 les répertorie.

Protéine	Séquence peptidique	Substrat polymère	Type de cellules testées	Réf.
BMP-2	DWIVA(NH <sub>2</sub> ) (résidu 26-50 de la BMP-2)	Hydrogels nanofibreux de peptides auto-assemblés	Cellules stromales de moelle osseuse	166
BMP-2	KIPKASSVPTELSAISTLYL(NH <sub>2</sub> ) (résidu 73-92 de la BMP-2)	Alginate	Cellules multipotentes mésenchymateuses de souris	167
BSP	Ac-CGGNGEPRGDTYRAY(NH <sub>2</sub> ) Ac-CG-GFHRIKA(NH <sub>2</sub> )	Poly(NIPAAm-co-AAc)	Ostéoblastes de crâne de rat	143
BSP	Ac-CGGNGEPRGDTYRAY(NH <sub>2</sub> )	Polycaprolactone	Préostéoblastes de souris	168

Tableau 7 : Etudes de séquences peptidiques spécifiques aux cellules osseuses

Les études concernant des séquences peptidiques issues de la BMP-2 s'intéressent surtout à la recherche d'un site de liaison aux récepteurs membranaires des cellules, celui-ci n'ayant pas encore été clairement identifié, et à son rôle dans la différenciation de cellules multi-potentes en ostéoblastes<sup>165-167</sup> (rôle ostéo-inducteur).

Une séquence peptidique de 15 acides aminés issus de la BSP contenant la séquence RGD a été identifiée et étudiée par A. Rezania *et al.*<sup>169</sup>. Leur étude s'appuie sur l'hypothèse que l'attachement spécifique des ostéoblastes à l'ECM de l'os est dû à des fragments de la BSP générés par dégradation enzymatique, et que ces peptides peuvent moduler l'attachement et la différenciation des ostéoblastes. Ils ont montré que ce peptide (-CGGNGEPRGDTYRAY-) permettait d'augmenter la force d'adhésion de cellules ostéoblastes et ostéocytes. Une étude ultérieure menée par O. Drevelle *et al.*<sup>168</sup> a montré que ce peptide greffé sur des matrices de polycaprolactone permettait, en plus d'une organisation

du cytosquelette des cellules, une réponse à la BMP-2. Ce peptide présente donc un intérêt pour des biomatériaux à destination de l'os contenant de la BMP-2.

### **I.6. Objectifs de la thèse**

Le sujet de cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet ambitieux incluant différents partenaires dans le but de développer un ciment injectable pour le comblement et la réparation osseuse. Globalement, la stratégie de ce projet se base sur l'association de deux systèmes innovants :

- Un ciment auto-résorbable à base de carbonate de calcium comme matrice minérale.
- un polysaccharide aux propriétés ajustées afin de promouvoir l'injectabilité d'une part et la cohésion du ciment après injection d'autre part.

Le polysaccharide permettra donc non seulement de contrôler les propriétés d'injectabilité et de mise en forme du matériau mais pourra également promouvoir le développement du tissu osseux.

Dans ce contexte, l'acide hyaluronique a été sélectionné pour ces propriétés visco-élastiques et biologiques uniques. En effet, parce que c'est l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire et parce qu'il contribue de façon significative à la prolifération et à la migration des cellules, c'est un matériau de choix pour l'ingénierie tissulaire.

Trois peptides ont été sélectionnés pour être greffés sur des hydrogels de HA : un peptide comportant la séquence classique GRGDS, un peptide issu de la sialoprotéine osseuse (BSP) contenant 15 acides aminés spécifique à l'attachement des cellules osseuses et un peptide témoin, le même que celui issu de la BSP, mais ne contenant pas la séquence RGD (remplacée par RGE). Ce peptide permet de confirmer que l'attachement est bien dépendant de la séquence peptidique et non d'autres paramètres pouvant affecter la surface.

## Références

1. Serge Nataf Cours d'histologie : le tissu osseux. (2009).at  
<<http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-osseux--2009->>
2. Peroglio-Martynovitch, M. Thèse : composites organiques-inorganiques poreux pour la substitution osseuse. (2008).
3. Funck-Brentano, T. & Cohen-Solal, M. Le vieillissement osseux : les nouveaux acteurs de communication intercellulaire. *Médecine & Longévité* **2**, 200–204 (2010).
4. Lewis, G. Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: State-of-the-art review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **76B**, 456–468 (2006).
5. Temenoff, J. S. & Mikos, A. G. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* **21**, 2405–2412 (2000).
6. Hollinger, J. O. & Battistone, G. C. Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clinical orthopaedics and related research* 290–305 (1986).at  
<<http://europepmc.org/abstract/MED/3522015>>
7. He, W. *et al.* Micro/nanomachining of Polymer Surface for Promoting Osteoblast Cell Adhesion. *Biomedical Microdevices* **5**, 101–108 (2003).
8. Davies, J. E. In vitro modeling of the bone/implant interface. *The Anatomical Record* **245**, 426–445 (1996).
9. Albrektsson, T. & Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* **10**, S96–S101 (2001).
10. Salgado, A. J., Coutinho, O. P. & Reis, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience* **4**, 743–765 (2004).
11. Burg, K. J. L., Porter, S. & Kellam, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **21**, 2347–2359 (2000).
12. Yang, S., Leong, K. F., Du, Z. & Chua, C. K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue engineering* **7**, 679–689 (2001).
13. Maquet, V. & Jerome, R. Design of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds for Cell Transplantation. *Materials Science Forum* **250**, 15 (1997).
14. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**, 920–926 (1993).
15. Tan, H. & Marra, K. G. Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Materials* **3**, 1746–1767 (2010).
16. Drury, J. L. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337–4351 (2003).

17. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews* **101**, 1869–1880 (2001).
18. Temenoff, J. S. & Mikos, A. G. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* **21**, 2405–2412 (2000).
19. Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J. & Boccaccini, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3413–3431 (2006).
20. Salgado, A. J., Coutinho, O. P. & Reis, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience* **4**, 743–765 (2004).
21. Sabir, M., Xu, X. & Li, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science* **44**, 5713–5724 (2009).
22. Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., Langer, R. & Peppas, N. A. Bioinspired Materials for Controlling Stem Cell Fate. *Accounts of Chemical Research* **43**, 419–428 (2009).
23. Raeber, G. P., Lutolf, M. P. & Hubbell, J. A. Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration. *Biophysical journal* **89**, 1374–1388 (2005).
24. Bryant, S. J. & Anseth, K. S. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **64**, 70–79 (2003).
25. Burdick, J. A. & Anseth, K. S. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* **23**, 4315–4323 (2002).
26. Holland, T. A., Tessmar, J. K., Tabata, Y. & Mikos, A. G. Transforming growth factor-beta 1 release from oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the cartilage wound healing environment. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* **94**, 101 (2004).
27. Hiemstra, C. *et al.* In vitro and in vivo protein delivery from in situ forming poly (ethylene glycol)–poly (lactide) hydrogels. *Journal of controlled release* **119**, 320–327 (2007).
28. Hiemstra, C., Zhong, Z., Li, L., Dijkstra, P. J. & Feijen, J. In-situ formation of biodegradable hydrogels by stereocomplexation of PEG-(PLLA) 8 and PEG-(PDLA) 8 star block copolymers. *Biomacromolecules* **7**, 2790–2795 (2006).
29. Yamaguchi, N., Chae, B.-S., Zhang, L., Kiick, K. L. & Furst, E. M. Rheological characterization of polysaccharide-poly (ethylene glycol) star copolymer hydrogels. *Biomacromolecules* **6**, 1931–1940 (2005).

30. Bhattarai, N., Ramay, H. R., Gunn, J., Matsen, F. A. & Zhang, M. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *Journal of Controlled Release* **103**, 609–624 (2005).
31. Almany, L. & Seliktar, D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. *Biomaterials* **26**, 2467–2477 (2005).
32. Wieland, J. A., Houchin-Ray, T. L. & Shea, L. D. Non-viral vector delivery from PEG-hyaluronic acid hydrogels. *Journal of controlled release* **120**, 233–241 (2007).
33. Leach, J. B., Bivens, K. A., Collins, C. N. & Schmidt, C. E. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **70A**, 74–82 (2004).
34. Seal, B. L., Otero, T. C. & Panitch, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **34**, 147–230 (2001).
35. Martin, C., Winet, H. & Bao, J. Y. Acidity near eroding polylactide-polyglycolide in vitro and in vivo in rabbit tibial bone chambers. *Biomaterials* **17**, 2373–2380 (1996).
36. Bergsma, E. J., Rozema, F. R., Bos, R. R. M. & Bruijn, W. C. De Foreign body reactions to resorbable poly (L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. *Journal of Oral and Maxillofacial surgery* **51**, 666–670 (1993).
37. Behravesh, E., Jo, S., Zygourakis, K. & Mikos, A. G. Synthesis of in Situ Cross-Linkable Macroporous Biodegradable Poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol) Hydrogels. *Biomacromolecules* **3**, 374–381 (2002).
38. Yaszemski, M. J. *et al.* The ingrowth of new bone tissue and initial mechanical properties of a degrading polymeric composite scaffold. *Tissue engineering* **1**, 41–52 (1995).
39. Peter, S. J. *et al.* Effects of transforming growth factor  $\beta$ 1 released from biodegradable polymer microparticles on marrow stromal osteoblasts cultured on poly(propylene fumarate) substrates. *Journal of Biomedical Materials Research* **50**, 452–462 (2000).
40. Chen, G.-Q. & Wu, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **26**, 6565–6578 (2005).
41. Loh, X. J., Goh, S. H. & Li, J. Hydrolytic degradation and protein release studies of thermogelling polyurethane copolymers consisting of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly(ethylene glycol), and poly(propylene glycol). *Biomaterials* **28**, 4113–4123 (2007).
42. Loh, X. J., Goh, S. H. & Li, J. New Biodegradable Thermogelling Copolymers Having Very Low Gelation Concentrations. *Biomacromolecules* **8**, 585–593 (2006).
43. Kumar, N., Langer, R. S. & Domb, A. J. Polyanhydrides: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 889–910 (2002).

44. Laurencin, C. T. *et al.* Use of polyphosphazenes for skeletal tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research* **27**, 963–973 (1993).
45. Ibim, S. M., Ambrosio, A. A., Larrier, D., Allcock, H. R. & Laurencin, C. T. Controlled macromolecule release from poly(phosphazene) matrices. *Journal of Controlled Release* **40**, 31–39 (1996).
46. Ibim, S. E. M. *et al.* Novel polyphosphazene/poly(lactide-co-glycolide) blends: miscibility and degradation studies. *Biomaterials* **18**, 1565–1569 (1997).
47. Ibim, S. E. M. *et al.* Preliminary in vivo report on the osteocompatibility of poly(anhydride-co-imides) evaluated in a tibial model. *Journal of Biomedical Materials Research* **43**, 374–379 (1998).
48. Malafaya, P. B., Silva, G. A. & Reis, R. L. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 207–233 (2007).
49. Yang, C. *et al.* The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *Biodrugs* **18**, 103–119 (2004).
50. Friess, W. Collagen–biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **45**, 113–136 (1998).
51. Vasita, R. & Katti, D. S. Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. *Expert review of medical devices* **3**, 29–47 (2006).
52. Xu, X. L. *et al.* Evaluation of different scaffolds for BMP-2 genetic orthopedic tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **75**, 289–303 (2005).
53. Tabata, Y., Miyao, M., Ozeki, M. & Ikada, Y. Controlled release of vascular endothelial growth factor by use of collagen hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **11**, 915–930 (2000).
54. Nöth, U. *et al.* Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **83A**, 626–635 (2007).
55. Civerchia-Perez, L. *et al.* Use of collagen-hydroxyethylmethacrylate hydrogels for cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**, 2064–2068 (1980).
56. Wolberg, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood reviews* **21**, 131–142 (2007).
57. Buchta, C., Hedrich, H. C., Macher, M., Höcker, P. & Redl, H. Biochemical characterization of autologous fibrin sealants produced by CryoSeal® and Vivostat® in comparison to the homologous fibrin sealant product Tissucol/Tisseel®. *Biomaterials* **26**, 6233–6241 (2005).

58. Hall, H. Modified fibrin hydrogel matrices: both, 3D-scaffolds and local and controlled release systems to stimulate angiogenesis. *Current pharmaceutical design* **13**, 3597–3607 (2007).
59. Schmoekel, H. *et al.* Bone healing in the rat and dog with nonglycosylated BMP-2 demonstrating low solubility in fibrin matrices. *Journal of orthopaedic research* **22**, 376–381 (2004).
60. Rowe, S. L., Lee, S. & Stegemann, J. P. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomaterialia* **3**, 59–67 (2007).
61. Park, K.-H., Kim, H., Moon, S. & Na, K. Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **108**, 530–537 (2009).
62. Des Rieux, A., Shikanov, A. & Shea, L. D. Fibrin hydrogels for non-viral vector delivery in vitro. *Journal of Controlled Release* **136**, 148–154 (2009).
63. Nishinari, K. & Takahashi, R. Interaction in polysaccharide solutions and gels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **8**, 396–400 (2003).
64. Cascone, M. G., Barbani, N., Giusti, C. C. P., Ciardelli, G. & Lazzeri, L. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **12**, 267–281 (2001).
65. George, M. & Abraham, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *Journal of Controlled Release* **114**, 1–14 (2006).
66. Khor, E. & Lim, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* **24**, 2339–2349 (2003).
67. Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A. & Madihally, S. V In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **26**, 7616–7627 (2005).
68. Lee, J.-Y. *et al.* Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *Journal of Controlled Release* **78**, 187–197 (2002).
69. Di Martino, A., Sittinger, M. & Risbud, M. V Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* **26**, 5983–5990 (2005).
70. Berger, J. *et al.* Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **57**, 19–34 (2004).
71. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O. & Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **57**, 35–52 (2004).

72. Poutanen, K. & Forssell, P. Modification of starch properties with plasticizers. *Trends in polymer science* **4**, 128–132 (1996).
73. Dell, P. A. & Kohlman, W. G. Effects of water content on the properties of starch/poly (ethylene–vinyl alcohol) blends. *Journal of applied polymer science* **52**, 353–363 (2003).
74. Bastioli, C., Cerutti, A., Guanella, I., Romano, G. C. & Tosin, M. Physical state and biodegradation behavior of starch-polycaprolactone systems. *Journal of Polymers and the Environment* **3**, 81–95 (1995).
75. Kotnis, M. A., O'Brien, G. S. & Willett, J. L. Processing and mechanical properties of biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-valerate)-starch compositions. *Journal of Polymers and the Environment* **3**, 97–105 (1995).
76. Villar, M. A., Thomas, E. L. & Armstrong, R. C. Rheological properties of thermoplastic starch and starch/poly (ethylene-co-vinyl alcohol) blends. *Polymer* **36**, 1869–1876 (1995).
77. Nakamatsu, J., Torres, F. G., Troncoso, O. P., Min-Lin, Y. & Boccaccini, A. R. Processing and characterization of porous structures from chitosan and starch for tissue engineering scaffolds. *Biomacromolecules* **7**, 3345–3355 (2006).
78. Bajpai, A. K. & Shrivastava, J.  $\alpha$ -Amylase Induced Enhanced Enzymatic Degradation of Binary Polymeric Blends of Crosslinked Starch and Gelatin. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **41**, 949–969 (2004).
79. PASHKULEVA, I., Marques, A. P., Vaz, F. & Reis, R. L. Surface modification of starch based blends using potassium permanganate-nitric acid system and its effect on the adhesion and proliferation of osteoblast-like cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **16**, 81–92 (2005).
80. Mostafa, K. M. Graft polymerization of acrylic acid onto starch using potassium permanganate acid (redox system). *Journal of applied polymer science* **56**, 263–269 (2003).
81. Tuovinen, L. *et al.* Drug release from starch-acetate microparticles and films with and without incorporated  $\alpha$ -amylase. *Biomaterials* **25**, 4355–4362 (2004).
82. Azevedo, H. S., Gama, F. M. & Reis, R. L. In vitro assessment of the enzymatic degradation of several starch based biomaterials. *Biomacromolecules* **4**, 1703–1712 (2003).
83. Gomes, M. E., Godinho, J. S., Tchalamov, D., Cunha, A. M. & Reis, R. L. Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties. *Materials Science and Engineering: C* **20**, 19–26 (2002).
84. Boesel, L. F. & Reis, R. L. The effect of water uptake on the behaviour of hydrophilic cements in confined environments. *Biomaterials* **27**, 5627–5633 (2006).

85. Espigares, I. *et al.* New partially degradable and bioactive acrylic bone cements based on starch blends and ceramic fillers. *Biomaterials* **23**, 1883–1895 (2002).
86. Marques, A. P., Reis, R. L. & Hunt, J. A. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. *Biomaterials* **23**, 1471–1478 (2002).
87. Salgado, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L. & Davies, J. E. In vivo response to starch-based scaffolds designed for bone tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **80**, 983–989 (2006).
88. Saboktakin, M. R., Maharramov, A. & Ramazanov, M. A. pH-sensitive starch hydrogels via free radical graft copolymerization, synthesis and properties. *Carbohydrate Polymers* **77**, 634–638 (2009).
89. Elvira, C., Mano, J. F., San Román, J. & Reis, R. L. Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems. *Biomaterials* **23**, 1955–1966 (2002).
90. Reis, A. V *et al.* Synthesis and characterization of a starch-modified hydrogel as potential carrier for drug delivery system. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **46**, 2567–2574 (2008).
91. Liao, Y.-H., Jones, S. A., Forbes, B., Martin, G. P. & Brown, M. B. Hyaluronan: pharmaceutical characterization and drug delivery. *Drug Delivery* **12**, 327–342 (2005).
92. Laurent, T. C., Laurent, U. B. & Fraser, J. R. Functions of hyaluronan. *Annals of the rheumatic diseases* **54**, 429 (1995).
93. Juhlin, L. Hyaluronan in skin. *Journal of internal medicine* **242**, 61–66 (1997).
94. Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., Schiller, J. & Mendichi, R. Hyaluronic Acid: Its Function and Degradation in in vivo Systems. *Bioactive Natural Products (Part N) Volume 34*, 789–882 (2008).
95. CHEN, W. Y. J. & ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration* **7**, 79–89 (1999).
96. Yang, B., Zhang, L. & Turley, E. A. Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 8617–8623 (1993).
97. Peach, R. J., Hollenbaugh, D., Stamenkovic, I. & Aruffo, A. Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *The Journal of cell biology* **122**, 257–264 (1993).
98. Toole, B. P. Hyaluronan in morphogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* **12**, 79–87 (2001).

99. Baier Leach, J., Bivens, K. A., Patrick Jr., C. W. & Schmidt, C. E. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* **82**, 578–589 (2003).
100. Burdick, J. A., Chung, C., Jia, X., Randolph, M. A. & Langer, R. Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules* **6**, 386–391 (2005).
101. Jia, X. *et al.* Synthesis and Characterization of in Situ Cross-Linkable Hyaluronic Acid-Based Hydrogels with Potential Application for Vocal Fold Regeneration. *Macromolecules* **37**, 3239–3248 (2004).
102. Oudshoorn, M. H. M., Rissmann, R., Bouwstra, J. A. & Hennink, W. E. Synthesis of methacrylated hyaluronic acid with tailored degree of substitution. *Polymer* **48**, 1915–1920 (2007).
103. Segura, T. *et al.* Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* **26**, 359–371 (2005).
104. Park, Y. D., Tirelli, N. & Hubbell, J. A. Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks. *Biomaterials* **24**, 893–900 (2003).
105. Sasaki, T. & Watanabe, C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone* **16**, 9–15 (1995).
106. Kim, J. *et al.* Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **28**, 1830–1837 (2007).
107. Patterson, J. *et al.* Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials* **31**, 6772–6781 (2010).
108. Kim, J.-H. *et al.* Selection of a Streptococcus equi mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, 440–445 (1996).
109. Armstrong, D. C. & Johns, M. R. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by Streptococcus zooepidemicus. *Applied and environmental microbiology* **63**, 2759–2764 (1997).
110. Park, Y. J. *et al.* Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate–chitosan sponge for guided bone regeneration. *Journal of controlled release* **67**, 385–394 (2000).
111. Keskin, D. S., Tezcaner, A., Korkusuz, P., Korkusuz, F. & Hasirci, V. Collagen–chondroitin sulfate-based PLLA–SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone repair. *Biomaterials* **26**, 4023–4034 (2005).
112. Shin, H., Jo, S. & Mikos, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 4353–4364 (2003).

113. LeBaron, R. G. & Athanasiou, K. A. Extracellular Matrix Cell Adhesion Peptides: Functional Applications in Orthopedic Materials. *Tissue Engineering* **6**, 85–103 (2000).
114. Hersel, U., Dahmen, C. & Kessler, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **24**, 4385–4415 (2003).
115. Elbert, D. L. & Hubbell, J. A. Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering. *Biomacromolecules* **2**, 430–441 (2001).
116. Ruoslahti, E. RGD AND OTHER RECOGNITION SEQUENCES FOR INTEGRINS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **12**, 697–715 (1996).
117. Albelda, S. M. & Buck, C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. *The FASEB Journal* **4**, 2868–2880 (1990).
118. Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**, 491–497 (1987).
119. Van der Flier, A. & Sonnenberg, A. Function and interactions of integrins. *Cell and tissue research* **305**, 285–298 (2001).
120. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 21785–21788 (2000).
121. Pierschbacher, M. D. & Ruoslahti, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30–33 (1984).
122. LeBaron, R. G. & Athanasiou, K. A. Extracellular Matrix Cell Adhesion Peptides: Functional Applications in Orthopedic Materials. *Tissue Engineering* **6**, 85 (2000).
123. Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11 (1992).
124. Giancotti, F. G. Complexity and specificity of integrin signalling. *Nature Cell Biology* **2**, E13–E14 (2000).
125. Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M. & Ingber, D. E. Geometric control of cell life and death. *Science* **276**, 1425–1428 (1997).
126. Choquet, D., Felsenfeld, D. P. & Sheetz, M. P. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin–cytoskeleton linkages. *Cell* **88**, 39–48 (1997).
127. Katz, B.-Z. *et al.* Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 1047–1060 (2000).
128. Pelham, R. J. & Wang, Y.-L. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate. *Biological Bulletin* **194**, 348–350 (1998).

129. Grinnell, F. Focal adhesion sites and the removal of substratum-bound fibronectin. *The Journal of cell biology* **103**, 2697–2706 (1986).
130. Gaebel, K. & Feuerstein, I. A. Platelets process adsorbed protein: a morphological study. *Biomaterials* **12**, 597–602 (1991).
131. Castel, S. *et al.* RGD Peptides and Monoclonal Antibodies, Antagonists of  $\alpha_5\beta_1$  Integrin, Enter the Cells by Independent Endocytic Pathways. *Laboratory investigation* **81**, 1615–1626 (2001).
132. Memmo, L. M. & McKeown-Longo, P. The  $\alpha_5\beta_1$  integrin functions as an endocytic receptor for vitronectin. *Journal of cell science* **111**, 425–433 (1998).
133. Lin, H. *et al.* Synthesis, surface, and cell-adhesion properties of polyurethanes containing covalently grafted RGD-peptides. *Journal of biomedical materials research* **28**, 329–342 (1994).
134. Lin, H.-B., Zhao, Z.-C., GARCIA-ECHEVERRIA, C., Rich, D. H. & Cooper, S. L. Synthesis of a novel polyurethane co-polymer containing covalently attached RGD peptide. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **3**, 217–227 (1992).
135. Quirk, R. A., Chan, W. C., Davies, M. C., Tendler, S. J. B. & Shakesheff, K. M. Poly (l-lysine)–GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly (lactic acid). *Biomaterials* **22**, 865–872 (2001).
136. Hern, D. L. & Hubbell, J. A. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *Journal of Biomedical Materials Research* **39**, 266–276 (1998).
137. Besselink, G. A. J., Beugeling, T. & Bantjes, A. N-Hydroxysuccinimide-activated glycine-sepharose. *Applied biochemistry and biotechnology* **43**, 227–246 (1993).
138. Ivanov, B., Grzesik, W. & Robey, F. A. Synthesis and use of a new bromoacetyl-derivatized heterotrifunctional amino acid for conjugation of cyclic RGD-containing peptides derived from human bone sialoprotein. *Bioconjugate chemistry* **6**, 269–277 (1995).
139. Scheibler, L. *et al.* Functional Molecular Thin Films: Topological Templates for the Chemoselective Ligation of Antigenic Peptides to Self-Assembled Monolayers. *Angewandte Chemie International Edition* **38**, 696–699 (1999).
140. Thumshirn, G., Hersel, U., Goodman, S. L. & Kessler, H. Multimeric Cyclic RGD Peptides as Potential Tools for Tumor Targeting: Solid-Phase Peptide Synthesis and Chemoselective Oxime Ligation. *Chemistry-A European Journal* **9**, 2717–2725 (2003).
141. Lateef, S. S. *et al.* GRGDSP peptide-bound silicone membranes withstand mechanical flexing in vitro and display enhanced fibroblast adhesion. *Biomaterials* **23**, 3159–3168 (2002).

142. BEARINGER, J. P., CASTNER, D. G. & HEALY, K. E. Biomolecular modification of p (AAm-co-EG/AA) IPNs supports osteoblast adhesion and phenotypic expression. *Polymers for tissue engineering* **9**, 165 (1998).
143. Stile, R. A. & Healy, K. E. Thermo-Responsive Peptide-Modified Hydrogels for Tissue Regeneration. *Biomacromolecules* **2**, 185–194 (2001).
144. Danilov, Y. N. & Juliano, R. L. (Arg-Gly-Asp)<sub>n</sub>-Albumin conjugates as a model substratum for integrin-mediated cell adhesion. *Experimental cell research* **182**, 186–196 (1989).
145. Jeschke, B. *et al.* RGD-peptides for tissue engineering of articular cartilage. *Biomaterials* **23**, 3455–3463 (2002).
146. Kantlehner, M. *et al.* Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *ChemBiochem* **1**, 107–114 (2000).
147. Service, R. F. Tissue Engineers Build New Bone. *Science* **289**, 1498–1500 (2000).
148. Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D. A., Wells, A. & Griffith, L. G. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *Journal of Cell Science* **113**, 1677–1686 (2000).
149. Mann, B. K. & West, J. L. Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds. *Journal of biomedical materials research* **60**, 86–93 (2002).
150. Massia, S. P. & Hubbell, J. A. Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. *Analytical Biochemistry* **187**, 292–301 (1990).
151. Neff, J. A., Tresco, P. A. & Caldwell, K. D. Surface modification for controlled studies of cell–ligand interactions. *Biomaterials* **20**, 2377–2393 (1999).
152. Massia, S. P. & Hubbell, J. A. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *The Journal of Cell Biology* **114**, 1089–1100 (1991).
153. Healy, K. E., Reznia, A. & Stile, R. A. Designing biomaterials to direct biological responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* **875**, 24–35 (1999).
154. Drumheller, P. D., Elbert, D. L. & Hubbell, J. A. Multifunctional poly (ethylene glycol) semi-interpenetrating polymer networks as highly selective adhesive substrates for bioadhesive peptide grafting. *Biotechnology and bioengineering* **43**, 772–780 (1994).
155. Cook, A. D. *et al.* Characterization and development of RGD-peptide-modified poly (lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *Journal of biomedical materials research* **35**, 513–523 (1997).

156. Brandley, B. K. & Schnaar, R. L. Covalent attachment of an Arg-Gly-Asp sequence peptide to derivatizable polyacrylamide surfaces: Support of fibroblast adhesion and long-term growth. *Analytical biochemistry* **172**, 270–278 (1988).
157. Massia, S. P. & Hubbell, J. A. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. *Journal of biomedical materials research* **25**, 223–242 (1991).
158. Fisher, L. W., McBride, O. W., Termine, J. D. & Young, M. F. Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 2347–2351 (1990).
159. Celeste, A. J. *et al.* Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 9843–9847 (1990).
160. Wozney, J. M. *et al.* Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**, 1528–1534 (1988).
161. West, J. L. & Hubbell, J. A. Polymeric Biomaterials with Degradation Sites for Proteases Involved in Cell Migration. *Macromolecules* **32**, 241–244 (1998).
162. Cruise, G. M., Scharp, D. S. & Hubbell, J. A. Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels. *Biomaterials* **19**, 1287–1294 (1998).
163. Shin, H., Jo, S. & Mikos, A. G. Modulation of marrow stromal osteoblast adhesion on biomimetic oligo[poly(ethylene glycol) fumarate] hydrogels modified with Arg-Gly-Asp peptides and a poly(ethylene glycol) spacer. *Journal of Biomedical Materials Research* **61**, 169–179 (2002).
164. Shin, H., Zygourakis, K., Farach-Carson, M. C., Yaszemski, M. J. & Mikos, A. G. Modulation of differentiation and mineralization of marrow stromal cells cultured on biomimetic hydrogels modified with Arg-Gly-Asp containing peptides. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **69A**, 535–543 (2004).
165. He, X., Ma, J. & Jabbari, E. Effect of Grafting RGD and BMP-2 Protein-Derived Peptides to a Hydrogel Substrate on Osteogenic Differentiation of Marrow Stromal Cells. *Langmuir* **24**, 12508–12516 (2008).
166. Lee, J.-Y. *et al.* Osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells in self-assembled BMP-2 receptor-binding peptide-amphiphiles. *Biomaterials* **30**, 3532–3541 (2009).
167. Saito, A., Suzuki, Y., Ogata, S., Ohtsuki, C. & Tanihara, M. Activation of osteoprogenitor cells by a novel synthetic peptide derived from the bone morphogenetic protein-2 knuckle epitope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1651**, 60–67 (2003).

## Chapitre 1 : Etude bibliographique

168. Drevelle, O. *et al.* Effect of functionalized polycaprolactone on the behaviour of murine preosteoblasts. *Biomaterials* **31**, 6468–6476 (2010).
169. Rezania, A., Thomas, C. H., Branger, A. B., Waters, C. M. & Healy, K. E. The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein. *Journal of Biomedical Materials Research* **37**, 9–19 (1997).

# **Chapitre 2**

*Mise au point d'une nouvelle méthode  
de fonctionnalisation de l'acide  
hyaluronique par chimie « thiol-clic »*

<b>II. Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »</b>	<b>47</b>
<b>Introduction : la chimie clic</b>	<b>47</b>
<b>II.1. Etude bibliographique : la chimie clic et ses applications à la modification chimique de l'acide hyaluronique</b>	<b>49</b>
II.1.1. Les réactions de chimie clic sans catalyseur	49
i. Réaction de cycloaddition [3+2] avec azoture sans catalyseurs	49
ii. Réaction « thiol-clic »	51
iii. Réaction de Diels-Alder	53
II.1.2. Applications à l'acide hyaluronique	55
i. Cycloaddition de Huisgen	55
ii. Réaction de Diels-Alder furane-maléimide	56
iii. Réaction catéchol-thiol	58
<b>II.2. Modification chimique du HA par couplage thiol-maléimide</b>	<b>59</b>
II.2.1. Description de la stratégie de synthèse	61
II.2.2. Synthèse de dérivés HA-maléimide : mise en évidence du greffage de la fonction maléimide	62
i. Influence de la masse molaire du HA sur le degré de substitution	63
ii. Influence des quantités de réactifs sur le degré de substitution	66
iii. Influence des conditions de réactions sur les masses molaires	67
II.2.3. Synthèse de dérivés HA fonctionnels linéaires	69
i. Greffage de la séquence peptidique GRGDS sur le HA-maléimide	69
ii. Greffage du thio-cholestérol sur le HA-maléimide	72
II.2.4. Systèmes réticulés : Etude cinétique	76
<b>Conclusion</b>	<b>77</b>
<b>Références</b>	<b>79</b>

## II. Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

### Introduction : la chimie clic

La modification chimique des polymères représente aujourd'hui un véritable enjeu dans la science des macromolécules, notamment dans le cas de polymères naturels utilisés par exemple dans le domaine de l'ingénierie tissulaire ou de la délivrance de médicament. L'engouement croissant des dernières décennies pour ces polymères a conduit à une demande croissante de polymères « bien définis » aux propriétés modulables, à laquelle la chimie « clic » tente de répondre. Le concept de chimie clic a été introduit par Sharpless *et al.* en 2001, avec pour objectif de développer une large gamme de blocs sélectifs, modulables et facilement assemblables pour une large gamme d'applications<sup>1</sup>. Ils ont ainsi défini un certain nombre de critères rigoureux auxquels toute réaction se réclamant de la chimie « clic » doit répondre :

- Le rendement de la réaction doit être très élevé, proche de 100%.
- La réaction ne doit générer que des sous-produits inoffensifs que l'on peut éliminer par une méthode non chromatographique.
- La réaction doit être stéréospécifique.
- Les conditions expérimentales doivent être simples
- Les réactifs de départ doivent être aisément disponibles.
- La réaction ne doit pas nécessiter l'utilisation de solvant, ou alors des solvants « bénins » comme l'eau ou faciles à éliminer.
- L'isolation du produit doit se faire facilement. La purification, si nécessaire, se doit d'être non chromatographique, comme la recristallisation ou la distillation.
- Le produit obtenu doit être stable sous conditions physiologiques.

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

Les réactions ayant ces caractéristiques nécessitent généralement une forte enthalpie de réaction, supérieure à  $20 \text{ Kcal.mol}^{-1}$  et conduisent rapidement et de manière sélective à un produit unique. Les réactions formant des liaisons carbone-hétéroatome sont l'exemple le plus commun, incluant les classes de transformations chimiques suivantes :

- Les cycloadditions d'espèces insaturées, notamment les cycloadditions 1,3-dipolaire et les transformations de Diels-Alder.
- Les substitutions nucléophiles, notamment les réactions d'ouverture d'hétérocycles électrophiles tendus comme les époxydes ou les aziridines.
- La chimie des carbonyles de type non-aldol.
- Les additions sur des liaisons multiples carbone-carbone, notamment les oxydations et additions de Michaël.

Bien qu'il existe une grande variété de réactions clic, la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un alcyne vrai et un azoture, conduisant à la formation d'un 1,2,3-triazole, est l'exemple de chimie clic le plus rencontré dans la littérature. Cette procédure de couplage a su s'imposer dans toutes les disciplines de la chimie en quelques années<sup>2-6</sup>.

En effet, pour ce type de réaction, les azotures et les alcynes se sont révélés être des groupes fonctionnels stables pour une large gamme de conditions réactionnelles, comparé à la plupart des autres groupes fonctionnels<sup>7</sup>. Toutefois, en raison de la mauvaise réputation des dérivés azotures (caractère explosif), les chimistes se sont détournés de ce groupement organique et n'ont que peu exploité ses potentialités jusqu'à une période récente. C'est avec la découverte simultanée en 2001 de Sharpless *et al.*<sup>8</sup> et de Meldal *et al.*<sup>9</sup> sur l'utilisation du cuivre au degré d'oxydation (I) comme catalyseur de cette cycloaddition-1,3, que le potentiel de cette réaction s'est considérablement développé. En effet, en présence d'un catalyseur approprié comme les ions de métaux de transition, non seulement le rendement de cette réaction s'accroît considérablement mais elle devient en plus stéréospécifique.

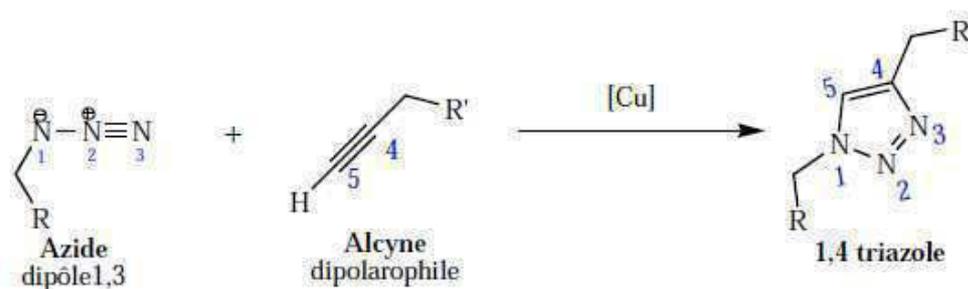


Figure 1 : cycloaddition 1,3 dipolaire azoture/alkyne de Huisgen

Cependant, la cytotoxicité du cuivre a conduit à l'investigation d'autres types de catalyseurs. Différents ligands et métaux de transition ont été étudiés. Néanmoins, la nécessité de développer des réactions clic qui ne requièrent pas de catalyseur métallique, en particulier pour les applications biologiques, tout en bénéficiant des mêmes avantages et propriétés que la cycloaddition de Huisgen a conduit à l'émergence de réactions clic alternatives.

Ce chapitre, après une partie introductive faisant état des différentes réactions de chimie-clic trouvées dans la littérature, présente une nouvelle méthode de modification chimique de l'acide hyaluronique développée au cours de ce travail de thèse.

## II.1. Etude bibliographique : la chimie clic et ses applications à la modification chimique de l'acide hyaluronique

### II.1.1. Les réactions de chimie clic sans catalyseur

#### *i. Réaction de cycloaddition [3+2] avec azoture sans catalyseurs*

La préparation d'un large éventail d'azotures a été bien étudiée et, ces dernières années, cette classe de composés facilement disponibles a bénéficié d'un intérêt croissant pour leur utilisation potentielle dans la réaction de cycloaddition de Huisgen azoture-alkyne (CuAAC). Cependant, les azotures ne réagissent pas facilement avec les alcynes sans la

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

présence d'un catalyseur car ils ont généralement un faible pouvoir d'accepteur 1,3 dipolaire. Différentes approches ont donc été développées afin d'accroître la réactivité des groupes alcynes et permettre ainsi la cycloaddition azoture-alcyne sans catalyseur métallique dans des conditions douces (cf. tableau 1)

Réactifs	Mécanisme	Schéma	Références
Azoture/cyclooctyne	Cycloaddition [3+2] azoture/alcyne "strain-promoted" (SPAAC)		[10-14]
Azoture/alcyne activé (complexe carbène alcynyle de Fischer)	Cycloaddition [3+2] de Huisgen		[15]
Azoture/alcyne électro-déficient	Cycloaddition [3+2]		[16-18]
Azoture/aryne	Cycloaddition [3+2]		[19,20]

Tableau 1 : Exemples de réactions de cycloaddition [3+2] sans catalyseur

La réaction SPAAC remplit la plupart des conditions d'une réaction clic. Cependant, la synthèse organique des dérivés cyclooctyne a besoin d'être simplifiée pour pouvoir s'élargir à d'autres champs que la chimie organique tel que la chimie-biologie. La disponibilité commerciale de dérivés cyclooctynes seraient un plus indéniable pour le développement de cette réaction.

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

Concernant la réaction avec un alcyne activé, bien que celle-ci soit prometteuse en tant que réaction clic non catalysée, elle doit être étudiée plus en détail en termes de rendement et de modularité. De plus, l'activation de l'alcyne avec du tungstène empêche cette réaction d'être classée dans les réactions clic « sans métal ». Bien que l'activation de l'alcyne soit méthodologiquement plus simple à obtenir que les cyclooctynes, d'autres méthodes d'activation doivent être développées afin de pouvoir appliquer cette méthode à des systèmes biologiques.

Les travaux de Ju *et al.*<sup>17</sup> mettant en jeu un alcyne électro-déficient sont également prometteurs mais, là encore, le rendement a besoin d'être amélioré et la modularité et la disponibilité des matériaux de départ évaluées.

La méthode développée par Larock *et al.*<sup>20</sup> puis améliorée par Feringa *et al.*<sup>19</sup> qui consiste à utiliser un benzyne et un azoture de benzyl en présence de CsF paraît également remplir les conditions de chimie clic. Cependant, les azotures attachés à un groupe électro-attracteur ne réagissent pas dans ces conditions. De plus, la réaction nécessite une source de fluorure et la disponibilité des matériaux aromatiques de départ peut être problématique.

### *ii. Réaction « thiol-clic »*

Les thiols sont utilisés dans diverses réactions chimiques depuis plus d'un siècle. Initialement, la chimie « thiol-ène » était utilisée pour la préparation de film bien définis ou de réseaux. Cependant, certains aspects pratiques comme l'odeur, le stockage ou la stabilité des mercaptans rendaient leur utilisation compliquée. La plupart de ces défis sont maintenant résolus, grâce à de nouvelles méthodes de synthèse des monomères et le développement de nombreux stabilisants efficaces. La littérature abonde sur les différentes voies de synthèse existantes et un large éventail de composés thiols sont maintenant relativement faciles à préparer. Les thiols sont donc de bons candidats pour des réactions clic (cf. tableau 2).

La chimie thiol-ène a reçu un fort regain d'attention ces deux dernières années grâce à sa simplicité, sa haute réactivité et la large variété de réactifs disponibles. En général, cette réaction s'opère sous UV sous conditions ambiantes dans des temps relativement courts. La

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

réaction clic thiol-ène a donc un futur prometteur pour la synthèse de macromolécules « sur-mesure » mais aussi de petites molécules organiques et bioconjuguées.

Réactifs		Mécanisme	Schéma	Références
Thiol/alcène		Addition radicalaire		[21-31]
Thiol	/maléimide	Addition de Michaël		[32,33]
	/énone			[34]
Thiol/Parafluorophényl		Substitution nucléophile	<p>SG1=<i>N</i>-<i>tert</i>-butyl-<i>N</i>-(1-diéthylphosphono-2,2-diméthylpropyl) nitroxyde</p>	[35]

Tableau 2 : Exemples de réaction « thiol-clic »

Bien que les conditions de la réaction d'addition de Michaël trouvées à ce jour dans la littérature ne permettent pas encore de remplir les critères d'une réaction clic, cette réaction fournit néanmoins une approche modulaire pour la préparation de nombreux copolymères à blocs fonctionnels synthétisés par la technique RAFT. A ce titre, l'addition de Michaël a le potentiel pour devenir une réaction clic du futur.

La versatilité et l'efficacité de la substitution par un thiol de la position *para* de C<sub>6</sub>F<sub>5</sub> satisfait la plupart des critères de chimie clic. De plus, de nombreux thiols sont disponibles

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

commerciallement. Cependant l'accessibilité du groupe C<sub>6</sub>F<sub>5</sub> est plutôt limitée, entravant ainsi la portée et la modularité de cette réaction.

### *iii. Réaction de Diels-Alder*

La réaction de Diels-Alder a été rapportée pour la première fois en 1928 par Otto Paul Herman Diels et Kurt Alder<sup>36</sup>. Ils reçurent en 1950 le prix Nobel de chimie pour ces travaux. Cette réaction est une des plus fascinantes en chimie organique en termes de mécanisme réactionnel et de potentiel de synthèse. Elle met en jeu la création et la destruction simultanées de liaisons carbone-carbone. Elle ne nécessite que très peu d'énergie et peut donc se produire à une température inférieure à la température ambiante. Il existe une multitude de travaux sur la réaction de Diels-Alder ; ceux qui suivent sont des exemples basés sur les bioconjugués ou les macromolécules (cf. tableau 3).

Les travaux de Hildebrand *et al.*<sup>37</sup> sur la réaction entre un *trans*-cyclooctène et la dipyridyltetrazine remplissent la plupart des critères de la chimie clic. Cette réaction permet d'obtenir un rendement quantitatif rapidement à température ambiante. De plus elle préserve sa réactivité dans les solvants organiques, l'eau ou le milieu de culture cellulaire. S'ajoute également le fait que les produits utilisés sont commercialement disponibles.

Les travaux de Tunca, Hizal *et al.*<sup>39</sup> ont montré que la réaction clic de Diels-Alder entre un motif anthracène et un maléimide est aussi efficace que la CuAAC pour la fabrication de polymères en forme d'étoile. Cependant, comme dans le cas de la CuAAC, il est difficile d'accéder à des hautes masses molaires par cette technique à cause de l'encombrement stérique créé par les branches déjà formées.

Enfin Barner-Kowollik, Stenzel *et al.*<sup>37</sup> ont reporté récemment une réaction clic ultra rapide de blocs macromoléculaires à température ambiante en quelques minutes en absence de catalyseur en utilisant un cyclopentadiène et un dithioester dans l'acide trifluoroacétique (TFA). Cette réaction clic est extrêmement efficace et permet la synthèse de copolymères à blocs.

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

Il ne fait aucun doute que les réactions de Diels-Alder remplissent de nombreux critères de la chimie clic. Cependant le temps parfois long de ces réactions et/ou de hautes températures de réaction, en particulier pour les systèmes macromoléculaires, représentent une limite de cette technique.

Réactifs	Mécanisme	Schéma	Références
Tétrazine/alcène	Rétro-cycloaddition [4+2] de Diels-Alder		[38,39]
Anthracène/maléimide	Réaction de Diels-Alder [4+2]		[40,41]
Dithioester/diène	Cycloaddition hétéro-Diels-Alder	<p>TFA=Acide trifluoroacétique</p>	[37,42]

Tableau 3 : Exemples de réactions de Diels-Alder

Dans le chapitre suivant, nous allons explorer les différentes réactions de chimie clic qui ont été mises en œuvre dans la modification de l'acide hyaluronique.

## II.1.2. Applications à l'acide hyaluronique

### i. Cycloaddition de Huisgen

Les hydrogels d'acide hyaluronique comme substrat pour l'ingénierie tissulaire sont très recherchés pour leur excellente biocompatibilité et biodégradabilité. Afin d'obtenir un meilleur contrôle sur la distribution des cellules à l'intérieur de ces gels, une solution consiste à ajouter les cellules au substrat pendant la gélification de celui-ci, pourvu qu'elle ne nécessite pas de chauffer ou d'ajouter des réactifs toxiques. Dans cette optique, Crescenzi *et al.* ont développé une nouvelle procédure pour la gélification rapide in situ de solutions d'acide hyaluronique basée sur la cycloaddition de Huisgen<sup>43</sup>.

Des dérivés d'acide hyaluronique portant des chaînes latérales finissant soit par une fonction azoture soit une fonction alcyne vrai ont été synthétisés. Quand ces deux dérivés sont mélangés ensemble dans une solution aqueuse en présence du catalyseur Cu(I) à température ambiante, la réaction de cycloaddition de Huisgen se produit, conduisant à une gélification rapide (cf. figure 2).

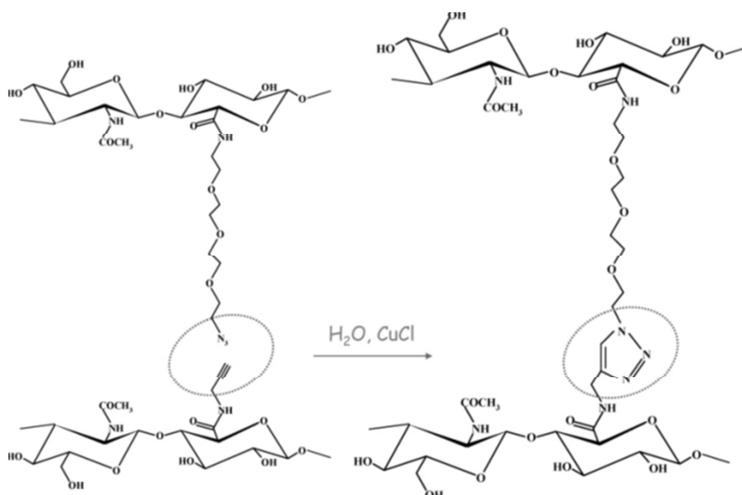


Figure 2 : cycloaddition de Huisgen entre un dérivé de HA-alcyne et un HA-azoture

Les deux dérivés ont été obtenus par simple couplage peptidique entre la propargylamine (pour le dérivé alcyne) et le 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (pour le dérivé azoture) et la fonction carboxylate du HA, en présence de *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDC) et *N*-hydroxysulfosuccinimide (NHS) dans un tampon aqueux à pH 4. Les « gels-clic » ont été préparés en mélangeant deux quantités égales en masse de ces deux dérivés à une concentration totale de 50 g/L, en présence de CuCl (10 g/L). Le gel se forme en quelques minutes sous vive agitation et est ensuite purifié par dialyse.

Chaque dérivé de HA (azoture et alcyne) a été synthétisé avec 2 degrés de substitution (DS, nombre de moles de substituants en moyenne toutes les 100 unités disaccharides de répétition) différents en faisant varier les équivalents de réactifs. Les auteurs ont ainsi obtenu 2 gels de degrés de réticulation différents : 21% et 8%. Ces 2 gels ont montré un temps de gélification très rapide, respectivement 130 et 160s et des modules de stockage (module élastique)  $G'$  importants : 14900 et 6900 Pa.

Les auteurs ont ensuite montré, entre autres, la possibilité d'encapsuler des cellules *in situ*, leur distribution homogène, leur viabilité et leur adhésion au substrat. Leur étude a été menée avec des levures *S. Cerevisiae* et a montré qu'après 24h, 80% des cellules montrent une activité de prolifération. Des images de microscopie électronique à balayage (SEM) confirment une distribution homogène et une bonne adhésion cellulaire.

Si cette procédure semble prometteuse pour l'élaboration de « gels-clic » pour l'ingénierie tissulaire, l'inconvénient majeur réside dans la présence même infime de Cu(I). En effet, pour d'autres types de cellule, il s'avèrera indispensable de diminuer la quantité de catalyseur, la question étant de savoir dans quelle mesure cela reste possible.

## ***ii. Réaction de Diels-Alder furane-maléimide***

Afin d'éviter l'emploi de catalyseurs potentiellement cytotoxiques Nimmo *et al.*<sup>44</sup> ont cherché à développer une méthode qui n'en requiert aucun. La réaction de Diels-Alder entre un furane et un maléimide apparaît comme une méthodologie idéale : il s'agit d'une

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

cycloaddition hautement sélective entre un diène et un diénophile qui s'opère dans l'eau, sans réactions secondaires ou formation de sous-produit, en une seule étape.

Le dérivé HA-furane (diène) a d'abord été synthétisé en utilisant du chlorure de 4-(4,6-diméthoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-méthylmorpholinium (DMTMM) comme agent d'activation de l'acide carboxylique, afin d'opérer un couplage peptidique entre la furfuylamine et la fonction carboxylate du HA. Des hydrogels de HA ont ensuite été obtenus par réticulation en mélangeant ce HA-furane avec un polyéthylène glycol bis-maléimide (diénophile) en solution aqueuse (cf. figure 3).

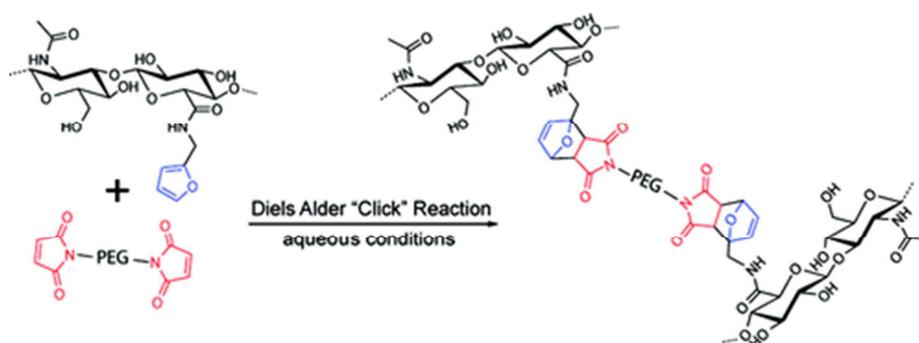


Figure 3 : Réaction clic de Diels-Alder entre un HA-furane et un PEG bis-maléimide

Le dérivé HA-furane a été synthétisé avec 3 DS différents : 75%, 61%, et 49%. Pour la suite de l'étude le HA de DS 49% a été utilisé. Différents gels ont été caractérisés par rhéologie afin de déterminer leur module élastique  $G'$ , en fonction de leur ratio furane/maléimide. Dans chaque expérience la concentration molaire en HA-furane reste constante (11 g/L) tandis que celle de PEG-maléimide varie. 3 ratios ont été testés : 1furane/0.5 maléimide 1furane/1maléimide, et 1 furane/2 maléimides correspondant à des concentrations totales (HA+PEG) de 21 g/L, 32 g/L et 53 g/L. Les  $G'$  obtenus sont respectivement 275, 557 et 679 Pa. Le fait que le module augmente encore au-delà du ratio 1/1 montre que la réaction ne procède pas à une conversion de 100%. De plus, il est intéressant de noter que les gels sont déposés une nuit à 37°C avant les mesures rhéologiques afin de s'assurer que la réticulation est bien terminée. La gélification semble donc moins rapide que la cycloaddition de Huisgen et est facilitée par un léger apport de chaleur.

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

Des tests d'attachement cellulaire et de viabilité ont aussi été effectués, ici avec des cellules endothéliales connues pour exprimer le CD44, un récepteur spécifique du HA, permettant ainsi une interaction et une adhésion potentielle au gel HA-PEG. Les cellules ont été déposées en surface, là encore après une nuit de gélification. On peut penser que la lenteur de la réaction ne permet pas d'encapsuler des cellules en 3D. Après 24h, les cellules commencent à s'étaler, suggérant une adhésion. Après 14 jours de culture, 98% des cellules présentes sur l'hydrogel étaient en vie, montrant ainsi la cytocompatibilité du gel. Il faut cependant préciser qu'une grande partie des cellules se sont détachées au fur et à mesure des changements de milieu.

### iii. Réaction catéchol-thiol

Toujours dans le même esprit, Lee *et al.*<sup>45</sup> ont tenté une autre approche afin de créer des gels de HA thermogélifiants et injectables pour l'ingénierie tissulaire. Leur stratégie est de greffer le Pluronic F127, qui est un copolymère thermosensible de type PEG, fonctionnalisé à ses extrémités par des fonctions thiol SH (Plu-SH) sur un HA modifié par couplage peptidique avec de la dopamine (cf. figure 4). Ce couplage thiol-catéchol est une réaction de type addition de Michaël.

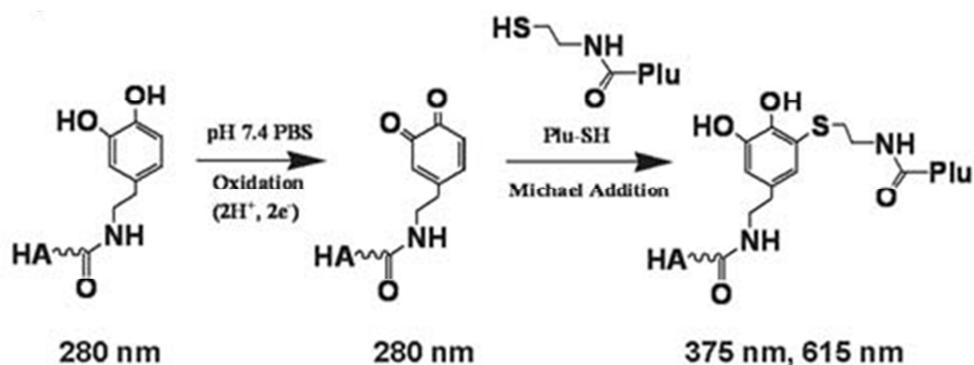


Figure 4 : Addition de Michaël « thiol-catéchol » entre un dérivé de HA-dopamine et un Pluronic-SH

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

La dopamine a été greffée par couplage peptidique sur le HA en présence d'EDC à pH 5,5. Deux degrés de substitution ont été obtenus en faisant varier les équivalents de réactifs : 46 et 23 %.

Le Pluronic F127 a été fonctionnalisé avec de la cystéamine sur les fonctions hydroxyles terminales. Le degré de thiolation obtenu est de 94%.

Les hydrogels composites thermosensibles HA/Pluronic sont ensuite obtenus en mélangeant le dérivé HA-dopamine et le Plu-SH dans le PBS à pH 7,4 pendant 1 jour à 4°C, la concentration en HA-dopamine étant fixée à 50 g/L et celle en Plu-SH variant. La faisabilité du couplage a été mise en évidence en mesurant par rhéologie l'évolution des modules  $G'$  et  $G''$  en fonction de la température des différents mélanges. Pour les 3 concentrations en Plu-SH testées (113 g/L, 125 g/L et 138 g/L), les températures de transition sol-gel sont de 29°C, 25°C et 19°C respectivement. Les modules  $G'$  maximum atteints varient quant à eux de  $10^3$  à  $10^5$  Pa. Ces résultats ont été comparés à une solution contrôle de HA à 50 g/L non modifié mélangé avec du Pluronic F127 138 g/L non modifié : le module  $G''$  reste supérieur à  $G'$  quelle que soit la température ; il n'y a donc pas de comportement thermogélifiant si le HA et le Pluronic ne sont pas réticulés.

Les auteurs ont ensuite montré l'intérêt de ce matériau pour l'injectabilité comparé à un Pluronic F127 seul, tant au niveau de sa robustesse et de sa stabilité après injection à 37°C qu'au niveau de ses capacités d'adhésion au tissu *in vitro et in vivo*.

Ce couplage thiol-cathécol bien qu'a priori très prometteur présente toutefois quelques inconvénients. En effet, la dopamine a tendance à s'oxyder en différentes forme (quinone) et il est donc difficile de maîtriser parfaitement le produit de cette addition.

## **II.2. Modification chimique du HA par couplage thiol-maléimide**

Le couplage furane-maléimide avait été tenté au laboratoire et n'avait pas été concluant. Cependant, le dimaléimide utilisé n'était pas un PEG de 30 kg/mol comme c'est le cas dans le travail de Nimmo *et al.* mais un simple motif PEG-(bis)maléimide de masse 308 g/mol. Ceci peut expliquer que la réticulation n'ait pas eu lieu et ne se soit pas observée

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

macroscopiquement. Une autre approche avait été de mélanger deux HA différents, l'un modifié par la fonction furane, l'autre par la fonction maléimide. Ces deux dérivés de HA avaient ensuite été mélangés à une concentration totale de 2,5 g/L. Là encore, même à 37°C après 5 jours de réaction, aucune gélification macroscopique ou augmentation de viscosité n'avait été observée. Ce couplage semble donc, en plus d'être cinétiquement plutôt lent, nécessiter une concentration assez importante de chaque fonction pour s'opérer.

Le couplage catéchol-thiol a également été tenté au laboratoire. Si la dopamine sous sa forme catéchol semble présenter un réel intérêt biologique de par son activité d'adhérence tissulaire, il faut noter que lors de son greffage sur le HA par couplage peptidique, un certain nombre de signaux non-identifiés en RMN  $^1\text{H}$  apparaissent sur le spectre, laissant supposer un réarrangement de l'EDC sous sa forme *N*-acylurée non-désirable. Cette réaction secondaire, qui semble inévitable dans le cas de la dopamine, même en présence des co-réactifs NHS ou HOBt, n'est pas mentionnée dans le travail de Lee *et al.* et peut apporter une potentielle cytotoxicité au matériau.

De plus, on a essayé de greffer le pentanethiol et l'acide 3-mercaptopropionique dans les conditions citées dans le travail de Lee *et al.* mais à une concentration en HA-dopamine 10 fois plus faible, soit 5 g/L. Ces tentatives ont été vaines et n'ont pas permis de greffer ces molécules, d'après les résultats obtenus en RMN  $^1\text{H}$ . Toujours dans ces conditions, on a également observé l'évolution de la viscosité au cours du temps d'une solution de HA-dopamine mélangé avec un PEG-4SH de masse 2200 g/mol. Là encore, aucune évolution significative de viscosité n'a été observée, suggérant une absence de couplage thiol-catéchol à cette concentration.

Suite à ces résultats peu concluants, nous avons donc développé une nouvelle approche de chimie clic appliquée au HA. Nous nous sommes intéressés au couplage par addition de Michaël, aussi appelé couplage thiol-ène ou « thiol-clic ». Cette réaction procède sous conditions physiologique et le lien thio-éther formé est très stable et résistant dans un environnement fortement acide ou basique ou face à un agent réducteur. Le principal inconvénient de la chimie thiol-ène provient de la sensibilité des thiols face à l'oxydation en disulfure. Cette réaction secondaire indésirable peut être en général évitée en excluant l'oxygène de la réaction, en utilisant un agent réducteur tel que le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), ou en utilisant des thiols protégés.

Nous nous sommes penchés plus précisément sur le couplage d'un thiol avec une fonction maléimide. Cette approche apparaît complémentaire au couplage thiol-ène par addition radicalaire sous UV, lui aussi développé au laboratoire, car elle ne nécessite pas l'utilisation d'UV susceptibles de dégrader la chaîne de HA.

### II.2.1. Description de la stratégie de synthèse

L'idée est de venir greffer sur le HA un motif maléimide par couplage peptidique sur sa fonction carboxylate, motif sur lequel on vient ensuite, par addition de Michaël, greffer une molécule possédant une fonction thiol (cf. figure 5). Cette stratégie présente l'avantage de se faire dans des conditions douces, c'est-à-dire dans l'eau, à pH physiologique et sans ajout d'un quelconque réactif au catalyseur cytotoxique. De plus, ce couplage s'avère quantitatif et présente un rendement proche de 100%.

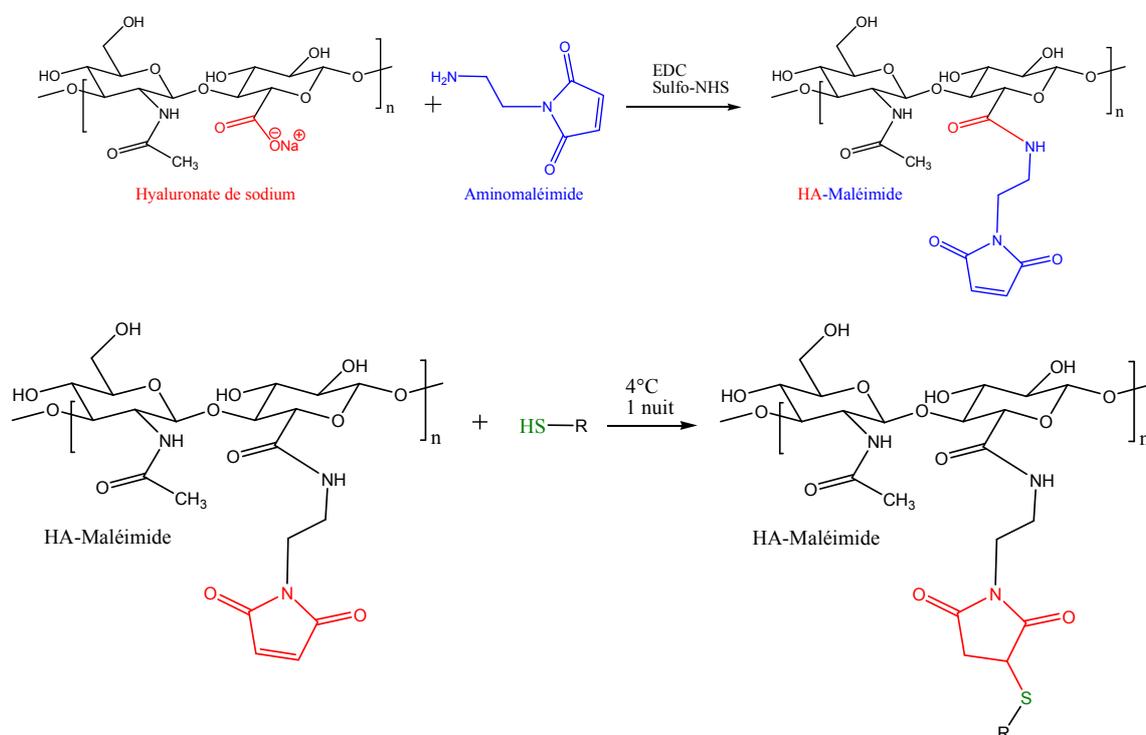


Figure 5 : Modification d'un HA par addition de Michaël d'un substituant comportant une fonction thiol sur une fonction maléimide

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

La première étape se fait dans des conditions similaires à celles rencontrées dans la littérature, en présence d'EDC et de sulfo-NHS à pH 4,75 en solution aqueuse. Contrairement à l'exemple de la dopamine cité précédemment, on n'observe pas de réarrangement de l'EDC en *N*-acylurée conduisant à son greffage sur la chaîne de HA. Cependant, il s'est avéré impossible de caractériser le produit après cette étape car, après lyophilisation, le polymère n'est plus soluble. Il existe donc des réactions secondaires, entraînant une réticulation du polymère lors de la lyophilisation. Si celles-ci n'ont pas été identifiées, on soupçonne cependant une possible réactivité des fonctions alcool du HA vis-à-vis de la fonction maléimide ; en effet, bien que les thiols aient des propriétés chimiques très différentes des alcools, ils sont structurellement similaires.

Les thiols correspondants étant plus nucléophiles, plus acides et plus facilement oxydés. Ces réactions indésirables sont néanmoins facilement évitables en opérant en régime dilué, c'est-à-dire à une concentration inférieure ou égale à la concentration critique de recouvrement des pelotes ( $C^*$ ) du HA. On passe donc directement à la deuxième étape après purification du HA-maléimide par ultrafiltration.

La deuxième étape consiste simplement à ajouter un thiol en quantité stœchiométrique, au HA-maléimide concentré à  $0,5 C^*$  environ, à pH 7,4. Par mesure de précaution, on ajoute après 1 nuit de réaction un excès d'acide 3-mercaptopropionique (AMP) afin de neutraliser toutes les fonctions maléimides potentiellement restantes pouvant conduire à des réactions secondaires lors de la lyophilisation. Le produit est ensuite purifié par ultrafiltration frontale avec de l'eau milliQ et lyophilisé.

### **II.2.2. Synthèse de dérivés HA-maléimide : mise en évidence du greffage de la fonction maléimide**

La mise en évidence du greffage de la fonction maléimide sur le HA s'est avérée impossible après la première étape pour les raisons citées précédemment. Cependant, après réaction de la fonction maléimide avec une molécule d'intérêt portant une fonction thiol, le produit ne présente plus de problème après lyophilisation. On a donc choisi de faire réagir l'acide 3-mercaptopropionique (AMP) en excès sur les fonctions maléimides afin d'isoler le

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

produit et de pouvoir l'étudier par RMN et GPC. Afin de faciliter l'interprétation des spectres RMN  $^1\text{H}$ , on a réalisé au préalable le couplage thiol-maléimide avec 1 équivalent d'AMP pour 1 équivalent d'amino-maléimide (cf. figure 6a)). Cela a permis d'identifier avec certitude les signaux que l'on observe en RMN (cf. figure 6b)). En effet, une grande partie des signaux caractéristiques du couplage thiol-maléimide se trouvent ensuite masqués par les signaux du HA lui-même.

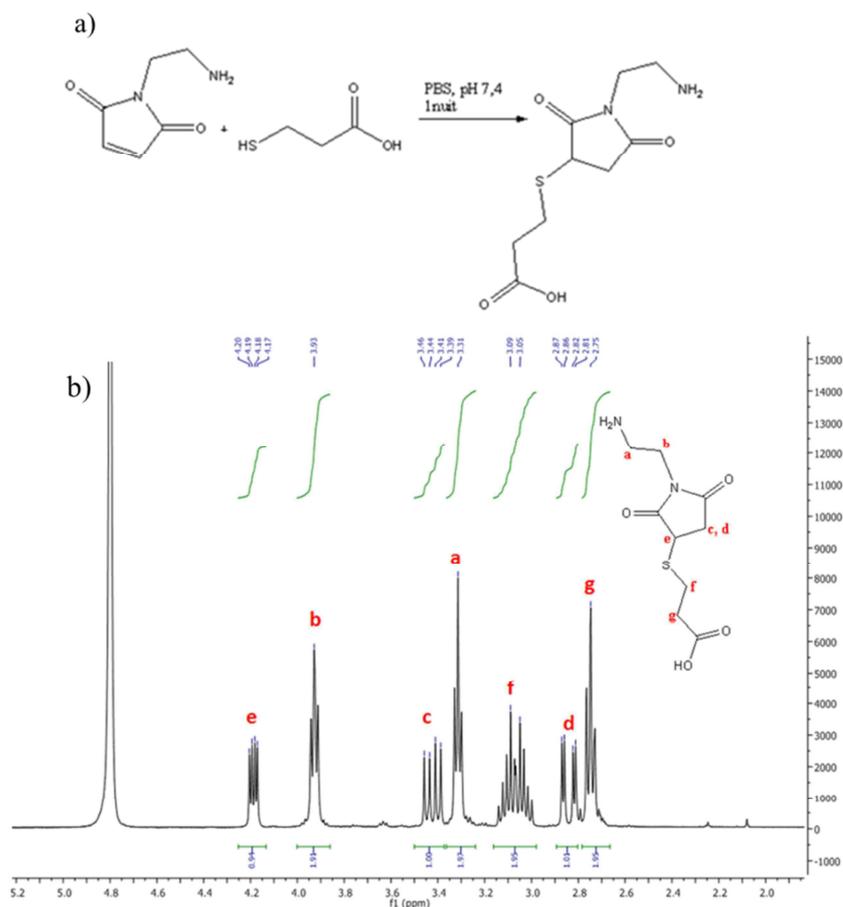


Figure : a) Couplage de l'AMP avec le sel de N-(2-Aminoéthyl)maleimide trifluoroacétate b) Spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit obtenu

Dans le chapitre suivant, on a étudié la faisabilité de ce couplage sur différentes masses molaires de HA et les degrés de substitution obtenus par RMN  $^1\text{H}$ .

*i. Influence de la masse molaire du HA sur le degré de substitution*

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

Les synthèses ont été effectuées à partir de 3 lots de HA de masses molaires  $M_w=20$ , 200 et 600 kg/mol modifiés comme expliqué précédemment. La première étape, le couplage peptidique avec l' amino-maléimide, se fait à une concentration en HA égale à leur  $C^*$  respectives (cf tableau), avec les mêmes quantités d'équivalents de réactifs, soit :

- HA 1 éq. molaire
- [NaCl] 0,15M
- *N*-(2-Aminoethyl)maleimide trifluoroacétate 1,5 éq. molaires par rapport au HA
- *N*-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS) 1 éq. molaire
- *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC) 2 éq. molaires

Les  $C^*$  ont été calculées grâce aux relations suivantes<sup>46</sup> : la valeur de la viscosité intrinsèque, c'est-à-dire de la viscosité à dilution infinie provient de la relation  $[\eta] = 0,0336 M_w^{0,79}$ . Les valeurs des  $C^*$ , les concentrations critiques de recouvrement des pelotes, sont déduites de la viscosité intrinsèque sachant que :  $C^*[\eta] = 1$  (cf. tableau 4).

$M_w$ (kg/mol) du HA	$C^*$ (g/L)
20	11,9
200	1,93
600	0,81

Tableau 4 :  $C^*$  du HA en fonction de sa masse molaire

La deuxième étape consiste en l'ajout de 2 équivalents d'AMP, à une concentration avoisinant  $0,5 C^*$  à pH 7,4.

Après modification du HA, seuls le proton noté d, appartenant au motif maléimide, et les protons f et g appartenant au motif AMP sont visibles sur le spectre RMN  $^1H$  (cf. figure 7).

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

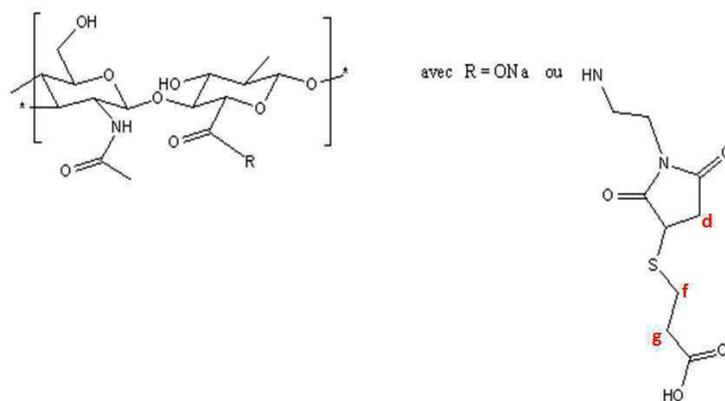


Figure 7 : Dérivé de HA-maléimide-AMP

Le degré de substitution (%), défini comme le nombre de moles moyen de substituants pour 100 moles d'unités de répétition, est calculé en rapportant l'intégrale du proton d ( $I_2$ ), ou celle des protons g ( $I_3$ ) à l'intégrale des protons anomères du HA ( $I_1$ ) (cf. figure 8). Ainsi on obtient :

$$DS (\%) = \frac{I_2}{I_1} * 2 * 100 = \frac{I_3}{I_1} * 100$$

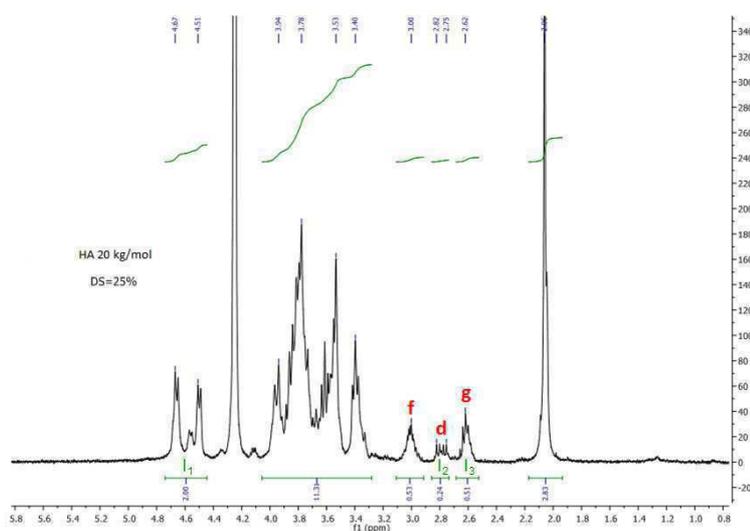


Figure 8 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du HA-maléimide-AMP de masse 20 Kg/mol substitué à 25%

On a montré grâce à la RMN que la masse molaire a une influence non négligeable sur l'efficacité du couplage peptidique: plus elle est élevée, plus il est difficile de substituer le HA avec l'amino-maléimide (cf. figure 9). En revanche, le rapport des intégrales  $I_3/I_2$  reste constant et égal à 2 montrant que le maléimide est toujours substitué à 100% par l'AMP. Cela

se confirme également par le fait que l'on n'observe pas de signal correspondant à un maléimide non réagi, qui aurait a priori de toute façon réagi lors de la lyophilisation et conduit à des réticulations indésirables. Les études SEC qui suivront vont également dans ce sens.

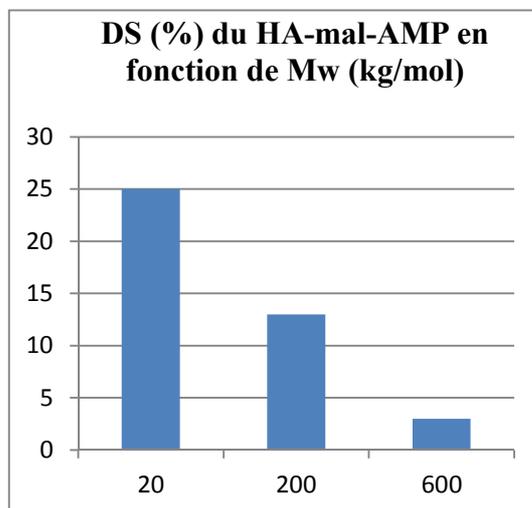


Figure 9 : Degré de substitution du HA-maléimide-AMP en fonction de sa masse molaire

Dans le chapitre suivant, on a étudié la maîtrise du DS du maléimide en fonction des quantités de réactifs ajoutés, afin de voir si celui-ci peut être aisément augmenté.

### *ii. Influence des quantités de réactifs sur le degré de substitution*

Le tableau 5 ci-dessous résume les 3 essais qui ont été effectués afin de tenter d'augmenter le DS en maléimide lors du couplage peptidique. Il donne le nombre d'équivalents employés pour chaque réactif lors de chaque essai par rapport au HA. Ces essais ont été réalisés avec un HA de masse 200 kg/mol. Les quantités des réactifs ont été augmentées proportionnellement.

	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Amino-maléimide	1,5	2,25	3
Sulfo-NHS	1	1,5	2
EDC	2	3	4

Tableau 5 : récapitulatif des différents essais

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

Les degrés de substitution ont été calculés d'après les spectres RMN comme précédemment. Cette étude a montré que le DS peut être augmenté jusqu'à une certaine limite, probablement pour des raisons d'encombrement stérique. Ainsi, pour le HA de masse 200 kg/mol, le DS maximum obtenu est de 17% (cf. figure 10).

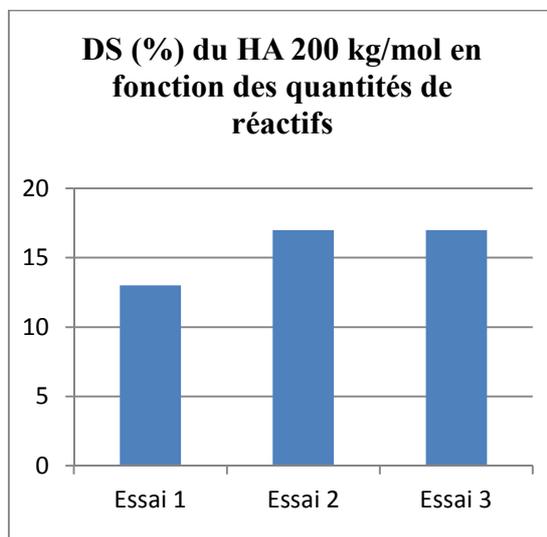


Figure 10 : Degré de substitution du HA-maléimide-AMP selon les quantités de réactifs

Ensuite on a regardé l'impact de cette méthode de modification sur la masse molaire du HA par SEC.

### *iii. Influence des conditions de réactions sur les masses molaires*

Tous les HA modifiés ont été étudiés en chromatographie d'exclusion stérique (SEC) avant et après modification, afin de se rendre compte de l'impact de ces synthèses sur leur masse molaire. En effet, il convient de s'assurer que les conditions mises en œuvre ne produisent pas de dépolymérisation, qui se traduirait par une diminution de masse molaire, ou à l'inverse de réticulation qui engendrerait une augmentation de celle-ci. Le tableau 6 récapitule les résultats obtenus.

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

On peut noter que globalement, les résultats sont représentatifs de notre échantillon car les produits sont presque toujours élus à 100%. De plus ils sont cohérents par rapport aux masses molaires attendues en théorie.

HA (kg/mol)	M <sub>w</sub> expérimentale (+/- 5%, kg/mol)		M <sub>w</sub> théorique après modification (kg/mol)	Pourcentage de produit élué	
	Avant modification	Après modification		Avant modification	Après modification
200 (Essais 1, 2 et 3)	195	203, 205, 220	208, 212, 212	67	100, 100, 100
600	608	475	617	100	100

Tableau 6 : Analyse par SEC (équipée d'un réfractomètre différentiel et d'un détecteur MALLS) de dérivés de HA modifiés.

D'après ces résultats, en ce qui concerne les HA de masse 20 et 200 kg/mol on peut dire que les conditions employées n'ont pas entraîné de perte de masse et donc de dépolymérisation. A l'inverse une très faible hausse de la masse molaire semble avoir lieu, ce qui s'explique par le fait que la masse de l'unité de répétition augmente du fait du greffage des fonctions maléimide et AMP. Ainsi, on a calculé l'augmentation de masse théorique comme suit.

Soit  $M_{HA}$  la masse de l'unité de répétition du HA non modifié en g/mol et  $M_{HA-mal-AMP}$  la masse de l'unité de répétition modifiée avec les fonctions maléimide et AMP, on détermine la masse moyenne de l'unité de répétition du HA modifié en fonction du DS comme suit :  

$$M_{HA-mal-AMP}(DS) = M_{HA-mal-AMP} * DS + M_{HA}(1-DS).$$

Puisqu'on connaît la masse molaire moyenne en masse des chaînes polymères initiale ( $M_{wi}$ ) grâce à la SEC, on peut en déduire le nombre d'unité de répétition moyen de notre

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

polymère de départ ( $N_{ur}$ ) :  $N_{ur} = M_{wi} / M_{HA}$ . On en déduit ainsi la nouvelle  $M_w$  après modification :  $M_w = N_{ur} * M_{HA-mal-AMP(DS)}$ .

Pour le HA 20 kg/mol substitué à 25%, voici en exemple le calcul de  $M_w$  après modification :

$$N_{ur} \approx \frac{18000}{401} \approx 45 \Rightarrow M_w \approx 45 * 452,5 \approx 20\ 300\ g/mol$$

On constate en revanche pour le HA de masse 600 kg/mol une perte de masse d'environ 20 % qui est difficile à expliquer.

Cette étude par SEC des HA modifiés par la réaction clic thiol-maléimide nous a permis de montrer que les conditions utilisées sont suffisamment douces pour ne pas entraîner de dégradation de la chaîne polymère principale du HA, avec toutefois une certaine réserve concernant les plus hautes masses molaires. De plus, elle nous a également permis de montrer qu'en procédant en milieu dilué, les réactions secondaires éventuelles provoquant une réticulation du polymère pouvaient être évitées.

### II.2.3. Synthèse de dérivés HA fonctionnels linéaires

Afin de montrer l'efficacité et la versatilité du couplage thiol-maléimide sur le HA, ce chapitre présente 2 exemples de molécules d'intérêt ayant été greffées avec succès sur la chaîne de HA : la séquence peptidique gly-arg-gly-asp-ser, notée aussi GRGDS et le cholestérol.

#### *i. Greffage de la séquence peptidique GRGDS sur le HA-maléimide*

L'acide Arginylglycylaspartique est un tripeptide composé des 3 acides aminés L-arginine, L-glycine, et acide L-aspartique, communément noté RGD (cf. figure 11).

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

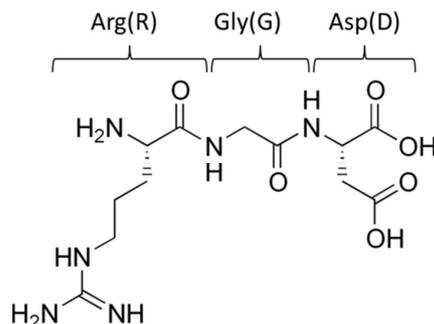


Figure 11 : tripeptide de séquence RGD

Comme expliqué dans le chapitre 1, cette séquence est connue pour promouvoir l'attachement des cellules lorsqu'elle est immobilisée en surface de biomatériaux<sup>47</sup>. Elle présente donc un grand intérêt dans le domaine de l'ingénierie tissulaire puisqu'elle permet, en la greffant sur des substrats a priori non-adhésifs, de faciliter l'adhésion, l'étalement et par conséquent l'organisation du cytosquelette de la cellule.

### Caractérisation et contrôle du DS

Un HA de masse 200 kg/mol a été modifié selon la méthode décrite précédemment. La première étape a été réalisée afin d'obtenir un DS en maléimide de l'ordre de 17% (DS maximum pour cette masse molaire). Ce HA-maléimide après purification a été divisé en 3 lots auxquels on a ajouté respectivement 5, 10 et 20% d'équivalents en peptide GRGDS (contenant une extrémité thiol) par rapport au HA. Enfin, après 1h30 de réaction, un excès d'AMP a été ajouté afin de faire réagir les fonctions maléimide potentiellement restantes. La figure 12 ci-dessous met en parallèle les spectres RMN <sup>1</sup>H du HA et du peptide seuls comparés au HA modifié avec le peptide, celui-ci ayant été greffé avec succès.

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

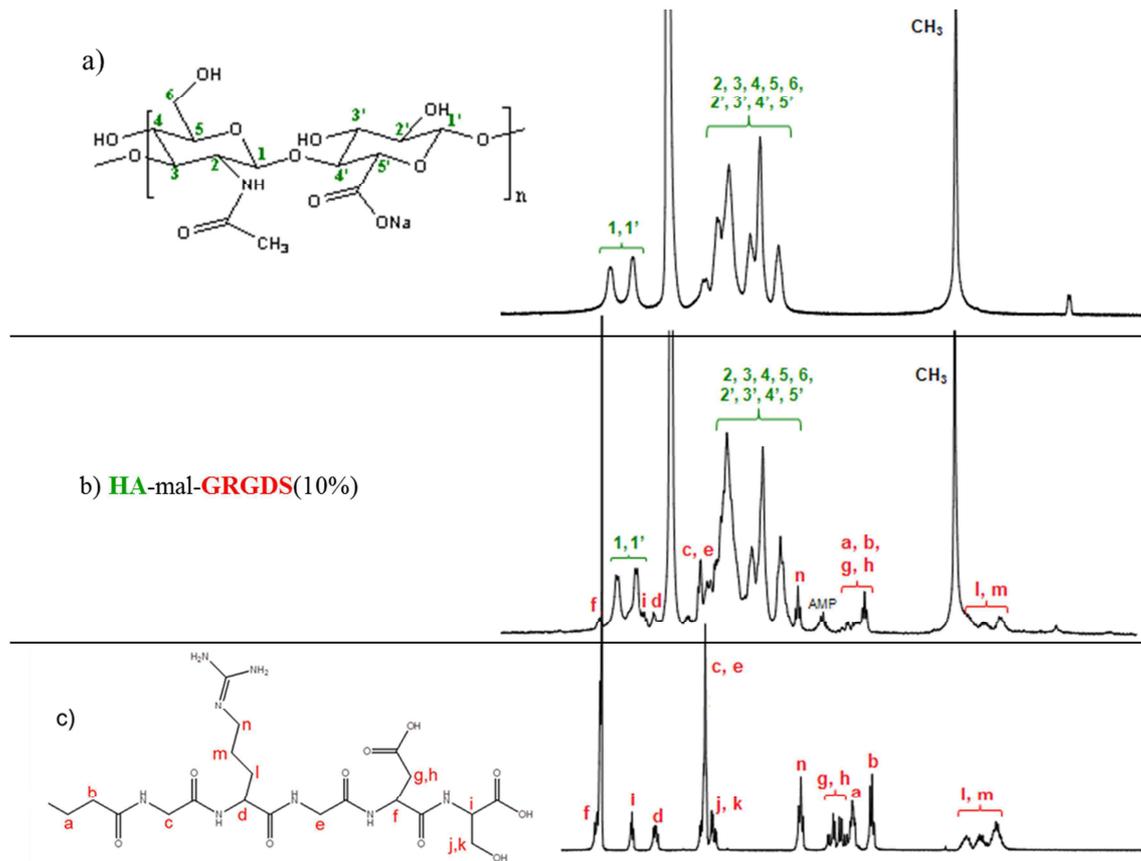


Figure 12 : a) Formule chimique et spectre du HA seul b) Spectre du HA-mal-GRGDS(10%) c) Formule chimique et spectre de la séquence peptidique GRGDS-SH

Les DS ont été calculés pour les 3 lots de HA modifiés en rapportant l'intégrale des protons 14 du peptide GRGDS sur celle des protons anomères du HA (cf. figure 13).

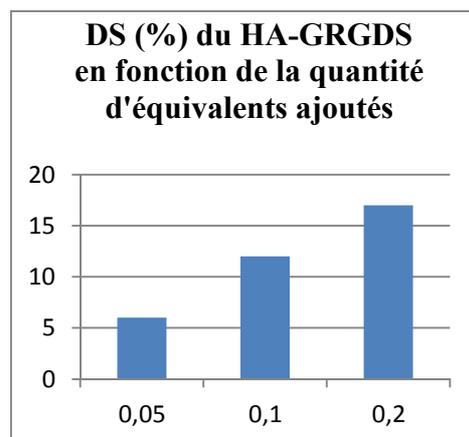


Figure 13 : DS du HA-GRGDS en fonction des équivalents de peptides ajoutés.

Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

Ces résultats montrent que la réaction est quantitative, car le DS obtenu correspond exactement aux quantités ajoutées. Pour le greffage de peptides RGD sur le HA, le couplage thiol-maléimide s'avère donc être une méthodologie de choix pour obtenir des matériaux sur-mesure dont on contrôle parfaitement les taux de greffage.

## ii. Greffage du thio-cholestérol sur le HA-maléimide

Le cholestérol est un lipide polycyclique amphiphile de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques (cf. figure 14).

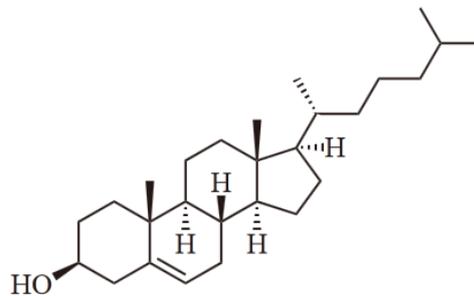


Figure 14 : Structure du cholestérol

C'est un composant majeur des membranes cellulaires animales qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides formant la bicouche de la membrane. Les phospholipides sont les constituants essentiels des membranes cellulaires : ils s'organisent en bicouche lipidique dans laquelle les queues hydrophobes sont orientées vers l'intérieur de la structure tandis que les têtes polaires forment les deux surfaces de la bicouche (cf. figure 15). Le cholestérol rigidifie la membrane car il empêche sa gélification en évitant la cristallisation des acides gras, et diminue la perméabilité membranaire aux molécules hydrosolubles. Il influence donc la fluidité membranaire.

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

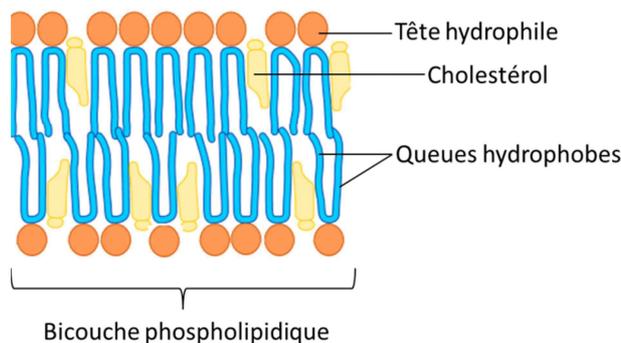


Figure 15 : bicouche phospholipidique d'une membrane cellulaire

Le développement de vecteurs de médicaments a pris un essor considérable au cours des dernières années. Le CEA-Leti a développé un nouveau nano-vecteur basé sur la technologie breveté lipidots®. Ces nanoparticules peuvent être utilisées dans le domaine de l'imagerie biologique ou pour vectoriser des médicaments peu solubles dans l'eau. Aujourd'hui, on tente de réaliser des nanovecteurs de troisième génération<sup>48</sup>, c'est-à-dire des nanovecteurs dont la surface, décorée avec des molécules d'intérêt, permet le ciblage actif de certaines cellules (cf. figure 16). Or le HA étant reconnu par le récepteur CD44, récepteur surexprimé par les cellules cancéreuses, celui-ci apparaît tout à fait adapté à du ciblage actif, une fois ancré dans les nanoparticules lipidiques (LNP), dans le traitement de tumeurs cancéreuses.

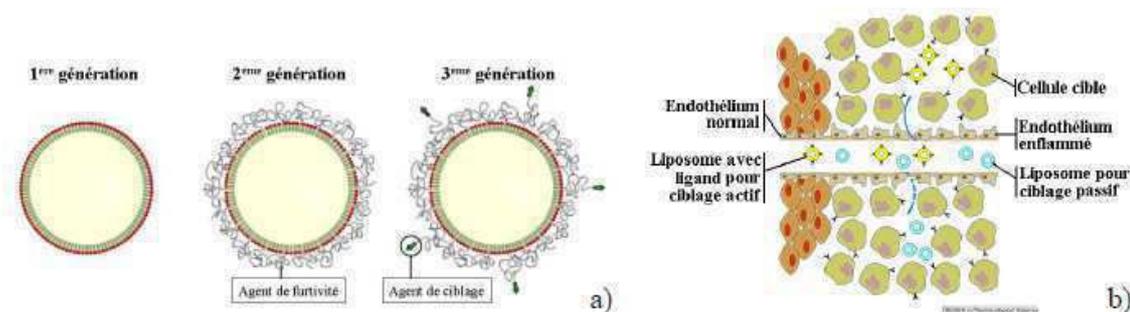


Figure 16 : Les 3 générations de vecteurs (a) et les ciblages actifs et passifs (b)

De par toutes ces propriétés physico-chimiques et biologiques, le cholestérol est apparu comme une molécule de choix pour la fabrication de nanoparticules lipidiques décorées avec du HA. L'idée est de greffer sur le HA du cholestérol jouant le rôle d'ancre hydrophobe afin de l'insérer à la surface des LNP. En effet, le cholestérol va pouvoir, de par

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

son hydrophobicité, s'insérer dans la couche de phospholipides qui forme les LNP<sup>49</sup>. Le HA ainsi présent en surface des LNP permettra un ciblage actif des cellules cancéreuses surexprimant le récepteur CD44.

### Caractérisation et contrôle du DS

Différentes synthèses ont été réalisées à partir de lots de HA de masse  $M_w = 20$  et  $200$  kg/mol. Le cholestérol n'étant pas soluble dans l'eau, les réactions ont été effectuées en milieu hydro-organique afin de pouvoir solubiliser le HA et le cholestérol. Des essais ont été effectués en utilisant un mélange tampon phosphate salin (PBS, pH 7,4)/THF ou PBS/éthanol. Dans tous les cas, le thiocholestérol est solubilisé au préalable uniquement dans du THF et additionné à la solution de HA-maléimide dans le mélange hydro-organique. Les différentes conditions de réaction sont résumées dans le tableau 7 ci-après.

HA initial	Essai	Quantité de thiocholestérol (équivalents par rapport au HA)	Condition solvant/volume (2 <sup>ème</sup> étape)	DS (%) dans D <sub>2</sub> O
Mw = 20 kg/mol	1	0,2	PBS/THF = 3/2	6
	2	0,1	PBS/THF = 3/2	3
Mw = 200 kg/mol	3	0,2	PBS/EtOH = 3/2	1
	4	0,1	PBS/EtOH = 3/2	<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Non déterminé car solution trop visqueuse

Tableau 7 : Récapitulatif des différents essais

Le greffage du thiocholestérol a été confirmé par RMN <sup>1</sup>H. La Figure 17 montre à titre d'exemple le spectre RMN <sup>1</sup>H du HA-cholestérol préparé selon les conditions de l'essai 2 du tableau superposé sur le spectre du thiocholestérol seul. Comme on peut le voir sur ce spectre, le signal à 0,6 ppm correspondant aux protons du groupe méthyle (noté b sur la Figure 17) est

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

faible. De plus, le signal du proton éthylénique (noté a) ne peut être clairement observé. Ceci suggère que les groupements cholestérol greffés sont associés sous forme de microdomaines hydrophobes conduisant à une diminution de leur mobilité et à une modification de leur environnement chimique<sup>50</sup>. L'intégration des signaux obtenus dans D<sub>2</sub>O ne peut donc pas donner des valeurs fiables pour les degrés de substitution des dérivés HA-cholestérol. Cependant, comme il n'est pas possible de dissoudre le HA-cholestérol dans un autre solvant empêchant le phénomène d'association hydrophobe, des valeurs « apparentes » de DS ont été calculées par l'intégration des signaux des protons du méthyle b par rapport aux protons anomères du HA. Les valeurs sont reportées dans le Tableau 7. Il est à noter que le HA-cholestérol de masse Mw = 200 kg/mol avec un DS visé de 10% n'a pu être analysé par RMN car il forme une solution très visqueuse à 6 mg/mL dans D<sub>2</sub>O.

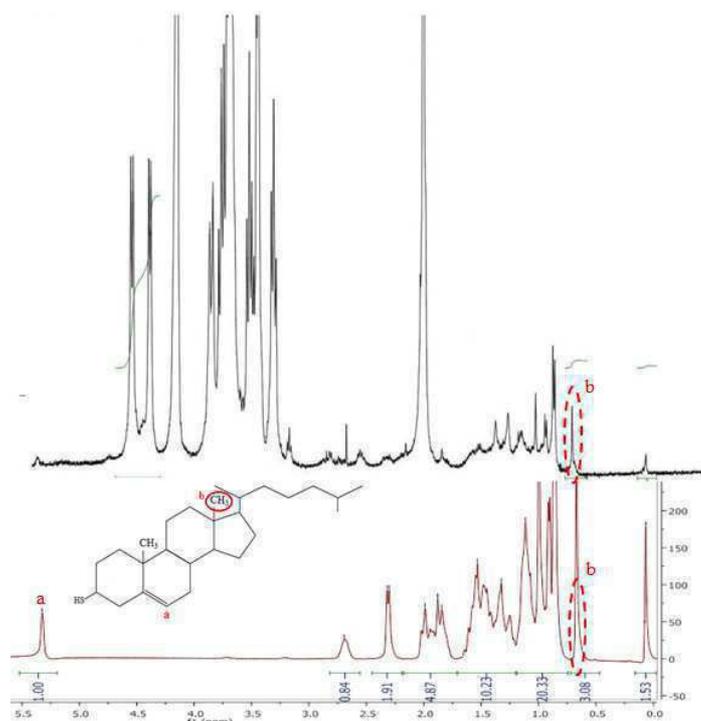


Figure 17 : superposition du spectre du HA-cholestérol (essai 2) sur celui du thiocholestérol

Le couplage thiol-maléimide a donc permis d'obtenir des résultats prometteurs et ouvert la voie vers la fabrication de LNP décorées en surface avec du HA. La difficulté principale réside dans le fait que la forte hydrophobicité du cholestérol conduit à l'obtention

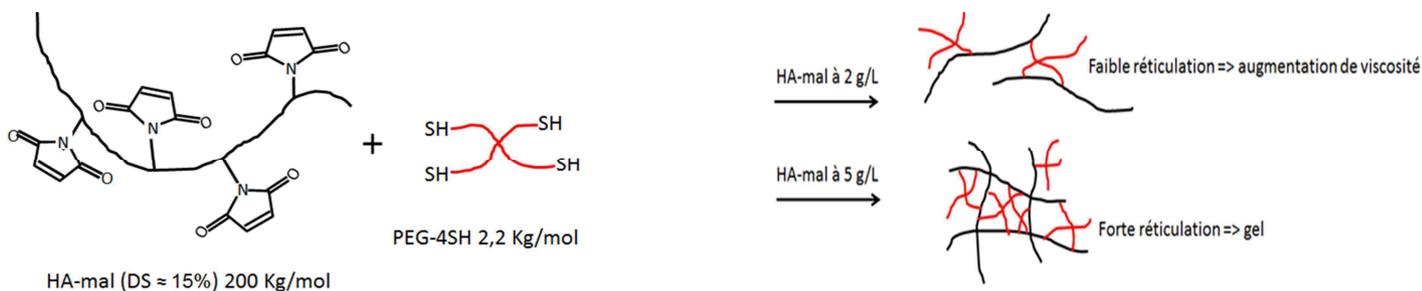
## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

de polymères très visqueux difficilement caractérisables en RMN du fait de ces auto-associations. La présence de domaines hydrophobes a été démontrée par rhéologie, diffusion de la lumière (DLS) et enfin spectrofluorimétrie et a permis de déterminer une concentration critique d'agrégation (CAC) pour chacun des polymères synthétisés, variant en fonction du DS en cholestérol. Certains de ces polymères ont ensuite été ancrés dans les LNP avec succès.

### II.2.4. Systèmes réticulés : Etude cinétique

On a étudié ici par rhéologie le couplage d'un PEG-4SH de masse 2200 g/mol avec un HA-maléimide de masse 200 kg/mol. Pour cette étude, les produits ont été mélangés dans un bécher sous agitation magnétique (environ une minute) puis placés sur le rhéomètre. Il a été déterminé que la réaction, à une concentration de 2 g/L en HA-maléimide (soit  $C^*$  environ), était complète au bout de 1h10 environ. A une concentration de 5 g/L (soit 2,5  $C^*$  environ), il se formait instantanément un gel dont le module était de l'ordre de quelques Pascals (cf. figure 18). Cette réaction est donc très rapide ce qui permet, lorsqu'on utilise des thiols, d'éviter leur oxydation en disulfure.

#### Schématiquement :



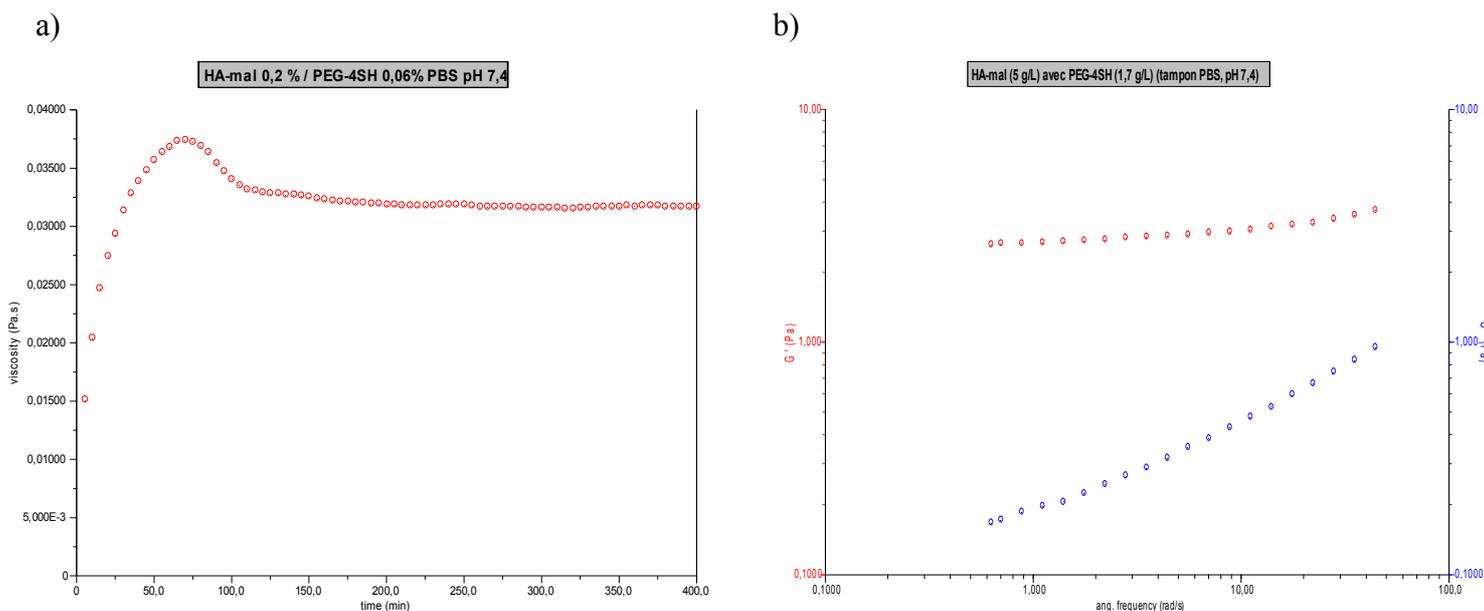


Figure 18 : a) Evolution de la viscosité d'une solution de HA-maléimide à 2 g/L et de PEG-4SH à 0,6 g/L au cours du temps. b) Evolution des modules  $G'$  et  $G''$  d'un gel formé par une solution de HA-maléimide à 5 g/L et de PEG-4SH à 1,7 g/L en fonction de la vitesse de cisaillement.

L'étude cinétique a montré que la réaction thiol-maléimide se produit très rapidement, voire instantanément à partir d'une concentration égale à 5 g/L. Ces résultats ont encouragé de nouveaux travaux concernant la fabrication de nanofilms covalents obtenu grâce au dépôt couche par couche de HA-maléimide et de PEG-4SH.

## Conclusion

Le développement d'une nouvelle méthode de modification de l'acide hyaluronique par chimie thiol-clic a été mis au point. Cette méthode s'est avérée efficace pour un grand nombre de molécules, avec un haut rendement et des conditions douces de mise en œuvre. Cependant, le fait de ne pouvoir lyophiliser l'intermédiaire HA-maléimide à cause de réactions secondaires indésirables restreint la modularité de cette approche : il est impossible, d'une part, de préparer le produit en grande quantité longtemps à l'avance et de le conserver et, d'autre part, de travailler à des concentrations élevées. Cependant, cette méthode nous a permis, comme nous l'avons vu au cours de ce chapitre, de greffer des molécules d'intérêt,

## Chapitre 2 : Mise au point d'une nouvelle méthode de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique par chimie « thiol-clic »

même très hydrophobes tel le cholestérol, avec une très bonne maîtrise du DS pour les greffons hydrosolubles, un très bon rendement, et sans dégradation de la chaîne principale. Elle a ouvert la voie également, de par sa cinétique très rapide et sa simplicité de mise en œuvre (absence de réactifs ou catalyseurs), vers la fabrication de films covalents nanostructurés par la méthode de dépôt couche par couche.

### Références

1. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **40**, 2004–2021 (2001).
2. Hawker, C. J. & Wooley, K. L. The Convergence of Synthetic Organic and Polymer Chemistries. *Science* **309**, 1200–1205 (2005).
3. Fournier, D., Hoogenboom, R. & Schubert, U. S. Clicking polymers: a straightforward approach to novel macromolecular architectures. *Chem. Soc. Rev.* **36**, 1369–1380 (2007).
4. Binder, W. H. & Sachsenhofer, R. “Click” Chemistry in Polymer and Materials Science. *Macromolecular Rapid Communications* **28**, 15–54 (2007).
5. Kolb, H. C. & Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **8**, 1128–1137 (2003).
6. Bock, V. D., Hiemstra, H. & Van Maarseveen, J. H. CuI-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, 51–68 (2006).
7. Becer, C. R., Hoogenboom, R. & Schubert, U. S. Click Chemistry beyond Metal-Catalyzed Cycloaddition. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 4900–4908 (2009).
8. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie* **114**, 2708–2711 (2002).
9. Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry* **67**, 3057–3064 (2002).
10. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 15046–15047 (2004).
11. Agard, N. J., Baskin, J. M., Prescher, J. A., Lo, A. & Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chemical Biology* **1**, 644–648 (2006).
12. Baskin, J. M. *et al.* Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 16793–16797 (2007).

13. Laughlin, S. T., Baskin, J. M., Amacher, S. L. & Bertozzi, C. R. In Vivo Imaging of Membrane-Associated Glycans in Developing Zebrafish . *Science* **320** , 664–667 (2008).
14. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry. *Organic Letters* **10**, 3097–3099 (2008).
15. Sawoo, S. *et al.* A new bio-active surface for protein immobilisation via copper-free “click” between azido SAM and alkynyl Fischer carbene complex. *Chemical Communications* 5957–5959 (2008).at <<http://dx.doi.org/10.1039/B813296H>>
16. Van Berkel, S. S. *et al.* Application of Metal-Free Triazole Formation in the Synthesis of Cyclic RGD–DTPA Conjugates. *ChemBioChem* **9**, 1805–1815 (2008).
17. Li, Z., Seo, T. S. & Ju, J. 1,3-Dipolar cycloaddition of azides with electron-deficient alkynes under mild condition in water. *Tetrahedron Letters* **45**, 3143–3146 (2004).
18. Van Berkel, S. S. *et al.* Metal-Free Triazole Formation as a Tool for Bioconjugation. *ChemBioChem* **8**, 1504–1508 (2007).
19. Campbell-Verduyn, L., Elsinga, P. H., Mirfeizi, L., Dierckx, R. A. & Feringa, B. L. Copper-free “click”: 1,3-dipolar cycloaddition of azides and alkynes. *Organic & Biomolecular Chemistry* **6**, 3461–3463 (2008).
20. Shi, F., Waldo, J. P., Chen, Y. & Larock, R. C. Benzyne Click Chemistry: Synthesis of Benzotriazoles from Benzyne and Azides. *Organic Letters* **10**, 2409–2412 (2008).
21. Hoyle, C. E., Lee, T. Y. & Roper, T. Thiol–enes: Chemistry of the past with promise for the future. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **42**, 5301–5338 (2004).
22. Hawker, C. J. & Wooley, K. L. The Convergence of Synthetic Organic and Polymer Chemistries . *Science* **309** , 1200–1205 (2005).
23. Gress, A., Völkel, A. & Schlaad, H. Thio-Click Modification of Poly[2-(3-butenyl)-2-oxazoline]. *Macromolecules* **40**, 7928–7933 (2007).
24. David, R. L. A. & Kornfield, J. A. Facile, Efficient Routes to Diverse Protected Thiols and to Their Deprotection and Addition to Create Functional Polymers by Thiol–Ene Coupling. *Macromolecules* **41**, 1151–1161 (2008).
25. Lutz, J.-F. & Schlaad, H. Modular chemical tools for advanced macromolecular engineering. *Polymer* **49**, 817–824 (2008).
26. Killups, K. L., Campos, L. M. & Hawker, C. J. Robust, Efficient, and Orthogonal Synthesis of Dendrimers via Thiol-ene “Click” Chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 5062–5064 (2008).

27. Nilsson, C., Simpson, N., Malkoch, M., Johansson, M. & Malmström, E. Synthesis and thiol-ene photopolymerization of allyl-ether functionalized dendrimers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **46**, 1339–1348 (2008).
28. Dondoni, A. The Emergence of Thiol-Ene Coupling as a Click Process for Materials and Bioorganic Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **47**, 8995–8997 (2008).
29. Ten Brummelhuis, N., Diehl, C. & Schlaad, H. Thiol-Ene Modification of 1,2-Polybutadiene Using UV Light or Sunlight. *Macromolecules* **41**, 9946–9947 (2008).
30. Kade, M. J., Burke, D. J. & Hawker, C. J. The power of thiol-ene chemistry. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **48**, 743–750 (2010).
31. Lowe, A. B. Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry* **1**, 17–36 (2010).
32. Pounder, R. J., Stanford, M. J., Brooks, P., Richards, S. P. & Dove, A. P. Metal free thiol-maleimide “Click” reaction as a mild functionalisation strategy for degradable polymers. *Chemical Communications* 5158–5160 (2008).at <<http://dx.doi.org/10.1039/B809167F>>
33. Li, M., De, P., Gondi, S. R. & Sumerlin, B. S. End group transformations of RAFT-generated polymers with bismaleimides: Functional telechelics and modular block copolymers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **46**, 5093–5100 (2008).
34. Witczak, Z. J., Lorchak, D. & Nguyen, N. A click chemistry approach to glycomimetics: Michael addition of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose to 4-deoxy-1,2-O-isopropylidene-1-glycero-pent-4-enopyranos-3-ulose – a convenient route to novel 4-deoxy-(1 $\rightarrow$ 5)-5-C-thiodisaccharides. *Carbohydrate Research* **342**, 1929–1933 (2007).
35. Becer, C. R. *et al.* Clicking Pentafluorostyrene Copolymers: Synthesis, Nanoprecipitation, and Glycosylation. *Macromolecules* **42**, 2387–2394 (2009).
36. Diels, O. & Alder, K. Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **460**, 98–122 (1928).
37. Sinnwell, S., Inglis, A. J., Davis, T. P., Stenzel, M. H. & Barner-Kowollik, C. An atom-efficient conjugation approach to well-defined block copolymers using RAFT chemistry and hetero Diels-Alder cycloaddition. *Chemical Communications* 2052–2054 (2008).at <<http://dx.doi.org/10.1039/B718180A>>
38. Blackman, M. L., Royzen, M. & Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 13518–13519 (2008).

39. Devaraj, N. K., Weissleder, R. & Hilderbrand, S. A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjugate Chemistry* **19**, 2297–2299 (2008).
40. Gacal, B. *et al.* Anthracene–Maleimide-Based Diels–Alder “Click Chemistry” as a Novel Route to Graft Copolymers. *Macromolecules* **39**, 5330–5336 (2006).
41. Dag, A., Durmaz, H., Hizal, G. & Tunca, U. Preparation of 3-arm star polymers (A3) via Diels–Alder click reaction. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **46**, 302–313 (2008).
42. Inglis, A. J., Sinnwell, S., Davis, T. P., Barner-Kowollik, C. & Stenzel, M. H. Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) and Hetero-Diels–Alder Chemistry as a Convenient Conjugation Tool for Access to Complex Macromolecular Designs. *Macromolecules* **41**, 4120–4126 (2008).
43. Crescenzi, V., Cornelio, L., Di Meo, C., Nardecchia, S. & Lamanna, R. Novel Hydrogels via Click Chemistry: Synthesis and Potential Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **8**, 1844–1850 (2007).
44. Nimmo, C. M., Owen, S. C. & Shoichet, M. S. Diels–Alder Click Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **12**, 824–830 (2011).
45. Lee, Y. *et al.* Thermo-sensitive, injectable, and tissue adhesive sol-gel transition hyaluronic acid/pluronic composite hydrogels prepared from bio-inspired catechol-thiol reaction. *Soft Matter* **6**, 977–983 (2010).
46. Szarpak, A., Pignot-Paintrand, I., Nicolas, C., Picart, C. & Auzély-Velty, R. Multilayer Assembly of Hyaluronic Acid/Poly(allylamine): Control of the Buildup for the Production of Hollow Capsules. *Langmuir* **24**, 9767–9774 (2008).
47. Pierschbacher, M. D. & Ruoslahti, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30–33 (1984).
48. Andrieux Karine, Desmaële Didier, D'Angelo Jean, C. P. Nanotechnologies et nouveaux médicaments. *L'actualité chimique* **269-270**, 135–139 (2003).
49. Zuidam, N. J., Gouw, H. K. M. E., Barenholz, Y. & Crommelin, D. J. A. Physical (in) stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1240**, 101–110 (1995).
50. Hrkach, J. S., Peracchia, M. T., Bomb, A., Lotan, Noah & Langer, R. Nanotechnology for biomaterials engineering: structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Biomaterials* **18**, 27–30 (1997).

# **Chapitre 3**

*Conception d'hydrogels fonctionnels à  
base d'acide hyaluronique pour  
l'ingénierie tissulaire osseuse*

<b>III. Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse</b>	<b>84</b>
<b>Introduction</b>	<b>84</b>
<b>III.1. Etude bibliographique</b>	<b>84</b>
III.1.1. Les hydrogels de HA-méthacrylate	84
III.1.2. Choix d'un polymère thermosensible : le Pluronic F127	85
<b>III.2. Hydrogels chimiques de HA fonctionnalisés par des peptides comme système modèles pour études biologiques</b>	<b>88</b>
III.2.1. Stratégie	88
III.2.2. Caractérisation	90
i) RMN	90
ii) Rhéologie	92
III.2.3. Etude biologique	93
i) HA-MA-GRGDS	93
ii) HA-MA-BSP(RGD)	95
<b>III.3. Synthèse d'un HA thermogélifiant pour l'obtention d'hydrogels physiques</b>	<b>97</b>
III.3.1. Fonctionnalisation du Pluronic® F127	97
i) Esterification avec l'acide 3-mercaptopropionique (AMP)	97
ii) Amination et couplage peptidique avec l'AMP	99
iii) Couplage de la cystamine	102
iv) Comparaison et conclusion	103
III.3.2. Synthèse d'un HA thermosensible injectable	104
i) Stratégie	104
III.3.3. Caractérisation	106
i) RMN	106
ii) Rhéologie	110
III.3.4. Etude biologique	113
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>115</b>
<b>Références</b>	<b>117</b>

### **III. Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse**

#### **Introduction**

Le projet ANR TECSAN au sein duquel se situe le sujet de la thèse vise à développer un nouveau biomatériau injectable pour la reconstruction osseuse. Il s'appuie sur une stratégie basée sur l'association de deux systèmes innovants : une matrice minérale auto-résorbable de ciment de carbonate de calcium, développée par les partenaires du projet au laboratoire CIRIMAT de Toulouse et un polysaccharide « sur-mesure », thermogélifiant comme agent de cohésion. L'objectif de la thèse était donc de mettre au point un adjuvant qui présente, d'une part, des propriétés biologiques intéressantes, favorisant l'ostéo-intégration du substitut osseux dans le corps humain mais également les propriétés rhéologiques voulues, c'est-à-dire une bonne injectabilité et une gélification à la température de 37°C. Ces deux objectifs ont été traités de front et le chapitre suivant se divise donc en deux parties : l'étude d'hydrogels chimiques de HA fonctionnalisés par des peptides bioactifs d'une part pour l'aspect biologique, et l'étude du greffage d'un polymère thermosensible le long de la chaîne de HA et des propriétés rhéologiques obtenues, pour l'aspect physico-chimique.

#### **III.1. Etude bibliographique**

##### **III.1.1. Les hydrogels de HA-méthacrylate**

Une stratégie efficace pour la réticulation du HA et l'obtention d'hydrogels pour la culture cellulaire sous conditions douces est la photo-polymérisation de groupes méthacrylates introduits au préalable par la fonctionnalisation des groupes hydroxyl<sup>1-10</sup> ou carboxylate<sup>11,12</sup> du HA. Cette polymérisation a lieu sous UV en présence d'un photo-initiateur sous conditions physiologiques (cf. figure 1).

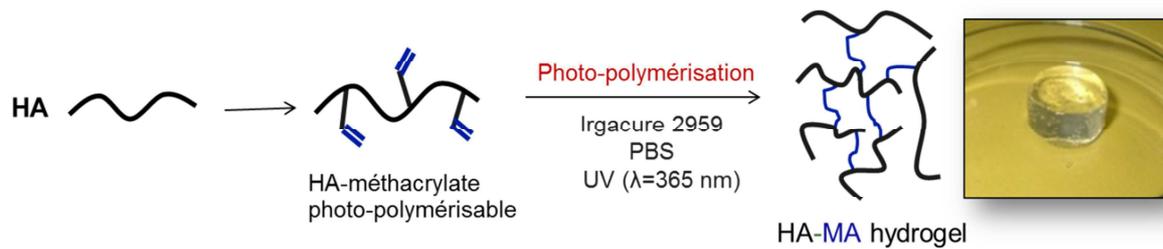


Figure 1 : Obtention d'hydrogel de HA par photo-polymérisation de fonctions méthacrylates

Cette méthodologie présente certains avantages, notamment un bon contrôle spatial et temporel de la réticulation et de la biocompatibilité pour la polymérisation *in situ*<sup>13,14</sup>. De plus les propriétés du réseau formé peuvent être modulées par la modification de la masse molaire du HA, de sa concentration et de son degré de méthacrylation (DM)<sup>1</sup>. Une étude reportait récemment que de tels gels obtenus avec des HA de DM allant de 0,1 à 0,9 et possédant donc différentes densités de réticulation ne permettaient pas seuls l'étalement de cellules myoblastes<sup>2</sup>, comme reporté précédemment pour des cellules fibroblastes et endothéliales<sup>11,15,16</sup>. Ces résultats ont été remis en question par le travail mené par l'équipe SMP du Cermav. Il a été montré que non seulement les cellules (préostéoblastes, fibroblastes NIH 3T3 et cellules HeLa) adhéraient et s'étaient étalées sur des gels de HA-méthacrylate pour peu que la rigidité soit suffisante mais que ce phénomène était directement lié à l'interaction spécifique des récepteurs CD44 et RHAMM de ces cellules avec le HA<sup>17</sup>. Les gels de HA méthacrylate s'avèrent donc des substrats de premier choix pour l'ingénierie tissulaire.

### III.1.2. Choix d'un polymère thermosensible : le Pluronic F127

Un polymère thermosensible est un polymère qui subit une modification de ses propriétés physiques sous l'action d'un stimulus extérieur, en l'occurrence la température. Cette capacité à subir de tels changements dans des conditions facilement contrôlables met cette classe de polymères dans la catégorie des matériaux dits « intelligents ». Ces matériaux présentent un grand intérêt dans de nombreux domaines, notamment dans les applications biomédicales telles que la délivrance contrôlée de médicaments ou l'ingénierie tissulaire<sup>32</sup>.

La température est le stimulus le plus utilisé pour perturber la solubilité des polymères en solution de manière réversible. Les polymères dits à LCST (lower critical solution

température ou température critique inférieure de démixtion) présentent la propriété unique de voir leur solubilité diminuer lorsque la température augmente. Lorsque celle-ci atteint le point de trouble, il se produit une séparation de phase entre le polymère et le solvant, ou entre les deux polymères dans le cas d'un mélange. La LCST est définie comme le minimum de la courbe de démixtion (cf. figure 2), elle est donc associée à une fraction volumique en polymère précise,  $\phi_{LCST}$ . La température de transition à une fraction volumique en polymère quelconque,  $\phi$ , est appelée point de trouble. Dans la littérature, LCST et point de trouble sont souvent confondus<sup>33</sup>.

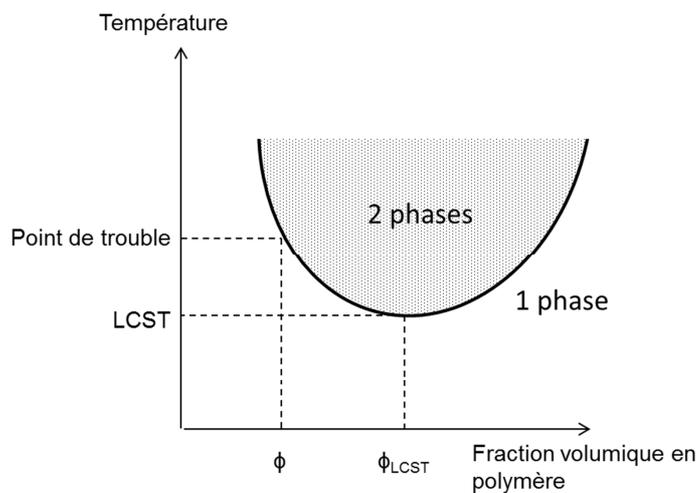


Figure 2 : diagramme de phase concentration-température d'un polymère LCST

De nombreux polymères possédant une LCST ont déjà été étudiés et parmi eux, les Pluronic® (BASF) ou Poloxamères. Ce sont des copolymères triblocs poly(oxyde d'éthylène) - poly(oxyde de propylène) - poly(oxyde d'éthylène) (POE-POP-POE) ; Ils ont été largement utilisés dans les applications biomédicales<sup>34-40</sup> grâce à leur bonne tolérance, faible cytotoxicité et leur effet thérapeutique positif<sup>41,42</sup>. Ce sont des polymères amphiphiles de par la nature hydrophile du bloc POE entre 0 et 100°C, associée au bloc hydrophobe POP dont la solubilité dans l'eau décroît fortement pour des températures supérieures à 15°C. C'est cette balance hydrophile/hydrophobe qui leur confère leur caractère thermosensible. En effet lorsqu'on augmente la température, les blocs POP se déshydratent favorisant ainsi la formation de micelles sphériques de taille nanométriques par auto-association hydrophobe de ceux-ci. Au-delà de la LCST la déshydratation des blocs POP est telle que les micelles s'enchevêtrent, constituant ainsi une phase gel semi-solide (cf. figure 3)<sup>43</sup>. L'obtention d'un tel système requiert cependant des concentrations élevées en Pluronic® (>16%wt)<sup>44</sup>.

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

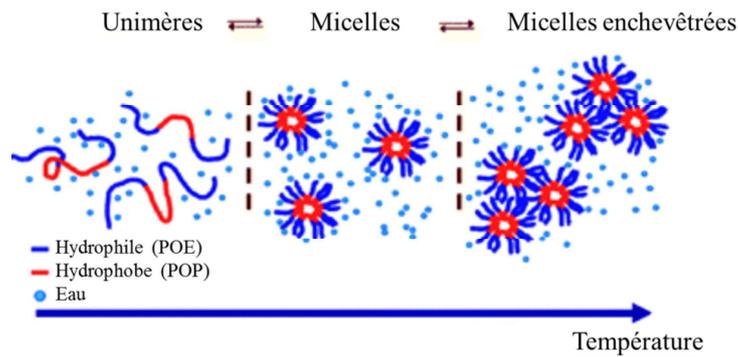


Figure 3 : Mécanisme de gélification des Pluronic<sup>43</sup>

De plus, les hydrogels de Pluronic® seuls montrent de faibles propriétés d'adhésion cellulaire, de faibles propriétés mécaniques, une érosion rapide et un relargage rapide de médicaments in vivo. Ils sont donc difficilement utilisables pour l'ingénierie tissulaire ou la vectorisation de médicament. En revanche, leurs propriétés thermogélifiantes peuvent être mises à contribution en les associant à d'autres polymères dans le but d'améliorer leurs propriétés d'adhésion et leur stabilité in vivo. Celui que l'on a choisi de greffer au HA est le Pluronic® F127 dont la structure est représentée figure 4. Ce Pluronic est en effet déjà utilisé en pharmacie et autorisé par la « Food and drug administration » (FDA) aux Etats-unis d'Amérique.

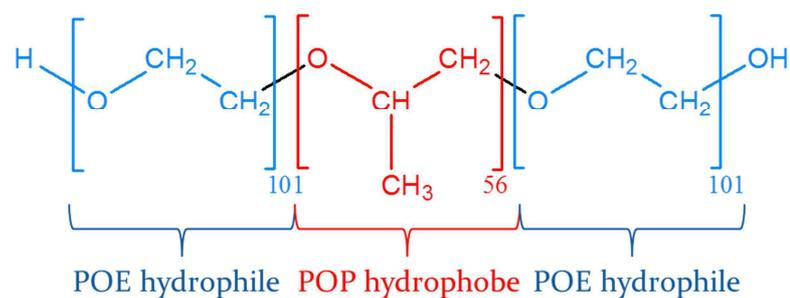


Figure 4 : Structure tribloc du Pluronic F127

### **III.2. Hydrogels chimiques de HA fonctionnalisés par des peptides comme système modèles pour études biologiques**

L'objectif ici est d'étudier l'impact de peptides bioactifs greffés le long de la chaîne de HA sur le comportement des cellules osseuses afin de favoriser leur adhésion et leur étalement sur des hydrogels de HA. En effet, Le HA thermogélifiant voulu pour l'application finale n'étant alors pas encore mis au point, nous avons choisi de mener cette étude sur des hydrogels chimiques de HA-méthacrylate développés au sein de l'équipe SMP du CERMAV.

#### **III.2.1. Stratégie**

La stratégie adoptée consiste à modifier dans un premier temps les fonctions hydroxyle du HA avec de l'anhydride méthacrylique afin d'obtenir un dérivé méthacrylate photo-polymérisable. On vient ensuite greffer la fonction maléimide sur les carboxylate du HA comme décrit dans le chapitre précédent, afin de pouvoir ajouter un peptide-thiol dont on pourra maîtriser aisément le DS (cf. figure 5).

La première étape s'opère à 4°C dans un mélange eau/DMF 3/2 v/v afin de faciliter la solubilisation de l'anhydride méthacrylique, qu'on ajoute à raison d'un équivalent molaire par rapport à l'unité de répétition du HA. Le pH est ensuite maintenu entre 8 et 9 pendant 4h puis la réaction est gardée sous agitation une nuit à 4°C. Le HA est ensuite précipité par ajout d'éthanol sous vive agitation. Le surnageant est éliminé et le précipité rincé plusieurs fois avec des mélanges eau/éthanol. Il est enfin solubilisé à nouveau dans de l'eau ultrapure pour une ultrafiltration.

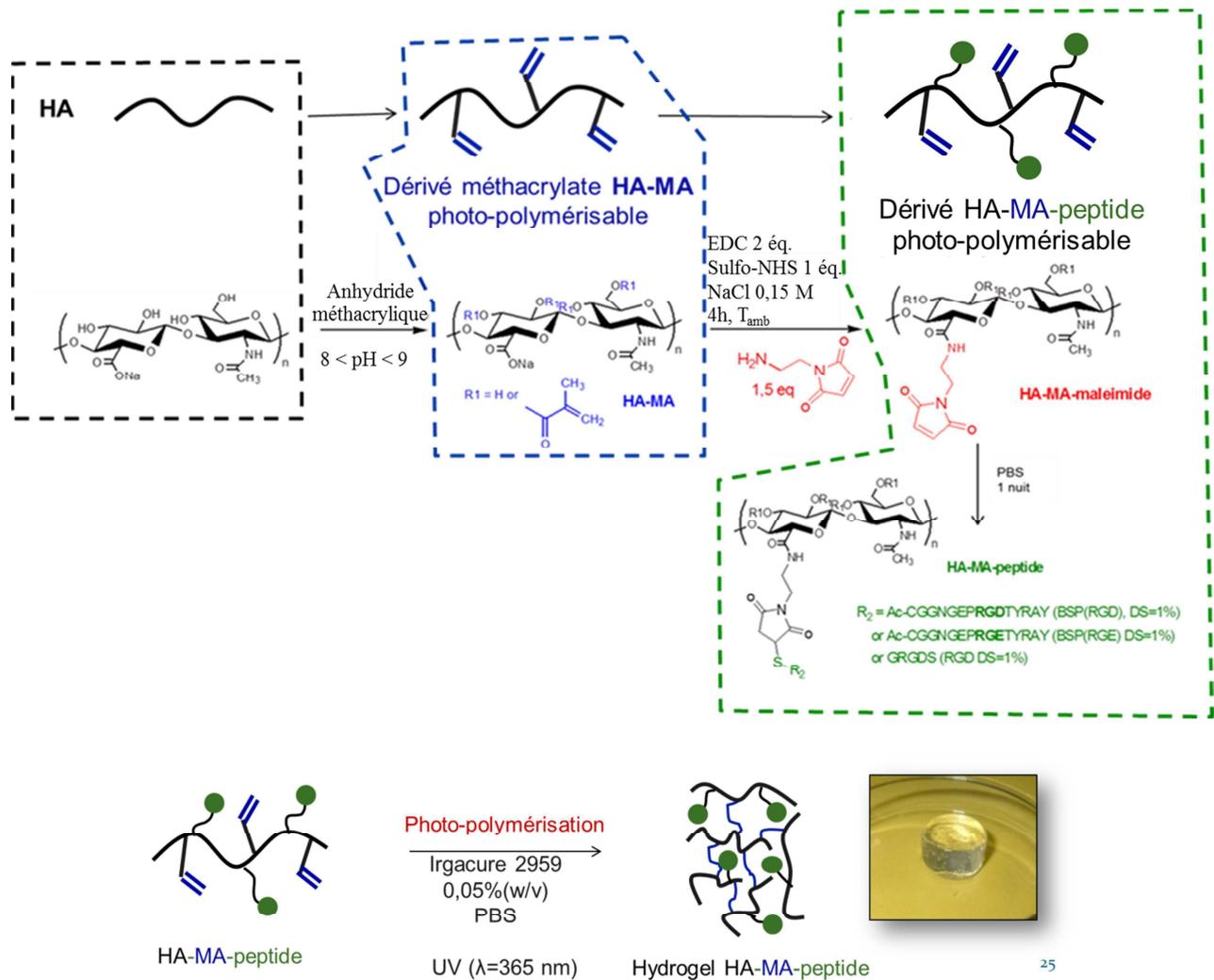


Figure 5 : stratégie pour l'obtention d'hydrogels de HA décorés avec des peptides

La deuxième étape se déroule comme décrite dans le chapitre 2, mais les équivalents de réactifs ont été proportionnellement diminués afin d'obtenir un DS en maléimide de 5%. On a ainsi ajouté 0,375 eq d'amino-maléimide pour 0,25 eq de sulfo-NHS et 0,5 eq d'EDC. Les peptides ont ensuite été ajoutés à raison de 1 et 2 % afin de réduire les quantités de peptide utilisées et donc les coûts mais aussi les modifications concernant les propriétés physico-chimiques des hydrogels de HA.

### III.2.2. Caractérisation

#### i) RMN

Le HA-méthacrylate a d'abord été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  avant greffage des peptides. Son degré de méthacrylation (DM) est calculé à partir du rapport des intégrales des pics correspondant aux protons  $\text{CH}_2$  du méthacrylate ( $I_B$  et  $I_C$ ) sur celle du pic des protons anomères du HA ( $I_{an}$ ) (cf. figure 5).

$$\text{DM (\%)} = \frac{I_b}{I_{an}} * 2 * 100 = \frac{I_c}{I_{an}} * 2 * 100$$

Ainsi, sur le spectre montré sur la figure 5, on observe un HA-méthacrylate de DM égal :

$$\frac{0,06}{2} * 2 * 100 = 6\%$$

Le produit a ensuite été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  après greffage du peptide issu de la BSP, noté BSP(RGD), via la méthode maléimide. Le DS visé en maléimide était de 5% et c'est précisément ce que nous obtenons d'après le rapport de l'intégrale  $I_M$  sur  $I_{an}$ . Comme expliqué dans le chapitre 2, il a été ajouté de l'acide mercaptopropionique en excès en fin de réaction afin de neutraliser les fonctions maléimide non réagies. On observe donc les signaux correspondant à l'AMP et le rapport de l'intégrale  $I_{AMP}$  sur  $I_{an}$  nous amène à un DS en AMP égal à 4%. En ce qui concerne le peptide greffé, il s'agit de la séquence CGGNGEPRGDTYRAY. On sait que son spectre possède 67 protons visibles en RMN  $^1\text{H}$  dont notamment 8 protons aromatiques provenant de l'acide aminé Y (tyrosine) présent 2 fois dans cette séquence. Le DS en peptide BSP(RGD) a été calculé à partir de ces protons aromatiques notés  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  et  $\beta'$  (cf. figure 6):

$$\text{DS (\%)} = \frac{I_{\alpha\alpha'}}{I_{an}} * \frac{1}{2} * 100 = \frac{I'_{\beta\beta}}{I_{an}} * \frac{1}{2} * 100$$

### Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Sur le spectre montré figure 6 le DS en peptide BSP(RGD) est donc de 1%. On remarque que la somme des DS du peptide (1%) et de l'AMP (4%) est bien égale au DS du maléimide (5%).

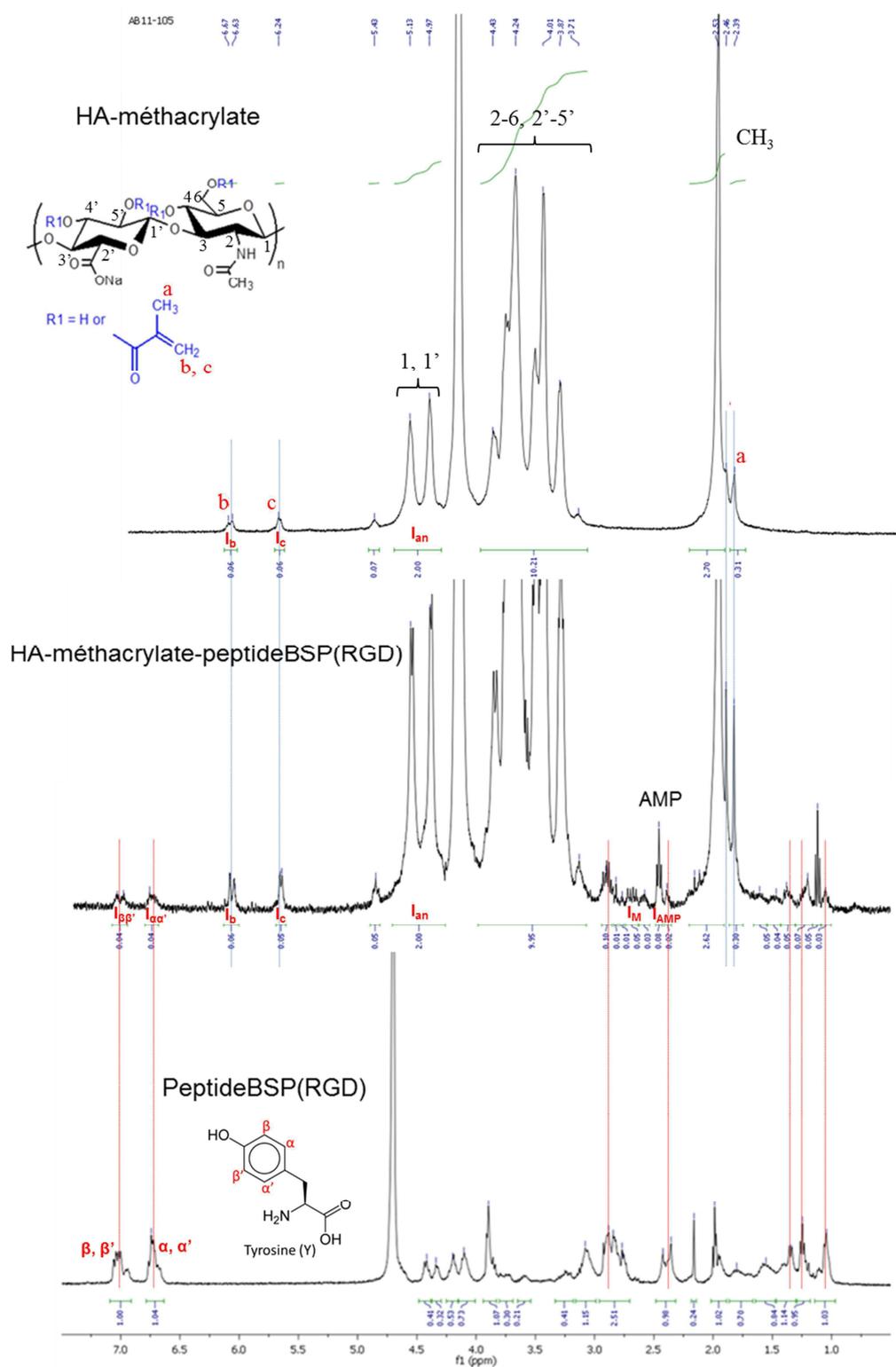


Figure 6 : Superposition des spectres du peptide BSP(RGD) et du HA-méthacrylate avec le spectre du HA-méthacrylate-BSP(RGD)

La RMN nous montre donc qu'on a réussi à greffer le peptide BSP(RGD) et elle nous permet de savoir avec précision en quelle quantité. Cependant, le spectre de la figure 6 correspond au produit pour lequel on a ajouté 2% de peptide BSP(RGD). Or le DS final est de 1%. Le couplage thiol-maléimide ne s'opère donc pas à 100% mais 50%. Ce résultat rappelle ceux obtenus pour le cas du cholestérol vu dans le chapitre 2 : lorsque le greffon est une molécule imposante qui présente des parties hydrophobes, le rendement du couplage thiol-maléimide s'en trouve diminué.

## ii) Rhéologie

Avant le greffage du peptide, le HA-méthacrylate a également été caractérisé par rhéologie afin de connaître les modules élastiques  $G'$  que l'on obtient après photopolymérisation. En effet, le module  $G'$  est un des éléments clé dans le domaine de l'ingénierie tissulaire puisqu'il fait état de la rigidité du gel, et donc de la capacité des différentes cellules à s'y accrocher et proliférer<sup>17</sup>. Ici, la synthèse a conduit à un DM de 6%. Pour la suite de l'étude, il était indispensable de connaître les modules que l'on peut atteindre afin d'adapter les concentrations (i.e. le module) pour l'étude biologique.

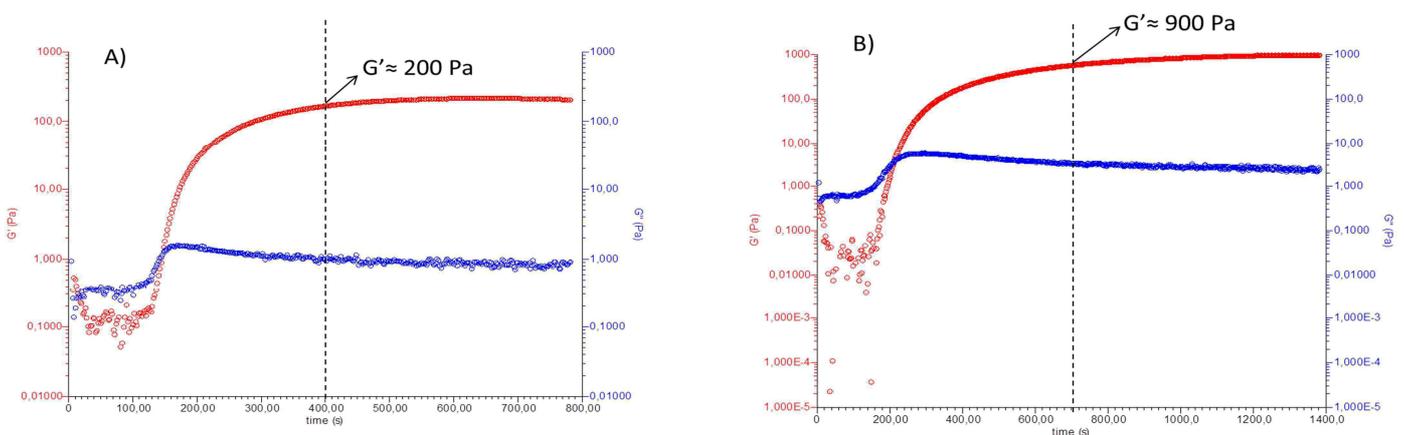


Figure 7 : Evolution des modules  $G'$  et  $G''$  (Pa) au cours de la réticulation sous UV d'un HA 100 Kg.mol<sup>-1</sup> de DM 0,06 à 15 g/L (A) et 30 g/L (B).

### III.2.3. Etude biologique

#### i) HA-MA-GRGDS

Les résultats présentés figure 8 montrent une étude préalable réalisée avec un HA-MA-GRGDS de  $100 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ , de DM 0,2 et fonctionnalisé à 15% par le peptide GRGDS. Les cellules déposées sur le gel sont des pré-ostéoblastes. La photo a été prise après que le gel a été rincé, après 24h de culture. On voit très nettement que les cellules, en présence du peptide GRGDS, adhèrent et s'étalent sur le gel, y compris lorsque le module  $G'$  est très bas et a priori insuffisant pour un étalement, d'après ce que l'on observe pour le gel témoin de module identique. On constate également que les cellules s'étalent d'autant mieux lorsque le module  $G'$  augmente. Ces résultats sont donc conformes à ce qu'on trouve dans la littérature.

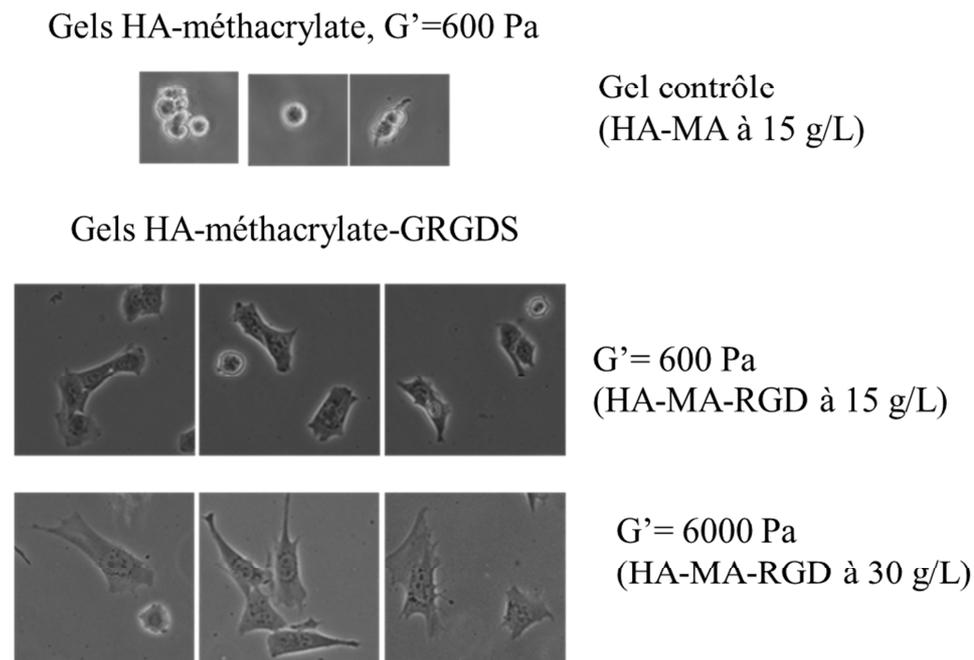


Figure 8 : Pré-osteoblastes sur gels de HA-MA seul et fonctionnalisés RGD.

Ces premiers résultats ont également permis de confirmer que la méthode de couplage développée « thiol-maléimide » ne présente pas de risque cytotoxique<sup>45</sup>. On a cherché ensuite à optimiser la quantité de peptide GRGDS greffée. Pour cela, en utilisant toujours le même HA-MA-GRGDS que précédemment, on a effectué des mélanges avec un HA-MA identique ( $\text{DM}=0,2$ ,  $\text{M}=100 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) mais non modifié avec le peptide. On a procédé à des mélanges

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

HA-MA/HA-MA-GRGDS (pourcentage en masse) à raison de : 100/0 (HA-MA seul), 95/5 puis 90/10, 75/25, et enfin 50/50. La quantité de peptide GRGDS est donc croissante et son DS « apparent » est, respectivement, de 0%, 0,75%, 1,5%, 3,75% et 7,5% (cf. figure 9). La concentration totale en HA est toujours la même, 15 g/L et le module  $G' \approx 600$  Pa.

**Etalement de cellules pré-ostéoblastiques sur gel de HA-méthacrylate/HA-méthacrylate-peptide RGD**

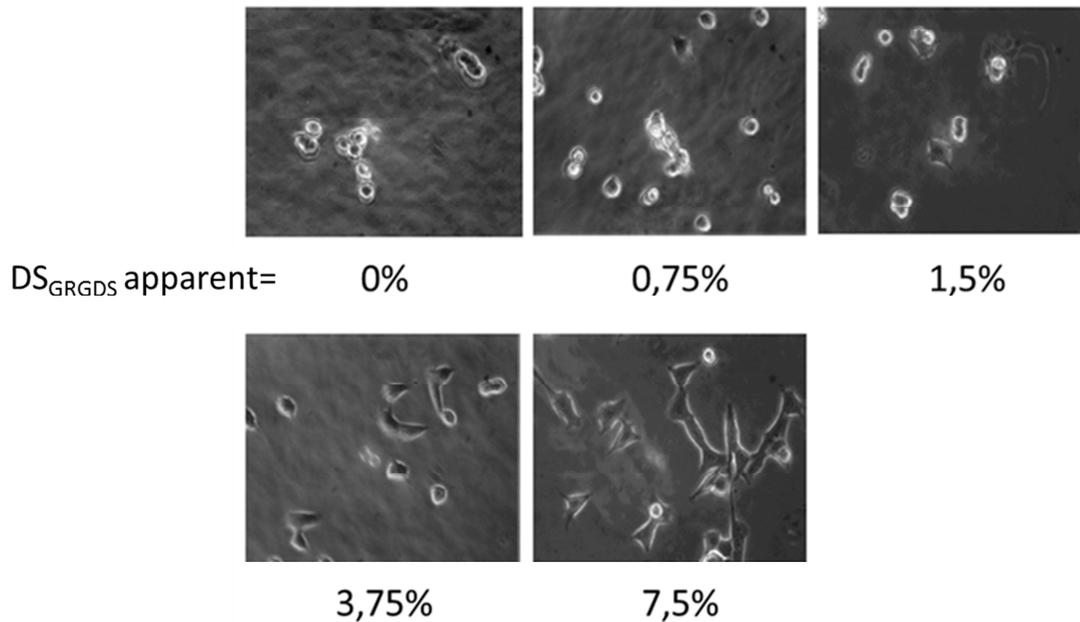


Figure 9 : Pré-ostéoblastes sur gels de HA-MA/HA-MA-GRGDS.

Cette étude nous montre que, même pour une quantité très faible en GRGDS (DS=0,75%), l'attachement des cellules au gel est déjà nettement amélioré. De plus, à partir d'un DS=3,75%, les cellules commencent déjà à s'étaler. Il ne semble donc pas forcément nécessaire de greffer 15 % de RGD pour obtenir un matériau intéressant pour l'ingénierie tissulaire. Les études suivantes ont pris ce fait en considération et le DS visé pour le peptide BSP-RGD était en général de 2%.

ii) *HA-MA-BSP(RGD)*

L'étude qui suit a été réalisée avec les HA-MA-BSP(RGD) ou HA-MA-BSP(RGE) présentés dans la partie III.1.2 ii) *Caractérisation : RMN et rhéologie*. Le DM est donc de 0,06. Les gels ont été faits à une concentration de 40 g/L afin d'obtenir un module  $G'$  d'environ 1500 Pa. Les DS en peptides sont de 0,5% et 1%, soit la moitié des DS visés au départ. Les résultats obtenus après 24 h de culture avec des cellules pré-ostéoblastes sont présentés figure 10. On observe une bonne adhésion et également un étalement avec les peptides comportant la séquence BSP(RGD), même avec un DS de 0,5%. Pour le gel comportant le peptide avec la séquence BSP(RGE), l'attachement des cellules est relativement important. En effet, à ce module ( $G'=1500$  Pa) et pour ce type de cellule, on a vu que le nombre de cellule qui adhéraient au gel sans peptide est nettement plus faible. En revanche, on n'observe aucun étalement, ce qui confirme que celui-ci est dû à la présence de la séquence RGD.

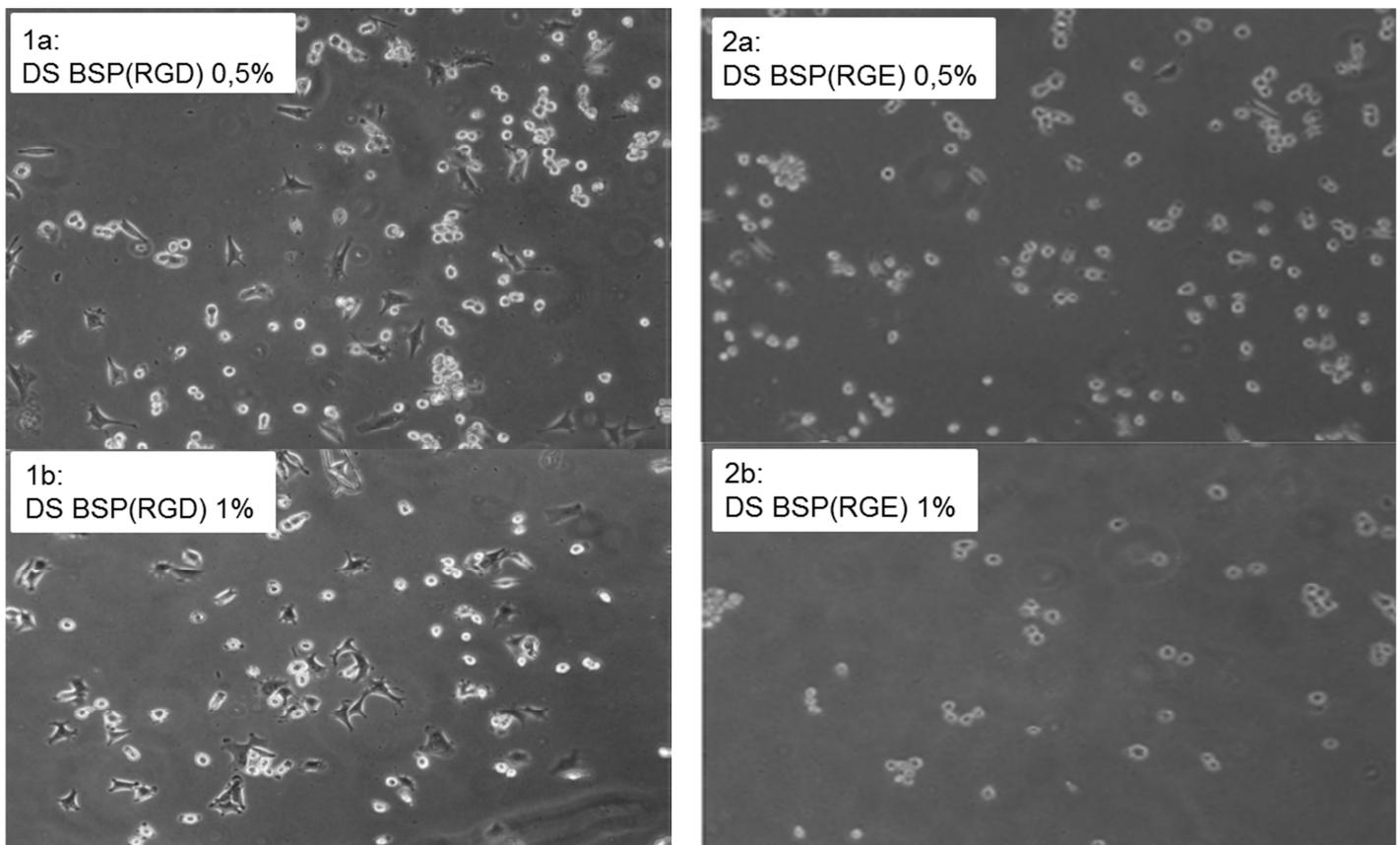


Figure 10 : Pré-ostéoblastes sur gels de HA-MA-peptide

### Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Une étude a également été menée en 3D avec les partenaires du projet TECSAN de Bordeaux (INSERM, Unité 1026 de l'université Bordeaux Segalen « Bioingénierie Tissulaire »). Des HA-MA et HA-MA-BSP ont été polymérisés en présence de cellules HBMSC (human bone marrow stromal cell) à une puissance adaptée à la survie de ces cellules. Les cellules sont donc, après irradiation, encapsulées dans le gel. Ces cellules proviennent de moelle osseuse humaine et sont des cellules progénitrices des ostéoblastes, c'est-à-dire qu'elle possède la capacité de se différencier en cellules de l'os. On a dans un premier temps observés l'attachement et l'étalement des cellules à l'intérieur des gels pendant 7 jours, à la fin desquels les cellules ont été récupérées afin d'en extraire les ARN messagers pour observer leur différenciation.

L'objectif était de récupérer les ARN messagers de ces cellules afin d'observer l'expression de certains marqueurs spécifiques d'une différenciation ostéoblastique. Or les ARN que l'on a récupérés étaient souvent trop dégradés pour en tirer de l'information et provenaient pour la plupart des cellules trouvées au fond des puits (facilement récupérables), donc de cellules n'ayant pas adhéré au gel. Il ressort tout de même de ces observations que les cellules adhèrent à tous les substrats et que cette adhésion est augmentée par la présence d'une séquence peptidique quelle qu'elle soit. Les cellules s'étaient sur les gels possédant la séquence RGD tandis qu'elles restent rondes dans celui comportant la séquence RGE et dans le HA-MA seul. De plus on observe dans le HA-MA seul la formation d'agrégats de cellules, toujours présents à J7. Le résultat le plus marquant a été que les gels comportant une séquence peptidique sont tous dégradés au bout de 7 jours, cette dégradation ayant commencé à J3, alors que l'on n'observe aucune dégradation du gel HA-MA seul.

### **III.3. Synthèse d'un HA thermogélifiant pour l'obtention d'hydrogels physiques**

Le chapitre suivant décrit les méthodes employées pour obtenir un HA thermogélifiant - la fonctionnalisation du Pluronic® F127, son greffage sur le HA - et l'étude rhéologique des produits obtenus.

#### **III.3.1. Fonctionnalisation du Pluronic® F127**

Le greffage du Pluronic® F127 sur le HA nécessite sa fonctionnalisation par des fonctions thiols permettant son utilisation dans les méthodes « thio-clic » développées au sein de l'équipe SMP du CERMAV. La modification chimique du Pluronic F-127 s'est inspirée des méthodes concernant la fonctionnalisation des PEG trouvées dans la littérature<sup>45</sup>. En effet, à l'instar des PEG, alors que la chaîne principale du Pluronic® F127 est chimiquement inerte, ses groupements hydroxyle terminaux sont eux réactifs. C'est donc sur ces groupements que la fonctionnalisation peut avoir lieu. Comme il s'avère difficile, dans la plupart des cas, de séparer le PEG di-fonctionnalisé du mono- ou non- fonctionnalisé, il est crucial d'avoir recours à des réactions propres et quantitatives. Le chapitre suivant décrit et compare les différentes voies étudiées.

##### *i) Esterification avec l'acide 3-mercaptopropionique (AMP)*

La première idée a été de procéder à l'estérification de l'acide 3-mercaptopropionique avec les hydroxyles terminaux du Pluronic F127, cette stratégie présentant l'avantage de se faire en une seule étape pendant 24h et d'utiliser l'AMP dont nous connaissons déjà bien la réactivité pour la chimie « thio-clic ».

Pour cela, nous avons choisi l'estérification de Steglich<sup>46</sup> qui s'opère avec du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) comme agent de couplage et le 4-diméthylaminopyridine (DMAP) comme catalyseur. Cette réaction a été décrite en premier par Wolfgang Steglich en 1978. Elle se fait à température ambiante dans le dichlorométhane (cf. figure 11).

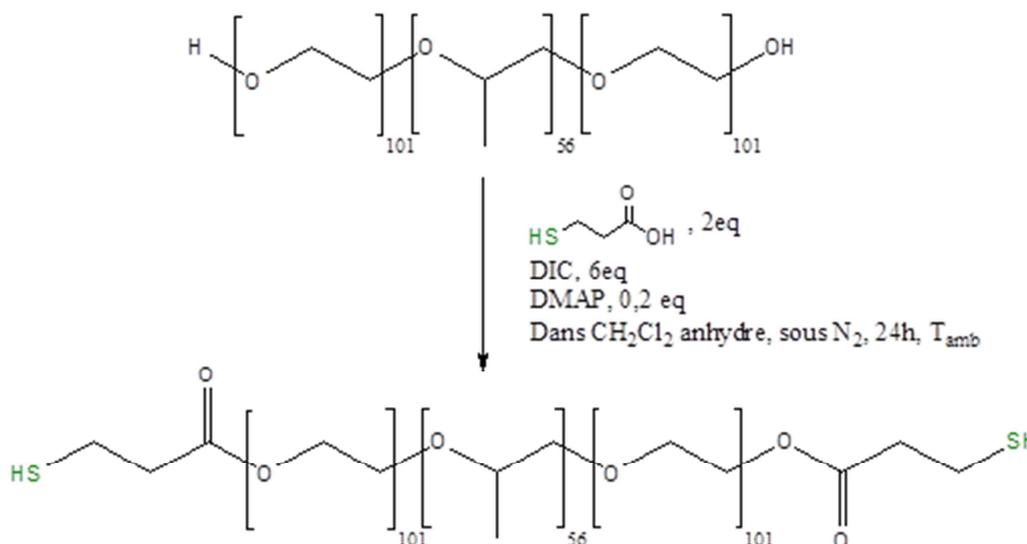


Figure 11: Esterification de Steglisch entre le Pluronic® F127 et l'AMP.

Après 24h de réaction, le solvant est évaporé et le polymère récupéré par précipitation dans l'éther à 0°C, puis filtration. La figure 12 présente le spectre du produit obtenu par RMN <sup>1</sup>H. Tous les spectres concernant la fonctionnalisation du Pluronic F127 ont été réalisés dans le chloroforme deutéré à 298K. Ce spectre nous montre qu'environ 60% des extrémités ont été fonctionnalisées. Le calcul s'opère ainsi : 100% des extrémités sont fonctionnalisées si les triplets A et B comptent chacun 4 protons lorsque le singulet des CH<sub>3</sub> du bloc POP en compte 168 (3×56), soit environ 0,07 pour 3. Ici les triplets A et B comptent pour 0,04 quand le singulet C compte pour 3, le pourcentage d'extrémités fonctionnalisées est donc de 0,04/0,07 soit 57%.

Cette méthode a cependant présenté plusieurs inconvénients. Nous avons essayé cette réaction en premier lieu avec purification par ultrafiltration : nous n'avons alors observé aucune fonctionnalisation. Ceci peut s'expliquer par l'hydrolyse de la liaison ester lors de l'UF et se pose alors la question de la stabilité du produit obtenu (qui devra subir à terme une stérilisation, entre autres). De plus, comme le montre le spectre RMN, le produit contient des impuretés et devient trouble lorsqu'on le solubilise dans l'eau (solvant utilisé pour la suite pour le greffage sur le HA), probablement du fait de ces impuretés qui n'y sont pas solubles. Enfin, la réaction n'est pas quantitative puisque seules 57% des extrémités sont modifiées. Pour ces raisons, nous nous sommes tournés vers une autre méthode, avec création de liaison amide plus stable.

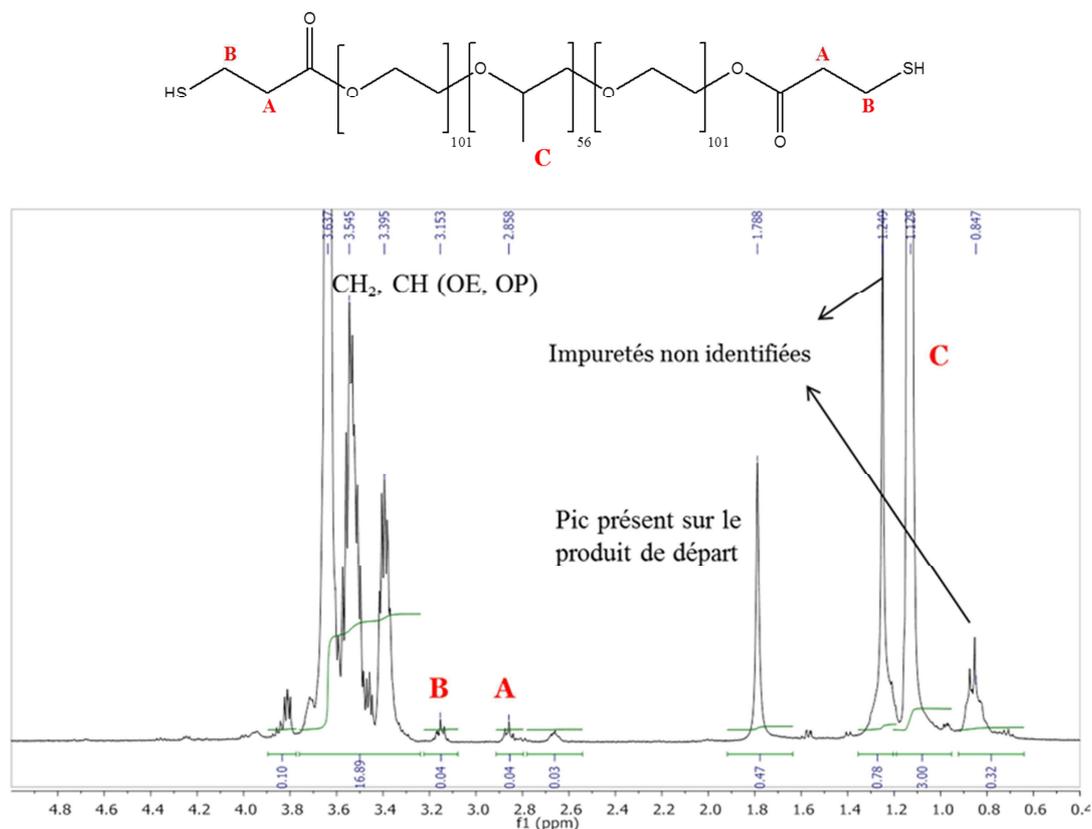


Figure 12 : spectre RMN  $^1\text{H}$  du Pluronic® F127 après esterification de Steglich, à 298K dans  $\text{CDCl}_3$ .

### ii) *Amination et couplage peptidique avec l'AMP*

Cette méthode consiste à obtenir en premier lieu un Pluronic-amine, dans le but d'y greffer ensuite l'AMP par couplage peptidique. Elle est une adaptation d'une procédure décrite par Mutter<sup>47</sup> en 1978.

La première étape consiste à activer les alcools terminaux du Pluronic® F127 en les remplaçant par des esters de toluène sulfonate qui sont, contrairement aux groupes hydroxyle, d'excellents groupes partants et qui peuvent ainsi facilement être substitués par de multiples groupes, même peu nucléophiles. La préparation des tosylates est conduite en présence d'une base, la triéthylamine qui neutralise le chlorure d'hydrogène (HCl) formé (cf. figure 13). Le produit est récupéré par précipitation dans l'éther et filtration.

La deuxième étape est une substitution nucléophile des esters de toluène sulfonate par l'azoture de sodium. Elle se déroule à 140°C, dans le DMF pendant 2h, par simple ajout de

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

l'azoture de sodium. Le produit est précipité dans l'éther, filtré, puis à nouveau solubilisé dans l'eau pour une ultrafiltration. On le récupère après lyophilisation.

La troisième étape est une hydrogénation des extrémités azoture en amine. Elle se fait en présence de dihydrogène en phase gazeuse et d'un catalyseur solide, le palladium, qui reste en suspension dans le solvant qui contient le Pluronic.

Enfin, la dernière étape est le couplage peptidique de l'AMP sur les extrémités amine du Pluronic F127, en présence d'un carbodiimide (DIC) et du *N*-Hydroxybenzotriazole (HOBt).

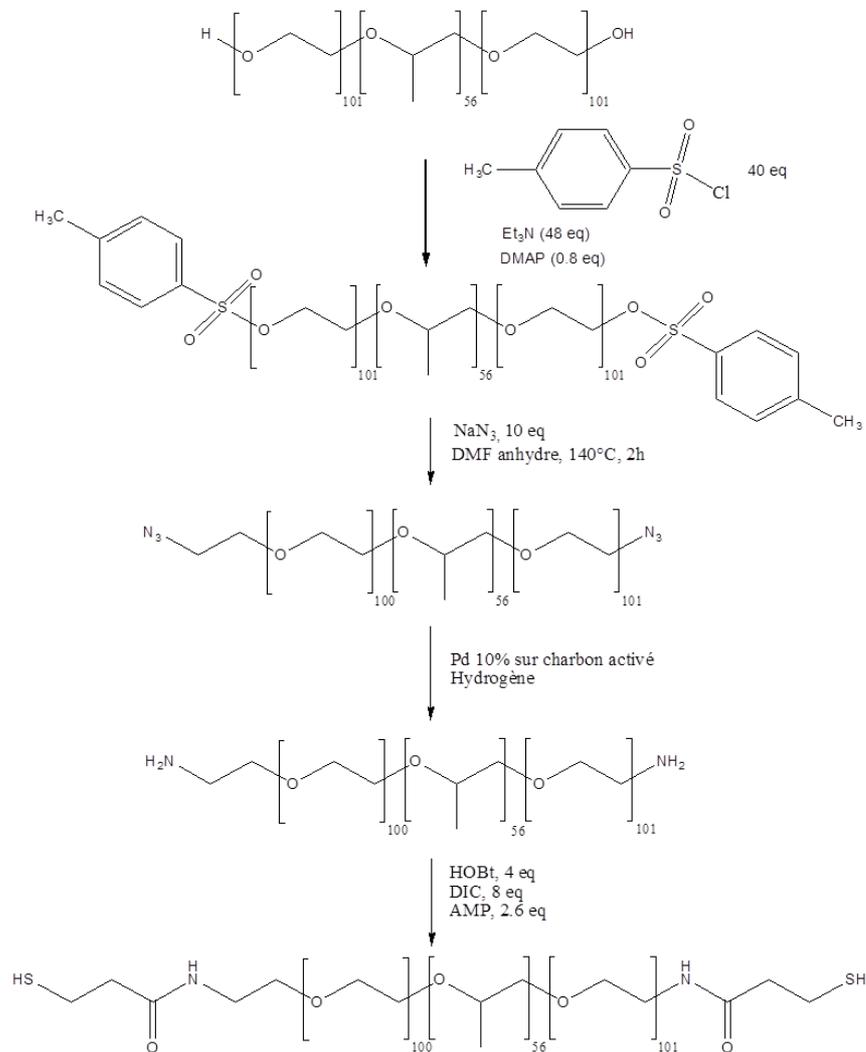


Figure 13 : Synthèse multi-étape d'un Pluronic-SH par amination puis couplage peptidique.

### Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

La figure 14 présente le spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit final. Comme pour l'estérification, environ 60% des extrémités du PEG ont été fonctionnalisées par l'AMP. Ce produit, bien qu'ayant subi de multiples purifications au cours des différentes étapes, contient encore des traces de chlorure de 4-toluènesulfonyle provenant de la première étape, signalées par des astérisques sur le spectre (protons aromatiques et méthyle). Cependant, il est parfaitement soluble dans l'eau et a montré une très bonne réactivité pour la chimie thio-clic.

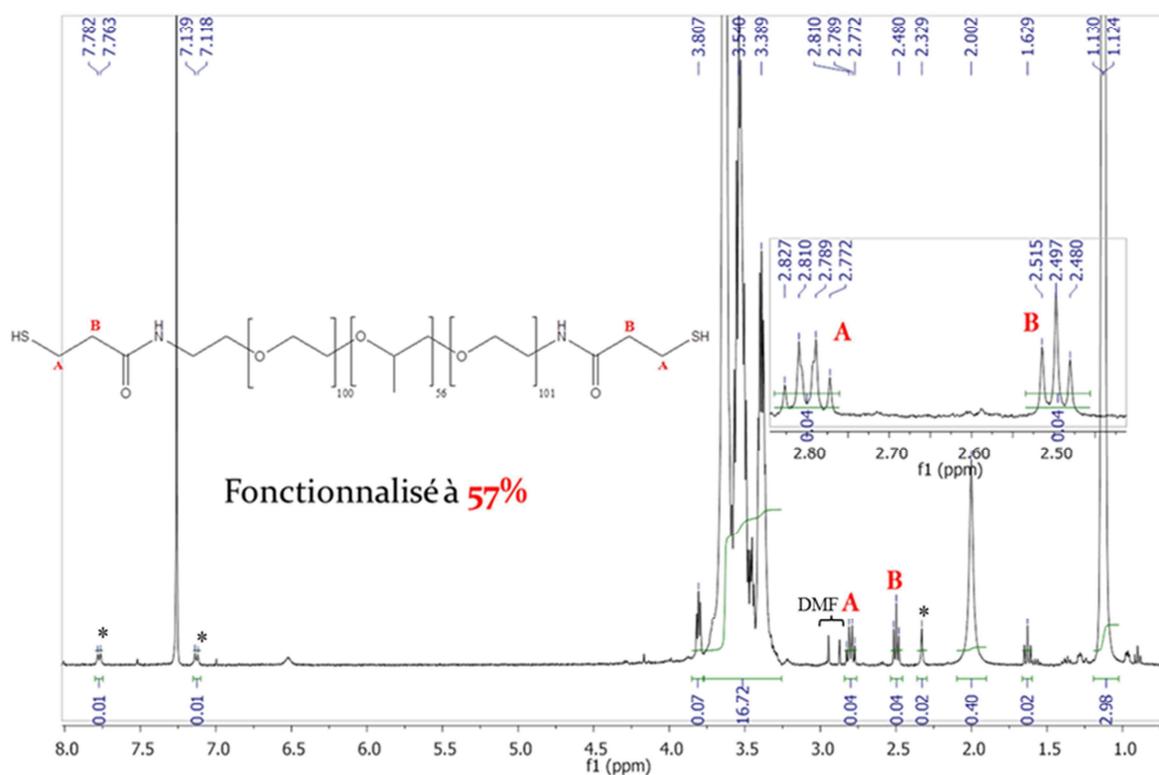


Figure 14 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du Pluronic F127-SH obtenu par amination et couplage peptidique.

Bien que cette méthode se soit montrée quantitative à la première étape (100% des extrémités fonctionnalisées par le chlorure de 4-toluènesulfonyle), la multiplication des étapes diminue le pourcentage d'extrémités fonctionnalisées en plus du rendement.

De plus, l'étape d'hydrogénation s'est avérée peu reproductible. Malgré une investigation poussée menée au laboratoire sur cette étape, le résultat n'a pu être reproduit 2 fois à l'identique. Cela laisse penser qu'une réaction secondaire dégrade le produit désiré. Pour ces raisons, une dernière méthode de fonctionnalisation a été envisagée.

*iii) Couplage de la cystamine*

La troisième stratégie envisagée est décrite dans la figure 15. Elle s'inspire des travaux de Park *et al.*<sup>44</sup>. La fonctionnalisation du Pluronic F127 se déroule en 3 étapes. Premièrement, les groupes hydroxyles sont activés avec le chloroformate de 4-nitrophényle. Ensuite on effectue une substitution des groupements nitrophényles par la cystamine. La dernière étape consiste en la réduction des ponts disulfures par un agent réducteur, le TCEP.

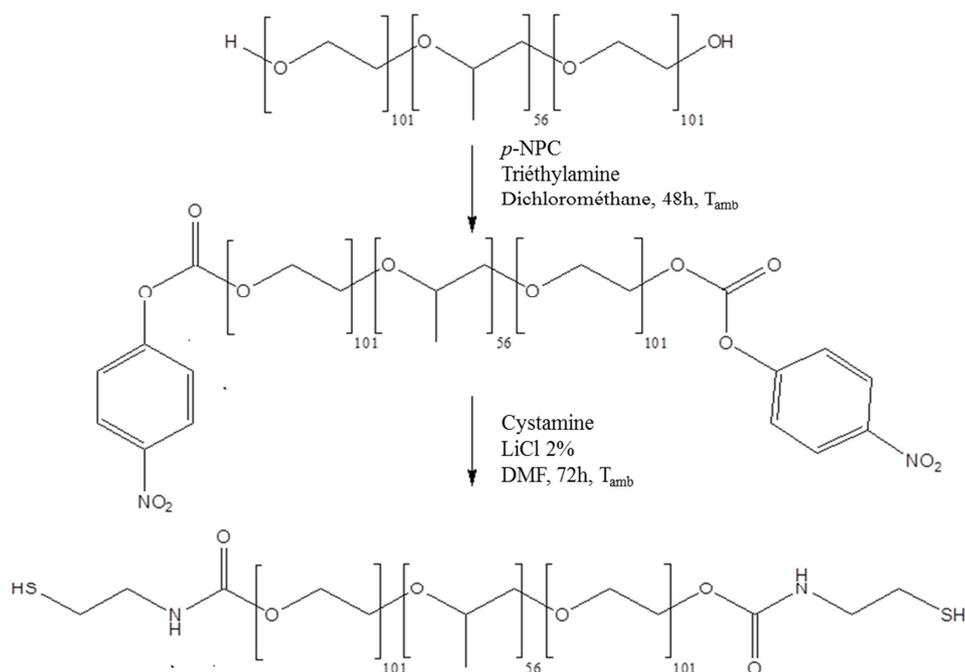


Figure 15 : Fonctionnalisation du Pluronic® F127 par la cystamine.

Cette stratégie a permis d'obtenir des Pluronic® fonctionnalisés à environ 40% de leurs extrémités (cf. figure 16). Là encore, la méthode n'est pas quantitative et quelques impuretés apparaissent sur le spectre RMN <sup>1</sup>H (les mêmes, semble-t-il, que lors de l'estérification). Cependant, elle permet de réduire le nombre d'étape par rapport à la méthode précédente, offre une bonne reproductibilité et un produit parfaitement soluble dans l'eau.

### Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

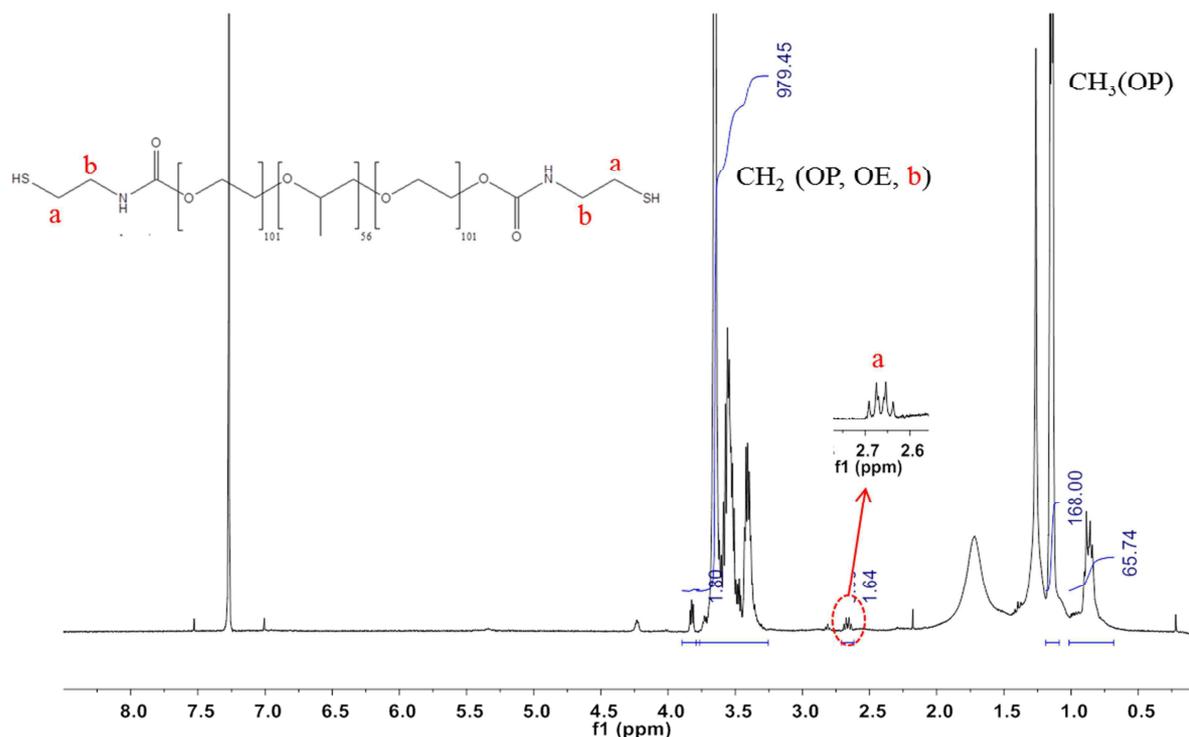


Figure 16 : Spectre RMN <sup>1</sup>H du Pluronic® F127 fonctionnalisé avec la cystamine

#### iv) Comparaison et conclusion

Le tableau de la figure 17 présente un comparatif des différentes méthodes employées pour la fonctionnalisation du Pluronic® F127 avec des thiols.

Synthèse	Nombre d'étapes	Durée de la synthèse	Taux de fonctionnalisation	rendement	Solubilité dans l'eau	Reproductibilité
Estérification de Steglich (AMP)	1	1 jour	60 %	95%	Trouble	moyenne
Amination et couplage peptidique (AMP)	4	7 jours	60%	10%	bonne	mauvaise
Couplage Cystamine	3	5 jours	40%	60%	bonne	bonne

Figure 17 : Comparaison des différentes méthodes de fonctionnalisation du Pluronic® F127

Compte tenu de ces résultats, nous avons opté pour le couplage avec la cystamine pour fonctionnaliser le Pluronic® F127 en grande quantité. En effet, cette méthode s'est avérée être le meilleur compromis afin d'obtenir un produit propre, soluble dans l'eau avec un rendement correcte et une bonne reproductibilité.

### III.3.2. Synthèse d'un HA thermosensible injectable

#### i) Stratégie

Afin de pouvoir préparer de manière efficace et de façon simple des polymères variés, une nouvelle méthode de greffage par chimie clic de type "thiol-ène" a été développée au sein de l'équipe SMP, parallèlement au couplage thiol-maléimide<sup>48</sup>.

Ce couplage "thio-ène" consiste en une addition radicalaire de thiols sur des doubles liaisons en présence d'une source d'irradiation et d'un photoamorceur (cf. figure 18). La stratégie de synthèse des polymères passe ainsi par la préparation de polysaccharides modifiés par des groupements alcènes pouvant réagir efficacement avec des molécules fonctionnalisées avec des thiols.

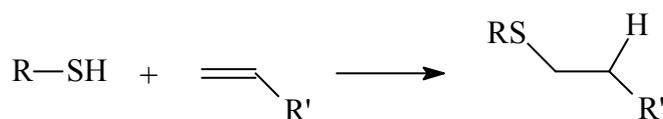


Figure 18 : Représentation simplifiée du couplage thiol-ène

Pour cela, on introduit de manière simple et dans des conditions douces des groupements penténoate sur le HA en les greffant aléatoirement sur les hydroxyles du polysaccharide par une réaction d'estérification effectuée en utilisant l'anhydride 4-penténoïque (cf. figure 19). Le choix d'utiliser cet anhydride a été orienté par des travaux réalisés en 2009 sur les glycopolymères par G. Chen *et al.*<sup>49</sup>. Ceux-ci ont en effet montré que

### Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

la modification du polyHEMA par l'anhydride 4-penténoïque conduisait à un polymère stable et très réactif lors des couplages thiol-ène réalisés sous UV avec des glucothioses. Le produit final était alors obtenu avec un très haut rendement de réaction et une bonne solubilité dans l'eau.

Ces travaux ont fait l'objet d'un brevet et donnent ainsi accès dans des conditions douces et de façon simple à des dérivés HA-penténoate avec des rendements supérieurs à 90% calculés par rapport au HA initial. C'est cette méthode que nous avons utilisée pour greffer le Pluronic® F127 au HA (cf. figure 19), notamment parce que l'intermédiaire HA-penténoate, contrairement au HA-maléimide, peut être lyophilisé et donc stocké.

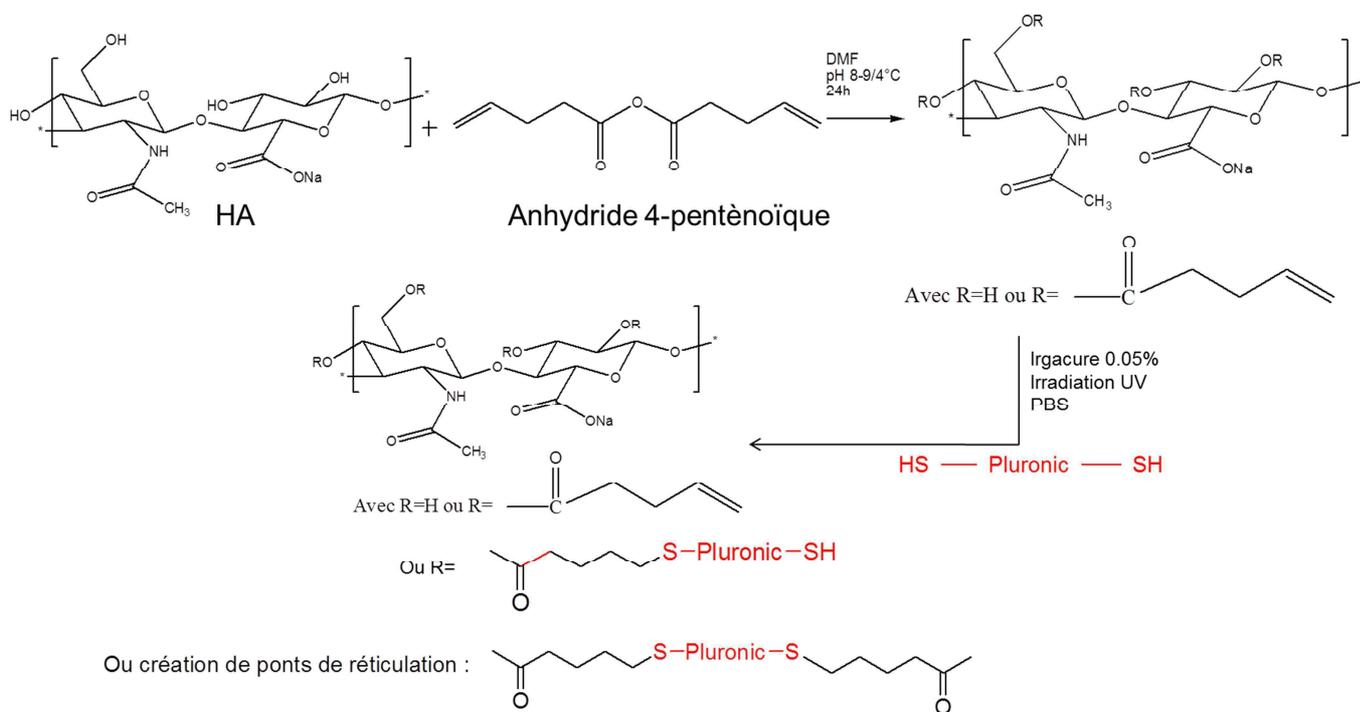


Figure 19 : Synthèse du HA-Pluronic par couplage thiol-ène du Pluronic-SH avec le HA-penténoate.

Les Pluronic® non-, mono- et di-substitués ne pouvant être séparés, ce produit greffé au HA peut conduire soit à des chaînes pendantes dans le cas du Pluronic® mono- et di-substitué, soit à des ponts de réticulation entre les chaînes de HA pour le di-substitué (cf. figure 19). Les synthèses ont été effectuées avec 2 masses molaires de HA différentes (200 et 400 kg.mol<sup>-1</sup>). Au vu des résultats (voir partie *iii*) **Rhéologie**) le HApent400 a été sélectionné

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

et sa réticulation a été testée à 3 concentrations différentes (3, 5 et 7 g/L) afin de favoriser ou non les réticulations et d'observer leur impact sur les propriétés rhéologiques du HA obtenu. Les HA réticulés à 5 et 7 g/L n'étant pas filtrables sur les filtres de 0,22  $\mu\text{m}$  nécessaires à la stérilisation, c'est finalement la concentration de 3 g/L qui a été retenue pour cette synthèse.

### **III.3.3. Caractérisation**

#### *i) RMN*

Le greffage de groupements penténoate sur le HA-penténoate a été mis en évidence par RMN  $^1\text{H}$ . La figure 20 compare les spectres du HA initial ( $M_w = 200\ 000\ \text{g/mol}$ ) et d'un dérivé HA-penténoate.

Le spectre de la figure 20 fait apparaître les signaux des protons caractéristiques de la chaîne penténoate. Le degré de substitution (DS), a été déterminé par intégration des signaux des protons anomères ou du  $\text{CH}_3$  (unité glucosamine) du HA et du proton c de la chaîne penténoate. Dans l'exemple donné dans la figure 20, le DS est de 0.20.

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

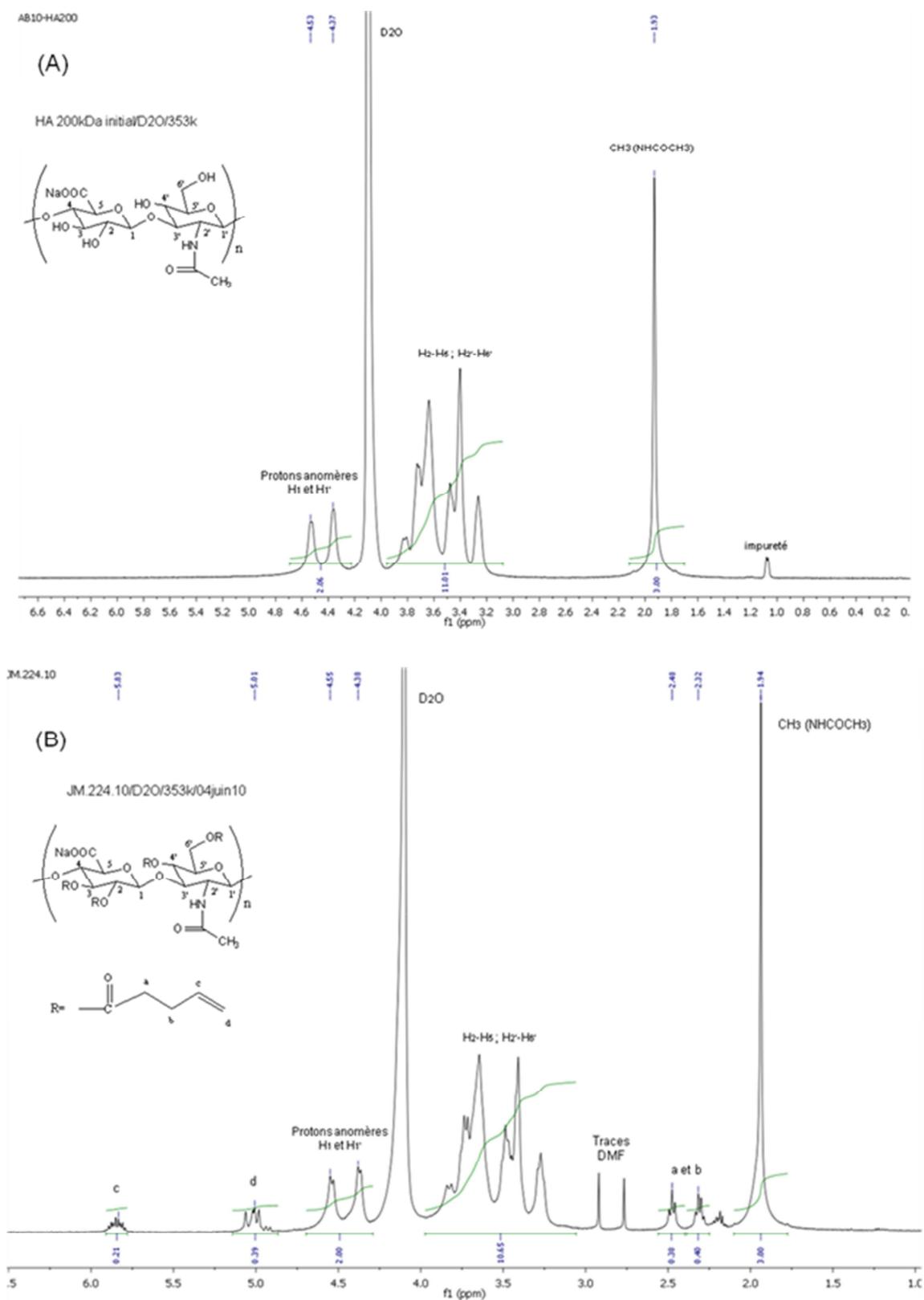


Figure 20 : Spectres RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, 80°C, D<sub>2</sub>O, 6mg/mL) du HA initial(A) et du HA-penténoate(B)

### Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Le greffage du Pluronic-SH sur le HA-penténoate par réaction thiol-ène a ensuite été mis en évidence par RMN<sup>1</sup>H. La figure 21 montre la formule chimique du produit de la réaction thiol-ène (HA-penténoate-Pluronic obtenu avec un Pluronic modifié avec la cystamine) et la figure 22 montre le spectre correspondant.

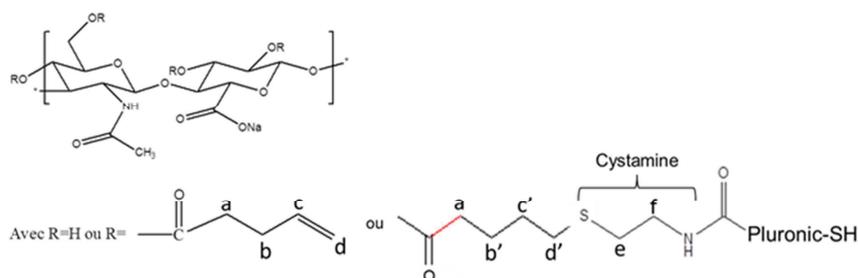


Figure 21 : Formule chimique d'un HA-penténoate-Pluronic obtenu par réaction thiol-ène

L'apparition des signaux des protons b' et c' nous permet de montrer que la réaction a bien eu lieu et que le Pluronic est donc relié de manière covalente au HA.

Le DS peut ici être calculé de multiples façons. On devrait en effet pouvoir observer par exemple la diminution du signal des protons c et d, par rapport au proton a au profit de l'apparition des protons b', c'. Cependant, le DS est faible et le spectre trop mal résolu pour obtenir un résultat fiable. En effet, le produit étant thermogélifiant, le spectre n'a pu être réalisé à 353K comme habituellement, mais à 298K. Le produit est assez visqueux à cette température et la ligne de base du spectre a subi de nombreuses modifications. Le meilleur moyen de calculer le DS est donc de comparer les CH<sub>3</sub> du Pluronic avec les CH<sub>3</sub> du HA. Ceci nous amène ici à un DS de 3,5% en Pluronic mais ne rend pas compte des possible ponts de réticulation.

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

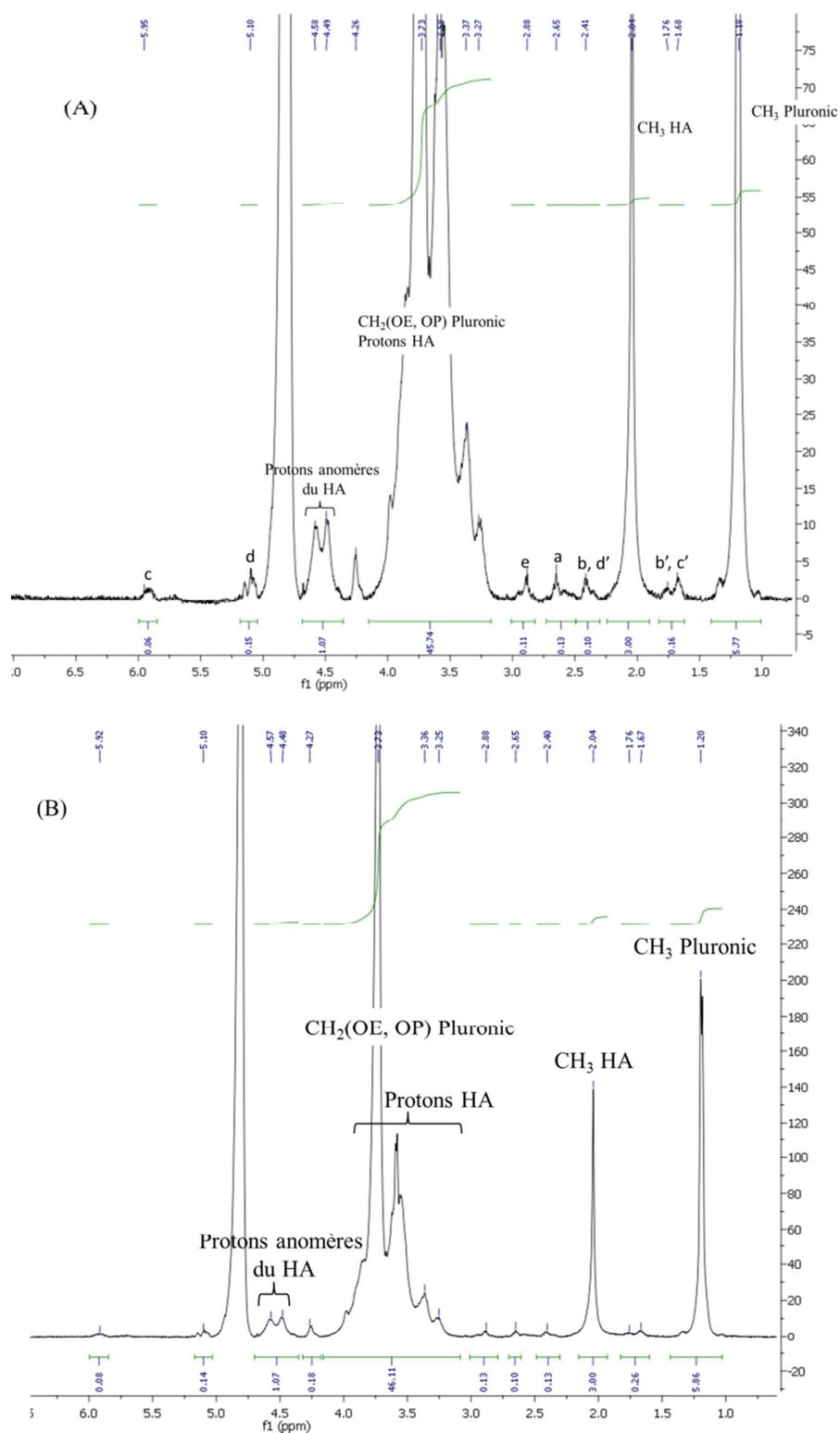


Figure 22: spectre  $\text{RMN}^1\text{H}$  du HA-penténoate-Pluronic réalisé avec un HA-penténoate de  $200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  de DS 0,2 et un Pluronic-SH modifié avec la cystamine, vu de près (A) et dézoomé (B).

ii) *Rhéologie*

Toutes les études rhéologiques présentées dans cette partie ont été effectuées dans le domaine linéaire de l'échantillon afin de ne pas modifier ses éléments structuraux. Il correspond au domaine où la relation entre contrainte et déformation est linéaire : un doublement de la déformation entraîne un doublement de la contrainte. Cela revient à considérer que les modules observés, rapports de la contrainte à la déformation, ne sont pas fonction de l'amplitude de celle-ci. Le domaine linéaire a donc été déterminé au préalable aux différentes fréquences. Les mesures qui suivent ont toutes été réalisées à la fréquence de 1 Hz pour une déformation de 20%, sur un rhéomètre AR2000ex avec une géométrie 4 cm 4° acier, dans un tampon PBS. La température varie à raison de 1°C par minute.

Le premier résultat marquant, montré figure 21, est l'obtention d'un HA au comportement thermogélifiant dont la température de transition sol-gel se situe à environ 26°C. Ce produit a été obtenu en réticulant un HA-penténoate de masse  $200 \text{ kg.mol}^{-1}$  (DS 0,2) à 3 g/L avec un 0,75 équivalents de Pluronic-SH obtenu par la méthode « amination et couplage peptidique de l'AMP » (fonctionnalisé à 60%). La mesure a été réalisée à 10 g/L et montre que l'on atteint un module de 28 Pa à 37°C. De plus, le comportement est totalement réversible.

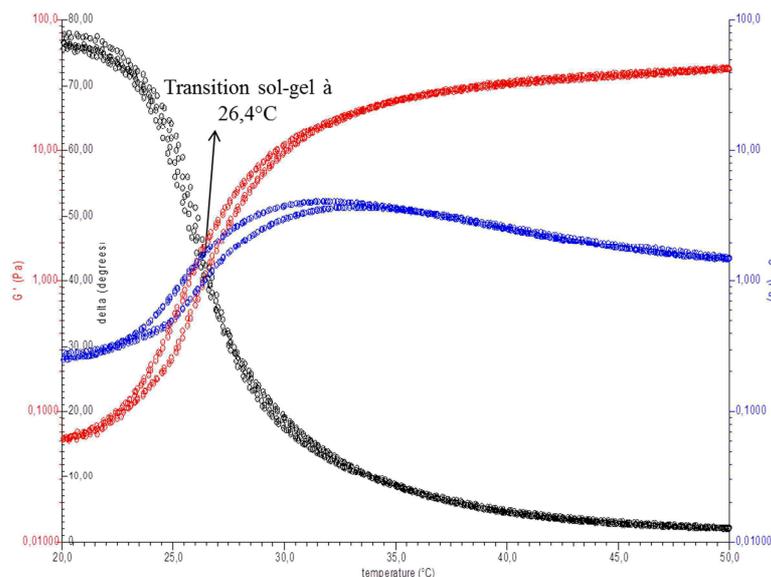


Figure 21 : Variation des modules  $G'$  et  $G''$  en fonction de la température d'un HA-pent-Pluronic ( $DS_{\text{pent}}=0,2$ ,  $M_w=200 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) à 10 g/L, réticulé à 3g/L avec 0,75 eq de Pluronic-SH (fonctionnalisé à 60%).

Suite à ce premier résultat, nous avons fait varier la masse molaire du HA et sa concentration lors de la mesure afin d'observer les conséquences sur les propriétés rhéologiques. Les différents essais sont récapitulés dans le tableau de la figure 22.

Lot HA-Pluronic	M <sub>w</sub> du HA (kg.mol <sup>-1</sup> )	DS penténoate (%)	DS Pluronic (%)	Concentration [HA-Pluronic] (g/L)	Module G' à 37°C (Pa)
AB11-94	200	20	7	10	27
AB11-121	200	20	3,5	10	3
				20	68
				30	163
AB11-123	400	20	5	10	32
				30	490

Figure 22 : Tableau récapitulatif des différents HA-Pluronic réalisés.

La figure 23 montre les résultats obtenus pour des HA de 200 (A) et 400 (B) kg.mol<sup>-1</sup> réticulés avec un 0,75 équivalents de Pluronic-SH obtenu par le greffage de la cystamine (fonctionnalisé à 40%).

Tout d'abord, on remarque que les produits obtenus avec ce Pluronic-SH (couplage de la cystamine) présentent un module 10 fois plus faible à 37°C que pour le produit obtenu avec le Pluronic précédent (couplage peptidique de l'AMP). En effet, sur la figure 21, le module à 37°C pour une concentration de 10 g/L est de 28 Pa, alors qu'il n'est que de 3 Pa à cette même concentration sur la figure 22(A) (courbe rouge). Ce résultat est logique car nous avons employé les mêmes quantités de Pluronic dans les 2 cas alors que l'un était plus substitué que l'autre. Il montre cependant l'importance d'avoir un Pluronic-SH fonctionnalisé au mieux. De plus, selon le Pluronic-SH utilisé, on remarque que la température de transition sol-gel varie également, celle-ci étant plus élevée pour le Pluronic-SH couplé avec la cystamine.

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

La figure 22 nous permet de montrer que les modules  $G'$  à 37°C augmentent avec la concentration, tandis que la température de transition sol-gel diminue. Cependant, aux concentrations testées, on est encore loin des valeurs  $G'$  requises pour l'étalement cellulaire en 2D (voir partie III.2.1. Synthèse d'hydrogels chimiques de HA fonctionnalisés par des peptides bioactifs).

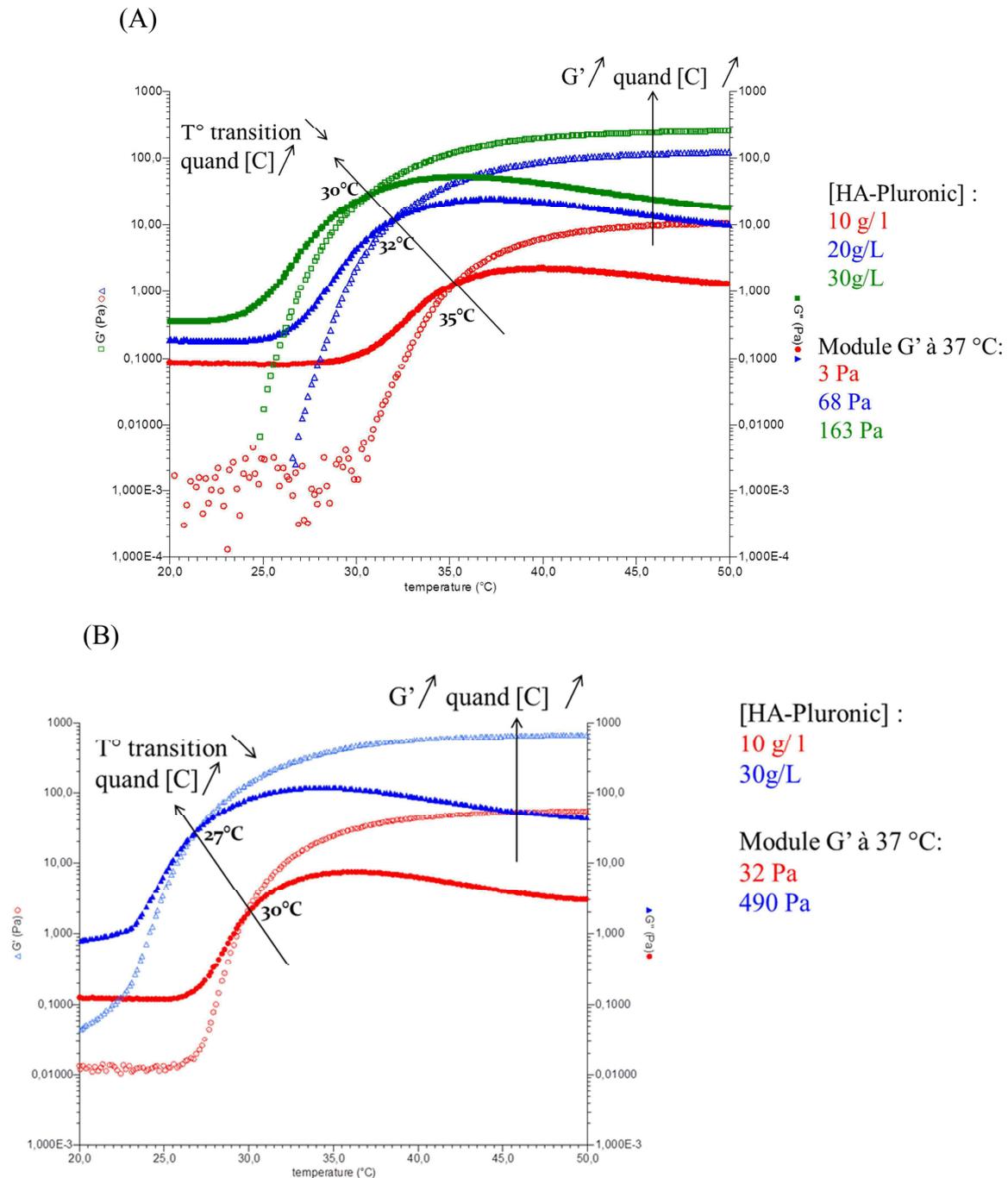


Figure 22 : Variation des modules  $G'$  et  $G''$  d'un HAent200 (A) et d'un HAent400 (B) DS 0,2 réticulés à 3g/L par un Pluronic-SH.

La figure 23 permet de comparer les modules  $G'$  à 37°C des HA-Pluronic de 200 et 400 kg.mol<sup>-1</sup> en fonction de leur concentration. Le HA-Pluronic de plus haute masse molaire permet d'atteindre des modules plus élevés.

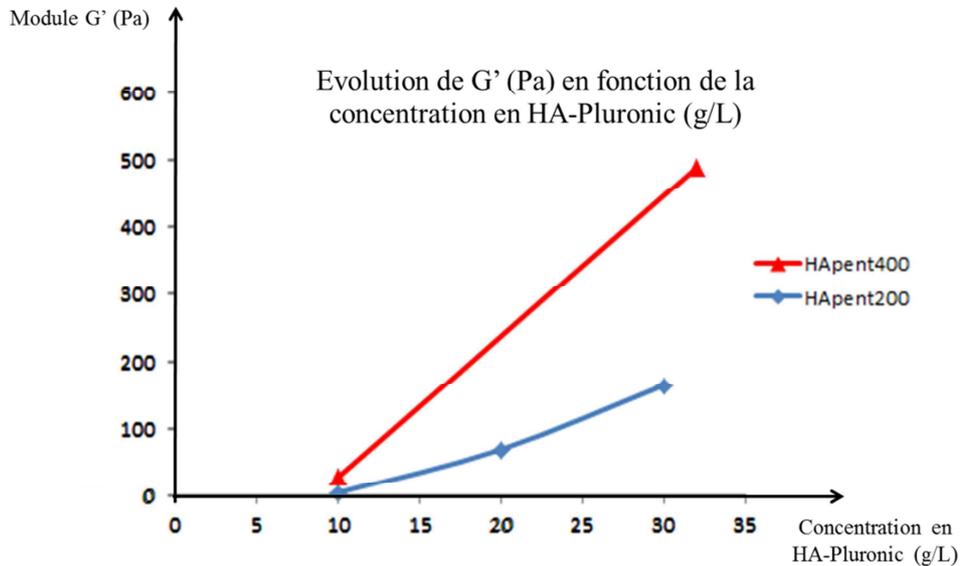


Figure 23 : Evolution de  $G'$  (Pa) à 37°C en fonction de la concentration en HA-Pluronic (g/L).

### III.3.4. Etude biologique

Afin de se rapprocher de la structure du HA thermogélifiant voulu pour l'application finale, nous avons également conduit une étude biologique sur des hydrogels de HA réticulés par des PEG-(SH)<sub>2</sub> qui présentent une structure similaire à celle du Pluronic® F127. Il s'agit donc ici d'une étude sur des hydrogels chimiques en 2D (cf. figure 24). L'intérêt des PEG-dithiol étant qu'ils sont disponibles dans le commerce et ne nécessitent donc pas de modification chimique.

### Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

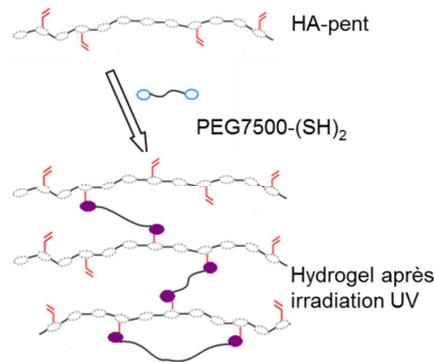


Figure 24 : Fabrication d'un hydrogel par couplage thiol-ène d'un HA-penténoate avec un PEG-SH

Pour cette étude, le peptide GRGDS a été greffé au préalable au HA-penténoate ( $400 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) par irradiation UV, avec un DS de 5%. La figure 25 présente les modules  $G'$  et  $G''$  obtenus pour ce type de gel au cours de l'irradiation UV.

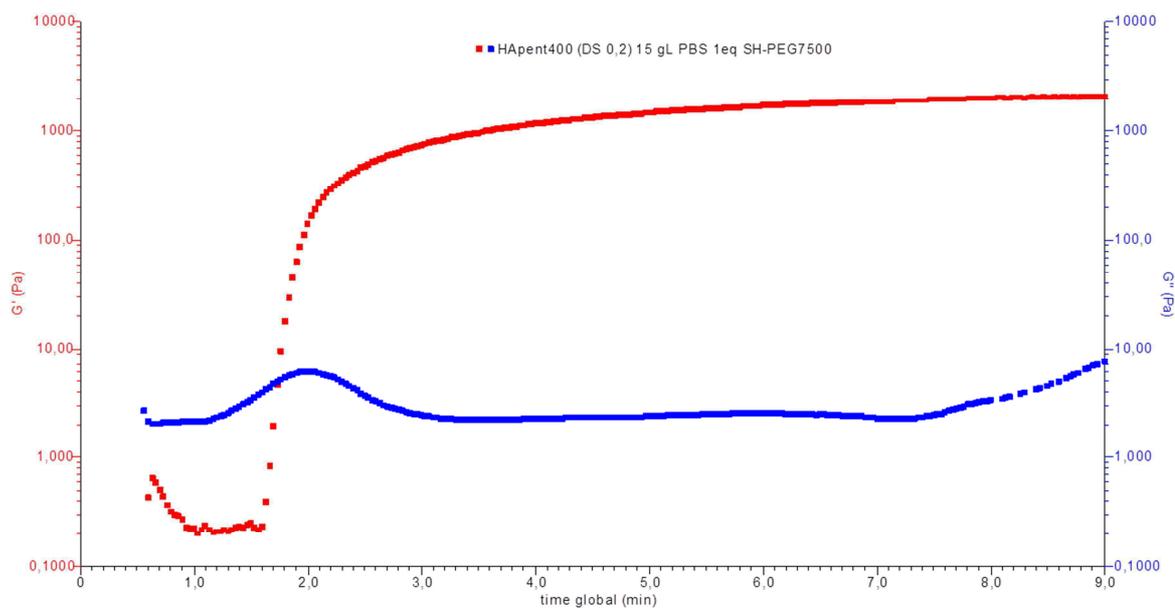


Figure 25 : variation des modules  $G'$  et  $G''$  au cours de la réticulation sous UV d'un HA-penténoate ( $400 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) à  $15 \text{ g/L}$  avec un PEG-(SH) $_2$  ( $7500 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

La Figure 26 montre le résultat obtenu après 24 h de culture sur ce gel de HA-PEG-RGD avec des cellules pré-ostéoblastes. On y observe un bon attachement et étalement cellulaire montrant que la présence du PEG ne semble pas affecter ceux-ci. Ce résultat laisse donc penser que le HA-Pluronic peut être à terme un matériau très intéressant pour l'ingénierie tissulaire de l'os.

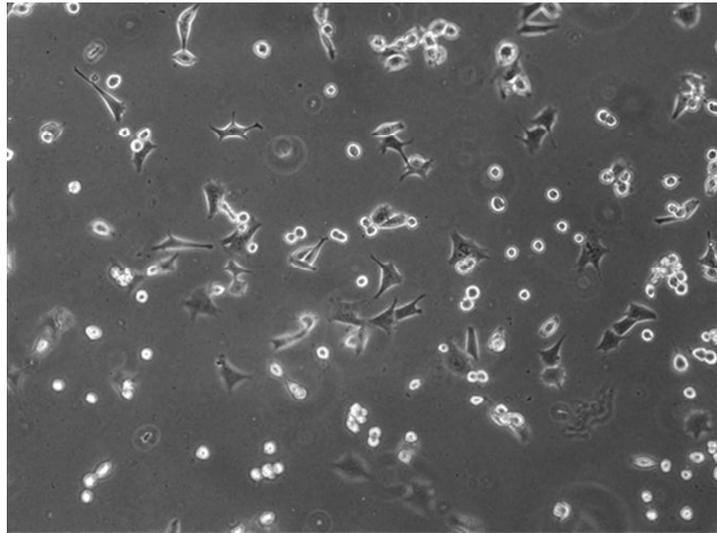


Figure 26 : Pré-ostéoblastes sur gel de HA-PEG-GRGDS(5%)

### Conclusion et perspectives

Au cours de ce chapitre 3, nous avons montré que la méthode de modification chimique de l'acide hyaluronique « thiol-maléimide » développée dans le chapitre 2 permettait la fabrication de substrats contenant des peptides d'intérêts pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Ces hydrogels ont été réalisés avec une très bonne maîtrise de leurs caractéristiques chimiques (quantité de peptides) comme l'a montré la caractérisation par RMN  $^1\text{H}$  et de leurs caractéristiques rhéologiques (rigidité) qui s'avèrent être des éléments cruciaux pour l'attachement et la prolifération des cellules.

Nous avons également mis au point un HA thermogélifiant, grâce à la chimie thiol-ène développée au sein de l'équipe SMP. Ce produit a demandé dans un premier temps de fonctionnaliser un polymère thermosensible, le Pluronic® F127, avec des extrémités thiols par une méthode efficace et reproductible. Nous avons montré qu'il était possible de moduler les propriétés de ce HA thermogélifiant, notamment la température de transition sol-gel et le module  $G'$  à  $37^\circ\text{C}$ , en faisant varier différents paramètres tels que la masse molaire du HA utilisé et sa concentration. Une étude biologique en 2D a été menée avec un HA réticulé par un PEG dans le but de mimer la structure chimique d'un HA-Pluronic. Ces résultats sont encourageants mais ne permettent pas de prédire précisément le comportement des cellules

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

sur des gels de HA-Pluronic, qui sont, contrairement aux gels HA-PEG réticulés chimiquement, des gels physiques obtenus en chauffant le matériau.

L'objectif serait donc de faire une étude biologique en 2D et 3D des gels de HA-Pluronic, puis y incorporer des peptides d'intérêts pour l'ingénierie tissulaire osseuse.

### Références

1. Burdick, J. A., Chung, C., Jia, X., Randolph, M. A. & Langer, R. Controlled Degradation and Mechanical Behavior of Photopolymerized Hyaluronic Acid Networks. *Biomacromolecules* **6**, 386–391 (2004).
2. Bencherif, S. A. *et al.* Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials* **29**, 1739–1749 (2008).
3. Jin, Y. *et al.* Recyclable characteristics of hyaluronate–polyhydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled releases. *Journal of Controlled Release* **73**, 173–181 (2001).
4. Leach, J. B., Bivens, K. A., Collins, C. N. & Schmidt, C. E. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **70A**, 74–82 (2004).
5. Baier Leach, J., Bivens, K. A., Patrick Jr., C. W. & Schmidt, C. E. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* **82**, 578–589 (2003).
6. Oudshoorn, M. H. M., Rissmann, R., Bouwstra, J. A. & Hennink, W. E. Synthesis of methacrylated hyaluronic acid with tailored degree of substitution. *Polymer* **48**, 1915–1920 (2007).
7. Pitarresi, G., Pierro, P., Palumbo, F. S., Tripodo, G. & Giammona, G. Photo-Cross-Linked Hydrogels with Polysaccharide–Poly(amino acid) Structure: New Biomaterials for Pharmaceutical Applications. *Biomacromolecules* **7**, 1302–1310 (2006).
8. Shah, D. N., Recktenwall-Work, S. M. & Anseth, K. S. The effect of bioactive hydrogels on the secretion of extracellular matrix molecules by valvular interstitial cells. *Biomaterials* **29**, 2060–2072 (2008).
9. Smeds, K. A. & Grinstaff, M. W. Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation. *Journal of Biomedical Materials Research* **54**, 115–121 (2001).
10. Trudel, J. & Massia, S. P. Assessment of the cytotoxicity of photocrosslinked dextran and hyaluronan-based hydrogels to vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* **23**, 3299–3307 (2002).
11. Park, Y. D., Tirelli, N. & Hubbell, J. A. Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks. *Biomaterials* **24**, 893–900 (2003).
12. Hahn, S. K., Park, J. K., Tomimatsu, T. & Shimoboji, T. Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules* **40**, 374–380 (2007).
13. Wang, D. A. & Elisseeff, J. H. Photopolymerization. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* **2**, 1212–1225 (2004).

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

14. Anseth, K. S. & Burdick, J. A. New Directions in Photopolymerizable Biomaterials. *MRS Bulletin* **27**, 130–136 (2002).
15. Shu, X. Z. *et al.* Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide–modified injectable hyaluronan hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **68A**, 365–375 (2004).
16. Leach, J. B., Bivens, K. A., Collins, C. N. & Schmidt, C. E. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **70A**, 74–82 (2004).
17. Hachet, E., Van Den Berghe, H., Bayma, E., Block, M. R. & Auzély-Velty, R. Design of Biomimetic Cell-Interactive Substrates Using Hyaluronic Acid Hydrogels with Tunable Mechanical Properties. *Biomacromolecules* **13**, 1818–1827 (2012).
18. Shin, H., Jo, S. & Mikos, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 4353–4364 (2003).
19. LeBaron, R. G. & Athanasiou, K. A. Extracellular Matrix Cell Adhesion Peptides: Functional Applications in Orthopedic Materials. *Tissue Engineering* **6**, 85–103 (2000).
20. Puleo, D. A. & Nanci, A. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials* **20**, 2311–2321 (1999).
21. Hersel, U., Dahmen, C. & Kessler, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **24**, 4385–4415 (2003).
22. Elbert, D. L. & Hubbell, J. A. Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering. *Biomacromolecules* **2**, 430–441 (2001).
23. Ruoslahti, E. RGD AND OTHER RECOGNITION SEQUENCES FOR INTEGRINS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **12**, 697–715 (1996).
24. Fisher, L. W., McBride, O. W., Termine, J. D. & Young, M. F. Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 2347–2351 (1990).
25. Celeste, A. J. *et al.* Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 9843–9847 (1990).
26. Wozney, J. M. *et al.* Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**, 1528–1534 (1988).
27. Saito, A., Suzuki, Y., Ogata, S., Ohtsuki, C. & Tanihara, M. Activation of osteo-progenitor cells by a novel synthetic peptide derived from the bone morphogenetic protein-2 knuckle epitope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1651**, 60–67 (2003).

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

28. Lee, J.-Y. *et al.* Osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells in self-assembled BMP-2 receptor-binding peptide-amphiphiles. *Biomaterials* **30**, 3532–3541 (2009).
29. He, X., Ma, J. & Jabbari, E. Effect of Grafting RGD and BMP-2 Protein-Derived Peptides to a Hydrogel Substrate on Osteogenic Differentiation of Marrow Stromal Cells. *Langmuir* **24**, 12508–12516 (2008).
30. Rezania, A., Thomas, C. H., Branger, A. B., Waters, C. M. & Healy, K. E. The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein. *Journal of Biomedical Materials Research* **37**, 9–19 (1997).
31. Drevelle, O. *et al.* Effect of functionalized polycaprolactone on the behaviour of murine preosteoblasts. *Biomaterials* **31**, 6468–6476 (2010).
32. Schmaljohann, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**, 1655–1670 (2006).
33. ROESER, J. Thèse : Synthèse de polymères dendronisés pour la reconnaissance ionique et à propriétés thermosensibles, Département de Sciences Analytiques (DSA), Université Louis Pasteur de Strasbourg. 41 (2008).
34. Brunet-Maheu, J.-M. *et al.* Pluronic F-127 as a Cell Carrier for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials Applications* **24**, 275–287 (2009).
35. Shachaf, Y., Gonen-Wadmany, M. & Seliktar, D. The biocompatibility of Pluronic®F127 fibrinogen-based hydrogels. *Biomaterials* **31**, 2836–2847 (2010).
36. Lin, H.-R., Sung, K. C. & Vong, W.-J. In Situ Gelling of Alginate/Pluronic Solutions for Ophthalmic Delivery of Pilocarpine. *Biomacromolecules* **5**, 2358–2365 (2004).
37. Jeong, B., Kim, S. W. & Bae, Y. H. Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 37–51 (2002).
38. Gajewiak, J., Cai, S., Shu, X. Z. & Prestwich, G. D. Aminoxy Pluronics: Synthesis and Preparation of Glycosaminoglycan Adducts. *Biomacromolecules* **7**, 1781–1789 (2006).
39. Huang, K., Lee, B. P., Ingram, D. R. & Messersmith, P. B. Synthesis and Characterization of Self-Assembling Block Copolymers Containing Bioadhesive End Groups. *Biomacromolecules* **3**, 397–406 (2002).
40. Hennink, W. E. & Van Nostrum, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 13–36 (2002).
41. Schmolka, I. R. Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of Biomedical Materials Research* **6**, 571–582 (1972).

Chapitre 3 : Conception d'hydrogels fonctionnels à base d'acide hyaluronique pour l'ingénierie tissulaire osseuse

42. Paustian, P. W. *et al.* Intravenous Pluronic F-127 in early burn wound treatment in rats. *Burns* **19**, 187–191 (1993).
43. Mayol, L. *et al.* Injectable Thermally Responsive Mucoadhesive Gel for Sustained Protein Delivery. *Biomacromolecules* **12**, 28–33 (2010).
44. Lee, Y. *et al.* Thermo-sensitive, injectable, and tissue adhesive sol-gel transition hyaluronic acid/pluronic composite hydrogels prepared from bio-inspired catechol-thiol reaction. *Soft Matter* **6**, 977–983 (2010).
45. Picart, C. *et al.* Primary Cell Adhesion on RGD-Functionalized and Covalently Crosslinked Thin Polyelectrolyte Multilayer Films. *Advanced Functional Materials* **15**, 83–94 (2005).
46. Neises, B. & Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English* **17**, 522–524 (1978).
47. Mutter, M. Soluble polymers in organic synthesis: I. Preparation of polymer reagents using polyethylene glycol with terminal amino groups as polymeric component. *Tetrahedron Letters* **19**, 2839–2842 (1978).
48. Mergy, J., Fournier, A., Hachet, E. & Auzély-Velty, R. Modification of polysaccharides via thiol-ene chemistry: A versatile route to functional biomaterials. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **50**, 4019–4028 (2012).
49. Chen, G., Amajjahe, S. & Stenzel, M. H. Synthesis of thiol-linked neoglycopolymers and thermo-responsive glycomicelles as potential drug carrier. *Chem. Commun.* 1198–1200 (2009).doi:10.1039/B900215D

# **Chapitre 4**

*Partie expérimentale*

<b>IV. Partie expérimentale</b>	<b>122</b>
<b>IV.1 Produits chimiques et solvants</b>	<b>122</b>
<b>IV.2 Matériels et méthodes générales</b>	<b>123</b>
IV.2.1 Purifications	123
i) Ultrafiltration frontale	123
ii) Précipitation	124
IV.2.2 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire	124
IV.2.3 Rhéologie	125
IV.2.4 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	128
<b>IV.3 Synthèses</b>	<b>129</b>
IV.3.1 Synthèse du dérivé HA-maléimide et addition du thiol	129
IV.3.2 Synthèse du dérivé HA-penténoate et addition du thiol	131
IV.3.3 Fonctionnalisation du Pluronic F127	133
i) Estérification avec l'AMP	133
ii) Amination et couplage peptidique de l'AMP	134
iii) Couplage de la cystamine	138
<b>Références</b>	<b>141</b>

## IV. Partie expérimentale

### IV.1 Produits chimiques et solvants

Plusieurs masses molaires d'acide hyaluronique ont été utilisées pour ces travaux. Les gels de HA-méthacrylates présentés dans le chapitre « III.2. Hydrogels chimiques de HA fonctionnalisés par des peptides comme système modèles pour études biologiques » ont été élaborés à partir d'un HA de masse molaire moyenne en masse  $M_w = 120 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  fourni par la société Lifecore.

Les dérivés de HA-maléimide présentés dans le chapitre « II.2. Fonctionnalisation du HA par couplage thiol-maléimide » ont été élaborés à partir de 3 masses molaires différentes,  $M_w = 20 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  et  $600 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ , provenant respectivement de la société ARD.

Le dérivé de HA-penténoate présenté dans le chapitre « III.3.2. Synthèse d'un HA thermosensible injectable » a été élaboré à partir d'un HA de masse molaire moyenne en masse  $M_w = 400 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  provenant de la société ARD.

Tous ces HA sont obtenus par fermentation bactérienne (bactérie *streptococcus zooepidemicus*). Leurs masses molaires ont été vérifiées par SEC.

Le Pluronic® F127 provient de Sigma Aldrich Le poly(éthylène glycol) de masse  $M_w = 7500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  provient également.

Les peptides GRGDS, BSP(RGD) et BSP(RGE) nous ont été fourni par la société Genecust (Luxembourg).

Le reste des produits chimiques a été commandé auprès de la société Sigma-Aldrich SARL et Fluka (division de Sigma-Aldrich SARL). Ils ont été utilisés sans purification préalable.

Les solvants (dichlorométhane, éthanol, N,N-diméthylformamide) et solvants deutérés ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) proviennent de la société SDS (France) et ont été utilisés sans purification préalable.

## IV.2 Matériels et méthodes générales

### IV.2.1 Purifications

#### i) Ultrafiltration frontale

L'ultrafiltration (UF) est une filtration sur membrane où le liquide traverse une membrane semi-perméable grâce à une différence de pression (pression transmembranaire ou TMP). Les particules en solution ou en suspension de haut poids moléculaire sont retenues dans la cellule tandis que l'eau et les molécules de faible poids moléculaire (de taille inférieure au seuil de coupure de la membrane) passent à travers la membrane (cf. figure 1). Ce processus de séparation est utilisé dans l'industrie pour purifier et/ou concentrer des solutions de macromolécules, notamment les protéines.

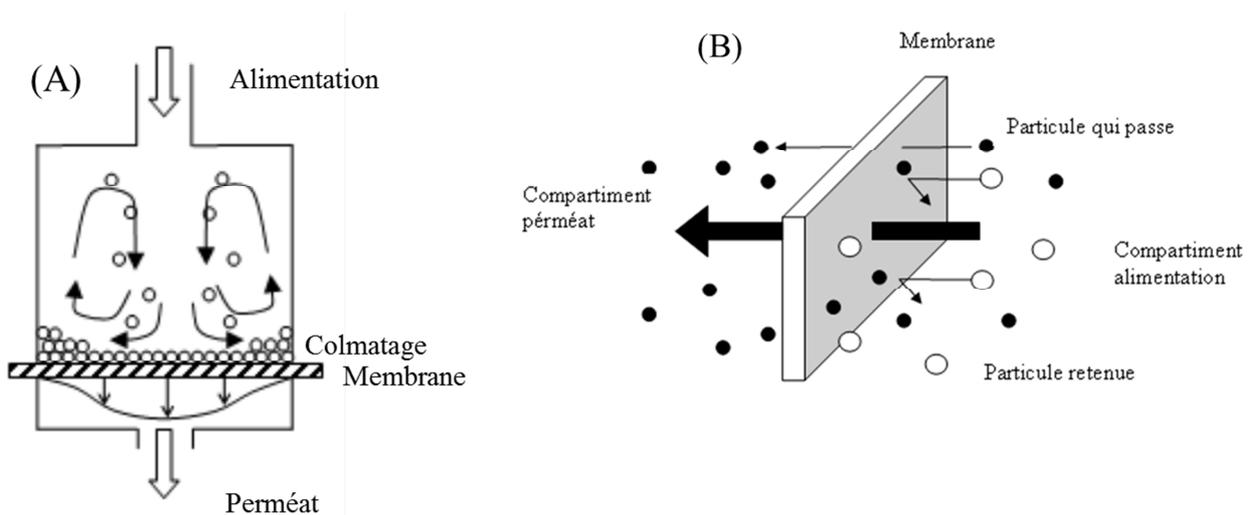


Figure 1 : Représentation schématique d'une cellule d'ultrafiltration frontale (A) et d'une membrane sélective utilisée en UF (B).

En filtration frontale, le courant à travers la membrane entraîne toutes les espèces dissoutes ou en suspension vers la surface de la membrane. Les espèces retenues par celle-ci s'y accumulent très rapidement. Ceci favorise un colmatage rapide de la membrane que l'on peut cependant minimiser par la présence d'un agitateur magnétique au sein de la cellule d'UF.

## Chapitre 4 : Partie expérimentale

Les membranes utilisées au laboratoire sont en cellulose régénérées et fournies par la société millipore. Le seuil de coupure est adapté en fonction de la masse molaire du produit à purifier et en général 20 fois inférieur à celle-ci. Par exemple pour le HA de masse molaire  $600 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ , le seuil de coupure était  $30 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Pour le Pluronic® F127, de masse  $12600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , il était de  $500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

L'UF est stoppée quand la conductivité du perméat est stable et inférieure à  $5 \mu\text{S}$ .

Cette méthode de purification a principalement été utilisée pour les synthèses du dérivé HA-maléimide et du Pluronic-SH fonctionnalisé.

### *ii) Précipitation*

Les dérivés HA-méthacrylate et HA-penténoate sont purifiés par précipitation. L'opération consiste à ajouter un non-solvant du polymère jusqu'à ce qu'il précipite. Pour le HA, on procède avec de l'éthanol, qu'on ajoute au HA en solution dans l'eau jusqu'à obtenir un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O 3/2. Il est important d'ajouter l'éthanol de façon lente et régulière afin d'avoir un mélange le plus homogène possible. Lorsque le polymère a précipité, on le laisse décanter afin d'éliminer le surnageant avec les impuretés qu'il contient. On procède ensuite à des lavages successifs du HA avec des solutions EtOH/ H<sub>2</sub>O 7/3, 4/1 et 9/1.

### **IV.2.2 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire**

Les spectres RMN du proton ont été réalisés sur un appareil Bruker avance 400 opérant à la fréquence de 400 MHz (<sup>1</sup>H) équipé d'une sonde QNP.

Les déplacements chimique ( $\delta$ ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane utilisé comme référence interne et en utilisant les solvants indiqués.

Les HA hydrosolubles sont solubilisés dans le D<sub>2</sub>O à 6 g/L. La référence utilisée est alors le pic résiduel de l'eau pour les spectres protons (étalonné à 4,8 ppm pour une température de 298K<sup>1</sup> et à 4,25 ppm pour une température de 353K). Les Pluronic sont

## Chapitre 4 : Partie expérimentale

solubilisés à 20 g/L dans le  $\text{CDCl}_3$ . La référence utilisée est alors le pic résiduel du chloroforme à 7,26 ppm à 298K.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  standards donnent des informations sur les protons de la molécule étudiée notamment les déplacements chimiques ( $\delta$ ) les intensités de signaux et les constantes de couplage ( $J$ ). Les spectres sont acquis sur 16 K points et transformés sur 32 K points (zéro-filling). Tous les spectres sont traités à l'aide d'une fonction exponentielle ( $\text{LB}=0,2$ ) et une correction de la ligne de base est effectuée. Les expériences avec le HA sont effectuées avec un temps de relaxation de 10s (2s pour les Pluronic), 64 scans afin d'obtenir un bon rapport signal/bruit (32 scans pour les Pluronic), à une température de 353K (298K pour le Pluronic)

### IV.2.3 Rhéologie

Le rhéomètre utilisé est un AR2000Ex de TA Instruments à géométrie cône-plan en acier (4 cm,  $4^\circ$ ). Le cône est soumis à une contrainte (couple) et l'on mesure sa vitesse de rotation et la déformation engendrée. Ce rhéomètre permet des mesures en dynamique pour la détermination des propriétés viscoélastiques en imposant des contraintes sinusoïdales de faibles amplitudes. De plus, il permet de disposer à la fois d'un plan Peltier pour les mesures nécessitant un contrôle précis de la température et d'un plan en quartz permettant l'irradiation UV de l'échantillon au cours de la mesure (cf. figure 2).



#### Mesures en mode dynamique

## Chapitre 4 : Partie expérimentale

Les propriétés viscoélastiques d'un matériau peuvent être déterminées par des sollicitations dynamiques. L'échantillon est soumis à une contrainte (ou déformation) qui varie de façon sinusoïdale en fonction de la fréquence imposée. La déformation résultante est une sinusoïde de même fréquence présentant un déphasage par rapport à la contrainte. Les équations correspondantes sont les suivantes :

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cos(\omega t)$$

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t + \delta)$$

Où  $\sigma_0$  et  $\gamma_0$  sont les amplitudes maximales de la contraintes et de la déformation,  $\omega$  la pulsation ( $\text{rad.s}^{-1}$ ) et  $\delta$  le déphasage de la déformation par rapport à la contrainte.

Le matériau peut être entièrement caractérisé par le module de rigidité complexe  $G^*(\omega)$  qui est défini comme le rapport de la contrainte  $\sigma^*(t)$  sur la déformation  $\gamma^*(t)$ .

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

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

Où  $\sigma^*$  et  $\gamma^*$  sont respectivement la déformation et la contrainte complexe et  $G^*(\omega)$  est le module de rigidité complexe.

Les deux modules déterminants sont  $G'(\omega)$  et  $G''(\omega)$ . La grandeur  $G'(\omega)$  représente la réponse du matériau en phase avec la contrainte (ou déformation) appliquée, c'est le module de stockage. Le terme  $G''(\omega)$  est la réponse différée du matériau, c'est le module de perte.

Dans le cas d'un solide élastique parfait :  $G'(\omega) = G$  et  $G''(\omega) = 0$

Dans le cas d'un liquide visqueux newtonien :  $G'(\omega) = 0$  et  $G''(\omega) = \eta\omega$

Où  $\eta$  est la viscosité.

Toutes les mesures dynamiques ont été réalisées dans le régime linéaire, domaine du matériau où les modules  $G'$  et  $G''$  sont indépendants de la contrainte imposée. Ce régime permet d'observer la dynamique du système dans sa structure d'origine et non pas dans une structure détruite par une trop forte contrainte.

## Chapitre 4 : Partie expérimentale

Le régime linéaire a été déterminé en suivant l'évolution de  $G'$  et  $G''$  en fonction de la déformation à une fréquence donnée, en l'occurrence à 1 Hz. On relève ainsi le pourcentage de déformation pour lequel  $G'$  et  $G''$  sont constants. Cela a été réalisé pour chaque échantillon, aux différentes températures. Pour nos échantillons, la déformation permettant de travailler dans le régime linéaire n'excède pas 20% pour les HA-Pluronic, 3,5% pour les gels de HA-méthacrylate.

### Préparation des échantillons et procédure

#### Les gels de HA-méthacrylate

Le HA-méthacrylate est solubilisé dans un tampon PBS à la concentration désirée. On dépose 250  $\mu\text{L}$  de la solution entre le quartz et la géométrie (plan aluminium de 20 mm de diamètre). Le gap est ensuite réglé manuellement de telle sorte que le produit soit uniformément réparti. Ce gap est ensuite maintenu pendant l'expérience en contrôlant la force normale (égale à  $0 \pm 0,1$  N). L'échantillon, après une période d'équilibration de 1,5 minutes, subit une irradiation UV constante de 50  $\text{mW}/\text{cm}^2$  pendant 20 minutes. Parallèlement, on mesure  $G'$  et  $G''$  pendant 43 minutes à une fréquence fixe de 1 Hz et une déformation fixe de 3,5% (régime linéaire déterminé au préalable). Au bout de 23 minutes, l'irradiation UV reprend pendant 5 minutes.

#### Les systèmes thermogélifiants HA-Pluronic

Le HA-Pluronic est solubilisé dans un tampon PBS à la concentration désirée. On dépose un volume suffisant ( $\approx 1,7$  mL) sur le plan Peltier. On descend la géométrie (cône acier de 4 cm  $4^\circ$ ) jusqu'au « zéro gap » (étalonnée automatiquement au préalable) autour de laquelle on dépose ensuite de l'huile de silicone, afin de palier tout problème d'évaporation de l'eau de l'échantillon. Après une période d'équilibration de 2 minutes à 20°C, on mesure  $G'$  et  $G''$  à une fréquence fixe de 1 Hz et une déformation fixe de 20% (régime linéaire déterminé au préalable à 20, 35 et 50°C), tout en faisant varier la température de 20 à 50 °C puis de 50 à 20°C à raison de 1°C/minute. On laisse l'échantillon au repos à 20°C pendant 2 minutes puis on réitère la mesure.

#### IV.2.4 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Cette technique donne accès à des grandeurs physiques telles que les masses molaires moyennes, le rayon de giration ou encore la viscosité intrinsèque des échantillons. La technique consiste à fractionner l'échantillon selon le volume hydrodynamique de ses constituants, puis à analyser les fractions à l'aide de différents détecteurs.

Les polysaccharides à analyser sont solubilisés dans l'éluant à une concentration de 0,5 ou 1 g/L (selon leur masse molaire supposée), puis filtrés à la seringue sur des membranes Millipore® de porosité 0,22  $\mu\text{m}$ . Les solutions sont injectées à travers des colonnes (2 colonnes en série Shodex OH pak) sur un appareil WATERS GPCV Alliance 2000. Le solvant utilisé est le nitrate de sodium 0,1 M. En sortie de colonne, la solution est analysée par 3 détecteurs montés en série :

- Un réfractomètre différentiel qui permet de déterminer la concentration de chaque fraction.
- Un viscosimètre capillaire qui permet d'accéder à la viscosité relative de chaque fraction.
- Un appareil de diffusion de la lumière (cf. figure 3).

La détermination de la concentration en polymère par réfractométrie permet de calculer la viscosité réduite  $\eta_{\text{red}}$  pour chaque fraction, qui peut être assimilée à la viscosité intrinsèque  $\eta_i$  du fait de la faible concentration en polymère. L'appareil de diffusion de la lumière DAWN DSP-F de la société Wyatt Technology Corporation permet d'accéder à la masse molaire et au rayon de giration  $R_G$  à partir de la méthode de Zimm, qui représente l'évolution de  $KC/R(\theta)$  en fonction de  $\sin^2(\theta/2)$ . Le programme ASTRA assure le traitement des données pour obtenir les masses molaires moyennes en nombre et en masse.

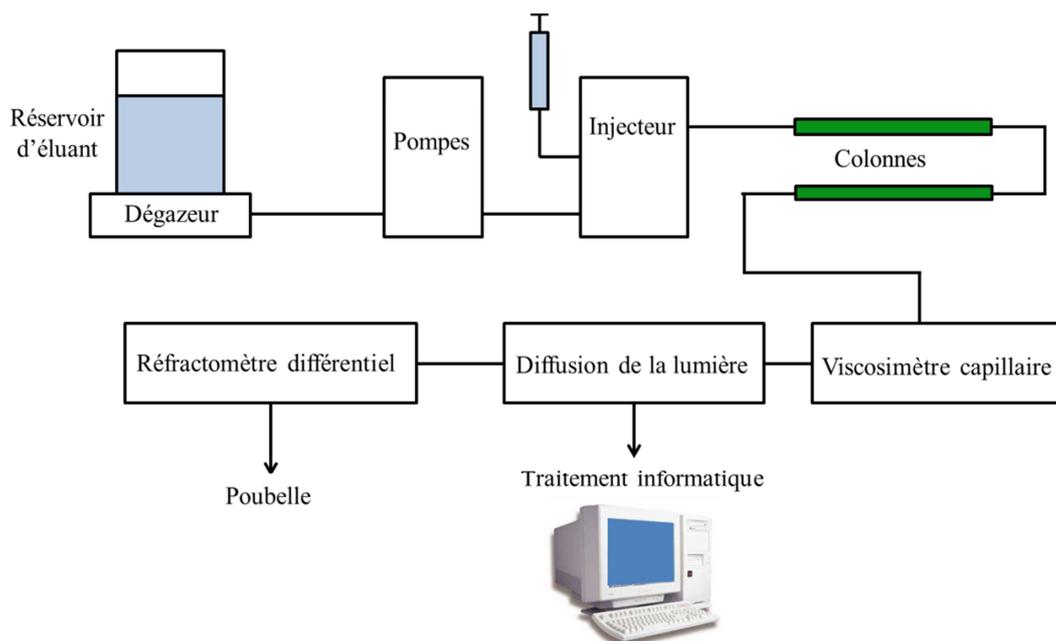
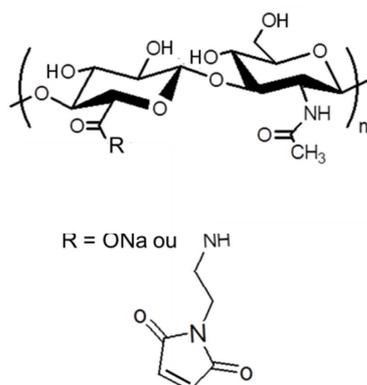


Figure 3 : Représentation schématique de l'appareillage de la chromatographie d'exclusion stérique triple détection

### IV.3 Synthèses

#### IV.3.1 Synthèse du dérivé HA-maléimide et addition du thiol

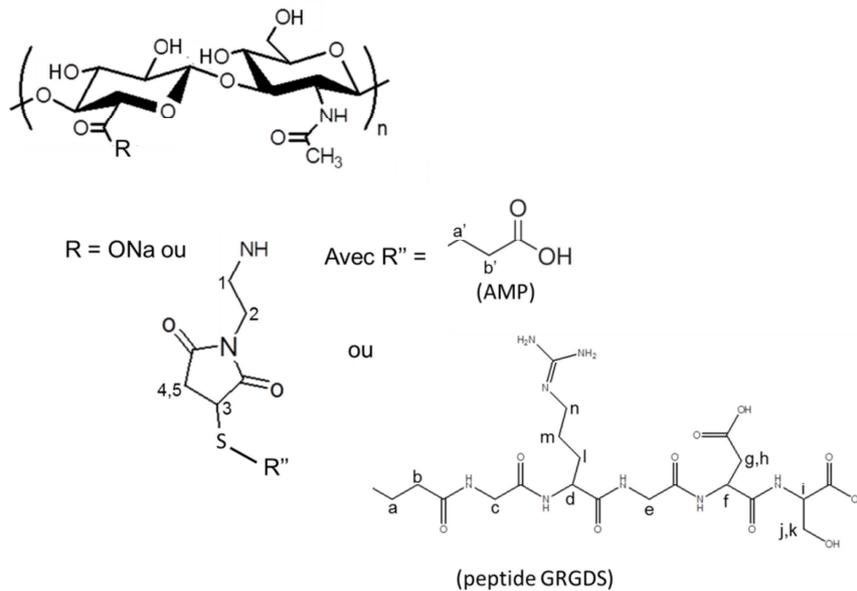
Exemple de synthèse d'un dérivé du HA porteur d'une fonction maléimide (HA-maléimide) de DS 15% à partir d'un lot de HA de masse  $200 \text{ kg.mol}^{-1}$



## Chapitre 4 : Partie expérimentale

Le hyaluronate de sodium de masse  $200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  (50 mg, 0,125 mmol) est solubilisé dans l'eau ultra-pure (20 mL) à température ambiante sous agitation magnétique dans un bécher. A cette solution, on ajoute 227 mg de chlorure de sodium NaCl préalablement solubilisé dans 6 mL d'eau ultra-pure, de telle sorte que finalement,  $[\text{NaCl}] = 0,15\text{M}$  et  $[\text{HA}] \approx C^* \approx 1,93 \text{ g/L}$ . On ajoute ensuite successivement l' amino-maléimide (sel de N-(2-aminoéthyl)maléimide trifluoroacétate) (47,7 mg soit 1,5 équivalents par rapport au HA), le sulfo-NHS (sel N-Hydroxysulfosuccinimide de sodium) (27 mg soit 1 équivalent) et l' EDC (N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochlorure) (48 mg Soit 2 équivalents). Au début de la réaction, le pH de la solution est ajusté à 4,75 avec une solution de HCl 0,5M puis contrôlé et régulièrement réajuster à 4,75 à l'aide d'une solution de NaOH 0,1M. La réaction est laissée sous vive agitation à température ambiante jusqu'à stabilisation du pH (environ 4 heures). Le milieu réactionnel est alors transféré dans une cellule d'ultrafiltration contenant une membrane de seuil de coupure égal à  $10 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ . On augmente le volume en ajoutant de l'eau ultrapure jusqu'à obtenir une concentration environ égale à 0,5  $C^*$ . On procède alors à l'ultrafiltration jusqu'à ce que le perméat ait une conductivité proche de celle de l'eau ultrapure.

### Exemple d'addition d'un peptide GRGDS fonctionnalisé par un thiol sur un dérivé HA-maléimide de masse $200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$



## Chapitre 4 : Partie expérimentale

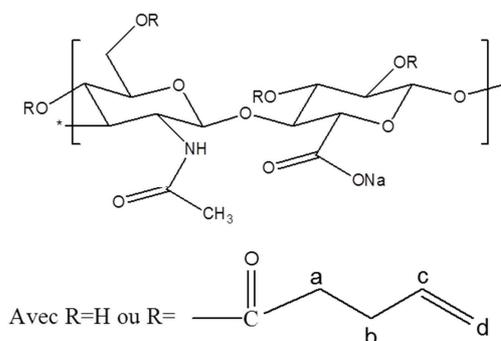
Aussitôt après l'ultrafiltration, le dérivé HA-maléimide est transféré dans un bécher auquel on ajoute, sous agitation magnétique, la quantité de PBS 10X nécessaire. Le pH est alors de 7,4 et la concentration en HA proche de 0,3 C\*. On ajoute ensuite la quantité de peptide GRGDS désirée, ici 0,15 équivalents par rapport au HA, soit 3,3 mg ( $M_{\text{GRGDS}} = 578 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2h. On ajoute ensuite 2 équivalents d'acide 3-mercaptopropionique et on laisse réagir une nuit. Le produit est ensuite purifié par ultrafiltration avec de l'eau ultra-pure puis lyophilisé et caractérisé par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ . Le degré de substitution en peptide GRGDS est de 13 %.

**Rendement** : 85%

**RMN $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz, 353K,  $\delta(\text{ppm})$ )** : 1,71-1,83 ppm ( $(\text{CH}_2)_i$  et  $(\text{CH}_2)_m$  du peptide), 2,05 ppm ( $(\text{CH}_3)$  du groupe acétamide du hyaluronane), 2,76-2,84 ppm ( $(\text{CH}_2)_a$ ,  $(\text{CH}_2)_b$ ,  $(\text{CH}_2)_{g, h}$  du peptide,  $(\text{CH}_2)_{b'}$  de l'AMP et  $(\text{CH}_2)_5$  du maléimide), 2,88 ppm ( $(\text{CH}_2)_a'$  de l'AMP), 3,08 ppm ( $(\text{CH}_2)_n$  du peptide), 3,27-4,00 ppm (protons des sucres du squelette polysaccharidique,  $(\text{CH}_2)_{j, k}$  du peptide et  $(\text{CH}_2)_1$ ,  $(\text{CH}_2)_2$  et  $(\text{CH}_2)_4$  du maléimide), 4,02 ppm ( $(\text{CH}_2)_c, e$  du peptide et  $(\text{CH})_3$  du maléimide), 4,39 ppm ( $(\text{CH})_d$  du peptide), 4,48 ( $(\text{CH})_i$  du peptide), 4,80 ( $(\text{CH})_f$  du peptide), 4,51 ppm (H-1 de l'acide glucuronique), 4,65 ppm (H-1 de l'unité *N*-acétylglucosamine).

### IV.3.2 Synthèse du dérivé HA-penténoate et addition du thiol

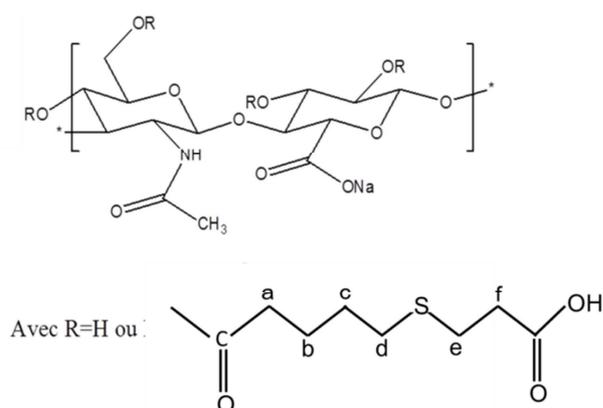
Exemple de synthèse d'un dérivé du HA porteur d'une fonction penténoate (HA-penténoate) de DS 20% à partir d'un lot de HA de masse  $200 \text{ kg.mol}^{-1}$ .



Le hyaluronate de sodium de masse  $200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  (0,30 g, 0,75 mmol) est solubilisé dans l'eau ultrapure (15 mL) à  $4^\circ\text{C}$  sous agitation magnétique pendant une nuit. Du DMF (10 mL) est ensuite ajouté goutte à goutte jusqu'à obtenir un mélange eau/DMF (3/2, v/v). L'anhydride penténoïque (1 équivalent par rapport au HA) est alors ajouté soit 0,137 g (0,75 mmol) tout en maintenant le pH entre 8 et 9 par ajout d'une solution de NaOH 0,5M pendant 4 heures. La réaction est ensuite maintenue sous agitation à  $4^\circ\text{C}$  pendant une nuit. On ajoute ensuite du NaCl à une concentration de 0,5M. Le polymère est ensuite précipité par ajout d'éthanol jusqu'à obtenir un mélange eau/éthanol (2/3 v/v). Après élimination du surnageant, le produit est rincé successivement par des mélanges eau/éthanol (3/7 1/4 1/9 v/v). Il est enfin à nouveau solubilisé dans l'eau ultra-pure pour une dernière purification par ultrafiltration. Le produit est ensuite lyophilisé et caractérisé par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ . Le degré de substitution est de 20 %.

**RMN $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz, 353K,  $\delta(\text{ppm})$ ) :** 2,04 ppm ( $(\text{CH}_3)$  du groupe acétamide du hyaluronane), 2,42 ppm ( $(\text{CH}_2)_b$  de la chaîne penténoate), 2,51 ppm ( $(\text{CH}_2)_a$  de la chaîne penténoate), 3,2-3,9 ppm (protons des sucres du squelette polysaccharidique), 4,48 ppm (H-1 de l'acide glucuronique), 4,65 ppm (H-1 de l'unité *N*-acétylglucosamine), 5,11 ppm ( $(\text{CH}_2)_d$  de la chaîne penténoate), 5,93 ppm ( $(\text{CH})_c$  de la chaîne penténoate).

Exemple d'addition de l'acide 3-mercaptopropionique (AMP) sur un dérivé HA-penténoate de DS 0,2 et de masse  $200 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$



## Chapitre 4 : Partie expérimentale

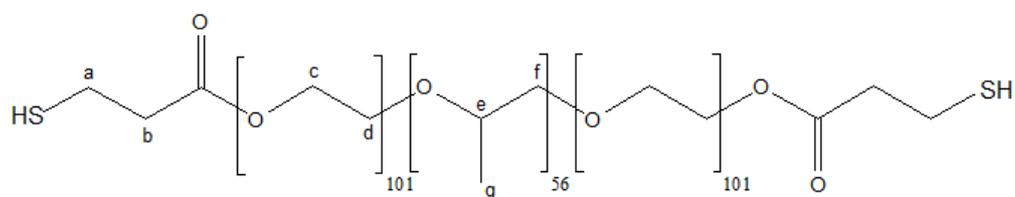
Le dérivé HA-penténoate (0,030 g, 0,75 mmol) est solubilisé dans l'eau ultra-pure (2,7 mL) pour être à une concentration finale de 10 g/L. On ajoute l'acide 3-mercaptopropionique (AMP) à raison de 1 équivalent par rapport à l'unité de HA (0,75 mmol soit 65  $\mu$ L). On ajoute ensuite 0,3 mL d'une solution d'Irgacure 2959 à 10 g/L dans le PBS 10X. On se retrouve donc avec une solution où le HA-penténoate est à 10 g/L, le PBS 1X et l'Irgacure est à 1 g/L (ou 0,1%). Le mélange est alors irradié sous UV (365 nm) pendant 5 minutes à température ambiante. Le produit est ensuite purifié par ultrafiltration avec de l'eau ultrapure sur une membrane de seuil de coupure de 10 kg.mol<sup>-1</sup>, puis lyophilisé et enfin caractérisé par RMN <sup>1</sup>H. Le DS obtenu en AMP est de 0,2 %, montrant que l'efficacité de ce couplage est de 100% (confirmé également par la disparition totale des signaux c et d du HA-penténoate).

**Rendement** : 85%

**RMN<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz, 353K,  $\delta$ (ppm))** : 1,66 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub> de la chaîne penténoate-AMP), 1,75 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub> de la chaîne penténoate-AMP), 2,03 ppm ((CH<sub>3</sub>) du groupe acétamide du hyaluronane), 2,49 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub> de la chaîne penténoate-AMP), 2,65 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub> de la chaîne penténoate-AMP), 2,70 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub> de la chaîne penténoate-AMP), 2,84 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub> de la chaîne penténoate-AMP), 3,2-3,9 ppm (protons des sucres du squelette polysaccharidique) , 4,48 ppm (H-1 de l'acide glucuronique), 4,65 ppm (H-1 de l'unité *N*-acétylglucosamine).

### IV.3.3 Fonctionnalisation du Pluronic F127

#### *i) Estérification avec l'AMP*



## Chapitre 4 : Partie expérimentale

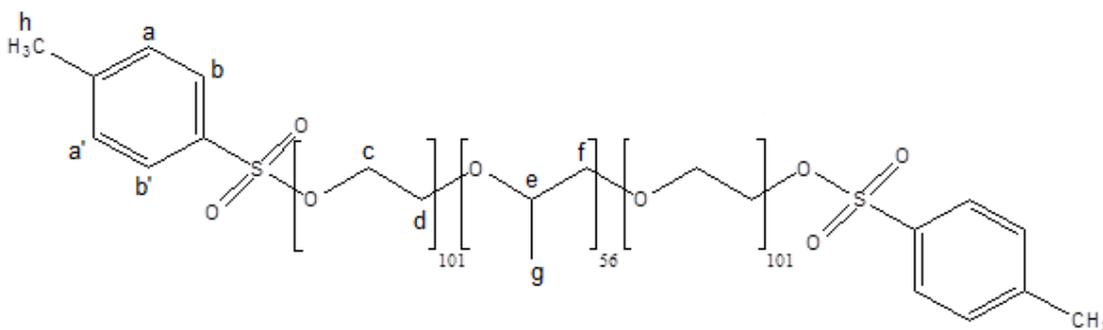
Dans un ballon, le Pluronic F127 (1g, 0,08 mmol) est solubilisé dans le dichlorométhane anhydre (20 mL). On ajoute successivement l'AMP (2 équivalents molaires par rapport aux extrémités hydroxyle du Pluronic F127, soit 0,32 mmol, 28  $\mu$ L), le DIC (N,N'-diisopropylcarbodiimide) (6 équivalents soit 0,96 mmol, 148  $\mu$ L) et la DMAP (4-Diméthylaminopyridine) (0,2 équivalents soit 0,032 mmol, 4 mg). On laisse la réaction opérer 24h sous atmosphère d'azote sous vive agitation. On évapore ensuite la dichlorométhane à l'évaporateur rotatif. Le produit est repris dans 2 mL de dichlorométhane. On précipite alors le Pluronic par ajout d'éther diéthylique à 0°C sous vive agitation. Le produit est ensuite filtré sur fritté 5 et rincé plusieurs fois à l'éther diéthylique à 0°C. Le produit est ensuite séché à l'étuve à 25°C sous pression réduite (25 mbar). Le produit est ensuite caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  dans le  $\text{CDCl}_3$ .

**Rendement** : 92 %

**Pourcentage d'extrémités fonctionnalisées** : 60 %

**RMN $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, 298K,  $\delta(\text{ppm})$ )** : 1,13 ppm ( $(\text{CH}_3)_g$  du groupe oxyde de propylène(OP)), 2,85 ppm ( $(\text{CH}_2)_b$  de l'extrémité AMP), 3,15 ppm ( $(\text{CH}_2)_a$  de l'extrémité AMP), 3,39 ppm ( $(\text{CH})_e$  du groupe OP), 3,54 ppm ( $(\text{CH}_2)_f$  du groupe OP), 3,63 ppm ( $(\text{CH}_2)_c$  et  $(\text{CH}_2)_d$  du groupe oxyde d'éthylène (OE)).

### ii) Amination et couplage peptidique de l'AMP



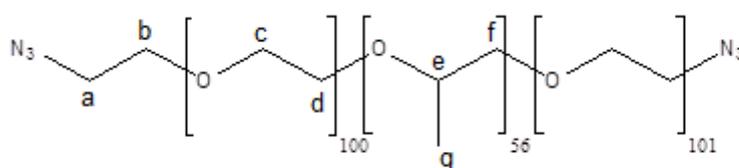
## Chapitre 4 : Partie expérimentale

Dans un ballon bicol, le Pluronic F127 (1g, 0,08 mmol) est solubilisé dans le dichlorométhane anhydre dégazé (30 mL). Le ballon est surmonté d'un réfrigérant. Sous agitation, on ajoute successivement du chlorure de 4-toluènesulfonyle (20 équivalents par rapport aux extrémités hydroxyle du Pluronic F127 soit 3,2 mmol soit 0,608 g), de la triéthylamine (48 équivalents soit 0,778 g soit 0,536 mL) et de la DMAP (0,4 équivalents soit 7,8 mg). On place le dispositif sous azote et on laisse réagir 48h à 30°C. Le solvant est alors évaporé à l'évaporateur rotatif et le produit est repris dans 2 mL de dichlorométhane. On précipite ensuite le Pluronic par ajout d'éther diéthylique à 0°C sous vive agitation. Le produit est ensuite filtré sur fritté 5 et rincé plusieurs fois à l'éther diéthylique à 0°C. Le produit est ensuite séché à l'étuve à 25°C sous pression réduite (25 mbar) puis caractérisé par RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub>.

**Rendement** : 100 %

**Pourcentage d'extrémités fonctionnalisées** : 100 %

**RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 298K, δ(ppm))** : 1,13 ppm ((CH<sub>3</sub>)<sub>g</sub> du groupe oxyde de propylène(OP)), 2,41 ppm ((CH<sub>3</sub>)<sub>h</sub> de l'extrémité 4-toluènesulfonyle), 3,39 ppm ((CH)<sub>e</sub> du groupe OP), 3,54 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub> du groupe OP), 3,63 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub> et (CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub> du groupe oxyde d'éthylène (OE)), 7,32 ppm ((CH)<sub>a</sub> et (CH)<sub>a'</sub> de l'extrémité 4-toluènesulfonyle), 7,75 ppm ((CH)<sub>b</sub> et (CH)<sub>b'</sub> de l'extrémité 4-toluènesulfonyle).



2

Dans un ballon bicol, le Pluronic modifié 1 est solubilisé dans le DMF anhydre (30 mL). Le ballon est surmonté d'un réfrigérant. On ajoute ensuite de l'azote de sodium (20 équivalents par rapport aux extrémités tosyle, soit 3,2 mmol, 0,208 g). Le milieu réactionnel, sous azote, est alors porté à 80°C et laissé sous agitation une nuit. A la fin de la réaction, un précipité blanc s'est formé : on filtre le produit sur du coton afin de l'éliminer. On évapore

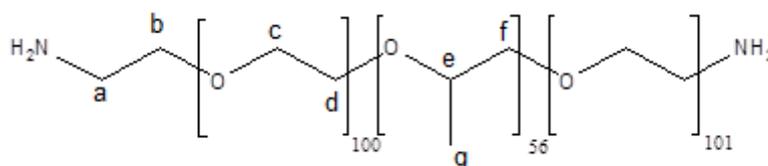
## Chapitre 4 : Partie expérimentale

ensuite le solvant puis le produit est repris dans 2 mL de DMF. On précipite ensuite le Pluronic par ajout d'éther diéthylique à 0°C sous vive agitation. Le produit est ensuite filtré sur fritté 5 et rincé plusieurs fois à l'éther diéthylique à 0°C. Le produit est ensuite repris dans de l'eau ultra-pure, purifié par ultrafiltration sur une membrane de seuil de coupure égal à 3 kg.mol<sup>-1</sup>, lyophilisé et caractérisé par RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub>.

**Rendement** : 70 %

**Pourcentage d'extrémités fonctionnalisées** : 100 %

**RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 298K, δ(ppm))** : 1,13 ppm ((CH<sub>3</sub>)<sub>g</sub> du groupe oxyde de propylène(OP)), 3,39 ppm ((CH)<sub>e</sub> du groupe OP), 3,54 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub> du groupe OP), 3,63 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub> et (CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub> du groupe oxyde d'éthylène (OE)).



### 3

Dans un ballon bicol, le Pluronic modifié 2 (660 mg) est solubilisé dans l'éthanol (30 mL). On ajoute 15 mg de palladium sur charbon actif (10%). Le montage est mis sous azote avant de venir fixer un ballon d'hydrogène sur le col du ballon. On chasse alors l'azote avec l'hydrogène puis on porte le milieu réactionnel sous vive agitation pendant une nuit. A la fin de la réaction, le produit est filtré sur célite puis le solvant est évaporé. Le produit est alors repris dans de l'eau ultra-pure, purifié par ultrafiltration sur une membrane de seuil de coupure égal à 3 kg.mol<sup>-1</sup>, lyophilisé et caractérisé par RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub>.

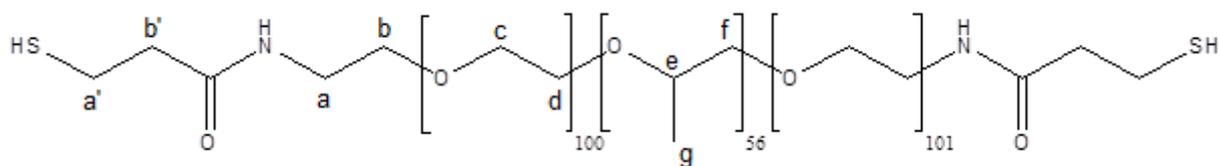
**Rendement** : 89 %

**Pourcentage d'extrémités fonctionnalisées** : 60 %

**RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 298K, δ(ppm))** : 1,13 ppm ((CH<sub>3</sub>)<sub>g</sub> du groupe oxyde de propylène(OP)), 2,96 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub> de l'extrémité NH<sub>2</sub>) 3,39 ppm ((CH)<sub>e</sub> du groupe OP),

## Chapitre 4 : Partie expérimentale

3,54 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub> du groupe OP), 3,63 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub> et (CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub> du groupe oxyde d'éthylène (OE)).



Dans un ballon, le Pluronic modifié 3 (0,57 g soit 0,045 mmol) est solubilisé dans le DMF anhydre (30 mL). On ajoute successivement de l'HOBt (Hydroxybenzotriazole) (2 équivalents par rapport aux extrémités du Pluronic, soit 0,18 mmol, soit 0,024 g), du DIC (4 équivalent, 0,36 mmol soit 0,045 g) et de l'AMP (1,3 équivalents soit 0,12 mmol soit 10,5 µL). Le milieu réactionnel, sous azote, est laissé sous agitation 36h. A la fin de la réaction, on évapore le solvant puis le produit est repris dans 2 mL de DMF. On précipite ensuite le Pluronic par ajout d'éther diéthylique à 0°C sous vive agitation. Le produit est ensuite filtré sur fritté 5 et rincé plusieurs fois à l'éther diéthylique à 0°C, puis séché à l'étuve à 25°C sous pression réduite (25 mbar) et enfin caractérisé par RMN <sup>1</sup>H dans le CDCl<sub>3</sub>.

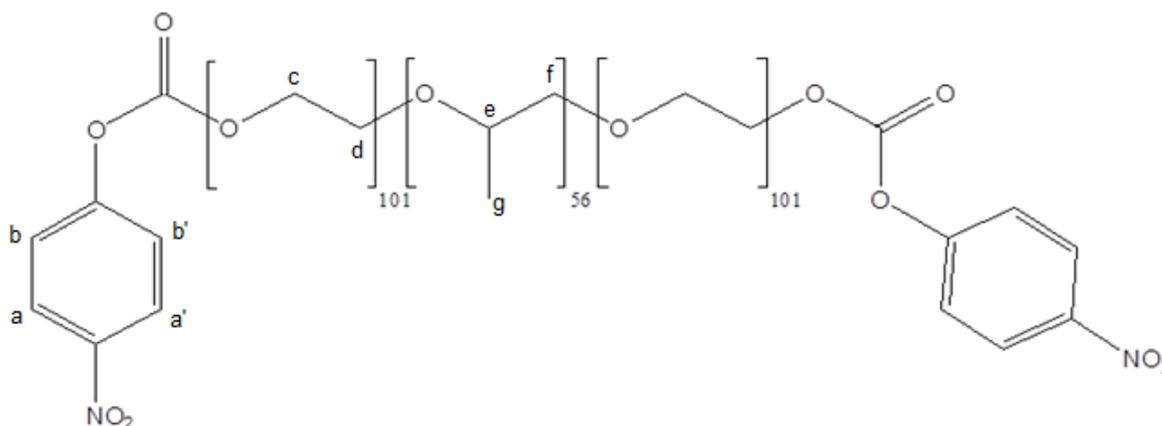
**Rendement** : 90 %

**Rendement total** : 56 %

**Pourcentage d'extrémités fonctionnalisées** : 60 %

**RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 298K, δ(ppm))** : 1,13 ppm ((CH<sub>3</sub>)<sub>g</sub> du groupe oxyde de propylène(OP)), 2,49 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>b'</sub> de l'extrémité AMP), 2,80 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>a'</sub> de l'extrémité AMP), 3,39 ppm ((CH)<sub>e</sub> du groupe OP), 3,54 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub> du groupe OP), 3,63 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub> et (CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub> du groupe oxyde d'éthylène (OE)).

*iii) Couplage de la cystamine*



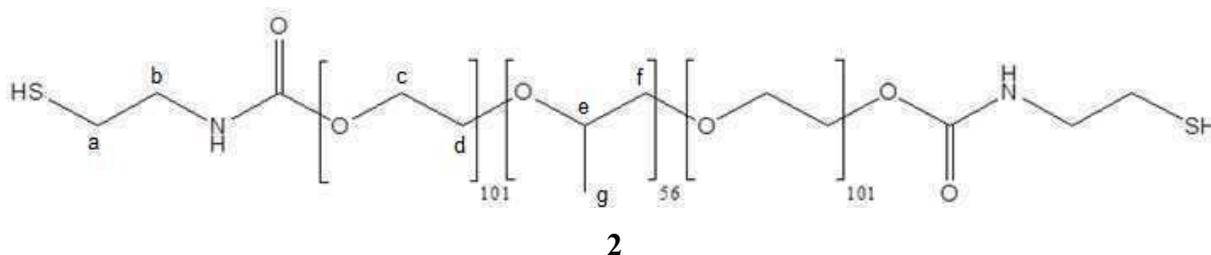
**1**

On solubilise le Pluronic F127 (2g, 0.16 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (30 mL). On y ajoute de la triéthylamine (1,25 équivalents par rapport aux extrémités du Pluronic F127, soit 0,4 mmol soit 55  $\mu$ L). Cette solution est alors ajoutée goutte-à-goutte, grâce à une ampoule de coulée à une solution de 4-Nitrophenyl chloroformate (3 équivalents, 0,96 mmol soit 0,192 g) dans 2ml de dichlorométhane, pendant 1 heure. Le mélange réactionnel est agité pendant 48 h à température ambiante. A la fin de la réaction, on évapore le solvant puis le produit est repris dans 2 mL de dichlorométhane. On précipite ensuite le Pluronic par ajout d'éther diéthylique à 0°C (200 mL) sous vive agitation. Le produit est ensuite filtré sur fritté 5 et rincé plusieurs fois à l'éther diéthylique à 0°C, puis séché à l'étuve à 25°C sous pression réduite (25 mbar) et enfin caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  dans le  $\text{CDCl}_3$ .

**Rendement : 96 %**

**Pourcentage d'extrémités fonctionnalisées : 62 %**

**RMN $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, 298K,  $\delta(\text{ppm})$ ) :** 1,13 ppm ( $(\text{CH}_3)_g$  du groupe oxyde de propylène(OP)), 3,39 ppm ( $(\text{CH})_e$  du groupe OP), 3,54 ppm ( $(\text{CH}_2)_f$  du groupe OP), 3,63 ppm ( $(\text{CH}_2)_c$  et  $(\text{CH}_2)_d$  du groupe oxyde d'éthylène (OE)), 7,35 ppm( $(\text{CH})_b$  et  $(\text{CH})_{b'}$  de l'extrémité nitrophényle), 8,25 ppm ( $(\text{CH})_a$  et  $(\text{CH})_{a'}$  de l'extrémité nitrophényle).



Au préalable, on dissout du dichlorhydrate de cystamine (1g, 4.44mmol) dans 50 mL d'eau ultrapure. On dissout de la soude (2 équivalents soit 0,355 g) dans de l'eau ultra-pure et on mélange les deux solutions. On laisse agiter 2h et on lyophilise.

Dans un ballon, on pèse le Pluronic modifié 1 (1,9g, 0,15 mmol), puis on ajoute successivement le DMF anhydre (30 mL), le LiCl anhydre (0,38g, 2%w/v), la cystamine (5 équivalents par rapport aux extrémités du Pluronic soit 1.5 mmol, 0,23g) obtenue après la lyophilisation. Le ballon est agité à température ambiante pendant 67 h. A la fin de la réaction, on évapore le solvant puis le produit est repris dans 2 mL de DMF. On précipite ensuite le Pluronic par ajout d'éther diéthylique à 0°C (200 mL) sous vive agitation. Le produit est ensuite filtré sur fritté 5 et rincé plusieurs fois à l'éther diéthylique à 0°C, puis séché à l'étuve à 25°C sous pression réduite (25 mbar). Le produit est alors repris dans de l'eau ultrapure (30mL) qu'on dégaze avec de l'azote pendant 20 minutes. On ajoute ensuite le tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) (1,5 équivalents par rapport aux extrémité du Pluronic, soit 0,44 mmol, 0,127 g). Le pH est ajusté à 5,2 avec une solution de soude 0,1 M et on laisse réagir 30 minutes sous agitation à température ambiante. A la fin de la réaction le pH est ajusté à 6,5. Le produit est alors purifié par ultrafiltration avec de l'eau ultra-pure sur une membrane se seuil de coupure 1 kg.mol<sup>-1</sup>. Le produit est ensuite lyophilisé et caractérisé par RMN <sup>1</sup>H.

**Rendement : 65 %**

**Rendement final : 62 %**

**Pourcentage d'extrémités fonctionnalisées : 41 %**

## Chapitre 4 : Partie expérimentale

**RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, 298K, δ(ppm))** : 1,13 ppm ((CH<sub>3</sub>)<sub>g</sub> du groupe oxyde de propoylène(OP)), 2,7 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub> de l'extrémité cystamine), 3,39 ppm ((CH)<sub>e</sub> du groupe OP), 3,54 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub> du groupe OP), 3,63 ppm ((CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub> et (CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub> du groupe oxyde d'éthylène (OE)).

**Références**

1. Gottlieb, H.E., Kotlyar, V. & Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry* **62**, 7512-7515 (1997).

## Conclusions générales et perspectives

Dans le cadre d'un projet ANR visant à développer de nouveaux matériaux composites pour le comblement osseux, ce travail s'était fixé comme premier objectif de développer un adjuvant thermosensible à base de polysaccharide, gélifiant à 37°C. Dans une vision plus élargie, relative à la conception d'hydrogels intelligents pour l'ingénierie tissulaire de l'os, l'objectif était de fonctionnaliser des hydrogels à base d'acide hyaluronique avec des séquences peptidiques spécifiques favorisant l'attachement, l'adhésion et la prolifération de cellules osseuses.

La première étape de ce projet a été le développement d'une nouvelle méthode de modification de l'acide hyaluronique par chimie thiol-clic. La voie de chimie choisie s'inspire du concept de « chimie clic » permettant des réactions entre 2 blocs réactifs avec de très hauts rendements dans des conditions simples et douces, sans utilisations de catalyseurs. Elle consiste en l'addition de Michaël d'un thiol sur une fonction maléimide préalablement greffée le long de la chaîne de HA par couplage peptidique. Cette méthode s'est avérée efficace pour un grand nombre de molécules, notamment des peptides RGD et le cholestérol, molécule pourtant imposante et hydrophobe. Le succès de cette méthode a été confirmé par RMN  $^1\text{H}$  et les degrés de substitution ont pu être déterminés avec précision pour les greffons hydrophiles. Le DS maximal en maléimide représente le facteur limitant. Il a été montré qu'il varie en fonction des masses molaires utilisées. Pour des molécules hydrophiles, la réaction du thiol sur le maléimide est totale et le DS peut être modulé en fonction des quantités ajoutées. Il a été montré que les conditions physiologiques employées par cette méthode n'entraînent pas de dégradation de la chaîne principale. La chimie utilisée ne requiert pas de solvants ou produits particulièrement nocifs.

Ces premiers travaux ont permis de greffer un peptide sélectionné spécifiquement pour interagir avec des ostéoblastes. Il s'agit d'une séquence de 15 acides aminés issue de la sialoprotéine osseuse (peptide BSP). Ce peptide a été greffé avec succès avec un DS de 0,5 et 1 % sur des dérivés de HA méthacrylate photopolymérisables, développés et étudiés au laboratoire. Ces dérivés ont été caractérisés par RMN  $^1\text{H}$  avant photopolymérisation, permettant ainsi de connaître avec précision la quantité de peptide présente le long de la chaîne polymère. Ces dérivés ont ainsi permis la fabrication d'hydrogels contenant le peptide

greffé de manière covalente. Ces hydrogels ont été caractérisés par rhéologie afin de connaître leur module élastique, celui-ci atteignant 1500 Pa pour les études réalisées avec le peptide BSP. Une étude biologique a permis de constater l'attachement et l'étalement de cellules préostéoblastes après 24h de culture en surface de ces hydrogels. Une étude en 3D, c'est-à-dire avec encapsulation de cellules (cellules stromales de moelle osseuse humaine (HBMSC)) à l'intérieur du gel pendant la photopolymérisation a également été tentée. Elle a permis de constater que les hydrogels de HA contenant une séquence peptidique étaient tous dégradés par les cellules au bout de 7 jours, indépendamment de la présence de la séquence RGD spécifique à l'adhésion cellulaire, et contrairement aux gels de HA seul. Toutefois, pour des raisons d'ordre expérimental, les expériences menées n'ont pas permis d'extraire et analyser les ARN messagers de ces cellules afin d'observer une éventuelle différenciation.

Concernant ces hydrogels, il serait intéressant d'adapter la technique d'extraction des ARN messagers afin d'étudier plus en détails l'évolution des caractéristiques des cellules qui y prolifèrent. Il serait également intéressant de greffer plusieurs types de peptides simultanément afin d'observer une éventuelle synergie. En effet le peptide BSP permet de favoriser avant tout l'adhésion des cellules dans les premiers stades de la culture et il serait intéressant de greffer un deuxième peptide favorisant la différenciation de cellules ostéoprogénitrices en ostéoblastes, autrement dit conférant une propriété d'ostéoinduction à l'hydrogel.

Au cours de ce travail, nous avons également mis au point un dérivé de HA thermogélifiant, au moyen de la chimie thiol-ène développée au sein de l'équipe SMP. La première étape de ce travail était la fonctionnalisation d'un polymère thermosensible, le Pluronic® F127, avec des extrémités thiols par une méthode efficace et reproductible. Plusieurs voies de synthèses ont été étudiées présentant chacune leurs avantages et inconvénients. Le Pluronic F127 a finalement été modifié au maximum à 60 % de ses extrémités et greffé au HA dans des conditions optimisées pour permettre la stérilisation ultérieure du produit par filtration. Nous avons montré, par étude rhéologique, l'obtention de produits thermogélifiant présentant une température de transition sol-gel variant de 27 à 35°C selon les produits. Nous avons ensuite étudié les propriétés rhéologiques des différents produits obtenus et ainsi montré qu'il était possible de moduler la température de transition sol-gel et le module  $G'$  à 37°C, en faisant varier différents paramètres tels que la masse molaire du HA utilisé ou sa concentration. Une étude biologique en 2D a été menée avec un HA réticulé par un PEG dans le but de mimer la structure chimique d'un HA-Pluronic. Ces

résultats sont encourageants mais ne permettent pas de prédire précisément le comportement des cellules sur des gels de HA-Pluronic, qui sont, contrairement aux gels HA-PEG réticulés chimiquement, des gels physiques obtenus par auto-association en chauffant le matériau.

Afin de faciliter l'obtention de ces dérivés de HA thermosensibles, il serait intéressant de travailler avec d'autres polymères que le Pluronic F127 présentant une température de transition équivalente. En effet, la fonctionnalisation de ses extrémités à 100 % s'est avérée impossible et probablement due à sa masse molaire importante. Il serait donc intéressant d'essayer d'autres polymères thermosensibles, de masse molaire plus faible par exemple.

Enfin, le plus grand challenge pour l'étude de ces HA thermosensible sera la mise au point de conditions adéquates pour leur évaluation biologique en 3D. L'idée serait de solubiliser le HA thermosensible stérilisé directement dans le milieu de culture et d'y ajouter les cellules avant de placer le tout à 37°C. On obtiendrait ainsi des cellules encapsulées dans le gel sans avoir à rajouter du milieu de culture, qui diluerait le gel dans le cas contraire. De plus, comme pour le cas des gels de HA-méthacrylate, une méthode adéquate d'extractions des ARN messagers serait requise.