



HAL
open science

Etude multi-échelle d'hydrogels stimulables d'acide hyaluronique pour la délivrance d'insuline

Helene Labie

► **To cite this version:**

Helene Labie. Etude multi-échelle d'hydrogels stimulables d'acide hyaluronique pour la délivrance d'insuline. Autre. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0859 . tel-01956588

HAL Id: tel-01956588

<https://theses.hal.science/tel-01956588>

Submitted on 16 Dec 2018

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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE
De SCIENCES CHIMIQUES

Par Hélène LABIE

**Etude multi-échelle d'hydrogels stimulables d'acide
hyaluronique pour la délivrance d'insuline**

Sous la direction de : Valérie RAVAINÉ

Soutenue le 15 Décembre 2017

Membres du jury :

Mme. GAUFFRE, Fabienne,	Directrice de Recherche, Institut des Sciences Chimiques de Rennes	Rapporteur
M. TSAPIS, Nicolas	Directeur de Recherche, Institut Galien Paris Sud	Rapporteur
M. MONDAIN-MONVAL, Olivier	Professeur des Universités, Centre de Recherche Paul Pascal	Président
Mme. AUZELY-VELTY, Rachel	Professeur des Universités, CERMAV	Examineur
Mme. BESENIUS Melissa	Industriel, Sanofi-Aventis	Examineur
Mme. RAVAINÉ, Valérie	Professeur, Bordeaux INP	Directeur de thèse
M. CATARGI, Bogdan	Professeur des Universités, Université de Bordeaux	Membre invité

A ma grand-mère Jeannette,

Ce manuscrit présente les résultats obtenus lors du travail de thèse que j'ai effectué au sein de l'Institut des Sciences Moléculaires, dans le groupe Nanosystèmes analytiques (NSysA), sous la direction de Valérie Ravaine. Je remercie respectivement Neso Sojic et Stéphane Arbault pour l'accueil et les bonnes conditions de travail dont j'ai pu bénéficier durant trois ans.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du Jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse : Mme Fabienne Gauffre et M. Nicolas Tsapis en tant que rapporteurs, Mme Rachel Auzély-Velty et Mme Melissa Besenius en tant qu'examinatrices ainsi que M. Olivier Mondain-Monval, président du jury et enfin M. Bogdan Catargi en tant que membre invité.

Je tiens à remercier particulièrement Mme Valérie Ravaine, qui a dirigé ma thèse, pour m'avoir confié ce travail et accompagnée pendant ces trois années. Je retiendrai les enseignements, conseils, discussions scientifiques qui m'ont poussée à vouloir donner le meilleur de moi-même pour ce projet et à m'améliorer. Merci de m'avoir fait confiance, et d'avoir permis à ce travail de rebondir à certains moments et ce, toujours avec passion, pédagogie et enthousiasme. J'ai appris à prendre du recul sur mon travail et à le mettre en valeur pour aboutir à la préparation de ce manuscrit. Et surtout merci pour la qualité de nos relations humaines, et de confiance qui ont fait de ces trois années une expérience enrichissante et un réel plaisir.

Mes remerciements viennent ensuite à tous les membres du projet LOOPING dans lequel s'est inscrit cette thèse, pour les discussions régulières. Merci à Sanofi-Aventis pour leur soutien financier, et merci plus particulièrement à Mme Melissa Besenius pour son suivi scientifique. Je tiens en particulier à remercier Rachel Auzély-Velty et son doctorant Robin Poirot qui nous ont fourni des polymères synthétisés dans leur laboratoire et ont partagé leurs connaissances et leur vision du projet.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble des personnes qui m'ont aidé à mener à bien ce travail de thèse : Fabien Xuereb et son étudiant Benjamin Sourrisseau (INSERM) pour l'étude de la libération d'insuline en milieu plasmatique, Anne-Laure Wirotius (LCPO) pour les analyses RMN en température, Emmanuel Ibarboure (LCPO) pour l'apprentissage de l'utilisation de la microforge, Eric Laurichesse et Marion Baillot (CRPP) pour l'utilisation du microfluidiseur et du tensiomètre à goutte. Je tiens également à remercier les équipes du BIC et de PLACAMAT pour m'avoir formée et permis d'utiliser le TEM pour imager les nanogels et les autoassemblages.

Je tiens à remercier particulièrement Carlos Busatto, pour le travail effectué sur l'insertion de gouttes d'huile dans des microgels et les échanges qu'ont apporté cette collaboration.

Je désire également remercier chaleureusement l'ensemble des membres du laboratoire et du groupe NSysA. Un grand merci aux personnes impliquées dans la thématique « hydrogel » : Véro tout d'abord, pour l'aide durant ces trois ans pour les analyses HPLC, les synthèses et autres, merci en particulier pour ta gentillesse et ta disponibilité. Merci également à Florent, Aileen, Eniko et les étudiants qui ont partagés mon labo et parfois contribué au projet : Yating, Hélène « l'autre », Rémi, Hugo, Oskana, Aymerick et Marie-Lou et Yann....

Remerciements

Merci à Adeline Perro-Marre, pour son expertise en microfluidique, ses conseils, notre escapade en salle blanche et sa bonne humeur. Je tiens à remercier également Bertrand pour ses conseils, son ingéniosité et son aide précieuse en microscopie. Je remercie également Patrick pour la gestion des petits soucis informatiques, son aide pour l'utilisation des appareils du labo et ses conseils en matière de séries et de film, notamment la découverte de « The wire » qui m'a accompagné durant ma 2^{ème} année de thèse.

Un grand merci à Aline, pour son aide précieuse pour se sortir des écueils bureaucratiques, mais aussi pour ses conseils naturels et anti-stress, sa compagnie et sa philosophie.

Je tiens à remercier la « NSysA family » composée de générations de doctorants et postdocs du monde entier. Merci d'abord à ceux qui étaient là pour m'accueillir à mon arrivée à mon laboratoire ainsi que pour mes premières années et qui ont contribué à me faire voyager depuis ma ville natale: Aileen, Flo, Eugenio, Suresh, Alessandra, Eniko, Pascal, Jérôme, Manu, Gibran, Sabina, Béa, Magdalena, Meow, Nui, Win, Iulia, Priscilla, Léo, Samuel, Damien. Je tiens également à remercier ceux qui m'ont accompagné durant la dernière année si particulière : Camille, Silvia, Jerry, Top, Maria, Tan, Lin, Bhavana, Sathya et les petits nouveaux Alice, Laura et Paul. Merci pour votre ouverture d'esprit, votre volonté d'échange et la bonne humeur qui a régné pendant ces trois ans. Thanks to all of you for the international parties and dinners!

En particulier, je souhaite remercier Pauline qui « surveille mes arrières » depuis trois ans. Nous avons commencé et fini ensemble et je suis sûre que sa présence, nos conversations et notre amitié ont rendu cette expérience plus facile. Merci d'avoir partagé, les différentes étapes, les doutes et les succès.

Un grand merci à la team fille du CAES, Hélène, Céline, Louisiane, et Marie, les repas en terrasse à refaire le monde et ne plus penser à nos manips le temps d'une pause déjeuner vont me manquer.

Je tiens également à remercier mes amis proches qui sont parfois loin, les bordelais, avec qui j'ai pu constater que les années passent mais ne nous atteignent (presque) pas et en tout cas n'érodent pas notre amitié : Jehanne, Rémi, Hugo, Gwendal, Elsa, Bouh, Anne, Jérémy. Les lyonnais/parisiens et pièces rapportées, qui me rappellent souvent que le massif central est un obstacle de taille et le TGV pas si rapide : Gigi, les grognasses Valentine, Marion et Lucie, Papa Tomme, Dédé, Tétine, Clément biquet, Marie, Laura et bien sûr Albane ma chapinette qui est toujours là quel que soit le continent où elle habite. Merci également aux copains d'Agfa et de Bham, Anne, Jack et Mathilde d'avoir partagé mes premières années de découvertes à l'étranger.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et en particulier mes parents pour leur soutien sans faille, et les moments partagés en particulier pendant ces trois années de retour dans le sud-ouest. Merci à mes grand-mères, à Jeffou et également à Camille qui est ma sœur, mais aussi un soutien et une amie précieuse. Merci à petit Sam, mon petit neveu qui est venu égayer ma dernière année de thèse de ces premiers pas et de ses premiers sourires.

Pour finir, je tiens à remercier Pierre qui m'a supportée, aéré la tête, rendu experte en préparation de lasagnes, fait relativiser, et soutenue, depuis notre rencontre. Merci pour tout.

La route ? Là où on va, on n'a pas besoin de route !

Dr. Emmett Brown Retour vers le futur

Abréviations et symboles

C*	Concentration critique de recouvrement
<i>Ca</i>	Nombre capillaire
CERMAV	Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales
CMC	Concentration micellaire critique
Cp	Concentration en polymère
DM	Degré de méthacrylation
DS	Degré de substitution
δ	Déplacement chimique
f	Fonctionnalité
G	Gradient de cisaillement
G'	Module élastique
G''	Module de perte
HLB	Balance hydrophile/hydrophobe
ISM	Institut des Sciences Moléculaires
kDa	Kilodalton
LbL	Layer-by-Layer
LCST	Lower Critical Solution Temperature
Mc	Masse moyenne des chaînes
Mw	Masse molaire en poids
N	Nombre d'unités monomères
Nav	Nombre d'Avogadro
η	Viscosité
P	Pression de Laplace
qe	Gonflement volumique
qm	Gonflement massique
<i>Re</i>	Nombre de Reynolds
ρ	Masse volumique
τ	contrainte visqueuse
UI	Unité d'insuline
UCST	Upper Critical Solution Temperature
<i>W_d</i>	Masse d'un gel sec
<i>W_s</i>	Masse d'un gel gonflé à l'équilibre dans un solvant donné
X	Nombre de points de réticulation
Z	Densité volumique de réticulation
γ	Tension de surface
χ	Paramètre de Flory

ξ Paramètre de maille

Composés chimiques

AA	Acide acrylique
AAM	Acrylamide
AAPBA	3-(acrylamido)phénylboronique
AMA	Anhydride méthacrylate
APBA	Acide 3-aminophénylboronique
ARS	Rouge Alizarine
BIS	N,N'-méthylènebisacrylamide
BSA	Albumine de sérum bovin
Con A	Concanavaline A
Dex	Dextran
Dex-Ma	Dextran modifié par des méthacrylates
DMF	Diméthyl formamide
EDC	1-éthyle-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
GBP	Protéines ligand du glucose
GMA	glycidyl méthacrylate
GOx	Glucose oxydase
HA	Acide hyaluronique
HA-MA	Acide hyaluronique modifié par des méthacrylates
HA-PBA	Acide hyaluronique modifié par des acides phénylboroniques
HA-MA-PBA	Acide hyaluronique modifié par des méthacrylates et des acides phénylboroniques
HA-Maltose	Acide hyaluronique modifié par des fonctions maltose
Hase	Hyaluronidase
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
MA	Méthacrylate
PAA	Acide polyacrylique
p(AA-co-AAM)	Poly (acide acrylique-co-acrylamide)
PAA-PBA	Acide polyacrylique modifié par des PBA
PBA	Acide phénylboronique
PBS	Tampon phosphate salin
PDMS	Poly(diméthylsiloxane)
PEG	Polyéthylène glycol
PEG (SH) ₂	Poly(éthylène glycol)-bis(thiol)

PLGA	Poly (acide lactique-co-glycolique)
PLL	Poly-L-lysine
pNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamide)
p(NIPAM-co-AAm)	Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)
PVA	Alcool polyvinylique
THF	Tétrahydrofurane

Termes techniques et caractérisation

AFM	Microscopie à force atomique
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
ITC	Titration calorimétrique isotherme
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
MF	Microfluidiseur
pDI	Indice de Polydispersité
ppm	Partie par million
R _H	Rayon hydrodynamique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SPE	Extraction phase solide liquide
SM	Spectroscopie de Masse
UV	Ultraviolet
TEM	Microscopie électronique à Transmission

Introduction générale 1

Chapitre 1 : Etat de l'art et concepts de l'étude

1	Matériaux à base de polymères stimulables pour la délivrance d'actifs.....	9
1.1	Les polymères stimulables.....	9
1.2	Les hydrogels stimulables:	10
1.2.1	Structure des hydrogels	10
1.2.2	Théorie du gonflement et application aux hydrogels stimulables :	11
1.3	Autres types de vecteurs basés sur des polymères stimulables.....	12
1.4	Stratégies de délivrance contrôlée d'actifs	13
1.4.1	Libération par modification de la porosité	13
1.4.2	Libération par destruction de la matrice.....	14
1.4.3	Dissociation actif-matrice.....	15
2	Les matériaux sensibles au glucose : enjeux du développement de nouveaux traitements du diabète..	15
2.1	Vers des systèmes à boucle fermée.....	16
2.1.1	Limite des traitements en boucle ouverte.....	16
2.1.2	Traitements en boucle fermée	16
2.2	Les mécanismes de sensibilité au glucose	17
2.2.1	Utilisation de l'enzyme Glucose Oxydase.	18
2.2.2	Les mécanismes impliquant les lectines.....	19
2.2.3	Mécanismes impliquant la Glucose Binding Protein (GBP).	20
2.2.4	Mécanismes impliquant des fonctions acides phénylboroniques	21
2.3	Présentation de systèmes plus élaborés en vue d'applications <i>in vivo</i>	24
2.3.1	Systèmes vecteur associé à un ligand du glucose.....	24
2.3.2	Stratégie de modification de l'insuline.....	26
3	Présentation de nos systèmes : des hydrogels d'acide hyaluronique sensibles au glucose	30
3.1	Présentation du cahier des charges du projet	30
3.2	L'acide hyaluronique : un polymère matriciel prometteur	31
3.2.1	Le HA, un biopolymère aux nombreuses propriétés utilisables pour des applications ciblées	31
3.2.2	Présentation générale de l'acide hyaluronique:	32
3.2.3	Les modifications chimiques du HA	33
3.2.4	Stratégies d'utilisation du HA pour des applications biomédicales	35
3.3	Vers des nanogels d'acide hyaluronique modifié par des fonctions PBA.	36
3.3.1	Vers des systèmes de taille nanométrique	36
3.3.2	Vers des systèmes doublement réticulés injectables	37
4	Projet LOOPING.....	38
4.1	Intérêt de l'étude des interactions protéines/gels : vers un meilleur contrôle de l'encapsulation et du relargage de protéines.....	38
4.2	Organisation de la thèse.....	39

Chapitre 2 : Comprendre et maîtriser les interactions protéines/polymères : vers un meilleur contrôle de l'encapsulation et la libération de protéines

1	Les différents types d'interactions	51
2	Les protéines des macromolécules complexes : exemple de l'insuline	52
2.1	Structure des protéines.....	52
2.1.1	Structure primaire et secondaire de l'insuline	53
2.1.2	Structure tertiaire de l'insuline	53
2.1.3	Structure quaternaire de l'insuline.....	54
2.1.4	La stabilité de l'insuline	54
3	Etude des interactions protéines modèles/polymères	55
3.1	Comment étudier les interactions entre les protéines et polymères?	55
3.1.1	Etude de l'effet de la nature des chaînes	55
3.1.2	Prise en compte des aspects structuraux.....	57
3.1.3	Autres techniques	58
3.1.4	Choix des techniques utilisées.....	59
3.2	Paramètres à étudier pour comprendre les interactions entre des protéines modèles et des gels ..	59
3.2.1	Effets électrostatiques.....	60
3.2.2	Hydrophobie des partenaires	63
3.2.3	Contraintes stériques dans des milieux tridimensionnels	64
3.2.4	Effet de la structure secondaire	65
4	Conclusions	65

Chapitre 3 : Préparations de gels d'acide hyaluronique à différentes échelles

Introduction au chapitre	73	
1	Réticulation des précurseurs en milieu confiné.....	73
1.1	Présentation des différents modes de confinement.....	74
1.1.1	Confinement en compartiment solide	74
1.1.2	Confinement en compartiment liquide.....	74
1.2	Contrôle des émulsions eau-dans-huile	76
1.2.1	Concept des émulsions eau-dans-huile.....	76
1.2.2	Contrôle de la taille des émulsions	77
1.3	Contrôle de la réticulation	81
1.3.1	Choix du précurseur.....	81
1.3.2	Choix de la méthode d'amorçage	82
1.3.3	Contrôle de la réaction	82
2	Préparation des précurseurs de HA	82
2.1	Préparation de dérivés de HA réticulables (HA-MA).....	82

2.2	Préparation de dérivés de HA réticulables modifiés par le PBA	85
3	Préparation de gels de HA de taille micrométrique	87
3.1	Préparation de microgels par photopolymérisation dans un dispositif microfluidique	87
3.1.1	Présentation du montage	87
3.1.2	Choix des paramètres de formulations	87
3.1.3	Vérification préliminaire	90
3.1.4	Purification des microgels	91
3.1.5	Commentaire sur le taux de conversion des méthacrylates	91
3.2	Synthèse et caractérisation des microgels de HA-MA	93
3.2.1	Synthèse des microgels de HA-MA	93
3.2.2	Etude de gonflement	94
3.2.3	Estimation de la porosité des gels de HA-MA	96
3.3	Synthèse et caractérisation des microgels de HA-MA-PBA	98
3.3.1	Synthèse des microgels de HA-MA-PBA	98
3.3.2	Vérification de la présence de PBA et étude de leur distribution	98
3.3.3	Etude du gonflement en présence de fructose	99
3.4	Préparation de gels de porosité macroscopique	99
3.4.1	Présentation du concept	100
3.4.2	Procédés de préparation	101
3.4.3	Etude de l'effet de la force ionique sur le gonflement des gels macroporeux	102
3.4.4	Application pour la délivrance d'actifs hydrophobes	102
4	Préparation de gels de HA de taille nanométrique	103
4.1	Résumé des travaux préalables et améliorations proposées	103
4.2	Choix des formulations	105
4.2.1	Compositions des phases mises en jeu dans l'émulsion	105
4.3	Amélioration de la préparation des nanogels	106
4.3.1	Procédé d'émulsification par utilisation d'un microfluidiseur	106
4.3.2	Etape de photopolymérisation des nanoémulsions	107
4.3.3	Purification des nanogels et redispersion en milieu aqueux	108
4.3.4	Caractérisation et comportement des nanogels en solution	109
4.3.5	Etude des nanogels de HA-MA ₂₀	109
4.3.6	Etude des nanogels de HA-MA ₂₀ , BIS ₂₀	110
4.3.7	Etude des nanogels de HA-MA-PBA ₂₀ , BIS ₂₀	111
4.3.8	Stabilité des gels obtenus dans le temps	112
4.3.9	Etude de zétamétrie	112
4.4	Conclusion intermédiaire	113
5	Dégradabilité des gels	113
5.1	La hyaluronidase, une enzyme spécifique	113
5.2	Dégradabilité des microgels de HA-MA	115
5.2.1	Dégradation d'un gel de HA-MA ₂₀	115
5.2.2	Considération cinétique : effet du degré de méthacrylation	115

5.2.3	Dégradabilité des gels de HA-MA-PBA	116
5.3	Dégradabilité des nanogels	117
5.4	Conclusion intermédiaire.....	117
6	Conclusion.....	117

Chapitre 4 : Etude entre des microgels de HA et des protéines modèles : vers la libération d'insuline contrôlée

1	Etude du chargement de protéines modèles	125
1.1	Présentation des méthodes choisies	125
1.2	Comportement des gels en présence de macromolécules modèles.....	126
1.2.1	Estimation de la taille de pores des gels.....	127
1.2.2	Comportement des microgels chargés en dextran	129
1.2.3	Comportement des gels chargés en PLL	130
1.3	Lien entre le paramètre de maille et l'encapsulation des protéines.....	134
1.4	Cas des gels macroporeux	136
1.4.1	Mise en évidence de la double porosité par imprégnation de dextrans fluorescents.....	136
1.4.2	Comportement des gels macroporeux en présence de PLL.....	136
1.5	Commentaires sur la rigidité des gels en fonction de leur composition	137
1.6	Comportement des gels en présence d'insuline	138
1.7	Dégradabilité des gels chargés en macromolécules.....	138
1.7.1	Dégradabilité des gels chargés en dextran.....	139
1.7.2	Dégradabilité des gels chargés en PLL	139
1.7.3	Dégradabilité des gels chargés en insuline.....	139
1.8	Conclusion intermédiaire.....	140
2	Applications aux gels sensibles au glucose	140
2.1	Etude de l'imprégnation des gels de HA-MA-PBA par des macromolécules modèles.....	141
2.1.1	Comportement des gels de HA-MA-PBA en présence de PLL	141
2.1.2	Comportement des gels de HA-MA-PBA en présence de dextran.....	142
2.1.3	Comportement des gels de HA-MA-PBA en présence d'insuline	143
2.2	Etude de la libération des protéines dans les microgels sensibles au glucose.....	143
2.2.1	Etude de la libération du dextran.....	144
2.2.2	Etude de la libération de l'insuline.....	145
2.2.3	Rôle de la structure du microgel dans la libération de la protéine.....	146
2.3	Conclusion intermédiaire.....	146
3	Confinement de protéines dans des microgels obturés par complexation	147
3.1	Stratégie de formation de la membrane	147
3.1.1	Concept	148
3.2	Stratégie d'encapsulation basée sur la complexation de polyélectrolytes	149
3.2.1	Encapsulation	149
3.2.2	Relargage par dégradation de la PLL peau.....	151

3.3	Stratégie d'encapsulation basée sur des interactions moléculaires spécifiques	153
3.3.1	Cahier des charges pour le design des partenaires microgels/macromolécule	153
3.3.2	Macromolécule fonctionnalisée avec les boronates	154
3.3.3	Système utilisant des microgels dérivés d'acide hyaluronique	154
3.3.4	Système utilisant des microgels de dextran.....	155
3.4	Conclusion intermédiaire.....	159
4	Conclusion	159

Chapitre 5 : Etude quantitative de la libération d'insuline encapsulée dans des macrogels d'acide hyaluronique

1	Préparation de macrogels doublement réticulés de HA-PBA/HA-Maltose.....	165
1.1	Précurseurs HA-PBA et HA-Maltose.....	166
1.2	Présentation de la liaison PBA/Maltose : mécanisme.....	166
1.3	Formation du réseau permanent.....	167
1.4	Composition et préparation des gels.....	168
1.5	Propriétés de gonflement des gels doublement réticulés	168
1.5.1	Protocole de détermination des variations de gonflement	168
1.5.2	Etude du gonflement des macrogels en absence d'insuline.....	169
1.5.3	Effet de la présence d'insuline sur le gonflement des macrogels.....	170
2	Etude des gels doublement réticulés chargés en insuline.....	171
2.1	Encapsulation de l'insuline.....	171
2.2	Méthode de dosage par chromatographie liquide.....	171
2.2.1	Présentation du protocole de détection de l'insuline humaine par chromatographie liquide HPLC	171
2.2.2	Résultats de l'étude cinétique de libération de l'insuline	173
2.2.3	Analyse de la libération de l'insuline par spectrométrie de masse.....	178
3	Préparation de gels de HA-MA-PBA de taille macroscopique	179
3.1	Présentation des précurseurs.....	179
3.2	Préparation des macrogels	180
3.3	Caractérisation des macrogels.....	180
4	Etude de l'encapsulation de protéines modèles par fluorescence	181
4.1	Méthode de dosage de l'insuline par spectroscopie de fluorescence	181
4.2	Etude de l'encapsulation de protéines dans les gels de HA-MA-PBA	181
4.2.1	Encapsulation de dextran comme modèle	181
4.2.2	Encapsulation de l'insuline	183
4.2.3	Etude de gels sensibles au glucose doublement réticulés.....	185
5	Etude de la libération de protéines	187
5.1	Dosage de l'insuline par spectroscopie de fluorescence	187
5.1.1	Présentation des deux méthodes analytiques	187
5.2	Gels de HA-MA-PBA	187

5.2.1	Relargage du dextran	187
5.2.2	Relargage de l'insuline.....	189
5.3	Etude des gels doublement réticulés HA-PBA/HA-Maltose.....	195
6	Conclusion.....	196
7	Comportement du HA-PBA en solution et aux interfaces	197
7.1	Interaction avec l'insuline.....	197
7.2	Propriétés amphiphiles du HA-PBA	198
7.2.1	Adsorption à une interface liquide.....	198
7.2.2	Stabilisation d'émulsions	199
7.3	Propriétés d'autoassemblages du HA-PBA	202
7.4	Conclusion.....	205

Conclusion générale et perspectives

207

Partie Expérimentale et Annexes

1	Annexe 1 : Matériel.....	215
1.1	. Produits utilisés.....	215
1.2	Formule développés des réactifs cités	215
1.3	Matériel utilisé.....	217
2	Annexe 2 : Descriptifs des outils et appareils utilisés.....	218
2.1	¹ H-RMN	218
2.2	Caractéristiques de la lampe UV.....	218
2.3	Techniques de microscopie.....	218
2.4	Chambre d'observation :	219
2.5	Les homogénéiseurs haute pression ou microfluidizer	220
2.6	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	220
2.7	Zétamétrie.....	221
2.8	Mesures de tension interraciale par la méthode de la goutte pendante	222
3	Annexe 3 : Descriptif des différents protocoles	224
3.1	Protocoles de synthèses	224
3.2	Protocole de préparation de microgels	226
3.3	Protocole de préparation de nanogels.....	228
3.4	Préparation des capillaires utilisés pour immobiliser les microgels	228
3.5	Etude des microgels en microscopie	229
3.6	Dosage de l'insuline par HPLC.....	230
4	Annexe 4 Compléments d'informations relatifs aux résultats.....	231
4.1	Théorie du gonflement	231
4.2	Calcul de la concentration critique de recouvrement C*	232
4.3	Calcul du paramètre de maille des gels de HA-MA DS 20%	233

4.4	Cinétique de libération du dextran encapsulés dans des macro/microgels de HA-MA-PBA	235
4.5	Etude en milieu plasmatique de l'insuline libérée de macrogels HA-PBA/HA-Maltose par dosage HPLC	237
5	Annexe 5: Publication Oil-in-microgel strategy for enzymatic-triggered release of hydrophobic drugs.....	238

Introduction générale.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet de recherche baptisé Closed LOOP INSulin delivery from glucose-responsive hydroGels (LOOPING). Ce projet porte sur l'élaboration d'hydrogels de polysaccharides sensibles au glucose pour délivrer de l'insuline en vue d'une amélioration potentielle des traitements du diabète de type I. Actuellement cette maladie est soignée grâce à des injections pluriquotidiennes d'insuline ou grâce au port de pompe à insuline qui permet de capter la glycémie en continue. Ces solutions sont dans le premiers cas, contraignantes et sources d'erreur de médication et dans le second très invasives pour le patient. C'est pourquoi, la communauté scientifique cherche à développer d'autres solutions pour délivrer l'insuline en boucle fermée, c'est-à-dire sans l'intervention du patient pour sonder sa glycémie, déterminer le dosage d'insuline nécessaire et se l'administrer. Dans le cadre de ce projet, nous proposons une solution alternative basée sur une forme pharmaceutique administrable qui sert de réservoir d'insuline et qui peut la libérer au besoin en fonction de la glycémie du patient.

Dans ce contexte, les micro/nanogels sensibles au glucose ont été identifiés comme des candidats à fort potentiel pour délivrer l'insuline relativement à la concentration en glucose. Les nanogels sont des particules colloïdales de taille inférieure au micromètre. Ces réseaux de polymères réticulés sont capables d'encapsuler une protéine et de la libérer par l'application d'un stimulus externe tel que le glucose. Les matériaux idéaux doivent être administrables, libérer l'insuline avec des pharmacocinétiques qui miment l'activité pancréatique, et être biocompatibles et biorésorbables. Afin de satisfaire aux critères de biocompatibilité et de biorésorption des vecteurs de l'insuline, nous avons choisi de développer des hydrogels à base de polysaccharides, tel que l'acide hyaluronique. Ce polysaccharide linéaire est présent dans de nombreux tissus, où il intervient comme agent structural et biologique. Il est de ce fait biocompatible et peut être dégradé par voie enzymatique dans l'organisme. Les particules ainsi préparées pourraient être administrées par voie sous cutanée, sous forme de dépôt, qui, bien que n'ayant pas la cinétique idéale, permettrait de moduler la délivrance d'insuline en fonction de la glycémie. Idéalement, les gels de taille nanométrique pourraient également rejoindre la circulation sanguine, et y circuler sur des périodes prolongées avant d'être dégradés. Leur taille pourrait également être un critère déterminant pour obtenir les bonnes cinétiques de délivrance d'insuline.

De manière préalable, notamment lors de travaux de thèse antérieurs, des matériaux sensibles au glucose ont été développés, mais ils ne sont pas maîtrisés en termes de délivrance d'insuline. Pour bien appréhender ces systèmes, les interactions pouvant exister entre la protéine et la matrice de gels doivent être comprises et contrôlées. Elles peuvent avoir un impact sur l'encapsulation et la libération de l'insuline mais aussi sur les propriétés des gels qui servent de vecteurs, notamment leurs propriétés de gonflement et de dégradation.

Le projet LOOPING s'inscrit dans le cadre d'un consortium entre un partenaire privé Sanofi, le laboratoire CERMAV à Grenoble et notre équipe au sein de l'ISM.

Le rôle du CERMAV dans ce consortium est de synthétiser de nouveaux précurseurs dérivés d'acide hyaluronique afin de préparer des gels sensibles au glucose comme vecteur d'insuline. Pour cela, leur savoir-

faire permet d'introduire sur ces polymères naturels, les fonctions nécessaires pour l'obtention de réseaux et pour la reconnaissance du glucose.

Le rôle de l'équipe NSysA à l'ISM est de permettre de comprendre les mécanismes qui régissent l'encapsulation et la libération de protéines dans les matrices de gels, et notamment le rôle des interactions entre les partenaires protéines/gels. En outre, les étapes de mise en forme à l'échelle colloïdale peuvent en modifier les propriétés si elles ne sont pas maîtrisées. La structure des gels ou nanogels doit être également mieux cernée.

L'enjeu de ce travail de thèse est d'établir une relation structure des gels-propriétés d'encapsulation/délivrance de l'insuline, en distinguant les paramètres chimiques (tels que la nature des modifications du HA, le taux de substitution et l'impact de la présence de sucre), des paramètres physiques (tels que la réticulation, la distribution de pores et la taille du système). Ce travail doit permettre de discriminer quelles sont les formulations pertinentes en vue de l'application.

Ce manuscrit présente les travaux réalisés dans cette direction au sein de l'ISM équipe NSysA. Il est divisé en cinq parties.

Le **chapitre 1** décrit les concepts généraux sur les vecteurs préparés à partir de polymères stimulables et en particulier les hydrogels. Il présente un état de l'art sur les matériaux sensibles au glucose, puis décrit les choix émanant de travaux préalables à ce projet réalisés au CERMAV et à l'ISM et les matériaux sensibles au glucose qui ont été développés auparavant par nos équipes.

Dans le **chapitre 2**, l'insuline, protéine d'intérêt pour ce projet est présentée en termes de structure et de propriétés. Dans un second temps, les méthodes disponibles pour étudier les interactions entre des protéines et des polymères en solution et sous forme d'hydrogels sont discutées. Enfin, un état des lieux des études menées pour comprendre les interactions entre les polyélectrolytes et plus particulièrement les gels de tailles micrométriques et les protéines est dressé, soulignant l'importance de l'étude de certains paramètres physico-chimiques.

Dans le **chapitre 3**, nous décrivons la préparation de micro/nanogels d'acide hyaluronique en milieu confiné grâce à la préparation d'émulsions eau-dans-huile par homogénéisation haute pression ou par voie microfluidique. Dans les deux cas, des précurseurs d'acide hyaluronique modifiés par des méthacrylates sont confinés dans les gouttes de l'émulsion et photopolymérisés. Les précurseurs peuvent également être modifiés par des fonctions ligand du glucose. La technique d'émulsification choisie permet de contrôler la taille des gouttes et induit la taille des gels. Des nanogels et des microgels sont obtenus et caractérisés en termes de structures et de comportements dans différents milieux.

Le **chapitre 4** présente l'étude des interactions entre des macromolécules modèles dont des protéines et des gels à l'échelle micrométrique. Les gels sont préparés à partir de précurseurs de HA réticulables qui, dans

certain cas, portent également des fonctions sensibles au sucre. Le chargement en protéines modèles est étudié. Le rôle des interactions sur le chargement et le comportement physico-chimique des gels est discuté. Une stratégie d'encapsulation et de libération contrôlée de protéines ne présentant aucune interaction avec les matrices de gels est également proposée.

Enfin, dans le **chapitre 5**, nous présentons l'analyse quantitative des performances d'encapsulation et de libération d'insuline, pour les hydrogels développés dans le cadre de ce projet industriel. Pour des raisons analytiques, nous avons choisi de travailler à l'échelle des hydrogels macroscopiques, dits macrogels.

Chapitre 1 :

**Etat de l'art et présentation des
concepts de l'étude.**

L'objectif de ce chapitre est de présenter le contexte et les concepts généraux de cette étude mais aussi les travaux préalables réalisés dans le laboratoire et présents dans la littérature, dont nous nous sommes inspirés pour ce travail de thèse.

Lors de ce projet, nous avons choisi d'utiliser les hydrogels stimulables, en particulier ceux sensibles au glucose. Pour cela, des biopolymères hydrosolubles sont fonctionnalisés pour être réticulables et sensibles aux sucres. Les matériaux préparés nous permettent d'envisager de nouvelles voies pour libérer de l'insuline de manière contrôlée.

Dans une première partie de ce chapitre, les polymères stimulables mis en forme pour servir de vecteurs de principes actifs seront présentés, ainsi que les stratégies pour contrôler l'encapsulation et déclencher la libération des actifs. Dans une deuxième partie, les mécanismes de sensibilité au glucose en vue de développer des traitements au diabète à partir de polymères stimulables seront présentés. Dans une troisième partie, nous positionnerons notre projet, nos choix, et les travaux préalables à cette thèse menant à l'utilisation d'hydrogels modifiés par des acides phénylboroniques.

1 Matériaux à base de polymères stimulables pour la délivrance d'actifs.

1.1 Les polymères stimulables

La délivrance d'actifs à partir de véhicule, peut faire appel à l'utilisation de polymères stimulables. Les polymères stimulables sont des macromolécules, qui peuvent suite à une modification de leur environnement, effectuer des changements physiques rapides et réversibles. Ces réponses se manifestent comme des modifications drastiques de l'un des paramètres suivants: conformation, solubilité, formation d'un complexe d'auto-assemblage moléculaire. Ces transformations sont déclenchées par la température, le pH, la lumière, la force ionique, les contraintes mécaniques, les champs électriques ou magnétiques, ou bien la concentration en substances spécifiques. Le contrôle du milieu permet de déclencher ces changements et donc de maîtriser l'encapsulation et la libération des espèces d'intérêts.

Les polymères stimulables peuvent être mis en forme de plusieurs manières afin de servir de vecteur pour des actifs tels que l'insuline. Entre autres, ils sont utilisés sous forme d'hydrogels, de micelles, de capsules ou encore greffés sur des surfaces. Ces mises en forme sont particulièrement prometteuses pour la délivrance d'actifs. Pour ce travail, nous nous intéressons particulièrement aux hydrogels qui sont parfois qualifiés de stimulables ou « intelligents ». En effet, en fonction de la nature des groupements présents le long de la chaîne de polymère, ils ont la capacité de moduler leurs propriétés, comme la conformation des chaînes mais aussi plus souvent, leur gonflement, en fonction de paramètres extérieurs. Le caractère réversible de ces transitions est souvent recherché.

1.2 Les hydrogels stimulables:

1.2.1 Structure des hydrogels

Dans la catégorie des matériaux poreux pouvant être utilisés pour encapsuler des principes actifs, se trouvent les solides poreux sur lesquels des polymères peuvent être greffés, et les hydrogels. Dans le cadre de ce travail, les polymères stimulables étudiés seront principalement mis en forme sous forme d'hydrogels. Ces matériaux ont la capacité de stocker des grandes quantités d'actifs hydrosolubles comme l'insuline et peuvent être développés en vue de les libérer dans les bonnes quantités au bon moment dans les bonnes cinétiques. Ils sont ainsi très prometteurs et largement étudiés.

Un gel est un matériau tridimensionnel poreux qui a la capacité d'absorber de grandes quantités de solvant, tout en maintenant une stabilité dimensionnelle. Un gel est donc la définition donnée à un ensemble composé d'un réseau et d'un solvant. Le réseau peut être un polymère ou un ensemble d'objets colloïdaux tels que des nanoparticules. Le solvant a lui, une bonne affinité physico-chimique avec le réseau, facilitant sa pénétration dans tout le volume. Dans le cadre de ce travail, le réseau est constitué de chaînes de polymères réticulés. Cette réticulation peut avoir plusieurs origines. Elle est dite physique, quand elle met en jeu des liaisons de faible énergie (comme les liaisons électrostatiques, hydrogènes ou de Van der Waals). On parle de réticulation chimique lorsque le réseau est constitué de liaisons covalentes entre les chaînes. Si la réticulation est réversible, c'est-à-dire que les liaisons entre les chaînes ne sont pas permanentes le gel est dit dynamique. Cependant pour maintenir la stabilité de la structure, il faut également un réseau permanent.

Idéalement, un gel est constitué d'un réseau, où toutes les chaînes sont connectées à toutes leurs extrémités par des nœuds de réticulation et où chaque chaîne contribue de manière équivalente à l'élasticité du réseau. Les gels préparés expérimentalement présentent des défauts comme des points d'enchevêtrement créant des nœuds de réticulation supplémentaires qui modifient l'élasticité du réseau (Figure 1). D'autres types de défauts existent, des chaînes pendantes connectées au réseau par une extrémité uniquement ou enfin des boucles, où les chaînes sont connectées aux deux extrémités au même nœud de réticulation, ces défauts ne contribuent pas à l'élasticité du réseau.

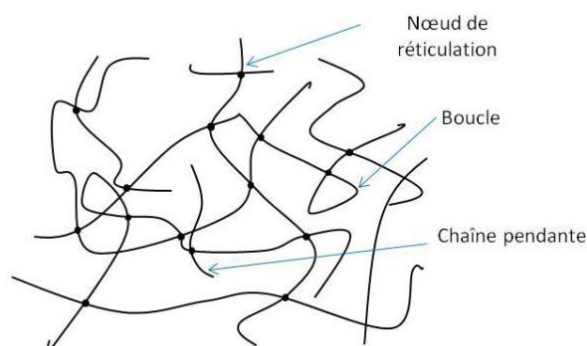


Figure 1: schématisation de la structure d'un gel

Dans le cas des hydrogels, le solvant est l'eau. Les hydrogels peuvent contenir jusqu'à 90% d'eau, tout en étant considéré d'un point de vue mécanique comme des solides élastiques. Les gels sont particulièrement sensibles à leur environnement qui va influencer sur leur taux de gonflement [1],[2] et leur conférer une grande maniabilité et modularité. Ces propriétés particulières en font des objets particulièrement intéressants pour de nombreuses applications tels que la préparation de capteurs [3],[4], d'actionneurs [5], de transporteurs pour l'administration contrôlée de principes actifs [6]–[8] ou de matrices structurantes pour l'ingénierie tissulaire [9]–[11]. Dans le cadre de ce travail nous nous focaliserons sur l'étude d'hydrogels polymériques et chimiques.

1.2.2 Théorie du gonflement et application aux hydrogels stimulables :

Les polymères composant les hydrogels peuvent être stimulés par des déclencheurs physico-chimiques ou environnementaux. Dans le cadre de variation de gonflement des gels, on peut identifier différents leviers qui selon la théorie de Flory, induisent des variations de gonflement :

- L'affinité polymère-solvant
- La densité de réticulation

On peut citer également des variations de gonflement, dues à un changement conformationnel.

Le gonflement peut influencer sur de nombreuses caractéristiques des hydrogels en tant que matériaux tel que, leur volume mais aussi leurs propriétés optiques, mécaniques ou encore leur porosité. Les stimuli entraînant un changement de comportement des hydrogels peuvent être de natures diverses, ainsi, il peut s'agir de la température [12], du pH [13], de la présence de champs électromagnétiques [14], ou de rayonnement lumineux [15]. Enfin, la présence sur la chaîne de polymère de ligands, comme les acides phénylboroniques, peut permettre la reconnaissance moléculaire d'espèces d'intérêt, ouvrant la voie à des applications biomédicales pour la vectorisation et la délivrance de principes actifs, l'imagerie médicale ou la détection d'espèces en solution [16].

Le gonflement des gels est largement étudié. Il peut être défini comme le rapport de gonflement, Q représentant le rapport des masses contenues dans le gel gonflé et la masse initiale c'est-à-dire la masse du gel sec. La masse d'eau dans le gel gonflé est définie comme la différence entre W_s (la masse du gel gonflé) et W_d (sa masse initiale à sec). Lorsque le gel ne gonfle plus, c'est-à-dire que sa masse reste constante en augmentant le temps d'immersion des gels, l'état d'équilibre est atteint, le gonflement est maximum et il peut s'écrire :

$$q_M = \frac{W_s - W_d}{W_d}$$

Le gonflement d'un hydrogel est déterminé par différentes contributions liées au solvant et à ses interactions avec les chaînes macromoléculaires et/ou à la structure du réseau. Parmi les contributions structurelles, la densité de réticulation du réseau du gel joue un rôle prépondérant. Ainsi, plus elle est élevée, plus le gonflement est faible. Le solvant, et en particulier son affinité pour les chaînes de polymères, impacte également le gonflement. Plus l'affinité du polymère avec l'eau est grande, plus le gonflement sera élevé. Enfin, le gonflement des hydrogels dépend de la différence entre les pressions osmotiques à l'intérieur et à

l'extérieur du réseau et des forces élastiques à l'intérieur du réseau. Les forces de pression osmotiques sont définies par les conditions de solvatation et la nature chimique des chaînes, tandis que les forces élastiques dépendent des nœuds de réticulation et de la structure du réseau. La force ionique du milieu d'immersion de l'hydrogel affecte donc son gonflement.

La structure de l'édifice macromoléculaire permet la formation d'un réseau qui empêche la dissolution totale du polymère et assure le maintien d'une structure tridimensionnelle. Elle est définie par plusieurs paramètres : les chaînes de polymères sont liées entre elles par des nœuds de réticulation caractérisés par leur fonctionnalité f , qui correspond au nombre moyen de chaîne reliées en ce point. La structure dépend également du paramètre de maille ou longueur de corrélation: ξ . Ce paramètre correspond à la taille caractéristique de la maille du réseau c'est-à-dire la distance entre deux nœuds de réticulation. Le paramètre de maille du réseau est dépendant de la densité de réticulation et de la fraction volumique du gel. Cette dernière correspond à la quantité de liquide absorbée au sein du réseau polymérique. Le paramètre de maille dépend donc directement du gonflement du gel.

Il existe des hydrogels chargés contenant des groupes ionisables. Ils sont appelés gels de polyélectrolytes. Pour eux, en plus des forces osmotiques liées aux chaînes et d'élasticité, liées à la réticulation, un troisième terme doit être pris en compte, qui provient de la contribution électrostatique. Pour préserver l'électroneutralité, un excès de contre-ions mobiles est présent dans les hydrogels. Cette différence de pression osmotique liée aux contre-ions est appelé l'équilibre de Donnan [17],[18]. La distribution décrite par Donnan des co-ions et contre-ions, entraîne la présence d'un excès d'ions dans le gel, comparé à l'extérieur de la solution. Cette différence induit une pression osmotique qui entraîne un gonflement du gel. Par ailleurs, les chaînes de polyélectrolytes sont également plus gonflées du fait de la répulsion électrostatique entre charges adjacentes. Cette contribution est néanmoins faible comparée à celle de l'équilibre de Donnan. Dans le cas des gels de polyélectrolytes, la densité de charge joue donc un rôle prépondérant dans le gonflement des gels. En présence d'électrolyte dans la solution, la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur du gel est moindre. Les hydrogels de polyélectrolytes sont donc moins gonflés en milieu électrolyte que dans l'eau pure.

La thermodynamique régissant le gonflement des gels chimiques est présentée plus en détails en Annexe 4.1.

1.3 Autres types de vecteurs basés sur des polymères stimulables

D'autres types de vecteurs que des hydrogels, mis en forme à partir des polymères stimulables peuvent être utilisés pour transporter des principes actifs. Parmi les stratégies utilisées, l'utilisation de polymères amphiphiles est courante. Des polymères amphiphiles contenant des groupements hydrophiles et hydrophobes peuvent former des structures auto-assemblées en solution afin de minimiser les contacts entre les parties hydrophobes et le milieu aqueux. Ces structures créent des réservoirs hydrophobes et hydrophiles permettant l'encapsulation d'espèces. On parle de **micelles** ou de **vésicules** suivant la nature et la géométrie du composé amphiphile (Figure 2 b et c). D'autres types d'assemblages par couche dit layer-by layer (LbL) peuvent avoir lieu (Figure 2 d). Ils sont généralement réalisés à la surface de particules colloïdales ultérieurement dégradées, on obtient ainsi des **capsules** creuses dont l'épaisseur et la taille sont parfaitement

contrôlées par le nombre de couches déposées. L'assemblage de la capsule peut mettre en jeu différents types d'interactions, traditionnellement ce sont des interactions électrostatiques [19] mais elles peuvent être d'autres natures, telles que des interactions spécifiques hôte-invité [20] ou la formation de liaisons covalentes [21]. Les systèmes assemblés couches par couches peuvent aussi exister sous forme de **films**. Ces trois types de systèmes permettent l'encapsulation d'espèces et sont utilisés pour les libérer de manière contrôlée, en utilisant le caractère stimuable des polymères utilisés pour moduler leur intégrité ou leur perméabilité. Les différents types de vecteurs sont représentés Figure 2.

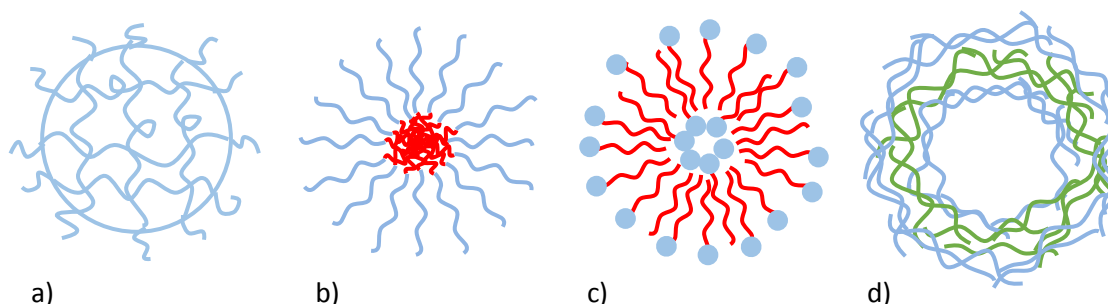


Figure 2 : Représentation schématique des vecteurs de potentiels de principe actif. Illustration de mise en forme de polymères stimulables a) hydrogels. Structures assemblées de composés amphiphiles b) sous forme de micelle c) sous forme de vésicule d) microcapsule assemblée. En rouge la partie hydrophobe en bleu la partie polaire hydrophile c) microcapsule assemblée par couche dite layer by layer, les chaînes en bleu et en verts sont généralement de charges opposées.

Enfin, une dernière catégorie de stratégie existe, il s'agit du greffage de polymères stimulables à la surface de matériaux. Pour des matériaux poreux, tels que des membranes, les changements conformationnels des polymères stimulables peuvent moduler la perméabilité en jouant le rôle de valve activable. A l'échelle colloïdale, cette stratégie a été appliquée à des **nanoparticules** poreuses, inorganiques ou non. On citera à titre d'exemple par exemple, l'utilisation de silices mésoporeuses.

1.4 Stratégies de délivrance contrôlée d'actifs

La libération des espèces d'intérêt peut être déclenchée par le stimulus suivant différents mécanismes notamment, par modification de la porosité, par destruction de la matrice, ou par dissociation actif-matrice.

1.4.1 Libération par modification de la porosité

1.4.1.1 *Elargissement des pores*

Parmi les mécanismes de libération d'actifs encapsulés dans une structure, l'augmentation de la porosité du contenant suivie d'un relargage par diffusion est possible. Dans le cas des hydrogels notamment, les propriétés de gonflement permettent de moduler la porosité du réseau. Les hydrogels peuvent être utilisés comme des membranes dont la perméabilité peut être modulée par action d'un stimulus. Ces membranes peuvent séparer le milieu d'un réservoir contenant l'actif (Figure 3 a) [22],[23]. Alternativement, les

hydrogels peuvent servir eux-mêmes de réservoirs de par leur nature poreuse (Figure 3 a) [24]–[26]. Dans les deux cas, la libération peut se faire par gonflement du gel. Les modifications de porosité sont aussi observées pour des microcapsules. Ainsi, il existe des systèmes assemblés couche par couche, qui forment des capsules dont la porosité peut être modifiée [27].

1.4.1.2 Ouverture-fermeture des pores par effet bouchon

La porosité peut être utilisée comme levier d'une autre manière, en effet, elle peut être bouchée par introduction dans le milieu d'une espèce qui interagira avec la structure, et viendra de ce fait obstruer les pores (Figure 3 b). C'est le cas notamment des nanoparticules de silice mésoporeuse ou des vésicules [28].

1.4.2 Libération par destruction de la matrice

Un autre moyen de libérer les actifs encapsulés, est de détruire les structures. Ainsi, les espèces encapsulées ne sont plus confinées à l'intérieur et sont relarguées vers le milieu extérieur. Ces systèmes impliquent souvent un chargement simultané à la mise en forme, de manière à emprisonner l'actif dans les structures lors de leur formation. Pour ce faire différentes stratégies peuvent être mises en place. L'inconvénient de ces stratégies est l'absence de caractère réversible du processus. L'actif est libéré en une fois.

1.4.2.1 Désassemblage des structures

Certaines structures sont basées sur des assemblages de polymères. Ces assemblages peuvent être stimulables, c'est-à-dire ils peuvent se faire et se défaire de manière contrôlée en fonction de stimuli externe (Figure 3 c). Par exemple, en changeant le milieu, les polymères composant la structure peuvent passer d'hydrophobe à hydrophile, et les interactions qui permettaient la cohésion tridimensionnelle du contenant peuvent être inhibées entraînant le désassemblage de la structure. Ces changements sont réversibles et mettent en jeu une modification de la solubilité dictée par le solvant. La modification de charge de polyélectrolytes composant un système assemblé couche par couche, peut induire le désassemblage des capsules formées par neutralisation des interactions électrostatiques [19]. C'est notamment le cas des capsules dites LbL ou des hydrogels basés sur des réticulations physiques ou clivables. Les assemblages peuvent aussi se dissocier par des mécanismes de compétition moléculaire, où l'assemblage de la structure est défait en raison de l'introduction d'une molécule qui a une plus forte affinité avec l'un des partenaires que les partenaires entre eux (Figure 3 c) [29],[30].

1.4.2.2 Dégradation des structures

Une autre manière de détruire les structures est de les dégrader. Pour ce faire, contrairement au cas du désassemblage, ce ne sont pas les interactions des chaînes entre elles qui sont visées, mais la structure de chaque chaîne [31]. En effet, les polymères peuvent être clivés, par rupture des liaisons covalentes. Ces clivages peuvent avoir lieu par réaction chimique ou dégradation enzymatique. La dégradation des structures est irréversible (Figure 3 d).

Le désassemblage des structures conduit généralement à une diffusion de l'actif. Si l'on souhaite associer une énergie cinétique à cette libération, il est possible d'utiliser l'effet propulseur de l'explosion de matrices,

produite par l'encapsulation d'un microgel dans une capsule de polymère. La dégradation de l'hydrogel génère une augmentation de la pression osmotique dans la capsule, qui provoque son explosion [32].

1.4.3 Dissociation actif-matrice

Enfin, les principes actifs peuvent être directement liés aux structures mises en forme. Le contrôle de cette liaison qui peut être covalente (orthogonalisation) ou due à des interactions, permet de maîtriser l'encapsulation et le relargage de l'actif, par dissociation du lien entre les deux (Figure 3 e) [33].

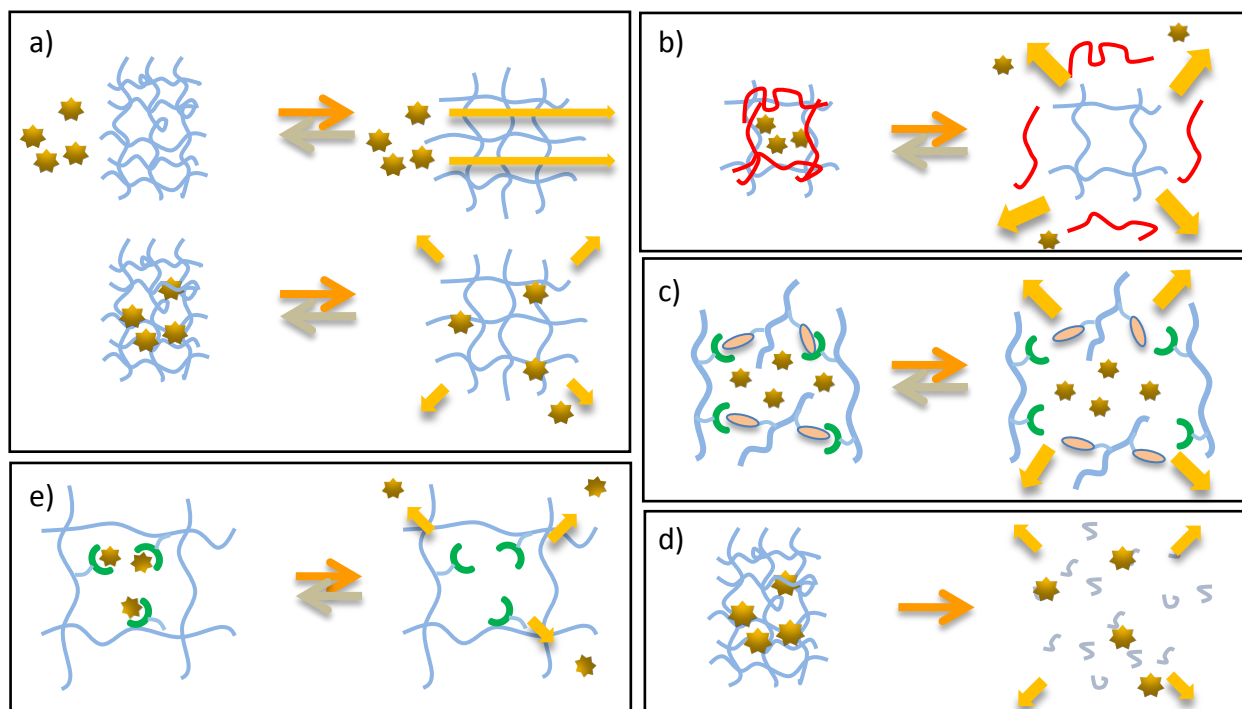


Figure 3 : illustration des stratégies de libération d'actifs: a) deux voies possibles pour la libération contrôlée d'actifs grâce à une modification de la porosité de structures poreuses. En haut : utilisées comme membrane en bas : utilisées comme réservoir. La diffusion du principe actif vers l'extérieur se produit lorsque la structure poreuse gonfle, b) encapsulation de principe actif par obstruction des pores des structures. La libération a lieu par diffusion du principe actif suite au débouchage des pores, c) encapsulation de principe actif dans des structures auto-assemblées. La libération a lieu par dissociation de l'assemblage entraînant la diffusion du principe actif hors de la matrice, d) encapsulation de principe actif dans des structures polymériques suivie de la libération par dégradation du polymère, e) encapsulation de principe actif par liaison/interaction avec la matrice polymérique. La libération se fait par dissociation de l'actif et du polymère.

2 Les matériaux sensibles au glucose : enjeux du développement de nouveaux traitements du diabète

Les différentes stratégies utilisant les polymères stimulables pour encapsuler et délivrer des principes actifs, peuvent être utilisées pour encapsuler et libérer aussi bien des petites molécules que des protéines et ce, afin de développer des traitements pour différentes pathologies. Parmi elles, le diabète est une maladie pour laquelle de nombreux travaux de recherche sont menés. D'après la Fédération internationale du diabète, 415

millions de personnes dans le monde sont atteintes de cette maladie. L'Organisation mondiale de la santé prévoit 622 millions de diabétiques d'ici 2040. En France, en 2013, plus de 3 millions de personnes prenaient un traitement médicamenteux contre le diabète.

Le diabète mellitus est un groupe de maladies métaboliques, qui se caractérise par des taux de sucres trop élevés dans le sang. Il existe deux formes de diabètes:

- Le diabète de type 1 : dit diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile. Il correspond à une maladie auto-immune où le système immunitaire détruit les cellules « bêta » des îlots de Langerhans du pancréas ayant pour conséquence l'arrêt de production d'insuline.
- Le diabète de type 2 : dit diabète non insulino-dépendant ou diabète d'âge mûr. Il est plus courant, environ 90% des diabètes traités. Il correspond au développement d'une résistance à l'insuline par inactivation de ses récepteurs et à l'émergence de défauts de sécrétion.

Le diabète non traité peut mener à des maladies rénales dites néphropathies diabétiques, la cécité, des déficiences du système nerveux appelées neuropathie diabétique. De plus, il prédispose au développement de maladies cardiovasculaires [34]. En particulier, le diabète de type 1 non traité n'est pas viable.

2.1 Vers des systèmes à boucle fermée

2.1.1 Limite des traitements en boucle ouverte

Le traitement du diabète repose sur la prévention par une alimentation équilibrée et une pratique régulière d'exercices physiques, mais aussi sur des traitements médicamenteux. Lors de cette étude nous nous intéresserons plus particulièrement au traitement du diabète de type 1, qui implique à ce jour des injections sous cutanées d'insuline fréquentes et la nécessité de contrôler régulièrement le taux de glucose. Ces traitements sont contraignants, douloureux et présentent des risques d'erreurs de traitement notamment en termes de dosage, justifiant la recherche de solutions alternatives afin d'améliorer les conditions de traitement des patients [35],[36]. D'autres méthodes d'administration dites non-invasives sont étudiées telles que les administrations par voie orale, rectale, nasale, transdermale et oculaire[37]–[40]. Toutefois, ces méthodes sont dites en boucle ouverte car la détection du taux de glucose et la délivrance d'insuline ne sont pas directement couplées.

2.1.2 Traitements en boucle fermée

2.1.2.1 *Les traitements en boucle fermée alternatifs à l'encapsulation d'insuline*

Le diabète de type I requiert un système en boucle fermée pour optimiser le traitement c'est-à-dire un traitement où la délivrance d'insuline dépend du taux de glucose sans intervention du patient. Des nouvelles solutions curatives de ce type sont à l'étude depuis les années 1960 [41]. Elles permettraient d'améliorer le contrôle de la glycémie sur des longues périodes de temps, et de réduire les incidences d'hypo- ou d'hyperglycémie ainsi que les complications qui en découlent. Parmi ces solutions, se trouvent la

transplantation de pancréas ou d'îlots de Langerhans pour remplacer les organes défaillants chez le patient [42]–[44]. Cependant, ces techniques sont limitées par la faible disponibilité de greffons, et par les complications dues à des réponses d'immunosuppressions. Des études ont permis de mettre au point des pancréas artificiels, ou pompe à insuline, permettant la surveillance du taux de glucose dans le sang. Ces données sont transmises à un algorithme qui évalue les quantités d'insuline et parfois aussi de glucagon, protéine aux propriétés antagonistes de l'insuline, à administrer en réponse aux variations de sucre dans le sang. Cependant ces dispositifs externes sont peu pratiques pour les patients. Une autre solution consiste à encapsuler des îlots de Langerhans, dans des macrocapsules ou microcapsules biocompatibles semi-perméables, permettant à l'oxygène, aux nutriments et à l'insuline de passer mais bloquant les réponses immunitaires [45]. A ce jour, différentes formulations sont en phase de test sur l'homme [46]–[48].

2.1.2.2 Les traitements en boucle fermée utilisant des polymères stimulables pour encapsuler l'insuline

De nombreuses équipes travaillent sur d'autres types de systèmes en boucle fermée, moins invasifs que les systèmes existants ou ne nécessitant pas de greffes, en utilisant des réservoirs d'insuline administrable *in vivo*, préparés à base de matériaux sensibles au glucose. Ces systèmes sont constitués de polymères stimulables comme présentés dans le paragraphe 1. Les polymères sont modifiés avec des fonctions capables de reconnaissance moléculaire pour le glucose. En fonction de la concentration en glucose du milieu, les propriétés des polymères vont être modifiées de manière à induire la libération de l'insuline encapsulée. Par conséquence, le taux de sucre dans le milieu va diminuer, entraînant le retour à l'état initial du polymère stimuable et l'arrêt du relargage d'insuline (Figure 4).

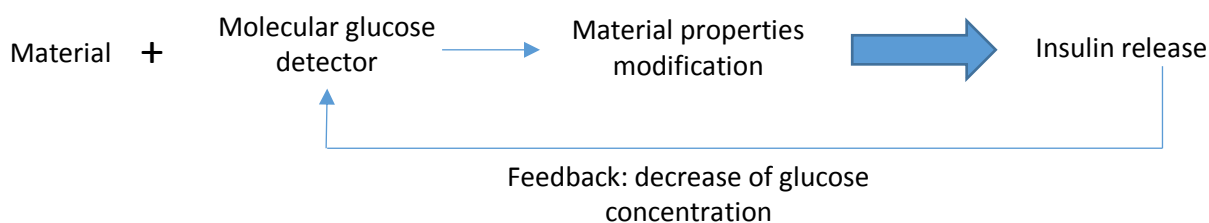


Figure 4 : présentation de la réponse des matériaux préparés à partir de polymères sensibles au glucose en fonction de la glycémie.

2.2 Les mécanismes de sensibilité au glucose

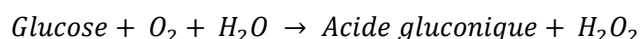
Les différents vecteurs présentés peuvent donc être modifiés de manière à pouvoir délivrer l'insuline en fonction du taux de glucose. Pour cela, les polymères ou les particules utilisés sont modifiés avec des récepteurs sensibles au glucose. Il existe ainsi, plusieurs mécanismes connus pour déclencher le relargage en fonction du taux de glucose mettant en jeu plusieurs types de ligand au glucose :

- Une enzyme : la glucose oxydase
- Une lectine : la Concanavalin A
- Une protéine : la glucose binding protéine (GBP)
- Une fonction chimique : les acides phénylboroniques

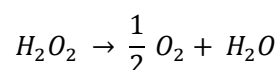
2.2.1 Utilisation de l'enzyme Glucose Oxydase.

2.2.1.1 Mécanisme de sensibilité au glucose impliquant la GOx

Le mécanisme mis en œuvre pour la délivrance d'insuline par l'enzyme glucose oxydase (GOx) en présence de glucose, est en deux étapes. Dans un premier temps, l'enzyme catalyse la réaction d'oxydation du glucose menant à la formation d'acide gluconique et d'hydrogène peroxyde selon la réaction suivante :



La production d'acide gluconique induit un changement de pH dans le milieu, qui provoque le relargage de l'insuline co-encapsulée dans des matériaux pH sensibles. Différents mécanismes de relargage ont été reportés, ils dépendent de la nature du contenant. La GOx agit à la fois comme détecteur de glucose, et comme déclencheur du mécanisme de relargage. Cependant cette réaction implique la consommation d'oxygène, sa quantité limite la réaction. Pour contrecarrer ce phénomène, une deuxième enzyme est co-encapsulée il s'agit de la catalase (CAT). Elle catalyse la dégradation de l'hydrogène peroxyde pour former à nouveau de l'oxygène et de l'eau suivant la réaction suivante [49]–[51]:



La mise en œuvre de cette deuxième réaction permet de régénérer les réactifs de la réaction d'oxydation du glucose, de plus, elle limite la formation d'hydrogène peroxyde qui peut dégrader la GOx. Ainsi, la cinétique de réponse, et la stabilité de la GOx sont améliorées par co-encapsulation de la catalase.

2.2.1.2 Utilisation de matériau sensibles au pH modifié par la GOx, exemple des hydrogels

Les réactions chimiques mises en jeu lors de la réaction du glucose catalysée par la GOx, entraînent des changements de pH du milieu qui sont utilisés pour modifier les propriétés des polymères stimulables et ainsi déclencher la libération de l'insuline. Des vecteurs pH sensibles, mis en forme à partir de ses polymères stimulables peuvent être utilisés.

Les équipes de Ihisara, et de Kost, Ratner and Horbett, furent les premières à utiliser ce principe pour l'associer aux propriétés des hydrogels [22],[52]–[55]. Les deux groupes ont copolymérisé du méthacrylate de diméthylamine (DMAEMA) à un copolymère neutre pour créer des hydrogels pH-sensibles qui gonflent quand le pH diminue. Les premiers travaux sur l'encapsulation d'enzyme dans des hydrogels d'acrylamide ont été menés par Bernfeld et Wan en 1963. Plus particulièrement la GOx a été encapsulée dans des gels méthacrylés [23],[50],[49]. Les premières utilisations de ces systèmes ont été limitées par une perte d'activité enzymatique dans le temps. Depuis, les enzymes ont été immobilisées afin d'augmenter leur stabilité et d'améliorer leur durée de vie [56] ; une autre stratégie consiste à les introduire en large excès [57].

2.2.2 Les mécanismes impliquant les lectines

2.2.2.1 Mécanisme de sensibilité au glucose impliquant les lectines

La deuxième méthode s'axe autour de l'utilisation de lectines et en particulier de la concanavaleine A (Con A) qui possède quatre sites de liaisons spécifiques avec le glucose ce qui en fait un bon candidat pour développer des systèmes de relargage gluco-dépendant. Deux mécanismes de relargage impliquant la Con A existent. Pour le premier, elle est utilisée afin de créer une structure tridimensionnelle grâce à ses propriétés de liaison. L'augmentation de la densité de réticulation permet d'emprisonner les actifs comme l'insuline. En présence de glucose, celui-ci peut diffuser jusqu'à la concanavaleine A et se lier de manière compétitive à cette dernière entraînant la rupture de la structure tridimensionnelle. La deuxième stratégie, implique que la Con A soit stériquement ou physiquement immobilisée dans une structure déjà existante. La présence de glucose entraîne un gonflement de cette structure par diminution de la densité de réticulation des structures et le relargage de l'insuline par diffusion.

2.2.2.2 Utilisation de variation de réticulation des hydrogels modifiés par des lectines

La Con A a d'abord été utilisée directement comme agent réticulant permettant, son encapsulation dans des squelettes de polysaccharides ou de polymères glycosylés (Figure 5). Dans ce cas elle rentre directement en jeu dans la création d'hydrogels [58],[59]. En présence de glucose, la Con A se détache des structures et entraîne un désassemblage des structures et donc la libération de l'insuline.

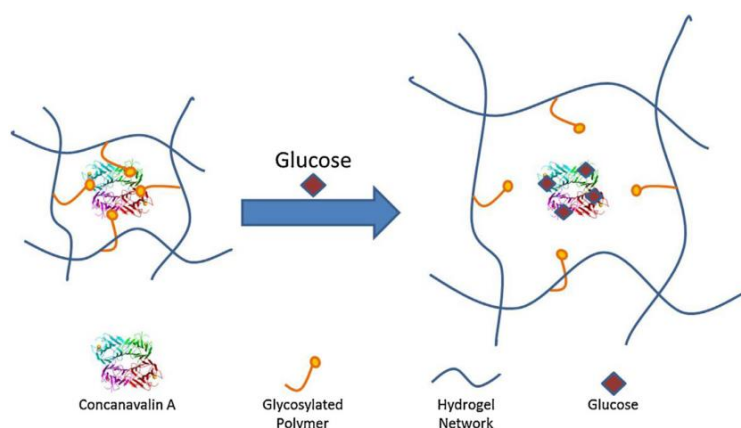


Figure 5: mécanisme de gonflement d'hydrogels glucosensibles basé sur des mécanismes impliquant la concanavaleine A.

Cependant, le mécanisme compétitif de désassemblage de la structure en présence de glucose ne permet pas une réponse rapide. Une perte d'activité est observée due à des fuites de la Con A vers le milieu extérieur, limitant les applications thérapeutiques potentielles. Pour contourner ces difficultés deux stratégies sont mises en œuvre, la modification de la Con A et/ou sa liaison au réseau. Dans le premier cas, la conjugaison de l'enzyme avec, par exemple, des chaînes de PEG, permet d'augmenter son hydrophilie, et ainsi, d'améliorer sa solubilité, sa stabilité et son affinité pour le glucose [60],[61]. La deuxième stratégie consiste à lier de manière covalente la Con A avec la matrice d'hydrogel à l'aide par exemple de carbodiimide annihilant la perte en Con A, permettant un relargage sur plusieurs cycles [62]–[64]. Différentes matrices de

polymères sont à l'étude, ainsi, des nanogels interpénétrés de poly(N-isopropylacrylamide) pNIPAM et de N,N'-méthylènebisacrylamide (BIS), ont montré une transition de phase en présence de glucose à température et pH physiologique, permettant le relargage d'insuline asservi à la glycémie [65]. D'autres types de formulations sont à l'étude tels que des gels de dextran modifiés par des méthacrylates et de la Con A [66] ou des formulations à bases de carbomère [62].

2.2.3 Mécanismes impliquant la Glucose Binding Protein (GBP).

Dans les années 70, une protéine ayant la capacité de se lier au glucose a été découverte il s'agit de la Glucose Binding Protein (GBP). Elle est constituée de deux domaines connectés par une charnière. Sa structure varie suivant si elle est liée au glucose ou non [67], [68]. En effet, en présence de glucose, l'interaction entre les deux partenaires entraîne une rotation de 31° des domaines de la protéine GBP, imposant une structure repliée (Figure 6). Cette rotation d'un domaine par rapport à l'autre est expliquée par l'incorporation du glucose au niveau de la charnière.

Cette propriété a été utilisée par l'équipe de Daunert, qui a couplé la GBP à des hydrogels. En effet, la GBP a été utilisée comme réticulant d'un hydrogel d'acrylamide. Il a été montré qu'en présence de glucose (ou de galactose), la protéine se replie entraînant la contraction du réseau. Cette technologie a été appliquée à l'élaboration de membranes sensibles au glucose dont la perméabilité diminue en présence de glucose. Toutefois, il a été prouvé que la perméabilité de protéines comme l'albumine de sérum bovin (BSA), était plus importante en absence de glucose limitant l'utilisation de la protéine pour la libération contrôlée d'insuline en fonction de la glycémie [69].

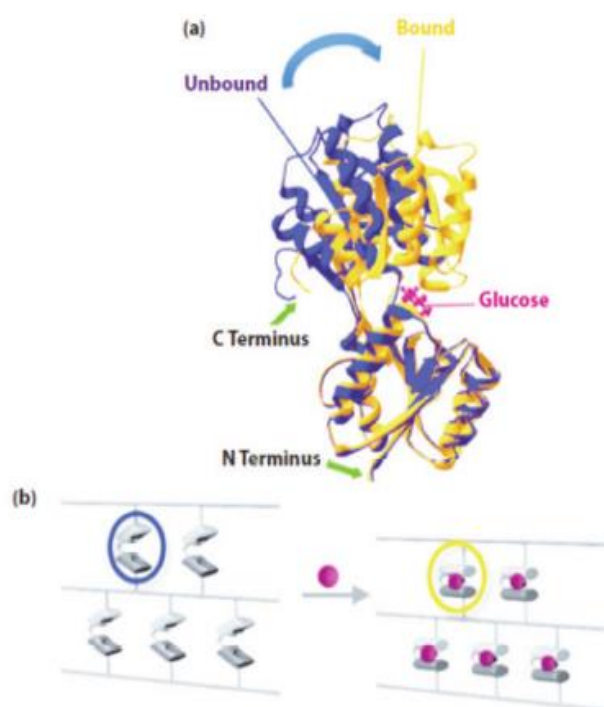


Figure 6 : a) structure de la GBP en absence (bleue) et en présence de glucose (jaune) ; b) représentation schématique de la contraction d'un hydrogel réticulé par la GBP sous l'action du glucose. Le repliement de la protéine induit une contraction du gel (extrait de [69]).

2.2.4 Mécanismes impliquant des fonctions acides phénylboroniques

2.2.4.1 Mécanisme de sensibilité au glucose impliquant les acides phénylboroniques

- Complexation réversible PBA/sucre

Le dernier mécanisme permettant d'envisager un relargage de l'insuline en fonction de la glycémie, consiste en l'introduction sur les polymères stimulables de fonctions synthétiques d'acide phénylboronique (PBA), ligand du glucose. En effet en 1913, Böeseken remarqua que la présence de glucose augmentait l'acidité des solutions d'acide boronique. Il fut le premier à étudier en détail les interactions des acides boroniques avec les monosaccharides [70]. Les PBA en tant qu'acides de Lewis, peuvent se complexer avec les bases de Lewis tels que les fonctions alcools et amines. Ainsi, ils se complexent avec les diols 1,2 ou 1,3 en formant un ester cyclique à 5 ou 6 chaînons, par liaison covalente réversible [71]. Le mécanisme de complexation des PBA en solution met en jeu plusieurs équilibres présentés Figure 7.

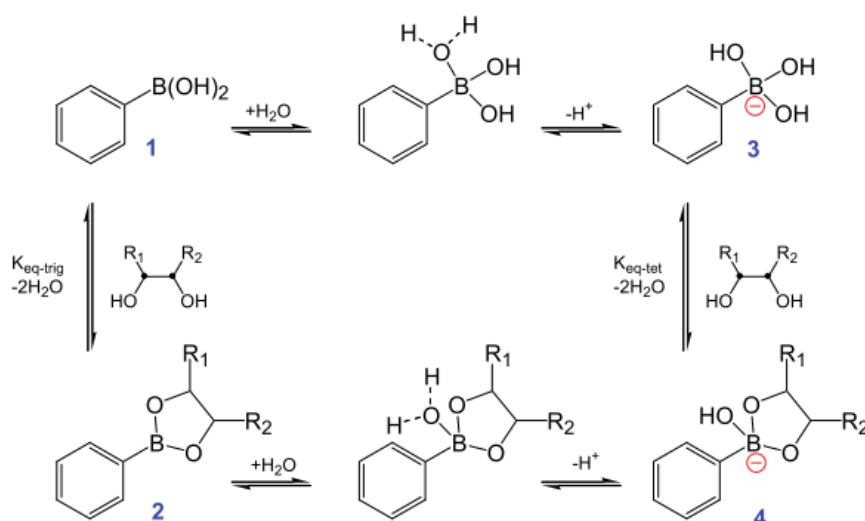


Figure 7: équilibre de complexation entre les diols et les fonctions acides phénylboroniques.

Les acides phénylboroniques existent sous une forme acide neutre et une forme basique chargée. A pH égal au pKa, les deux espèces sont présentes en quantités équivalentes. Lorsque le pH est inférieur au pKa de l'espèce PBA, la forme neutre de l'acide phénylboronique (1) est majoritaire. Sous cette forme, l'atome de bore est lié à une fonction phényle, un diol et une molécule d'eau en suivant une géométrie trigonale plane sp². A pH supérieur au pKa, la molécule d'eau se déprotonne, entraînant la formation d'un boronate chargé (3). Or, lorsqu'il le devient, l'atome de bore est relié à trois fonctions hydroxyles et au cycle aromatique, changeant sa géométrie en tétraogonale sp³. Dans cette géométrie, deux des groupements hydroxyles peuvent former des complexes (4) par condensation bisbidentate avec les diols en positions cis, notamment avec les sucres tels que le glucose. Lors du changement de géométrie, les acides phénylboroniques présentent un angle de 120° qui est réduit à 108° pour la formation de l'ester cyclique. Le complexe boronate est stabilisé par la compression de l'angle entraînant une réduction du pKa et un déplacement de l'équilibre vers la forme

complexée. L'équilibre K_{tri} est négligeable devant l'équilibre K_{tet} . L'équilibre global entre formes complexées et non complexées est décrit Figure 8 :

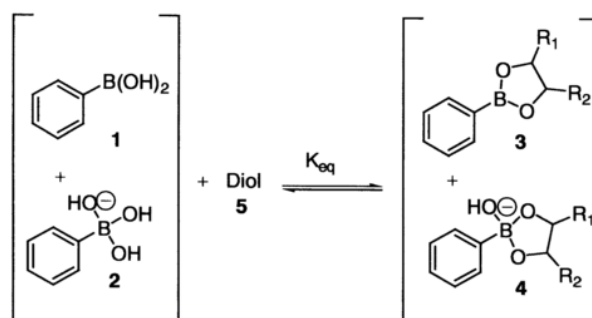


Figure 8 : équilibre de formation des esters boronates.

Ces propriétés peuvent être utilisées pour former des complexes entre les PBA et le glucose. En effet, lorsque le pH est proche du pKa de l'acide phénylboronique, la présence de glucose déplace l'équilibre vers la forme chargée favorable à la complexation

- Sélectivité vis-à-vis des différents ligands

Comme le mentionne le paragraphe précédent, les PBA sont des capteurs de diols tels que des polyols, de simple diols ou des espèces de type saccharides. La sélectivité de la liaison entre les PBA et les différentes espèces citées est un paramètre primordial à appréhender afin de déterminer l'efficacité des systèmes développés pour le traitement du diabète. Afin de comparer l'affinité des PBA pour les diols, l'étude des constantes de complexation PBA/diol est un outil de choix. Ces constantes ont été déterminées expérimentalement par suivi de pH, par dichroïsme circulaire, par RMN du bore, ou en utilisant du rouge alizarine [71]–[75]. Les constantes obtenues à l'aide des différentes méthodes diffèrent légèrement, mais les tendances entre les polyols restent les mêmes (Tableau 1).

Concernant les monosaccharides, il est intéressant de noter que le fructose est mieux complexé que le glucose.

Tableau 1 : Constantes d'association de diols simples et de saccharides avec un acide phénylboronique déterminée par les méthodes de suivi de pH [71] et par complexation avec le rouge alizarine [76].

POLYOL	K_{TET}^A	$K_{EQ}^B (M^{-1})$	POLYOL	K_{TET}^A
CATECHOL	17500	830	ETHYLENE GLYCOL	2,8
D+ GALACTOSE °	276	15	PROPYLENE GLYCOL	3,8
FRUCTOSE	4370	160	2,3 BUTANEDIOL	3,6
L + ARABINOS	391	25	3 METHOXY-1,2-PROPANEDIOL	8,5
D GLUCOSE	110	4.6	PHENYL-1,2-EHANEDIOL	9,9
D MANNOSE	172	13	POLYVYNIL ALCOHOL	1,9
MANNITOL	2275	120	1,3 PROPANEDIOL	0,9
			GLYCEROL	19,7

A : déterminé par diminution de pH [71]

B : déterminée par compétition de la fluorescence en présence d'ARS [76]

2.2.4.2 Utilisation de la modification de l'hydrophobie des gels modifiés par des fonctions PBA pour déclencher la libération d'insuline

Les hydrogels modifiés par des acides phénylboroniques sont, grâce aux propriétés de complexation décrites ci-dessus, couramment utilisés pour développer des systèmes sensibles au glucose. Ainsi, la présence de PBA entraîne des changements physiques ou chimiques dans les structures des gels, permettant de libérer des espèces chargées comme par exemple l'insuline. Plusieurs mécanismes de relargage en fonctions du glucose sont reportés dans la littérature.

- *Relargage par modification de la densité de charges du gel*

La détection de glucose par les matrices de gel modifiées par des fonctions PBA, suit les équilibres présentés précédemment. La complexation des fonctions PBA avec les sucres a lieu pour un pH proche du pKA et implique la formation de boronates chargés, la densité de charge des matrices augmente donc lors de la complexation. En conséquence, le gel gonfle, du fait des effets de répulsions électrostatiques et de l'augmentation de la quantité de contre-ions présents dans la matrice qui exercent une pression osmotique [77].

Cette technique a été employée par Asher pour des hydrogels de polyacrylamide fonctionnalisés avec des fonctions pendantes d'acide 3-(acrylamido) phénylboronique (AAPBA). En présence de glucose, le gonflement des gels est relativement faible dans un milieu à forte force ionique limitant les applications pour la délivrance d'actifs. Cependant, la présence d'un cristal colloïdal insérée dans la matrice de gel permet d'envisager des applications comme capteur de glucose [78].

Les changements d'hydrophobie peuvent également être utilisés pour désassembler d'autres types de structure tels que des micelles, des vésicules et des films. Des exemples sont répertoriés dans le tableau récapitulatif Tableau 2 (fin du paragraphe 2).

- *Relargage par modification de l'hydrophobie : cas des polymères thermosensibles*

Un cas particulier de la modification de l'hydrophobie des gels met en jeu l'utilisation de polymères thermosensibles. Cette famille de gels peut moduler sa solubilité en fonction de la température. Il existe deux cas de figure, dans le premier, le polymère devient hydrophile au-dessus d'une certaine température critique, ce polymère présente alors une UCST (Upper Critical Solution Temperature); dans le deuxième cas le polymère devient soluble au-dessous d'une température définie comme la LCST (Lower Critical Solution Temperature). Parmi les polymères thermosensibles, le poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM) fait figure de référence, il possède une LCST à 32°C, autour de laquelle il subit une transition réversible, où il passe d'une forme pelote aléatoire à un état globulaire en raison de la rupture des liaisons hydrogène à haute température. La solubilité dans l'eau devient ainsi limitée. Lorsque ces polymères sont utilisés pour former des gels, ils sont associés à un volume critique appelé VPTT (Volume Phase Transition Temperature), où le gel passe d'un état gonflé à un état collapsé autour de la LCST [79].

Kataoka, s'est appuyé sur ce principe en préparant des gels de copolymères de N,N'-diméthylacrylamide-co-PBA [80]. L'introduction de PBA abaisse la LCST du polymère, elle augmente en présence de glucose. De la même manière, des gels de pNIPAM-co-PBA ont montré une capacité à gonfler en présence de fructose

[25]. Ces travaux avant-gardistes de Kataoka, ont ouvert la voie à de nombreuses études utilisant des fonctions PBA en les combinant avec une grande variété d'hydrogels. Dans un premier temps, la plupart des formules développées combinaient les propriétés d'un polymère thermosensible avec celles d'un dérivé PBA. Deux stratégies existent : le greffage de dérivés PBA sur des gels déjà existants, [81]–[83] ou la préparation de microgels, par copolymérisation de monomères modifiés par des fonctions PBA. Cette dernière voie a été choisie initialement par notre équipe. Ainsi dans ses travaux de thèse, Christophe Ancla a synthétisé des microgels sensibles au glucose à force ionique physiologique, par copolymérisation de polymères thermosensibles poly(N-alkylacrylamide) modifiés par l'acide phénylboronique [84],[85]. Dans un second temps, de nouveaux matériaux ont été développés afin d'obtenir une réponse aux conditions physiologiques. Les microgels obtenus gonflent proportionnellement à la concentration en glucose. La libération cyclique d'insuline bovine fluorescente en fonction de la glycémie a été reportée.

2.2.4.3 Utilisation de la dissociation des hydrogels par déréticulation compétitive.

Le deuxième levier qui permet d'entraîner la libération d'insuline à partir des structures de polymères stimulables modifiés par des fonctions PBA, est de jouer sur le caractère réversible des complexes PBA/sucres pour induire à la demande une dissociation des structures. Kataoka a été pionnier dans l'utilisation des PBA comme ligand synthétique du glucose, il a dans un premier temps synthétisé des copolymères portant des fonctions PBA. Ces structures de poly(N-vinyl-pyrrolidone-co-PBA), complexent avec un polyol, le poly(vinyl alcohol) (PVA). Ces complexes se dissocient par compétition en présence de glucose. La cohésion de la matrice est assurée par la longueur du polyol qui se lie au copolymère à plusieurs endroits simultanément [30].

2.3 Présentation de systèmes plus élaborés en vue d'applications *in vivo*

2.3.1 Systèmes vecteur associé à un ligand du glucose

La stratégie mettant en jeu des fonctions PBA, paraît à ce jour très prometteuse pour mener à des études cliniques car en plus d'être glucose-dépendant, les systèmes développés n'ont pas les limites dues à leur stabilité et leur dégradation que l'on retrouve pour ceux utilisant la Con A ou la GOx. En effet, la GOx et la Con A sont sujettes à des phénomènes de dégradation enzymatique ou de fuite hors des vecteurs les contenant [85],[86]. L'enzyme GOx peut-être endommagée lors des étapes de mise en forme à cause d'une sensibilité à la température et au pH et perdre ainsi de sa bioactivité [87],[88]. De plus, la Con A est relativement instable et sa biotoxicité peut limiter ses applications *in vivo* [89]. Les PBA quant à eux sont des groupements synthétiques non dégradés *in vivo*, ils sont aussi liés chimiquement au gel, permettant le relargage de l'insuline sur plusieurs cycles.

La sélectivité de la liaison en fonction de la nature du diol, discutée plus haut (paragraphe 2.2.4.1) pourrait être considérée comme un frein à l'utilisation des PBA pour le relargage contrôlé en fonction de la glycémie. Cependant, le glucose est bien plus concentré dans le sang que ses compétiteurs, le fructose et le lactate par exemple. La sensibilité au glucose pourrait ne pas être affectée *in vivo*. Les mécanismes décrits montrent que

le caractère stimuable du gel dépend à la fois du pH et de la concentration en glucose [90],[30],[71]. Pour avoir des systèmes efficaces à pH physiologique, le pKa de l'espèce contenant le PBA doit être abaissé. Pour ce faire, le caractère électro attracteur du groupe vicinal au PBA doit être augmenté en introduisant par exemples des bases de Lewis, tel que des amines, [72], [91], [92].

Nous avons choisi de mettre en avant quelques systèmes qui nous paraissent particulièrement prometteurs en vue du développement de médicaments à boucle fermée pour l'administration d'insuline. En particulier les systèmes présentés ci-dessous sont choisis, car ils sont préparés à partir de systèmes biocompatibles parfois avec des systèmes proches des nôtres, Certains de ces systèmes ont entamé les essais clinique de phase

2.3.1.1 Réseau de nanoparticules modifié par la GOx.

Récemment, l'équipe de Gu a développé des réseaux innovants de polysaccharides tel que le chitosan [93] ou le dextran permettant le relargage d'insuline déclenché de manière asservie au glucose (Figure 9). Dans ces travaux, un dextran modifié est utilisé comme matrice biodégradable et biocompatible pour préparer une formulation injectable et dégradabile par voie acide. Des nanoparticules de dextran recouvertes d'alginate, chargées négativement, ou de chitosan, chargées positivement, sont préparées par une méthode d'émulsion double. Dans un deuxième temps, la glucose oxydase et l'insuline sont encapsulées. Un réseau est formé par interactions électrostatiques entre les nanoparticules. Le réseau de gel formé par les nanoparticules est stable, poreux et induit un grand ratio surface/volume, entraînant une meilleure interaction entre le glucose et la GOx. Cette structure poreuse se dissocie en cas d'hyperglycémie entraînant le relargage de l'insuline par la conversion catalytique du glucose en acide gluconique (Figure 9). Des études *in vitro* ont montré le relargage d'insuline par pulse en réponse au taux de glucose. Les recherches étendues *in vivo*, sur des souris diabétiques, ont montré qu'une injection permettait de stabiliser le taux de glucose au niveau basal pour 10 jours [94]. Ce système permet de contourner les limitations souvent observées lors de la mise en œuvre d'hydrogels polymériques et des systèmes utilisant la GOx. Les hydrogels de polymères, ont souvent des taux de réponse assez lents en raison des limitations dues au transport de l'insuline hors des structures. De plus, les systèmes mettant en jeu des membranes contenant de la GOx souffrent de mauvaise stabilité mécanique qui peuvent induire un relargage prématuré [36].

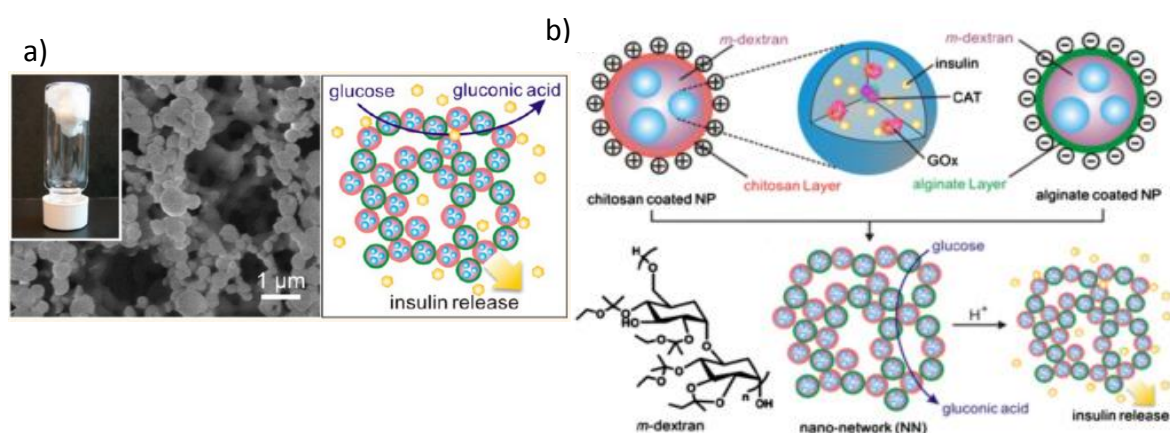


Figure 9: a) représentation schématique des réseaux de polysaccharides nanométriques sensibles au glucose et image de microscopie électronique à balayage du réseau de polysaccharide formé b) représentation des particules formant le réseau par interactions électrostatiques (extrait de [94]).

2.3.1.2 Réseaux de polymère de PEG en étoile modifiés par des fonctions PBA

Récemment, l'équipe de Langer, a initié des travaux sur la préparation de gels injectables, ses formulations présentent une baisse de viscosité avec le cisaillement, et sont auto-réparantes, permettant aux gels de retrouver leur intégrité après injection [95]. Parmi ces gels rhéofluidifiants, certains sont préparés à partir de dérivés PEG à quatre branches fonctionnalisés par différentes fonctions PBA ou des fonctions diols (Figure 10). De l'insuline fluorescente, et deux autres protéines la BSA et l'immunoglobuline (IgG) de tailles respectives de 5800, 66 000 et 150 000 g/mol ont été encapsulées, puis relarguées de manière contrôlée par compétition en présence de glucose. Les profils de diffusion suivent le modèle de Fick et sont corrélés aux tailles des protéines. [96].

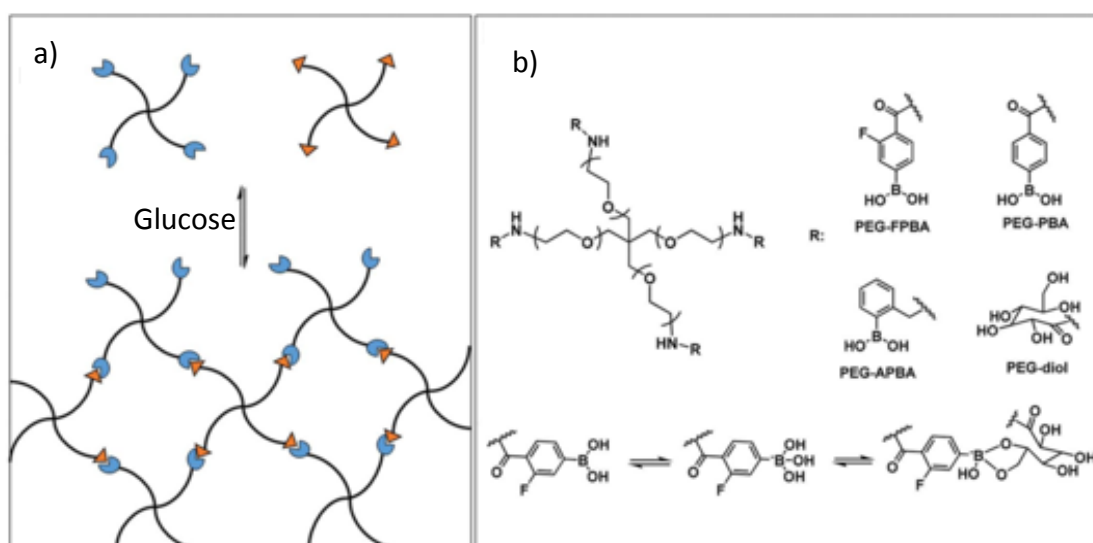


Figure 10 : Vers des hydrogels injectables a) Représentation schématique d'hydrogels formés à partir de PEG à quatre branches fonctionnalisées par des diols ou des PEG. b) Structures chimiques des macomères de PEG-PBA et PEG-diols et leur mécanisme de liaison (extrait de [96]).

2.3.2 Stratégie de modification de l'insuline

2.3.2.1 Modification de l'insuline par des fonctions acides phénylboroniques.

Une dernière stratégie mettant en jeu des fonctions acides phénylboroniques pour réguler la glycémie est à l'étude. Cette méthode ne met pas en jeu des polymères stimulables. Il s'agit de la modification directe de l'insuline. En effet, l'insuline peut être modifiée chimiquement ou génétiquement afin de moduler la pharmacocinétique de son activité, notamment par greffage en présence de dicyclohexyl- carbodiimide et de N-hydroxysuccinimide en conditions basiques. Des insulines dites à actions longues, ont été développées afin de limiter le nombre d'injections d'insuline nécessaire pour maintenir la glycémie au niveau basal [97]. Les équipes de Langer et Anderson ont préparé une nouvelle insuline qui combine cette action longue à une sensibilité au glucose par le biais de fonctions acide phénylboronique [98]. L'insuline est modifiée en ajoutant à l'amine du résidu lysine B 29 des fonctions composées d'une chaîne aliphatique et d'une terminaison PBA (Figure 11). Des fonctions fluor, nitro et sulfo sont introduites sur le cycle aromatique des PBA afin d'abaisser le pKa du PBA et favoriser une sensibilité au glucose à pH physiologique [99]. Les insulines modifiées obtenues ont permis une régulation du taux de glucose de souris atteintes de diabète de type 1 sur une période de 13h [98].

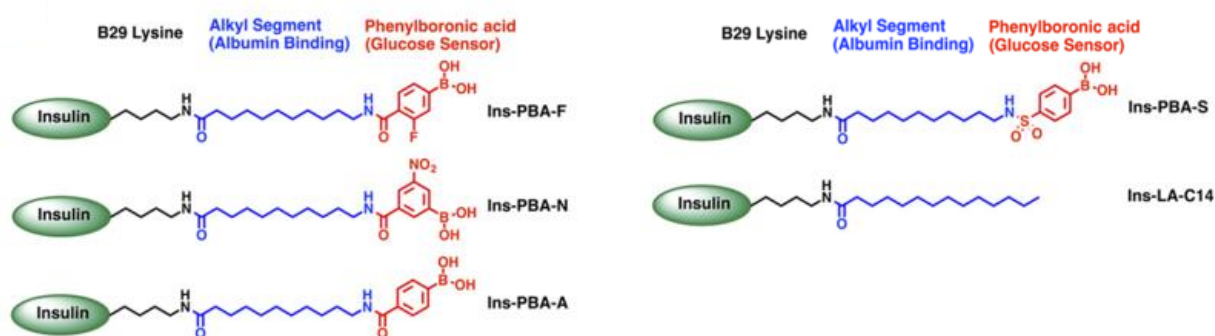


Figure 11 : a) Structure des quatre insulines modifiées par des fonction PBA (extrait de [98]).

Ces systèmes présentent plusieurs avantages: premièrement, ils peuvent permettre de réguler la glycémie sans introduire de vecteurs étrangers qui sont associés à des risques de réponses immunitaires. Deuxièmement, les analogues de l'insuline peuvent être inactivés à faible taux de glucose et ainsi limiter les cas d'hyperglycémie.

2.3.2.2 *Bio-orthogonalisation de l'insuline : projet « Smart Insulin »*

La formation de liaisons covalentes, est utilisée dans des processus de bio-orthogonalisation où les protéines sont liées à la matrice du vecteur qui a ainsi un rôle stabilisateur. Ainsi, l'entreprise Merck travaille sur le projet « SmartInsulin » où la protéine est liée de manière covalente à un polymère glycosylé, qui est relargué en présence de glucose, faisant baisser la glycémie dans le sang (Figure 12). Ce projet est en phase d'essai clinique. [33]. L'insuline, liée de manière covalente au polymère glycosylé, forme un réseau avec une molécule qui peut se lier de manière multivalente à l'insuline. Ce réseau est réversible en présence de glucose, en raison de l'affinité de ce dernier pour la molécule multivalente entraînant l'érosion du réseau. La libération d'insuline conjuguée au polymère glycosylé peut faire diminuer la glycémie ce qui implique l'arrêt de l'érosion du réseau, jusqu'au prochain pic glycémique.

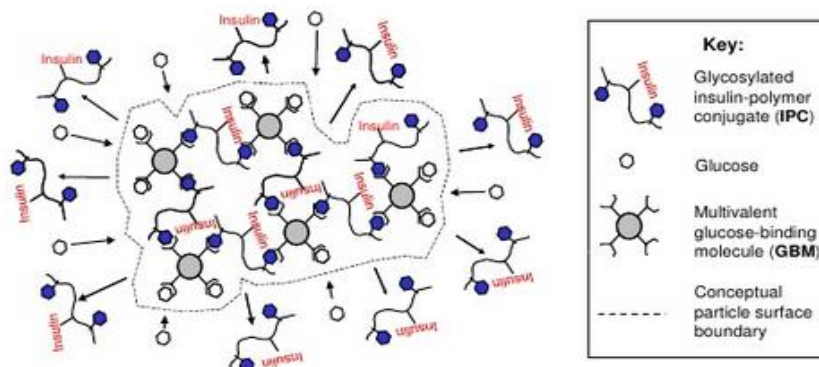


Figure 12 : représentation schématique du réseau formé par l'insuline conjuguée à un polymère glycosylé qui se lie à une molécule sensible au glucose de manière multivalente ; et représentation de l'érosion du réseau en présence de glucose entraînant la libération de l'insuline (extrait de [33]).

Afin de conclure cet aperçu non exhaustif des stratégies utilisées pour libérer l'insuline de manière asservie au glucose, un tableau résumant et classant les différentes stratégies est présenté (Tableau 2).

Tableau 2 : Récapitulatifs des stratégies de libération d'actifs à partir de polymères stimulables mis en forme en fonction du type d'architecture, du type de ligand du glucose, des leviers de stimulation des polymères et des mécanismes de libération

Type de récepteur	Type d'architecture	Type de matériau	Levier	Mécanisme	référence
Gox	Hydrogels	Gels méthacrylés	Changement de pH	Gonflement	[22], [23], [52]–[55], [100]–[102]
	liposomes	Léchitines ou phosphatidylcholines			[126], [127],[105]
	polymersome	Dibloc PEG		Désassemblage par hydrolyse	[31]
	microcapsule	Layer by layer Gox/hémoglobine		Augmentation de perméabilité	[27],[106]
	Films multicouches	Polymère en étoile		Réorganisations des couches et séparation de phase	[107]
	Nanoparticules	Silice mésoporeuse Cyclodextrine comme bouchon		Désobstruction des pores	[28]
Lectines	Hydrogels	Polymère modifié par Con A	Réticulation réversible		[58]–[66], [108]–[110]
	Liposome	PEG-glycosylés		Désassemblage d'agrégats de liposomes	[29]
	Microcapsule	Glycogène/Con A		Augmentation de perméabilité	[111]
	Nanoparticules	Silice mésoporeuse fonctionnalisés par des groupements mannoses		Désobstruction des pores	[112]
GBP	Hydrogels	Acrylamide	Changement de conformation		[67]–[69]

PBA	Hydrogels	Poly(N-vinyl-pyrrolidone-co-PBA)/PVA	Réticulation réversible	Dissociation des liaisons PBA/PVA par compétition	[30]
		Polyacrylamide-PBA	changement d'hydrophobie	gonflement	[78]
		pNIPAM, acrylamide		gonflement	[25], [79], [80], [85]
		HA-Maltose-HA-PBA	Réticulation réversible	Dissociation des liaisons PBA/Maltose par compétition	[113]
		PEG-PBA/PEG-diol	Réticulation réversible	Dissociation des liaisons PBA/PEG-diol par compétition	[96]
	Micelles	Copolymères amphiphiles modifiés PBA (Acrylamide, pNIPAM,...)	Réticulation réversible	Dissociation des liaisons par compétition	[114]–[117]
	Microcapsules/films	Layer by layer polymère PBA/polymère-diol (PAA, PVA/polymère-PBA)	Réticulation réversible	Dissociation des liaisons par compétition	[118]
		Polystyrene sulfonate/poly (dimethyl aminoethyl acrylate-PBA)	Réticulation réversible Polyélectrolytes	Dissociation des liaisons par changement de charges	[19]
	Nanoparticules hybrides	Particule de silice modifiée par des dextrans-PBA ou de l'acide gluconique-PBA	Réticulation réversible	Dissociation des liaisons par compétition	[119], [120]

3 Présentation de nos systèmes : des hydrogels d'acide hyaluronique sensibles au glucose

Après une présentation claire du cahier des charges, nous présenterons le polymère choisi pour composer la matrice des gels, avant de décrire plus précisément quels sont les matériaux sensibles au glucose qui ont été développés lors de la phase antérieure de ce projet.

3.1 Présentation du cahier des charges du projet

Comme mentionné précédemment, ce projet consiste à développer un nouveau système en boucle fermée afin de libérer l'insuline de manière asservie au glucose. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser des polymères stimulables et certaines spécifications sont nécessaires. Les polymères doivent être mis en forme pour servir de vecteur à l'insuline et doivent être modifiés par des fonctions sensibles aux sucres. Parmi les différents types de vecteurs présentés ci-dessus notre attention s'est portée plus particulièrement sur les hydrogels. Ils devront respecter les critères suivants :

- Le squelette polymérique choisi doit être biocompatible et être modifiable de manière à être réticulé pour mener à des hydrogels, et posséder des fonctions sensibles au glucose. Il doit également être biodégradable avec des sous-produits de dégradation non-toxiques.
- Les matrices de gel doivent être, administrables *in vivo*, et pouvoir dans l'idéal accéder à la circulation sanguine et avoir un temps de circulation prolongé. Pour cela la taille des vecteurs doit être inférieure à 400 nm. Les gels peuvent également être administrés sous forme de dépôt sous-cutané. A ce stade du projet les gels n'ont pas de spécifications de tailles requises
- Les réponses aux variations de glycémie doivent être rapides et les cinétiques de libération doivent être adaptées au métabolisme c'est-à-dire simuler l'activité pancréatique en réponse aux variations du taux de glucose.
- Le processus de libération doit être réversible, seule une partie de l'insuline est libérée quand le taux de glucose augmente, permettant le maintien de la glycémie au niveau basal pour plusieurs pics de glycémie et ainsi pouvoir diminuer le nombre d'injections. De plus, en absence de pic glycémique, la libération ne doit pas avoir lieu.

Notons que pour les deux voies d'administration envisagées : des nanogels injectables ou des micro/macrogels implantables, les cinétiques de libération et les taux de chargements en insuline seraient différents. En effet, pour l'utilisation de nanogels les taux de chargements atteints peuvent être limités par la taille, les variations de glycémie dans le sang sont rapidement détectées car les gels sont circulants et de petites tailles et la libération d'insuline sera rapide. A l'inverse, des micro/macrogels en dépôts sous cutanés peuvent avoir de plus grandes capacités de chargement en insuline, la détection des variations de glycémie dans le sang est retardée de par la localisation du dépôt sous cutanée, et enfin les cinétiques de libération sont plus lentes en raison de la taille du dépôt. L'une ou l'autre de ces solutions est envisageable, tant que la régulation de la glycémie est efficace, rapide, et réversible. Une grande capacité d'encapsulation est envisagée afin d'espacer au maximum les injections.

3.2 L'acide hyaluronique : un polymère matriciel prometteur

Les hydrogels peuvent être séparés en deux groupes en fonction de l'origine du polymère qui peut être naturel ou synthétique [11],[121]. Les hydrogels synthétiques sont préparés grâce à des méthodes de polymérisation. Des approches plus récentes utilisent des techniques d'ingénierie génétique ou des méthodes de biosynthèse pour préparer des hydrogels aux propriétés spécifiques [137],[138]. La deuxième catégorie est celle des hydrogels préparés à partir de polymères naturels tels des protéines comme le collagène ou la gélatine ou les polysaccharides tels que les alginates, l'agarose, le dextran ou l'acide hyaluronique. Parmi eux, certains présentent une faible toxicité, une très bonne compatibilité, en particulier pour ceux déjà présents *in vivo* et très hydrophiles. Pour cette étude, nous nous intéresserons donc à un polysaccharide: l'acide hyaluronique (HA).

3.2.1 Le HA, un biopolymère aux nombreuses propriétés utilisables pour des applications ciblées

Il est déjà utilisé depuis plusieurs décades pour la chirurgie des yeux [124],[125] mais un intérêt récent est apparu pour son utilisation comme biopolymère en médecine régénérative et en ingénierie tissulaire [126]. L'acide hyaluronique est plus connu du grand public pour ses applications en dermocosmétique où il est utilisé en injection pour combler les rides [127],[128]. Il est aussi employé pour soigner les articulations, car il permet leur lubrification en vue de soigner l'ostéo-arthrose grâce à ses propriétés viscoélastiques [129],[130]. Ses assemblages sont utilisés pour de nombreuses applications : ils permettent notamment d'augmenter la biodisponibilité des médicaments ophtalmiques en améliorant leur durée de vie oculaire [131],[132].

Le HA est aussi un bon candidat pour la délivrance d'actifs par voie transdermale en raison de ses propriétés hygroscopiques, et de sa capacité à hydrater le stratum corneum. De plus, de nombreux récepteurs du HA sont présents dans les cellules de la peau, notamment des kératinocytes dans l'épiderme et des fibroblastes dans le derme [133]. Il a également été montré que, la présence de zones plus hydrophobes dues aux liaisons C-H de son squelette, améliore sa capacité à traverser le stratum corneum [133]. Il est ainsi utilisé pour l'administration de différents cargos comme des actifs, des vaccins, des facteurs d'hormones ou des nanomatériaux.

L'acide hyaluronique a de nombreuses particularités exploitables pour une large gamme d'applications. Son utilisation permet de cibler des maladies concernant de nombreux organes du corps humain. Le HA, permet de prolonger le temps de résidence *in vivo* des principes actifs et présente une très faible cytotoxicité. Dans la dernière décennie, les dérivés de HA ont été étudiés en tant que transporteurs d'actifs anti-cancéreux car ils permettent de cibler les cellules cancéreuses en limitant ainsi les effets secondaires. En effet le HA possède la faculté de se lier à des récepteurs spécifiques tels que les CD44, RHAMM, HARE et LYVE [134]. Ces récepteurs sont présents sur différents organes et jouent des rôles centraux dans la prolifération, la différenciation ou la migration de cellules par activation de signalisation. La présence de ces récepteurs et leurs facultés d'interaction avec le HA en font un candidat de choix pour la délivrance d'actif spatio-contrôlée. Les récepteurs HARE sont surexprimés dans les cellules endothéliales sinusoidales du foie et les

récepteurs CD44 le sont dans les foies malades [135],[136] permettant d'utiliser des conjugués HA-actifs dans le traitement de maladie comme l'hépatite C [137],[138]. Dans le cas du cancer de la peau les récepteurs du HA sont surexprimés à la surface des cellules cancéreuses améliorant l'endocytose des cellules touchées [139].

L'acide hyaluronique, présent *in vivo*, est un composé essentiel de la matrice extra cellulaire, où il joue un rôle structurel notamment en termes d'organisation matricielle [140]. Il est aussi mis en jeu dans la morphogénèse, la réparation ou la signalisation cellulaire [141],[142].

3.2.2 Présentation générale de l'acide hyaluronique:

3.2.2.1 Structure de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un disaccharide linéaire naturel de la famille des glycosaminoglycanes. Isolé pour la première fois par Meyer et Palmer en 1934, il est largement présent *in vivo* chez de nombreux animaux mais aussi chez l'homme [143]. Il est composé de deux unités de répétitions le N acétyl-*D*-glucosamine et *D*-glucuronique acide se liant par des liaisons glycosidiques alternativement β 1,3 ou β 1,4 [144] (Figure 13).

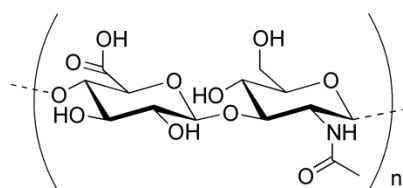


Figure 13 Structure chimique de l'acide hyaluronique.

Le HA possède des fonctions hydrophiles comme des hydroxyles, des carboxyles et des acétamides qui interagissent avec les molécules d'eau en faisant un polymère hautement hydrosoluble [145],[146]. Ces fonctions, encombrantes stériquement, se placent en positions équatoriales plus favorables énergétiquement. Elles limitent la rotation libre autour des liaisons glycosidiques du squelette entraînant une certaine rigidité de la chaîne. Les positions axiales sont occupées par des atomes d'hydrogène créant des zones de plus faible hydrophilie dans le squelette [147]. A pH physiologique, chaque unité glucuronate porte une charge négative.

3.2.2.2 Un polymère biocompatible et dégradable

En tant que polysaccharide omniprésent *in vivo*, sa biocompatibilité n'est pas controversée contrairement à celle d'autres polymères tels que les polyéthylènes glycols (PEG), les acides poly(acide lactiques-co-glycolique) (PLGA) [148],[149] ou même que d'autres polysaccharides comme le chitosan qui présentent des effets secondaires significatifs en cas d'administration par voie intraveineuse qui peuvent déclencher des phénomènes d'agrégation à haute concentration [150]. De plus, l'acide hyaluronique est dégradé rapidement *in vivo* par une enzyme spécifique appelée hyaluronidase [151]. Les cinétiques de dégradation sont contrôlées par des modifications chimiques de la chaîne [152],[153]. Ces propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité font du HA un polymère d'intérêt pour des applications biomédicales.

3.2.3 Les modifications chimiques du HA

Le HA peut être facilement modifié chimiquement afin de moduler son hydrophobicité, ou par exemple pour ajouter des fonctions réticulables. Une large gamme de fonctions chimiques peut être greffée sur le HA par modification de l'acide carboxylique, de l'acide glucuronique ou du carbone C-6 du groupe hydroxyle du sucre N-acétylglucosamine. Ces modifications peuvent être classées en deux catégories, les modifications dites monolithiques ou les modifications dites vivantes qui permettent de greffer des fonctions ultérieurement modifiables ou réticulables. Parmi les modifications monolithiques on retrouve par exemple, le greffage d'ester benzylique. Parmi les modifications laissant la chaîne de HA vivante, une grande variété de motifs peut être greffée. En vue de préparer des hydrogels, ces modifications peuvent être classées en deux catégories, celles qui forment des gels par liaisons covalentes et celles qui forment des gels par auto-assemblage non covalent.

3.2.3.1 *Dérivés de HA gélifiant par formation de liaisons covalentes*

Dans cette première catégorie de dérivés de HA, on retrouve des composés qui nécessitent la présence d'un amorceur pour initier une réticulation par photopolymérisation ou électropolymérisation et d'autres qui vont gélifier de manière spontanée. Parmi les dérivés gélifiant spontanément, on retrouve les HA modifiés par condensation ou addition par des fonctions thiol, haloacétate, dihydrazide, aldéhyde, ou tyramide (Figure 14).

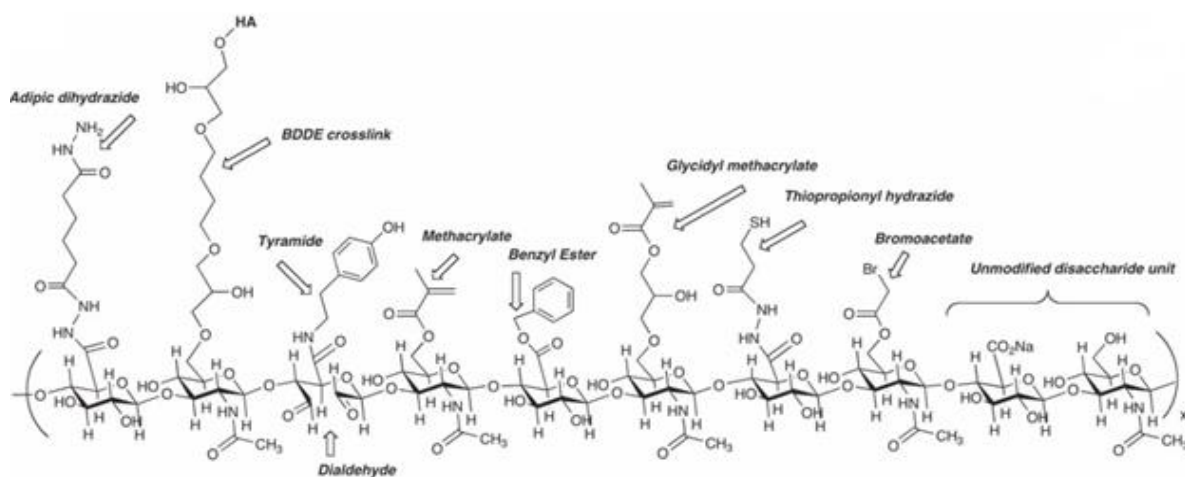


Figure 14: Modification de l'acide hyaluronique : représentation des dérivés de HA conventionnels.

Plus récemment l'acide hyaluronique a été modifié par des groupements pouvant mettre en œuvre la chimie orthogonale dite chimie click ou pseudo-click. Cette chimie met en jeu des réactions de cycloaddition [3+2] pour les dérivés HA-cyclooctyne ou HA-azide [154], de Diels-Alder avec des dérivés HA-furan ou HA-Malimide [155], de Mickael pour des dérivés HA-maleimide [156], ou de photopolymérisation par chimie thiol-ene pour les dérivés HA-tétrazine [157] (Figure 15).

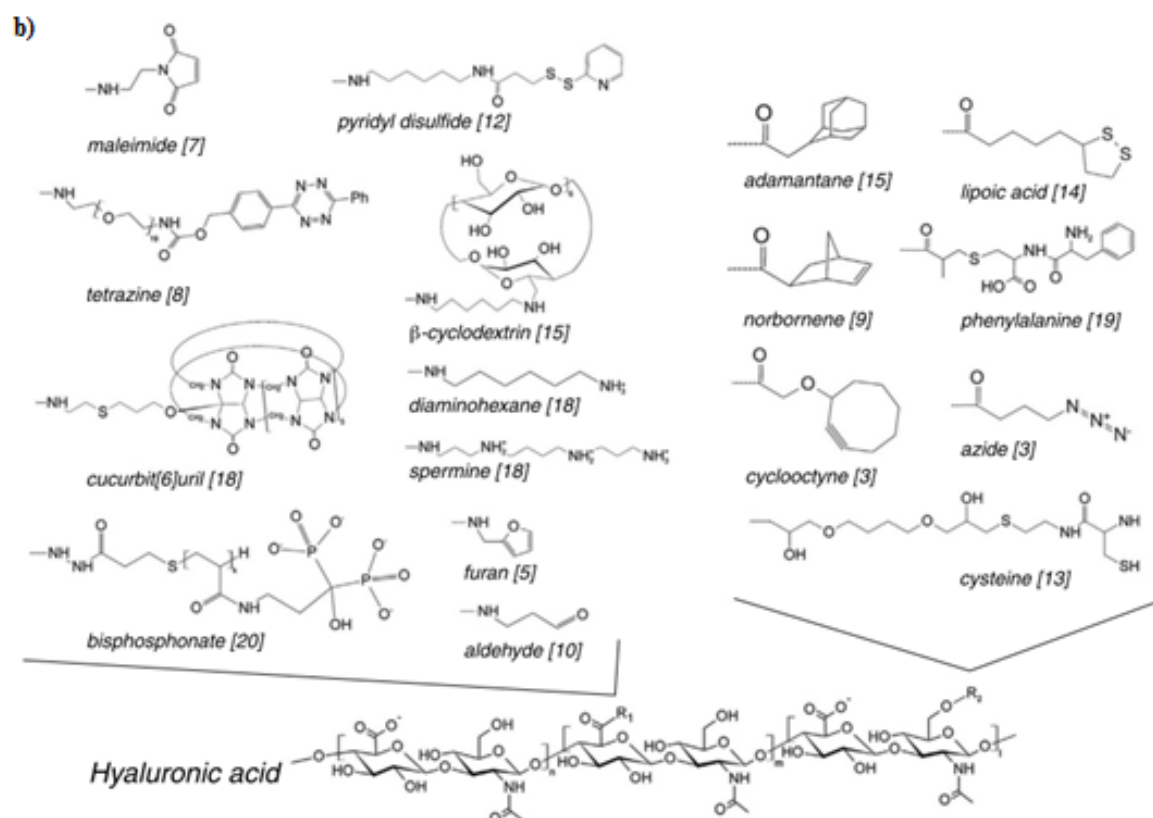


Figure 15: Modification de l'acide hyaluronique : représentation des dérivés de HA développés récemment permettant d'ouvrir la voie à de nouvelles voies de glycosylation.

Ainsi, certains de ces composés nécessitent la présence d'un amorceur pour obtenir des gels. La réticulation est déclenchée par voie radicalaire amorcée par voie thermique, lumineuse ou redox.

L'utilisation de ces techniques permet de travailler en milieu aqueux et assure un grand contrôle de la réticulation en termes de spatialité et de temporalité [158]. La photopolymérisation est la méthode la plus utilisée pour la formation d'hydrogels de HA, elle permet l'encapsulation de cellules en utilisant des conditions de polymérisation douces n'affectant pas la viabilité de ces dernières [159]. Différents groupes réactifs peuvent être employés, pour la polymérisation radicalaire du HA. Les plus utilisés sont les dérivés acrylates, glycidyl-méthacrylates et méthacrylates.

La fonctionnalisation du HA par des fonctions glycidyles méthacrylates (GMA) a été décrite par Schmidt *et al* [160] permettant la préparation d'une large gamme d'hydrogels. Des taux de fonctionnalisation jusqu'à 90% peuvent être atteints en utilisant de longs temps de réaction à température ambiante conduisant à des hydrogels très robustes grâce à de très fortes densités de réticulation [160]. A l'inverse, la préparation de dérivés HA-GMA à très faible densité de réticulation permet d'obtenir des pseudo-gels au comportement viscoélastique [161]. Les gels obtenus montrent une très bonne biocompatibilité et une réponse favorable en termes de cyto-compatibilité, permettant l'utilisation *in vivo* [162]. Une des méthodes les plus utilisées pour la modification du HA avec des fonctions méthacrylates a été décrite par Grinstaff, elle consiste en la modification du HA en milieu aqueux basique pour former du HA-méthacrylate [163],[164]. Les hydrogels obtenus sont très versatiles et les propriétés des réseaux obtenus sont modulables en faisant varier, la masse moléculaire du HA, le degré de méthacrylation, et la concentration en macromères permettant de contrôler

la rigidité, le gonflement et permettant de moduler les cinétiques de dégradations par action de la hyaluronidase.

3.2.3.2 Dérivés de HA gélifiant par auto-assemblage non covalent

D'autres méthodes pour former des hydrogels ont été développées, elles mettent en jeu des assemblages dynamiques non covalents. Ces réactions sont réversibles: l'assemblage ou le désassemblage peut être déclenché en fonction de paramètres physiques ou chimiques. La formation de gels à partir de dérivés HA-hôte/ HA-invités tel que β -cyclodextrine (hôte)/adamantate (invité) ou cucurbit[8]uril (hôte)/ diaminohexane (invité) a été reportée. Ces formulations ont des propriétés intéressantes notamment leur injectabilité due au caractère réversible de la liaison [165]–[168] (Figure 15). Des films préparés à partir de dérivés d'acide hyaluronique modifié par des fonctions decylamino hydrazide ont également été reportés. Ils ont la capacité de s'autoassembler pour former des gels transparents [169].

3.2.4 Stratégies d'utilisation du HA pour des applications biomédicales

3.2.4.1 Présentation des stratégies pour l'utilisation du HA

Différentes stratégies, peuvent être mise en œuvre, afin d'utiliser le HA pour des applications biomédicales notamment pour la délivrance d'actifs. Le HA peut être combiné avec d'autres polymères tel que le polyéthylène glycol [170], les polyacides lactiques, les poly(acide lactique-co-glycolique) acide [171], [172], la polycaprolactone [173], les polyacrylates [174], ou même le chitosan [175], afin de combiner les propriétés des différents polymères. Il peut également être modifié pour former des auto-assemblages. Deux stratégies sont utilisées, la première consiste à conjuguer directement le principe actif sur la chaîne de HA. La deuxième consiste à modifier l'hydrophobie du HA chimiquement pour former des auto-assemblages thermodynamiquement favorables. Dans les deux cas, le polymère modifié se réarrange pour minimiser ses interactions avec l'eau provoquant la création de structures auto-assemblées. Ces systèmes ont de nombreux avantages, des composés hydrophobes peuvent être encapsulés au cœur des assemblages, ils sont relativement stables et leur déstabilisation peut être déclenchée spécifiquement. De plus, la partie hydrophile du polymère à l'extérieur de l'auto-assemblage peut permettre de cibler le relargage. Enfin, de par sa nature réticulable, le HA peut former des hydrogels, et servir de vecteur pour des principes actifs. Sous cette forme il permet non seulement de protéger le cargo contre des environnements hostiles mais aussi de le relarguer dans le milieu en fonction de stimuli externes.

3.2.4.2 Cas des hydrogels de HA

Ainsi de manière plus spécifiques, les hydrogels d'acide hyaluronique peuvent être utilisés pour de nombreuses applications biomédicales comme le contrôle du comportement de cellules souches [176], la réparation cardiaque [177] ou l'ingénierie de valves cardiaques [178],[179] et la délivrance d'actifs. Les hydrogels de HA-MA ont été utilisés pour l'encapsulation de chondrocytes de tailles variables (50 à 110 kDa) et pour différentes concentrations en macromères (2 à 20 %wt) afin d'évaluer l'impact des gels sur la formation de cartilage. Les formulations d'hydrogels optimisés ont permis d'imiter la formation native de

cartilage ouvrant la voie à des applications pour leur régénération, [180]. Les hydrogels de HA peuvent également être utilisés comme substituts biologiques aux valves cardiaques endommagés en raison de la présence de HA dans les valves natives [178].

Ainsi, l'acide hyaluronique répond aux critères pour être un vecteur potentiel de l'insuline. C'est un polymère modifiable, biocompatible et dégradable.

3.3 Vers des nanogels d'acide hyaluronique modifié par des fonctions PBA.

3.3.1 Vers des systèmes de taille nanométrique

Récemment, lors des travaux de thèse de Léa Messenger, notre équipe s'est concentrée sur la préparation de gels nanométriques de polysaccharides en vue de développer de nouveaux systèmes pour la délivrance d'insuline [181]. L'intérêt de matériaux dans cette gamme de taille, est de pouvoir atteindre la circulation sanguine et d'augmenter le temps d'action mais aussi d'accéder à des cinétiques de réponse plus rapides permettant d'imiter l'activité pancréatique. Ainsi, la préparation de nanogels d'acide hyaluronique a pu être réalisée [182]. Léa Messenger a pu préparer des nanogels d'acide hyaluronique de première génération (HA-MA-PBA) réticulés grâce à des fonctions méthacrylates, et fonctionnalisés par des fonctions PBA par mini-émulsion inverse. Les précurseurs utilisés sont hydrosolubles et restent confinés dans les gouttes d'eau. La réaction est alors amorcée par irradiation UV déclenchant la réticulation des chaînes. Le taux de conversion des méthacrylates est contrôlé par le choix des paramètres expérimentaux de photopolymérisation tels que la puissance de la lampe UV et le temps d'irradiation. Les gels sont alors purifiés et redispersés dans l'eau. (Figure 16 a). Des nanogels monodisperses sont obtenus et caractérisés par microscopie électronique en transmission (TEM) et par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Figure 16 b et c). Le contrôle de la taille des gouttes de l'émulsion permet d'obtenir des gels monodisperses.

Cependant, la sensibilité des gels vis-à-vis du glucose, n'a pas été mise en évidence. Ces systèmes, obtenus après photopolymérisation, nécessitent le chargement en insuline par diffusion, après la préparation des nanogels afin de limiter l'exposition de la protéine aux UV. De plus, de nouvelles chimies plus douces ont été étudiées, utilisant un amorçage redox ou thermique ou par introduction de thiols. Les nanogels marqués par un fluorophore ont été injectés en sous-cutanée à des souris. 5 jours après administration, les souris sont toujours vivantes et les gels toujours visibles au niveau du point d'injection montrant la biocompatibilité des systèmes.

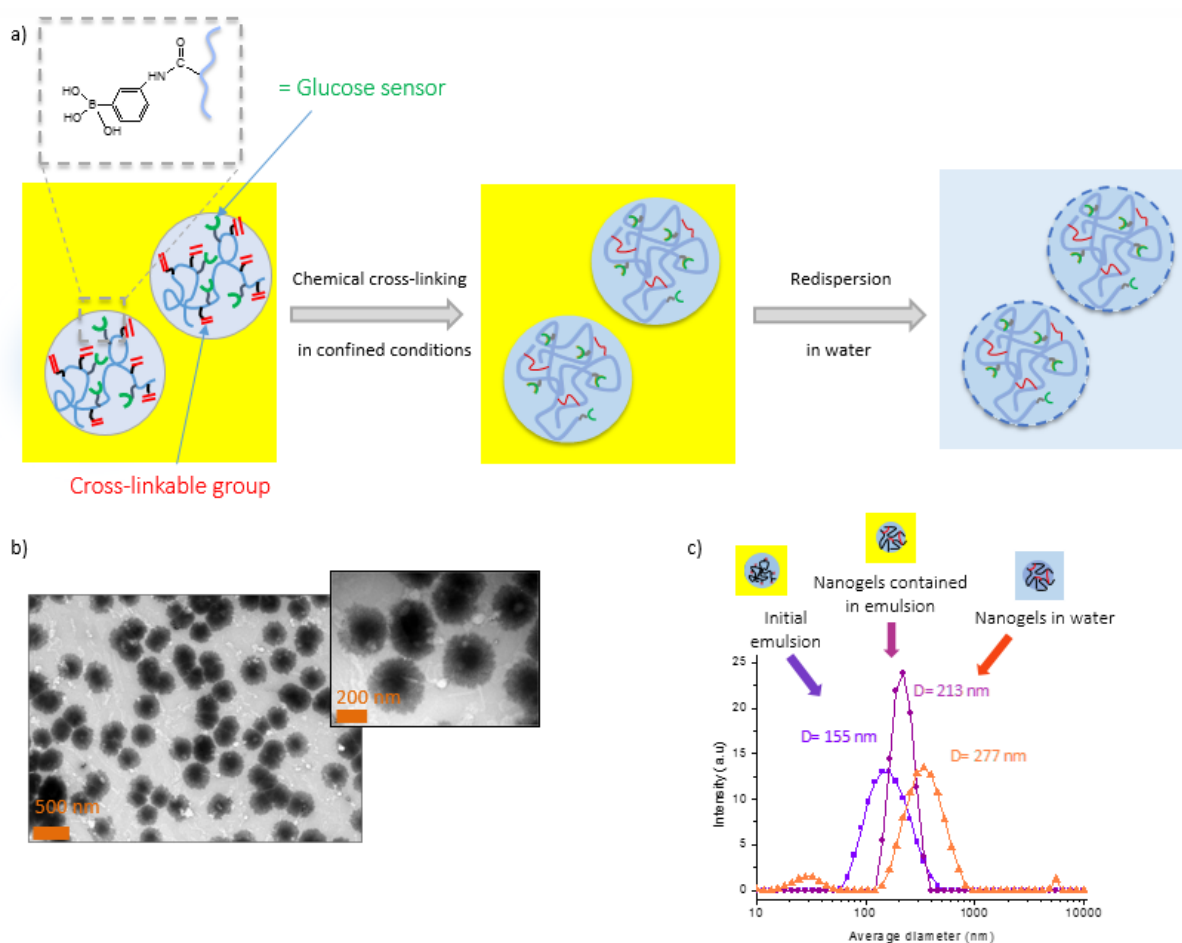


Figure 16 : a) représentation schématique de la préparation de nanogels sensibles au glucose b) image TEM des nanogels d'acide hyaluronique sensibles au glucose c) profil de DLS montrant les tailles de gouttes ou de nanogels aux différentes étapes de fabrication (adapté de [181]).

3.3.2 Vers des systèmes doublement réticulés injectables

Egalement dans l'optique de préparer des hydrogels mis en forme pour des applications *in vivo*, des systèmes injectables ont été mis au point par nos collaborateurs au laboratoire CERMAV (Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales). Ainsi, des systèmes auto-assemblés mettant en jeu des liaisons Maltose-PBA ont été développés. Dans ces travaux, l'acide hyaluronique a été modifié soit par des fonctions PBA, soit par des fonctions maltose. Mis en présence, les deux précurseurs s'auto-assemblent par formation de l'ester de boronate, donnant lieu à des gels pH sensibles, autoréparants au comportement viscoélastique, ces gels sont désignés comme gels de seconde génération. Leur préparation a lieu en milieu neutre. Les taux de substitution des gels en PBA et Maltose permettent de contrôler l'élasticité des gels. Les valeurs d'élasticité sont à l'équilibre, assimilées aux modules élastique G' des gels. Les liaisons sont également réversibles en présence de glucose, ouvrant des applications pour la délivrance d'insuline (Figure 17). La réponse au glucose peut être modulée en faisant varier les ratios PBA/maltose. [113].

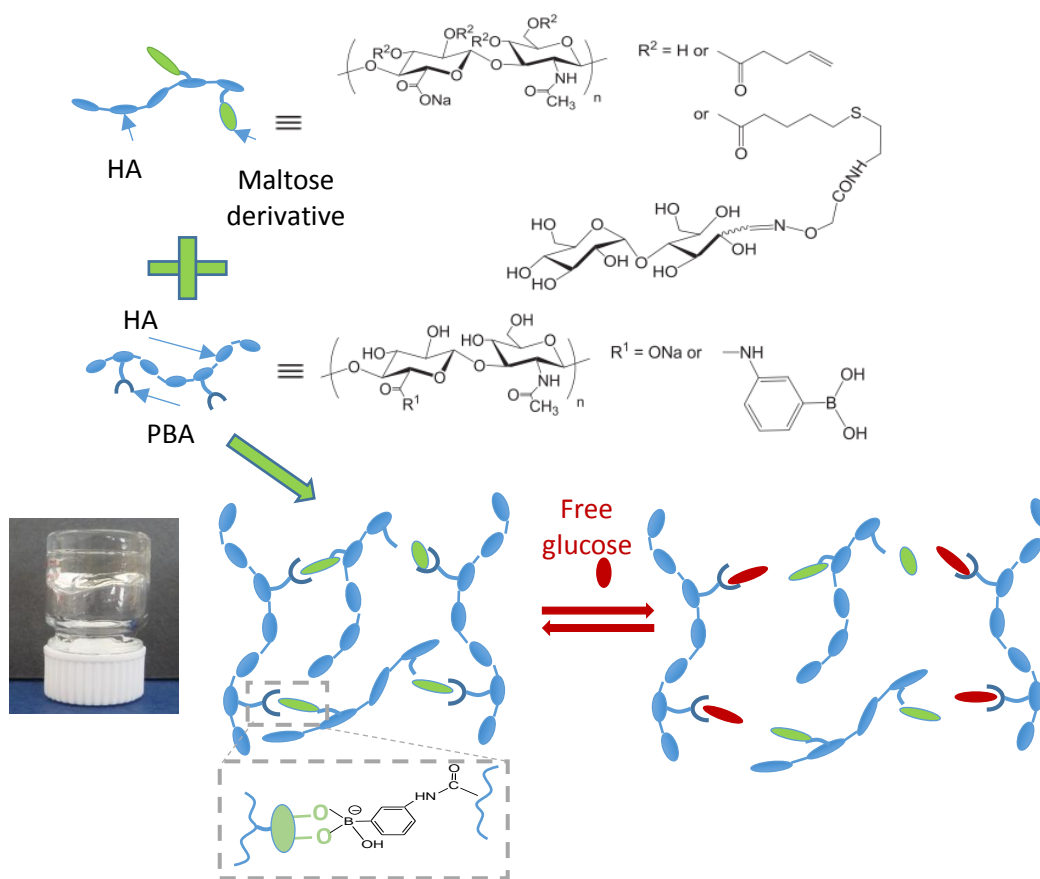


Figure 17 : Vers des hydrogels injectables Représentation schématique des liaisons covalentes dynamiques entre des dérivés d'acide hyaluronique fonctionnalisés par des fonctions maltose et PBA à des conditions physiologiques. Les dérivés mis en présence forment des hydrogels glucose sensible. Les liaisons sont réversibles en présence d'un monosaccharide en compétition avec les liaisons maltose-PBA (adapté de [113]).

4 Projet LOOPING

4.1 Intérêt de l'étude des interactions protéines/gels : vers un meilleur contrôle de l'encapsulation et du relargage de protéines

L'étude des systèmes présentés dans les paragraphes précédents, reste à approfondir. Des gels de première génération d'acide hyaluronique réticulés grâce à des fonctions méthacrylates et des gels de seconde génération auto-assemblés de dérivés HA-Maltose/HA-PBA feront l'objet de nos travaux. Ainsi de manière préalable, des matériaux sensibles au glucose ont été développés, mais ils ne sont pas maîtrisés en termes de délivrance d'insuline. L'objectif de ce travail est de comprendre les mécanismes qui régissent l'encapsulation et la libération de protéines telles que l'insuline dans ces matrices de gels. Comme nous le verrons, les matériaux qui ont été développés peuvent se comporter de façon complexe vis-à-vis d'une protéine. L'association d'un biopolymère, de type polyélectrolyte, modifié par des fonctions boronates présentant des

propriétés d'hydrophobie, constitue en soi, un matériau relativement complexe en milieu aqueux. En outre, les étapes de mise en forme à l'échelle colloïdale peuvent en modifier les propriétés si elles ne sont pas maîtrisées. La structure des gels ou nanogels doit être également mieux cernée.

L'enjeu de ce travail de thèse est donc d'établir une relation structure des gels-propriétés d'encapsulation/délivrance de l'insuline, en distinguant les paramètres chimiques (nature des greffons, taux de substitution, impact de la présence de sucre) et physiques (réticulation, distribution de pores, taille du système) des gels. Il doit permettre d'apporter un guide de formulation et de sélectionner les candidats idéaux pour cet enjeu.

Ce projet doit donc permettre de pouvoir déterminer la potentialité de ces systèmes.

4.2 Organisation de la thèse

La partie expérimentale de ce manuscrit s'articule en trois chapitres où les systèmes sont étudiés à différentes échelles. Dans un premier temps, l'aspect préparation des matériaux est abordé à l'échelle micrométrique en vue de l'étude des interactions avec les protéines, et à l'échelle nanométrique en vue de la préparation de gels circulants et injectables. Dans un second temps, des gels de dérivés de HA sont étudiés à l'échelle micrométrique afin d'observer les interactions éventuelles entre les formulations et des protéines modèles. Dans un troisième temps, suite à l'identification de formulations prometteuses, des études de quantification de l'insuline encapsulée et relarguée en fonction de la présence de sucre dans le milieu sont réalisées à l'échelle macrométrique.

Ce manuscrit comprend un deuxième chapitre bibliographique, qui présente la complexité des protéines à travers la présentation de la protéine d'intérêt pour le traitement du diabète: l'insuline. Ce deuxième chapitre fait un état des lieux des interactions reportés dans la littérature entre des protéines modèles et des polymères ainsi que les techniques disponibles pour mener ce type de travaux. Une attention particulière est portée à l'étude des interactions entre des protéines et des hydrogels et aux effets en termes d'encapsulation et de libération des protéines. Ce chapitre permet de mieux appréhender les concepts abordés dans le chapitre 4, concernant l'étude des interactions protéines/gels à l'échelle micrométrique.

Références :

- [1] P. J. Flory and B. Erman, "Critical Phenomena and Transitions in Swollen Polymer Networks and in Linear Macromolecules.," *Am. Chem. Soc. Polym. Prepr. Div. Polym. Chem.*, vol. 26, no. 2, p. 34, 1985.
- [2] P. J. Flory, *Principles of polymer chemistry*, First Edit. Cornell University Press, 1953.
- [3] C. Kantak, Q. Zhu, S. Beyer, T. Bansal, and D. Trau, "Utilizing microfluidics to synthesize polyethylene glycol microbeads for Förster resonance energy transfer based glucose sensing," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 2, 2012.
- [4] H. Shibata, Y. J. Heo, T. Okitsu, Y. Matsunaga, T. Kawanishi, and S. Takeuchi, "Injectable hydrogel microbeads for fluorescence-based in vivo continuous glucose monitoring," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 42, pp. 17894–17898, 2010.
- [5] A. D. Jadhav *et al.*, "Photoresponsive microvalve for remote actuation and flow control in microfluidic devices," *Biomicrofluidics*, vol. 9, no. 3, p. 34114, 2015.
- [6] N. M. B. Smeets and T. Hoare, "Designing Responsive Microgels for Drug Delivery Applications," *J. Polym. Sci. part A Polym. Chem.*, vol. 51, pp. 3027–3043, 2013.
- [7] M. Björnalm, Y. Yan, and F. Caruso, "Engineering and evaluating drug delivery particles in microfluidic devices," *J. Control. Release*, vol. 190, pp. 139–149, 2014.
- [8] R. Riahi, A. Tamayol, S. A. M. Shaegh, A. M. Ghaemmaghami, M. R. Dokmeci, and A. Khademshosseini, "Microfluidics for advanced drug delivery systems," *Curr. Opin. Chem. Eng.*, vol. 7, pp. 101–112, 2015.
- [9] M. Chau *et al.*, "Microfluidic generation of composite biopolymer microgels with tunable compositions and mechanical properties," *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 7, pp. 2419–2425, 2014.
- [10] T. Rossow *et al.*, "Controlled synthesis of cell-laden microgels by radical-free gelation in droplet microfluidics," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 10, pp. 4983–4989, 2012.
- [11] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Hydrogels for Tissue Engineering," *Chem. Rev.*, vol. 101, no. 7, pp. 1869–1879, 2001.
- [12] L. E. Bromberg and E. S. Ron, "Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 31, no. 3, pp. 197–221, 1998.
- [13] P. Gupta, K. Vermani, and S. Garg, "Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery," *Drug Discov. Today*, vol. 7, no. 10, pp. 569–579, 2002.
- [14] S. Maeda, Y. Hara, T. Sakai, R. Yoshida, and S. Hashimoto, "Self-walking gel," *Adv. Mater.*, vol. 19, no. 21, pp. 3480–3484, 2007.
- [15] G. S. Kumar and D. C. Neckers, "Photochemistry of azobenzene-containing polymers," *Chem. Rev.*, vol. 89, no. 8, pp. 1915–1925, 1989.
- [16] T. Miyata, T. Uragami, and K. Nakamae, "Biomolecule-sensitive hydrogels," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. 1, pp. 79–98, 2002.
- [17] F. . Donnan, "Theory of membrane equilibria and membrane potentials in the presence of non-dialysing electrolytes. A contribution to physical-chemical physiology," *J. Memb. Sci.*, vol. 100, pp. 45–55, 1995.
- [18] J. . Overbeek, "The donnan equilibrium," *Prog. Biophys. Biophys. Chem.*, vol. 6, pp. 57–84, 1956.
- [19] B. G. De Geest, A. M. Jonas, J. Demeester, and S. C. De Smedt, "Glucose-responsive polyelectrolyte capsules," *Langmuir*, vol. 22, no. 11, pp. 5070–5074, 2006.
- [20] C. Li *et al.*, "Host-guest assembly of pH-responsive degradable microcapsules with controlled drug release behavior," *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, no. 36, pp. 17651–17659, 2011.
- [21] X. Zhang, Y. Guan, and Y. Zhang, "Dynamically bonded layer-by-layer films for self-regulated insulin release," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 32, p. 16299, 2012.
- [22] K. Ishihara, M. Kobayashi, N. Ishimaru, and I. Shinohara, "Glucose Induced Permeation Control of Insulin through a Complex Membrane Consisting of Immobilized Glucose Oxidase and a Poly(amine)," *Polymer Journal*, vol. 16, no. 8. pp. 625–631, 1984.
- [23] G. Albin, T. A. Horbett, and B. D. Ratner, "Glucose sensitive membranes for controlled delivery of insulin: Insulin transport studies," *J. Control. Release*, vol. 2, pp. 153–164, Nov. 1985.
- [24] N. Kashyap, B. Viswanad, G. Sharma, V. Bhardwaj, P. Ramarao, and M. N. V Ravi Kumar, "Design and evaluation of biodegradable, biosensitive in situ gelling system for pulsatile delivery of insulin," *Biomaterials*, vol. 28, no. 11, pp. 2051–2060, 2007.
- [25] K. Kataoka, H. Miyazaki, and M. Bunya, "Totally Synthetic Polymer Gels Responding to External Glucose Concentration: Their Preparation and Application to On - Off Regulation of Insulin Release," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, no. 1, pp. 12694–12695, 1998.
- [26] T. Hoare and R. Pelton, "Charge-switching, amphoteric glucose-responsive microgels with

- physiological swelling activity," *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 2, pp. 733–740, 2008.
- [27] W. Qi, X. Yan, L. Duan, Y. Cui, Y. Yang, and J. Li, "Glucose-sensitive microcapsules from glutaraldehyde cross-linked hemoglobin and glucose oxidase," *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 5, pp. 1212–1216, 2009.
- [28] P. Díez *et al.*, "Toward the design of smart delivery systems controlled by integrated enzyme-based biocomputing ensembles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 25, pp. 9116–9123, 2014.
- [29] E. Karathanasis, R. Bhavane, and A. V Annapragada, "Glucose-sensing pulmonary delivery of human insulin to the systemic circulation of rats.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 2, no. 3, pp. 501–13, 2007.
- [30] S. Kitano, Y. Koyama, K. Kataoka, T. Okano, and Y. Sakurai, "A novel drug delivery system utilizing a glucose responsive polymer complex between poly (vinyl alcohol) and poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) with a phenylboronic acid moiety," *J. Control. Release*, vol. 19, no. 1–3, pp. 161–170, 1992.
- [31] W. Tai *et al.*, "Bio-inspired synthetic nanovesicles for glucose-responsive release of insulin," *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 10, pp. 3495–3502, 2014.
- [32] B. G. De Geest, M. J. McShane, J. Demeester, S. C. De Smedt, and W. E. Hennink, "Microcapsules ejecting nanosized species into the environment," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 44, pp. 14480–14482, 2008.
- [33] T. Lancaster, M. Nalewanski, and T. Zion, "US20070099820 A1 Polymer-drug conjugates," 2006.
- [34] M. Muggeo, "Fasting Plasma Glucose variability predicts 10 - Year Survival of Type 2 Diabetic Patients," *Diabetes Care*, vol. 23, no. 1, pp. 45–50, 2000.
- [35] M. Peyrot, A. H. Barnett, L. F. Meneghini, and P. M. Schumm-Draeger, "Insulin adherence behaviours and barriers in the multinational Global Attitudes of Patients and Physicians in Insulin Therapy study," *Diabet. Med.*, vol. 29, no. 5, pp. 682–689, 2012.
- [36] V. Ravaine, C. Ancla, and B. Catargi, "Chemically controlled closed-loop insulin delivery," *J. Control. Release*, vol. 132, no. 1, pp. 2–11, 2008.
- [37] V. C. Woo, "New Insulins and New Aspects in Insulin Delivery," *Can. J. Diabetes*, vol. 39, no. 4, pp. 335–343, 2015.
- [38] L. Heinemann, "Insulin pens and new ways of insulin delivery," *Diabetes Technol. Ther.*, 2015.
- [39] E. Matteucci, O. Giampietro, V. Covolan, D. Giustarini, P. Fanti, and R. Rossi, "Insulin administration: Present strategies and future directions for a non invasive (possibly more physiological) delivery," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 9, pp. 3109–3118, 2015.
- [40] R. Mo, T. Jiang, J. Di, W. Tai, and Z. Gu, "Emerging micro- and nanotechnology based synthetic approaches for insulin delivery.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 10, pp. 3595–629, 2014.
- [41] R. S. Parker and F. J. Doyle, "Control-relevant modeling in drug delivery.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, no. 2–3, pp. 211–28, 2001.
- [42] P. Soon-Shiong, "Treatment of type I diabetes using encapsulated islets," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 35, no. 2–3, pp. 259–270, 1999.
- [43] R. Lundberg *et al.*, "Metabolic assessment prior to total pancreatectomy and islet autotransplant: Utility, limitations and potential," *Am. J. Transplant.*, vol. 13, no. 10, pp. 2664–2671, 2013.
- [44] T. A. Desai, W. Hw, J. K. Tu, and G. M. Beattie, "Microfabricated Immunoisolating Biocapsules," *Biotechnol. bioengineering*, vol. 57, no. 1, pp. 118–120, 1998.
- [45] T. Zhu, L. Lu, X. Liu, L. Yu, L. Y, and B. Wang, "Treatment of diabetes with encapsulated pig islets : an update on current developments," *Biomed. Biotechnol.*, vol. 16, no. 5, pp. 329–343, 2015.
- [46] R. A. Valdés-González *et al.*, "Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: A 4-year study," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 153, no. 3, pp. 419–427, 2005.
- [47] R. Calafiore *et al.*, "Microencapsulated Pancreatic Islet Allografts Into Non immunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes: First two cases," *Diabetes Care*, vol. 29, no. 1, pp. 137–138, 2005.
- [48] G. Basta *et al.*, "Long-Term Metabolic and Immunological Follow-Up of Non immunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes Treated With Microencapsulated Islet Allografts," *Emerg. Treat. Technol.*, vol. 34, no. April, pp. 2406–2409, 2011.
- [49] K. Podual, F. J. Doyle, and N. A. Peppas, "Preparation and dynamic response of cationic copolymer hydrogels containing glucose oxidase," *Polymer (Guildf.)*, vol. 41, no. 11, pp. 3975–3983, 2000.
- [50] T. A. Klumb, Lisa A., Horbett, "Design of insulin delivery devices based on glucose sensitive membranes," *J. Control. Release*, vol. 18, pp. 59–80, 1992.
- [51] D. Y. Jung, J. J. Magda, and I. S. Han, "Catalase effects on glucose-sensitive hydrogels," *Macromolecules*, vol. 33, no. 9, pp. 3332–3336, 2000.
- [52] K. Ishihara and K. Matsui, "Glucose-Responsive Insulin Release from Polymer Capsule," *J. Polym. Sci.*, vol. 24, pp. 413–417, 1986.

- [53] J. Kost, T. A. Horbett, B. D. Ratner, and M. Singh, "Glucose-sensitive membranes containing glucose oxidase: Activity, swelling, and permeability studies," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 19, no. 9, pp. 1117–1133, 1985.
- [54] S. Cartier, T. A. Horbett, and B. D. Ratner, "Glucose-sensitive membrane coated porous filters for control of hydraulic permeability and insulin delivery from a pressurized reservoir," *J. Memb. Sci.*, vol. 106, no. 1–2, pp. 17–24, 1995.
- [55] T. Traitel, Y. Cohen, and J. Kost, "Characterization of glucose-sensitive insulin release systems in simulated in vivo conditions," *Biomaterials*, vol. 21, no. 16, pp. 1679–1687, 2000.
- [56] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente, "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, no. 6, pp. 1451–1463, 2007.
- [57] J. Y. Lucisano, J. C. Armour, and D. A. Gough, "In vitro stability of an oxygen sensor," *Anal. Chem.*, vol. 739, no. 12, pp. 736–739, 1987.
- [58] T. Miyata, A. Jikihara, K. Nakamae, and A. S. Hoffman, "Preparation of poly (2-glucosyloxyethyl methacrylate) - concanavalin A complex hydrogel and its glucose-sensitivity," *Bioengineering*, vol. 1146, pp. 1135–1146, 1996.
- [59] G. G. Adams, Y. Cui, J. H. Mitchell, and M. J. Taylor, "Rheological and diffusion properties of a dextran-con A polymer in the presence of Insulin and Magnesium," *Rheol. Acta*, vol. 45, no. 5, pp. 611–620, 2006.
- [60] J. J. Kim and K. Park, "Modulated insulin delivery from glucose-sensitive hydrogel dosage forms," *J. Control. Release*, vol. 77, no. 1–2, pp. 39–47, 2001.
- [61] J. J. Kim and K. Park, "Glucose-binding property of pegylated concanavalin A," *Pharm. Res.*, vol. 18, no. 6, pp. 794–799, 2001.
- [62] S. Tanna, T. Sahota, J. Clark, and M. J. Taylor, "Covalent coupling of concanavalin A to a Carbopol 934P and 941P carrier in glucose-sensitive gels for delivery of insulin," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 54, no. 11, pp. 1461–9, 2002.
- [63] T. Miyata, A. Jikihara, K. Nakamae, and A. S. Hoffman, "Preparation of reversibly glucose-responsive hydrogels by covalent immobilization of lectin in polymer networks having pendant glucose," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 15, no. 9, pp. 1085–1098, 2004.
- [64] Sung Wan Kim *et al.*, "Self-regulated glycosylated insulin delivery," *J. Control. Release*, vol. 11, no. 1–3, pp. 193–201, 1990.
- [65] T. Ye, S. Yan, Y. Hu, L. Ding, and W. Wu, "Synthesis and volume phase transition of concanavalin A-based glucose-responsive nanogels," *Polym. Chem.*, vol. 5, no. 1, pp. 186–194, 2014.
- [66] R. Yin, Z. Tong, D. Yang, and J. Nie, "Glucose-responsive microhydrogels based on methacrylate modified dextran/concanavalin A for insulin delivery," *J. Control. Release*, vol. 152, no. 2011, 2011.
- [67] N. . Vyas, M. . Vyas, and F. . Quioco, "Sugar and signal-transducer binding sites of the Escherichia coli galactose chemoreceptor protein," *Science (80-)*, vol. 242, no. 4883, pp. 1290–1295, 1988.
- [68] M. J. Borrok, L. L. Kiessling, and K. T. Forest, "Conformational changes of glucose / galactose-binding protein illuminated by open , unliganded , and ultra-high-resolution ligand-bound structures," *Protein Sci.*, vol. 16, no. 6, pp. 1032–1041, 2007.
- [69] J. D. Ehrick *et al.*, "Glucose Responsive Hydrogel Networks Based on Protein Recognition a," *Macromol. Biosci.*, pp. 864–868, 2009.
- [70] J. Böeseken, "On the storage of hydroxyl groups of polyoxide compounds in space. The configuration of saturated glycols and of alpha- and beta-glycose," *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, vol. 46, no. 3, pp. 2612–2628, 1913.
- [71] J. P. Lorand and J. O. Edwards, "Polyol Complexes and Structure of the Benzeneboronate Ion," *J. Org. Chem.*, vol. 24, no. 6, pp. 769–774, 1959.
- [72] R. Pizer and C. Tihal, "Equilibria and Reaction Mechanism of the Complexation of Methylboronic Acid with Polyols," *Inorg. Chem.*, vol. 31, no. 13, pp. 3243–3247, 1992.
- [73] W. G. Henderson, M. J. How, G. R. Kennedy, and E. F. Mooney, "The interconversion of aqueous boron species and the interaction of borate with diols: a ¹¹B n.m.r. study," *Carbohydr. Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–12, 1973.
- [74] M. Van Duin, J. A. Peters, A. P. G. Kieboom, and H. Van Bekkum, "Studies on borate esters I," *Tetrahedron*, vol. 40, no. 15, pp. 2901–2911, 1984.
- [75] K. Tsukagoshi and S. Shinkai, "Specific Complexation with Mono- and Disaccharides That Can Be Detected by Circular Dichroism," *J. Org. Chem.*, vol. 56, pp. 4089–4091, 1991.
- [76] G. Springsteen and B. Wang, "A detailed examination of boronic acid-diol complexation," *Tetrahedron*, vol. 58, no. 26, pp. 5291–5300, 2002.

- [77] T. Tanaka and D. J. Fillmore, "Kinetics of swelling of gels," *J. Chem. Phys.*, vol. 70, pp. 1952–1955, 1986.
- [78] S. A. Asher *et al.*, "Photonic crystal carbohydrate sensors: Low ionic strength sugar sensing," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 11, pp. 3322–3329, 2003.
- [79] C. Tsitsilianis, "Responsive Reversible Hydrogels from associative 'smart' macromolecules," *Soft Matter*, vol. 6, no. 11, pp. 2372–2388, 2010.
- [80] K. Kataoka, H. Miyazaki, T. Okano, and Y. Sakurai, "Sensitive Glucose-Induced Change of the Lower Critical Solution Temperature of Poly[N,N-(dimethylacrylamide)-co-3-(acrylamido)-phenylboronic acid] in Physiological Saline," *Macromolecules*, vol. 27, no. 4, pp. 1061–1062, 1994.
- [81] Y. Zhang, Y. Guan, and S. Zhou, "Synthesis and Volume Phase Transitions of glucose-sensitive microgels," *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 3196–3201, 2006.
- [82] T. Hoare and R. Pelton, "Engineering Glucose Swelling Responses in Poly (N -isopropylacrylamide) -Based Microgels," *Macromolecules*, vol. 40, no. 3, pp. 670–678, 2007.
- [83] W. Wu, N. Mitra, E. C. Y. Yan, and S. Zhou, "Multifunctional Hybrid Nanogel for and Self-Regulated Insulin Release at Physiological pH," *ACS Nano*, vol. 4, no. 8, pp. 4831–4839, 2010.
- [84] C. Ancla, I. Gosse, and B. Catargi, "Designed Glucose-Responsive Microgels with Selective Shrinking Behavior," *Langmuir*, vol. 27, pp. 12693–12701, 2011.
- [85] V. Lapeyre, I. Gosse, S. Chevreux, and V. Ravaine, "Monodispersed glucose-responsive microgels operating at physiological salinity," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 12, pp. 3356–3363, 2006.
- [86] R. Nishiyabu, Y. Kubo, T. D. James, and J. S. Fossey, "Boronic acid building blocks: tools for self assembly," *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 4, pp. 1124–1150, 2011.
- [87] M. Samoszuk, D. Ehrlich, and E. Ramzi, "Preclinical Safety Studies of Glucose Oxidase," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 266, pp. 1643–1648, 1993.
- [88] S. Y. Cheng, I. Constantinidis, and A. Sambanis, "Use of Glucose-Responsive Material to Regulate Insulin Release From Constitutively Secreting Cells," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 93, no. 6, pp. 1079–1088, 2006.
- [89] R. Ballerstadt, C. Evans, R. McNichols, and A. Gowda, "Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 2, pp. 275–284, 2006.
- [90] A. Kim, S. Mujumdar, and R. Siegel, "Swelling Properties of Hydrogels Containing Phenylboronic Acids," *Chemosensors*, vol. 2, no. 1, pp. 1–12, 2013.
- [91] A. Matsumoto, K. Yamamoto, R. Yoshida, K. Kataoka, T. Aoyagi, and Y. Miyahara, "A totally synthetic glucose responsive gel operating in physiological aqueous conditions," *Chem. Commun.*, vol. 46, no. 13, p. 2203, 2010.
- [92] Q. Wu *et al.*, "Bioinspired synthesis of poly(phenylboronic acid) microgels with high glucose selectivity at physiological pH," *Polym. Chem.*, vol. 7, pp. 6500–6512, 2016.
- [93] Z. Gu *et al.*, "Glucose-responsive microgels integrated with enzyme nanocapsules for closed-loop insulin delivery," *ACS Nano*, vol. 7, no. 8, pp. 6758–6766, 2013.
- [94] Z. Gu *et al.*, "Injectable Nano-Network for Glucose-Mediated Insulin Delivery," *ACS Nano*, vol. 7, no. 5, pp. 4194–4201, 2013.
- [95] Y. Dong *et al.*, "Injectable and Glucose-Responsive Hydrogels Based on Boronic Acid – Glucose Complexation," *Langmuir*, vol. 32, no. 34, pp. 8743–8747, 2016.
- [96] V. Yesilyurt, M. J. Webber, E. A. Appel, C. Godwin, R. Langer, and D. G. Anderson, "Injectable Self-Healing Glucose-Responsive Hydrogels with pH-Regulated Mechanical Properties," *Adv. Mater.*, vol. 28, pp. 86–91, 2016.
- [97] J. Rosenstock, S. L. Schwartz, C. M. Clark, G. D. Park, D. W. Donley, and M. B. Edwards, "Basal Insulin Therapy in Type 2 Diabetes," *Diabetes Care*, vol. 24, no. 4, pp. 631–636, 2001.
- [98] D. H. Chou, M. J. Webber, B. C. Tang, A. B. Lin, and L. S. Thapa, "Glucose-responsive insulin activity by covalent modification with aliphatic phenylboronic acid conjugates," *PNAS*, vol. 112, no. 8, 2015.
- [99] J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, and B. Wang, "The relationship among pK_a, pH, and binding constants in the interactions between boronic acids and diols — it is not as simple as it appears," *Tetrahedron*, vol. 60, pp. 11205–11209, 2004.
- [100] G. W. Albin, T. A. Horbett, S. R. Miller, and N. L. Ricker, "Theoretical and experimental studies of glucose sensitive membranes," *J. Control. Release*, vol. 6, no. 1, pp. 267–291, 1987.
- [101] T. A. Horbett, J. Kost, and B. D. Ratner, "Swelling Behavior of Glucose Sensitive Membranes," in *Polymers as Biomaterials*, S. W. Shalaby, A. S. Hoffman, B. D. Ratner, and T. A. Horbett, Eds. Boston, MA: Springer US, 1984, pp. 193–207.
- [102] T. A. Horbett, B. D. Ratner, J. Kost, and M. Singh, *Recent advances in drug delivery systems*.

- Springer US, 1984.
- [103] S.-M. Jo, H. Y. Lee, and J.-C. Kim, "Glucose-Sensitive Liposomes Incorporating Hydrophobically Modified Glucose Oxidase," *Lipids*, vol. 43, no. 10, pp. 937–943, 2008.
- [104] K. Chong-Kook, I. Eun-Bin, L. Soo-Jeong, O. Yu-Kyoung, and H. Seok-Kyu, "Development of glucose-triggered pH-sensitive liposomes for a potential insulin delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 101, no. 3, pp. 191–197, 1994.
- [105] S. M. Jo and J. C. Kim, "Glucose-triggered release from liposomes incorporating poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecylacrylate) and glucose oxidase," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 287, no. 4, pp. 379–384, 2009.
- [106] T. Kishigawa, Y. Tagami, T. Narita, and Y. Oishi, "Volume Change Behavior of Poly(L-lysine-alt-terephthalic acid) Microcapsules Encapsulating Glucose Oxidase," *Chem Lett*, vol. 41, no. 10, pp. 1148–1150, 2012.
- [107] X. Chen, W. Wu, Z. Guo, J. Xin, and J. Li, "Controlled insulin release from glucose-sensitive self-assembled multilayer films based on 21-arm star polymer," *Biomaterials*, vol. 32, no. 6, pp. 1759–1766, 2011.
- [108] K. Makino, E. J. Mack, T. Okano, and S. W. Kim, "A microcapsule self-regulating delivery system for insulin," *J. Control. Release*, vol. 12, pp. 235–239, 1990.
- [109] M. J. Taylor, S. Tanna, T. S. Sahota, and B. Voermans, "Rheological characterisation of dextran-concanavalin A mixtures as a basis for a self-regulated drug delivery device," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 62, no. 1, pp. 94–100, 2006.
- [110] F. Liu, S. C. Song, D. Mix, M. Baudyš, and S. W. Kim, "Glucose-induced release of glycosylpoly(ethylene glycol) insulin bound to a soluble conjugate of concanavalin A," *Bioconjug. Chem.*, vol. 8, no. 5, pp. 664–672, 1997.
- [111] K. Sato, D. Kodama, Y. Endo, and J. Anzai, "Preparation of insulin-containing microcapsules by a layer-by-layer deposition of concanavalin A and glycogen," *J Nanosci Nanotechnol*, vol. 9, no. 1, pp. 386–390, 2009.
- [112] S. Wu, X. Huang, and X. Du, "Glucose- and pH-responsive controlled release of cargo from protein-gated carbohydrate-functionalized mesoporous silica nanocontainers," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 52, no. 21, pp. 5580–5584, 2013.
- [113] D. Tarus, E. Hachet, L. Messenger, B. Catargi, V. Ravaine, and R. Auzély-velty, "Readily Prepared Dynamic Hydrogels by Combining Phenyl Boronic Acid- and Maltose- Modified Anionic Polysaccharides at Neutral pH," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 35, pp. 2089–2095, 2014.
- [114] Y. Yao, L. Zhao, J. Yang, and J. Yang, "Glucose-responsive vehicles containing phenylborate ester for controlled insulin release at neutral pH," *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 6, pp. 1837–1844, 2012.
- [115] G. Jiang *et al.*, "Preparation of multi-responsive micelles for controlled release of insulin," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 293, no. 1, pp. 209–215, 2014.
- [116] X. Du *et al.*, "Preparation of glucose-sensitive and fluorescence micelles via a combination of photoinitiated polymerization and chemoenzymatic transesterification for the controlled release of insulin," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 133, no. 9, pp. 75766–75772, 2016.
- [117] G. Vancoillie, W. L. A. Brooks, M. A. Mees, B. S. Sumerlin, and R. Hoogenboom, "Synthesis of novel boronic acid-decorated poly(2-oxazoline)s showing triple-stimuli responsive behavior," *Polym. Chem.*, vol. 7, no. 44, pp. 6725–6734, 2016.
- [118] T. Levy, C. Déjugnat, and G. B. Sukhorukov, "Polymer microcapsules with carbohydrate-sensitive properties," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 18, no. 10, pp. 1586–1594, 2008.
- [119] Y. Zhao, B. G. Trewyn, I. I. Slowing, and V. S. Y. Lin, "Mesoporous silica nanoparticle-based double drug delivery system for glucose-responsive controlled release of insulin and cyclic AMP," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 24, pp. 8398–8400, 2009.
- [120] A. Sinha, A. Chakraborty, and N. R. Jana, "Dextran-gated, multifunctional mesoporous nanoparticle for glucose-responsive and targeted drug delivery," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 24, pp. 22183–22191, 2014.
- [121] R. Narain, *Applications, Engineered carbohydrate-based materials for biomedical: polymers, surfaces, dendrimers, nanoparticles and hydrogels*, Wiley, 2011.
- [122] W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. Mcgrath, D. Wirtz, and D. A. Tirrell, "Reversible Hydrogels from Self-Assembling Artificial Proteins," *Science (80-.)*, vol. 281, pp. 389–393, 1998.
- [123] C. Wang, R. J. Stewart, and J. Kopecek, "Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains," *Nature*, vol. 397, no. 6718, pp. 417–420, 1999.
- [124] P. Sourdille *et al.*, "Reticulated hyaluronic acid implant in nonperforating trabecular surgery," *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 25, no. 3, 1999.

- [125] R. C. Pruett, C. L. Schepens, and D. A. Swann, "Hyaluronic acid vitreous substitute: a six-year clinical evaluation," *Arch. Ophthalmol.*, vol. 97, pp. 17–30, 1979.
- [126] G. D. Prestwich, "Engineering a clinically useful matrix for cell therapy," *Organogenesis*, vol. 4, no. 1, 2008.
- [127] J. Kablik, G. D. Monheit, L. Yu, G. Chang, and J. Gershkovich, "Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers," *Dermatology Surg.*, vol. 35, pp. 302–3012, 2009.
- [128] A. W. Klein and M. L. Elson, "The history of substances for soft tissue augmentation," *Dermatology Surg.*, vol. 26, pp. 1096–1105, 2000.
- [129] G. W. Greene, X. Banquy, D. Woog, D. D. Lowrey, J. Yu, and J. N. Israelachvili, "Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, pp. 5255–5259, 2011.
- [130] J. Seror, L. Zhu, R. Goldberg, A. J. Day, and J. Klein, "Supramolecular synergy in the boundary lubrication of synovial joints," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 6497, 2015.
- [131] K. Prabhasawat, Tesavibul, "Performance profile of sodium hyaluronate in patients with lipid tear deficiency: randomised, double-blind, controlled,exploratory study," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 9, pp. 47–51, 2007.
- [132] B. Sand, K. Marner, and M. S. Norn, "Sodium hyaluronate in the treatment of keratoconjunctivitis sicca," *Acta Ophthalmol.*, vol. 67, no. 2, pp. 181–183, 1989.
- [133] H. Jung, Kim, Yun, "Enhancing the transdermal penetration of nanoconstructs : could hyaluronic acid be the key?," *Nanomedecines*, vol. 9, pp. 743–745, 2014.
- [134] E. Ju *et al.*, "Target specific and long-acting delivery of protein , peptide , and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives," *J. Control. Release*, vol. 141, no. 1, pp. 2–12, 2010.
- [135] S. Urashima *et al.*, "Immunohistochemical study of hyaluronate receptor (CD44) in alcoholic liver disease.," *Alcohol. Clin. experimental Res.*, vol. 24, pp. 349–389, 2000.
- [136] B. Zhou, J. A. Weigel, L. Fauss, and P. H. Weigel, "Identification of the Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE)," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 48, pp. 37733–37741, 2000.
- [137] D. Prati *et al.*, "Peginterferon Alfa-2a (40 Kilodaltons) and Ribavirin in Patients With Chronic Hepatitis C and Normal Aminotransferase Levels," *Gastroenterology*, pp. 1724–1732, 2004.
- [138] P. Glue *et al.*, "Pegylated interferon alpha-2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety , and preliminary efficacy data," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 68, pp. 556–567, 2000.
- [139] S. Beack *et al.*, "Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot – chlorin e6 – hyaluronate conjugate," *Acta Biomater.*, vol. 26, pp. 295–305, 2015.
- [140] J. R. E. Fraser, T. C. Laurent, and U. B. G. Laurent, "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover," *J. Intern. Med.*, vol. 242, pp. 27–33, 1997.
- [141] B. P. Toole, "Hyaluronan in morphogenesis," *Cell Dev. Biol.*, vol. 12, pp. 79–87, 2001.
- [142] D. C. West, I. N. Hampson, F. Arnold, and S. Kumar, "Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid," *Science (80-)*, vol. 228, no. 4705, pp. 1324–1326, 1985.
- [143] W. Palmer and K. M. John, "Polysaccharide of Vitreous Humor," *J. Biol. Chem. Biol. Chem.*, vol. 107, pp. 629–634, 1934.
- [144] V. N. Khabarov, P. Y. Boykov, and M. A. Selyanin, *Hyaluronic Acid: Production, Properties, Application in Biology and Medicine*, Wiley. 2015.
- [145] B. K. Y. Suh, A. Khademhosseini, J. M. Yang, G. Eng, and R. Langer, "Soft Lithographic Patterning of Hyaluronic Acid on Hydrophilic Substrates Using Molding and Printing," *Adv. Mater.*, vol. 16, no. 7, pp. 584–588, 2004.
- [146] H. Hatakeyama, "Interaction between water and hydrophilic polymers 1," *Themochimica acta*, vol. 308, pp. 3–22, 1998.
- [147] J. E. Scott, C. Cummings, and A. Brasst, "Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution , investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation," *Biochem. Journals*, vol. 274, pp. 699–705, 1991.
- [148] L. C. Becker *et al.*, "Final Report of the Safety Assessment of Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate," *Int. J. Toxicol.*, vol. 28, pp. 5–67, 2009.
- [149] V. Voinchet, P. Vasseur, and J. Kern, "Efficacy and Safety of Hyaluronic Acid in the management of acute wounds," *Am. J. Clin. dermatologyclinical dermatology*, vol. 7, no. 6, pp. 353–357, 2006.
- [150] E. Marin, M. I. Briceño, and C. Caballero-, "Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 3071–3091, 2013.
- [151] H. S. Yoo, E. A. Lee, J. J. Yoon, and T. G. Park, "Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 1925–1933, 2005.
- [152] R. Stern and M. J. Jedrzejewski, "Hyaluronidases : Their Genomics , Structures , and Mechanisms of

- Action,” *Chem. Rev.*, vol. 106, pp. 818–839, 2006.
- [153] J. Patterson, R. Siew, S. W. Herring, A. S. P. Lin, R. Guldborg, and P. S. Stayton, “Biomaterials Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 26, pp. 6772–6781, 2010.
- [154] A. Takahashi *et al.*, “In Situ Cross-Linkable Hydrogel of Hyaluronan Produced via Copper-Free Click Chemistry,” *Biomacromolecules*, vol. 14, pp. 3581–3588, 2013.
- [155] H. Tan, J. P. Rubin, and K. G. Marra, “Direct Synthesis of Biodegradable Polysaccharide Derivative Hydrogels Through Aqueous Diels-Alder Chemistry a,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 32, pp. 905–911, 2011.
- [156] S. Khetan, M. Guvendiren, W. R. Legant, D. M. Cohen, C. S. Chen, and J. A. Burdick, “Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels,” *Nat. Mater.*, vol. 12, no. 5, pp. 458–465, 2013.
- [157] W. M. Gramlich, I. L. Kim, and J. A. Burdick, “Synthesis and orthogonal photopatterning of hyaluronic acid hydrogels with thiol-norbornene chemistry,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 38, pp. 9803–9811, 2013.
- [158] J. L. Iffkovits and J. A. Burdick, “Photopolymerizable and Degradable Biomaterials for Tissue Engineering Applications,” *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 10, pp. 2369–2385, 2007.
- [159] J. A. Burdick and K. S. Anseth, “Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 23, pp. 4315–4323, 2002.
- [160] J. B. Leach, K. A. Bivens, C. W. Patrick, and C. E. Schmidt, “Photocrosslinked Hyaluronic acid hydrogels : Natural , Biodegradable Tissue Engineering Scaffolds,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 82, p. 578, 2003.
- [161] J. E. Prata, T. A. Barth, S. A. Bencherif, and N. R. Washburn, “Complex Fluids Based on Methacrylated Hyaluronic Acid,” *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 3, pp. 769–775, 2010.
- [162] J. Trudel and S. P. Massia, “Assessment of the cytotoxicity of photocrosslinked dextran and hyaluronan-based hydrogels to vascular smooth muscle cells,” *Biomacromolecules*, vol. 23, pp. 3299–3307, 2002.
- [163] K. A. Smeds and M. W. Grinstaff, “Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 54, no. 1, pp. 115–121, 2000.
- [164] K. A. Smeds, A. Pfister-Serres, D. L. Hatchell, and M. W. Grinstaff, “Synthesis of a novel polysaccharide hydrogel,” *J Macromol Sci Part A Pure Appl Chem*, vol. 36, no. 8, pp. 981–989, 1999.
- [165] A. Charlot and R. Auzely-velty, “Synthesis of Novel Supramolecular Assemblies Based on Hyaluronic Acid Derivatives Bearing Bivalent -Cyclodextrin and Adamantane Moieties,” *Macromolecules*, vol. 40, no. 4, pp. 1147–1158, 2007.
- [166] C. B. Rodell *et al.*, “Shear-Thinning Supramolecular Hydrogels with Secondary Autonomous Covalent Crosslinking to Modulate Viscoelastic Properties In Vivo,” *Biomacromolecules*, vol. 25, pp. 636–644, 2015.
- [167] C. B. Rodell, A. L. Kaminski, and J. A. Burdick, “Rational Design of Network Properties in Guest – Host Assembled and Shear-Thinning Hyaluronic Acid Hydrogels,” *Biomacromolecules*, vol. 14, pp. 4125–4134, 2013.
- [168] X. Xu, E. A. Appel, X. Liu, R. M. Parker, O. A. Scherman, and C. Abell, “Formation of Cucurbit[8]uril-Based Supramolecular Hydrogel Beads Using Droplet-Based Microfluidics,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 9, pp. 2743–2749, 2015.
- [169] S. Kadi *et al.*, “Alkylamino Hydrazide Derivatives of Hyaluronic Acid : Synthesis , Characterization in Semidilute Aqueous Solutions , and Assembly into Thin Multilayer Films,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 10, pp. 2875–2884, 2009.
- [170] H. Seung *et al.*, “Robust PEGylated hyaluronic acid nanoparticles as the carrier of doxorubicin : Mineralization and its effect on tumor targetability in vivo,” *J. Control. Release*, vol. 168, no. 2, pp. 105–114, 2013.
- [171] C. C. Liu, K. Y. Chang, and Y. J. Wang, “A novel biodegradable amphiphilic diblock copolymers based on poly (lactic acid) and hyaluronic acid as biomaterials for drug delivery,” *J. Polym. Res.*, vol. 17, no. 4, pp. 459–469, 2010.
- [172] H. Lee, C. Ahn, and T. G. Park, “Poly lactic-co-(glycolic acid)-grafted hyaluronic Acid Copolymer Micelle Nanoparticles for Target-Specific Delivery of Doxorubicin,” *Macromol. Biosci.*, vol. 9, pp. 336–342, 2009.
- [173] I. Youm, V. Agrahari, J. B. Murowchick, and B. C. Youan, “Uptake and Cytotoxicity of Docetaxel-Loaded Hyaluronic Acid- Grafted Oily Core Nanocapsules in MDA-MB 231 Cancer Cells,” *Pharm. Res.*, vol. 31, pp. 2439–2452, 2014.

- [174] D. Press, "Enhanced and sustained topical ocular delivery of cyclosporine A in thermosensitive hyaluronic acid-based in situ forming microgels," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 3587–3601, 2013.
- [175] S. Al-Qadi, M. Alatorre-Meda, M. Martin-Pastor, P. Taboada, and C. Remuñán-López, "The role of hyaluronic acid inclusion on the energetics of encapsulation and release of a protein molecule from chitosan-based nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 141, pp. 223–232, 2016.
- [176] S. Gerecht, J. A. Burdick, L. S. Ferreira, S. A. Townsend, R. Langer, and G. Vunjak-Novakovic, "Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells," *PNAS*, vol. 104, no. 27, pp. 1–6, 2007.
- [177] J. L. Ifkovits, E. Tous, M. Minakawa, M. Morita, J. D. Robb, and K. J. Koomalsingh, "Injectable hydrogel properties influence infarct expansion and extent of postinfarction left ventricular remodeling in an ovine model," *PNAS*, vol. 25, pp. 1–6, 2010.
- [178] K. S. Masters *et al.*, "Designing scaffolds for valvular interstitial cells : Cell," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 71, no. 1, pp. 172–180, 2004.
- [179] D. N. Shah, S. M. Recktenwall-work, and K. S. Anseth, "The effect of bioactive hydrogels on the secretion of extracellular matrix molecules by valvular interstitial cells," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2060–2072, 2008.
- [180] C. Chung, J. Mesa, M. A. Randolph, M. Yaremchuk, and J. A. Burdick, "Influence of gel properties on neocartilage formation by auricular chondrocytes photoencapsulated in hyaluronic," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 77, 2006.
- [181] L. Messenger, "Nanogels de polysaccharides pour la délivrance d'insuline," Université de Bordeaux I.
- [182] L. Messenger *et al.*, "Photochemical crosslinking of hyaluronic acid confined in nanoemulsions: towards nanogels with a controlled structure," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, pp. 3369–3379, 2013.

Chapitre 2 :

Comprendre et maîtriser les interactions protéines/polymères: vers un meilleur contrôle de l'encapsulation et de la libération de protéines.

Les systèmes composés de matériaux à base de polymères stimulables comme ceux présentés dans le chapitre précédent, peuvent montrer une bonne sensibilité au glucose. Cependant, ces structures n'ont pas forcément le même comportement en présence d'un chargement et la libération des actifs encapsulés en fonction du stimulus appliqué n'est pas assurée pour autant. En effet, les interactions entre les cargos (actifs) et les vecteurs les transportant, sont un paramètre primordial qu'il ne faut pas négliger pour maîtriser ces systèmes. Ainsi, une partie de ce travail de thèse est d'identifier et de comprendre les interactions entre l'insuline et les matrices de gels sélectionnées, pour maîtriser leurs impacts sur l'encapsulation et le relargage des protéines. Apporter une réponse à ces questionnements est primordial pour le développement de nouvelles applications biomédicales comme la délivrance de protéines, mais aussi pour limiter le biofouling qui peut avoir lieu par interaction de protéines présentes *in vivo* avec des dispositifs biomédicaux implantés. En effet, l'interaction de protéines présentes *in vivo* avec ces dispositifs peuvent en limiter l'efficacité [1]–[3]. L'étude de ces interactions est aussi primordiale pour le développement de nombreuses applications potentielles dans des domaines variés comme l'alimentaire, les biomatériaux, l'immobilisation enzymatique, la purification de protéines, ou les biocapteurs.

Pour commencer ce chapitre, les différents types d'interactions seront présentés. Les études menées pour les étudier sont rendues difficiles par la nature complexe des protéines, qui sera illustrée à travers la présentation de l'insuline en termes de structure et de propriétés. De nombreuses techniques sont disponibles en fonction de la nature de l'architecture des polymères mis en contact avec les protéines. Ces différentes techniques disponibles pour les systèmes protéines/ polymères, qu'ils soient mis en forme ou non, seront également discutées. Dans un dernier temps, un état des lieux des études menées pour comprendre les interactions entre les polyélectrolytes, et plus particulièrement les gels de tailles micrométriques, et les protéines sera dressé en listant les paramètres à étudier.

1 Les différents types d'interactions

Il existe différents types d'interactions plus ou moins fortes. Les liaisons covalentes sont des liaisons fortes responsables de la cohésion moléculaire qui mettent en jeu des énergies de 200 à 800 kJ/mol [4]. Cependant, l'étude des interactions entre les protéines et les matrices de gels s'articule principalement autour d'interactions non covalentes qui ont un rôle fondamental dans le contrôle de l'encapsulation et du relargage d'actifs. Elles impliquent, en solution, des énergies inférieures à 100 kJ/mol bien plus faibles que les liaisons covalentes [4]. Ces interactions intramoléculaires réversibles régissent la conformation tridimensionnelle des espèces comme les protéines influant sur leurs structures tertiaires [5], et quaternaires [6], pouvant moduler leur activité et leur localisation au sein de l'organisme. De la même manière la vectorisation, l'encapsulation et le relargage des espèces sont contrôlés par ses interactions.

Les interactions non covalentes regroupent les interactions hydrophobes, les interactions électrostatiques et de Van der Waals, ainsi que les liaisons hydrogènes. Dans le cadre de l'étude des protéines, certains types d'interactions sont particulièrement prépondérants. Les **interactions électrostatiques de type**

coulombienne, en raison du caractère parfois chargé des acides aminés constituant les protéines, jouent un rôle non négligeable dans les interactions avec les matrices de gels qui peuvent également être chargées comme pour le cas de l'acide hyaluronique à pH physiologique. Les **liaisons hydrogènes** dépendent des propriétés des atomes impliqués mais aussi des conditions externes telles que la nature du solvant, son pH et la température du milieu. Ce type de liaison est particulièrement important dans la biologie structurale. En milieux aqueux, notamment dans les milieux biologiques, on trouve également, des **interactions hydrophobes**. Elles font partie des interactions non covalentes principales. Elles sont régies par l'attraction de groupements apolaires et peu polarisables qui s'associent spontanément et préférentiellement entre eux aux dépens des régions hydrophiles composées des groupements polaires. Cette association crée une force de liaison cohésive hydrophobe. Il s'agit d'interactions entre molécules ou groupements qui ont peu d'affinité pour le solvant, et qui vont se regrouper entre eux afin de minimiser leur contact avec l'eau. Ces interactions participent ainsi à la conformation globale des molécules dans un solvant donné. L'intensité de ces interactions dépend des surfaces hydrophobes en contact.

2 Les protéines des macromolécules complexes : exemple de l'insuline

Afin, d'étudier les interactions entre l'insuline et les différents vecteurs potentiels pour son administration, il est primordial de bien connaître sa structure et ses propriétés. L'insuline est une hormone polypeptidique qui possède une structure tridimensionnelle régie par les interactions entre les différents acides aminés la composant. Les structures des différents acides aminés cités dans le manuscrit sont présentées en annexe.

2.1 Structure des protéines

La structure tridimensionnelle de l'insuline et des protéines en général, est complexe en raison du grand nombre de résidus ou acides aminés de compositions chimiques différentes, impliqués dans sa conformation. La description de ces structures est découpée en quatre niveaux. Chaque niveau n décrit l'arrangement des structures du niveau inférieur n-1 entre elles. La structure primaire ou séquence primaire correspond à l'enchaînement des résidus d'acides aminés de la protéine. La structure secondaire correspond au repliement et à l'agencement de la séquence primaire. Les hélices alpha et les feuillets bêta sont des conformations classiques stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les acides aminés vicinaux. La structure tertiaire décrit le repliement et l'agencement des éléments de structure secondaire. Ce niveau définit la structure tridimensionnelle de la protéine. Elle est stabilisée par des interactions non covalentes ou covalentes comme les ponts disulfures créés par oxydation des résidus cystéines. La structure quaternaire décrit le repliement et l'agencement en complexes non covalents de plusieurs éléments de structure tertiaire. Elles peuvent être stabilisées par des interactions covalentes et non covalentes. En conditions physiologiques, une protéine possède une conformation spécifique dite native qui régit ses fonctions biologiques.

2.1.1 Structure primaire et secondaire de l'insuline

La structure de l'insuline est établie en 1955 par Sanger, qui reçut le prix Nobel pour ses travaux sur la détermination des structures des protéines trois ans plus tard [7]–[9]. Son poids moléculaire est de 5800 Da. Elle est composée de 51 acides aminés répartis sur deux chaînes dites A et B (Figure 1). La chaîne A contient 21 acides aminés, a un caractère acide, et comprend un pont disulfure intra-brin entre les cystéines 6 et 11. La chaîne B, de caractère neutre possède 30 acides aminés. La cohésion entre ses deux brins est maintenue par deux ponts disulfures. La géométrie de l'insuline dans l'espace est définie par la présence d'hélices alpha sur les chaînes, deux pour la chaîne B et une sur la chaîne A, qui composent sa structure secondaire (Figure 1).

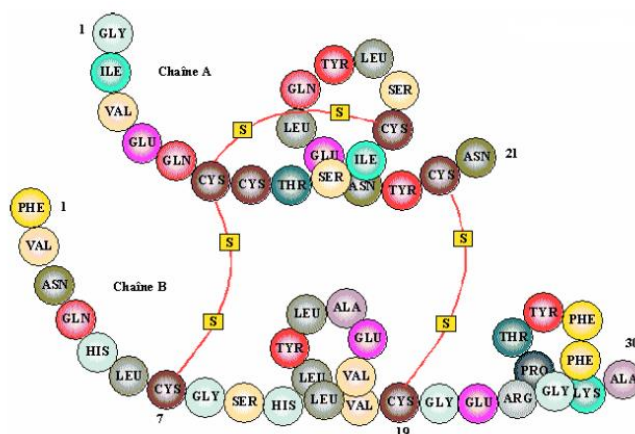


Figure 1 : Structure de l'insuline : chaîne A et B et ponts disulfures.

2.1.2 Structure tertiaire de l'insuline

Sous forme monomérique l'insuline est une structure globulaire avec un cœur hydrophobe. Les acides aminés en surface sont polaires mais l'insuline comprend deux surfaces hydrophobes de chaque côté de la molécule. L'hydrophobicité joue un rôle prépondérant dans la structure de l'insuline. Ainsi, le rôle des résidus A8 dans l'agrégation de la protéine en solution a été identifié [10]. Ce résidu thréonine polaire pour l'insuline humaine, est en surface de la protéine et influence l'agrégation de l'insuline via des interactions hydrophobes. L'importance de ce résidu est montrée en comparant l'insuline humaine à l'insuline bovine, qui portent respectivement en position A 8 des résidus thréonine polaire et alanine apolaire (Tableau 1). Les vitesses d'agrégation sont différentes pour ces deux formes d'insuline [11]. De plus il a été montré que les acides aminés terminaux de la chaîne B jouent un rôle important pour définir les propriétés de solubilité et d'agrégation de l'insuline. A titre d'exemple, "l'insuline glargine" qui est un analogue de l'insuline contenant deux arginines en plus à l'extrémité de la chaîne, est moins soluble à pH physiologique et s'agrège différemment en comparaison avec l'insuline humaine [12]. Il est important de noter, que la modification d'un seul acide aminé de la séquence primaire, entraîne, des modifications profondes de l'arrangement des structures et peut modifier la bioactivité des protéines.

Les zones des insulines bovines et humaines sont représentées en fonction de leur hydrophobie (Figure 2) et montrent une plus grande hydrophobie de l'insuline bovine.

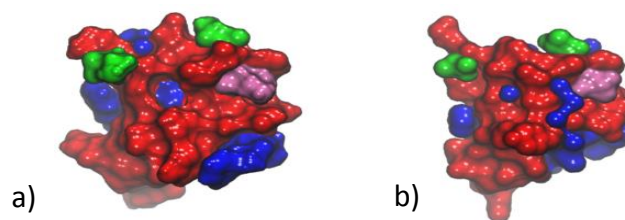


Figure 2 : Charge de surface de l'insuline humaine à droite et bovine à gauche. Les résidus hydrophiles sont représentés en rouge, les résidus hydrophobes en bleu. Les résidus variant entre les deux formes sont les résidus A8 (en haut à droite), et B30 (en haut à gauche) en verts, et A10 en rose. Extrait de [11].

Tableau 1: Acides aminés des résidus 18, A10 et B30 pour les protéines insuline humaine et bovine.

Résidu	A8	A10	B30
Bovine insulin	Alanine	Valine	Alanine
Human insulin	Thréonine	Histidine	Thréonine

La présence de ces patches hydrophobes donne à l'insuline la capacité de s'auto-assembler en structure quaternaire.

2.1.3 Structure quaternaire de l'insuline

Ainsi, l'insuline est sécrétée sous forme monomérique mais elle peut s'associer sous forme de dimère de manière spontanée, à des concentrations supérieures aux concentrations physiologiques, et à pH neutre ou acide. En 1969, Hodgkin découvre la forme hexamérique de l'insuline [10],[11] qui correspond à l'association de trois dimères (Figure 3). Dans cette configuration, elle est stockée *in vivo* sous forme hexamérique stabilisée en présence de zinc. Les patches hydrophobes sont tournés vers l'intérieur lors de la formation des dimères et des hexamères.

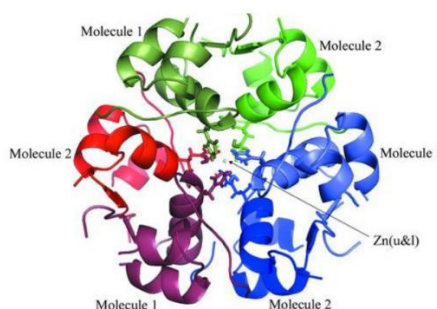


Figure 3: Structure hexamérique de l'insuline.

2.1.4 La stabilité de l'insuline

Le point isoélectrique de l'insuline est de 5.5, sa solubilité est donc optimale en milieu acide. A pH physiologique l'insuline est globalement négativement chargée. En tant que polypeptide, l'insuline est dénaturée, par acidité gastrique lié à la présence de peptidase, rendant l'administration directe par voie orale impossible. Les ponts disulfures sont sensibles aux milieux alcalins, et aux agents réducteurs. L'insuline est dégradée à chaud dès 30°C et à froid en-dessous de 0°C.

Les protéines sont donc des macromolécules complexes et sensibles à leur environnement.

3 Etude des interactions protéines modèles/polymères

3.1 Comment étudier les interactions entre les protéines et polymères?

De nombreuses techniques de caractérisation sont disponibles pour étudier les interactions entre des polymères notamment des polyélectrolytes et des protéines. Une liste non exhaustive est abordée dans ce paragraphe. Les différentes techniques disponibles peuvent se classer en fonction du type d'objet. En effet, suivant les techniques il est possible d'étudier des couples :

- polymère en solution/protéines,
- surfaces/protéines,
- hydrogels/protéines,
- systèmes colloïdaux ou nanoparticules/protéines.

De plus, certaines techniques permettent d'étudier les interactions entre les chaînes de polymère et les protéines en termes de chimie alors que d'autres peuvent aussi également prendre en compte les effets structuraux, notamment l'effet des interactions sur la porosité, les effets sur l'état d'agrégation et sur la conformation des protéines. Les interactions identifiées peuvent induire des variations structurales affectant aussi bien les polymères que la protéine.

3.1.1 Etude de l'effet de la nature des chaînes

3.1.1.1 *Technique de diffusion du rayonnement*

Les phénomènes de diffusion peuvent être étudiés pour des systèmes de petites tailles en solution, sous forme moléculaire ou sous forme de particule nanométrique. La formation de complexes colloïdaux en solution permet notamment d'utiliser les techniques de diffusion de la lumière. Les complexes formés doivent être de taille petite afin d'être soumis au mouvement brownien. Cependant de larges quantités de polymères sont nécessaires pour mener ces études, et il est parfois difficile de différencier la formation de complexes avec la protéine, de la simple précipitation du polymère. La turbidimétrie a été utilisée pour déterminer l'état d'agrégation d'une protéine en présence de polyélectrolyte [15]. La technique de diffusion dynamique de la lumière est plus largement utilisée [16]. Cependant il est parfois délicat d'interpréter les signaux obtenus car les polymères et les protéines en solution peuvent impliquer des systèmes multimodaux complexes. De plus il est difficile de différencier les interactions particules/protéines, des interactions particules/particules.

3.1.1.2 *Calorimétrie*

La calorimétrie et plus particulièrement la titration calorimétrique isotherme (ITC) est largement utilisée dans la compréhension des interactions entre des polymères en solution et des protéines. La nature des interactions peut, elle, être étudiée grâce à leur thermodynamique [17]. Les mesures se font par ajout successifs d'aliquots contenant le polymère dans la cellule de mesure où la protéine a été préalablement introduite. Les thermogrammes bruts dépendent directement des changements enthalpiques ΔH° pour différentes

stœchiométries, ils représentent l'énergie d'association due aux interactions entre les protéines et les polymères mis au contact dans la cellule. On peut, en appliquant les modèles d'isothermes, déterminer les constantes d'associations entre le polymère et la protéine et le nombre de protéines liées aux chaînes de polymères [18].

L'ITC a notamment été utilisée pour l'étude des interactions de l'insuline avec des nanoparticules de polysaccharides en comparant des nanoparticules de chitosan positivement chargées avec des nanoparticules hybrides chitosan/acide hyaluronique [19]. Il a été montré que l'acide hyaluronique n'était pas impliqué dans l'encapsulation de l'insuline par effet électrostatique, ni ne l'améliorait. En effet, le HA est en compétition avec l'insuline pour former des complexes électrostatiques et diminue ainsi le nombre de liaisons possibles entre l'insuline et le chitosan. L'analyse a permis de montrer qu'en présence de chitosan, les dimères et hexamères d'insuline semblaient se dissocier pour favoriser la forme monomérique de l'insuline. Cependant les thermogrammes sont plus difficiles à interpréter à cause de la possibilité de l'insuline de s'associer sous formes de dimères ou hexamères dont la dissociation a également une empreinte thermique.

3.1.1.3 Spectroscopie RMN

Pour caractériser les interactions protéines/polyélectrolytes en solution, des méthodes spectroscopiques sont disponibles, l'effet de la liaison de protéines à des molécules telles que des sucres peut être étudié par le suivi des perturbations observées en résonance magnétique nucléaire (RMN). Les paramètres étudiés peuvent être de différentes natures : déplacement chimique, vitesse de relaxation, intensité du signal, relaxation croisée, et peuvent être suivis pour le sucre comme pour la protéine. Il est par exemple possible de corrélérer la variation de déplacement chimique de protons caractéristiques de la protéine à la présence de concentrations croissantes de ligand polymériques comme pour l'étude de l'hévéine protéine extraite de l'*Hevea brasiliensis*, interagissant avec des saccharides [20].

De plus, la diffusion des molécules en solution peut être étudiée par RMN grâce à la technique dite DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY). Cette technique mise au point en 1992 par Morris et Johnson [21], permet d'obtenir des spectres en deux dimensions, une représentant les déplacements chimiques et l'autre les coefficients de diffusion des espèces présentes en solution. Lorsqu'une molécule interagit avec un système de plus grande dimension, le coefficient de diffusion de cette dernière diminue fortement. La RMN DOSY-¹H permet de mettre en évidence des interactions protéine/ligand [22]. Enfin la technique dite de RMN gradient de champ d'impulsion permet également de déterminer des coefficients de diffusion de protéines notamment à travers des gels [23]. Une liste plus complète des techniques de RMN disponibles pour étudier les interactions entre les protéines et les saccharides est proposée dans la revue de Barbero *et al* [24]. On notera que les techniques de RMN manquent de sensibilité, et une grande quantité de matériaux est nécessaire pour pouvoir mener des analyses.

3.1.2 Prise en compte des aspects structuraux

3.1.2.1 *Microscopie*

La microscopie optique est également utilisée pour étudier la morphologie ou la dynamique des complexes polyélectrolytes/protéines sur les surfaces. Ainsi, la microscopie à force atomique (AFM), est une technique d'étude topologique utilisée communément, afin d'étudier les surfaces de protéines/polyélectrolytes. La rugosité moyenne est utilisée pour étudier l'adsorption sur des surfaces, grâce à la détermination de courbes « force en fonction de la distance ». En effet, l'attraction entre la pointe de l'appareil et une surface de polyélectrolyte où la protéine est liée, sera plus importante que pour une surface libre [25]. Il a par exemple été montré que l'interaction entre la pointe de l'AFM et la protéine lysozyme était plus forte pour des surfaces de polyélectrolytes de faibles densité de charges [26].

D'autres techniques de microscopie optique peuvent être utilisées pour étudier les effets de structure, en particulier dans l'étude d'interactions entre des polymères sous forme de gel et des protéines. A ce titre, la microscopie confocale permet en particulier d'observer les échantillons sur une fine couche d'épaisseur de quelques dizaines de micromètres environ. Elle permet ainsi d'étudier la localisation, la diffusion d'espèces sur des surfaces de polyélectrolytes [27], ou même des systèmes tridimensionnels tels que des capsules [27], des gels [28], des coacervats [29], ou des particules [30]. Afin d'adapter cette technique à l'étude de microgels micrométriques, l'équipe de Malmsten les a immobilisés à l'aide d'une micropipette, les maintenant immergés dans une chambre d'observation. La composition du milieu est contrôlée et les acquisitions d'images sont faites en direct, en utilisant les techniques de transmission et de fluorescence. Les cinétiques de gonflement des gels peuvent être étudiées, de même que la distribution des espèces encapsulées dans les gels. Ainsi, le gonflement ou la contraction du gel peut être mesuré à chaque instant.

Un bon indicateur de l'absorption de protéines dans des microgels est la contraction de ses derniers [31]–[33]. En utilisant cette caractéristique, l'encapsulation et le relargage contrôlé de BSA encapsulée dans des microgels de taille micrométrique de carboxyméthyle chitosan réticulés par des ions Ca^{2+} ont pu être suivis par microscopie optique [34]. Ces hydrogels gonflent à haut pH à cause de la précipitation du $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Cette propriété est utilisée pour encapsuler et libérer la BSA. De même, l'étude des interactions entre le lysozyme chargé positivement et des microgels de polyacide acrylique (PAA) a été réalisée, par microscopie optique. Le marquage fluorescent des espèces à encapsuler permet de suivre en temps réel leur distribution, et l'influence du chargement sur la variation du volume du gel. L'influence du milieu notamment du pH et de la force ionique est facilement déterminé en suivant les variations de gonflement (Figure 4) [35].

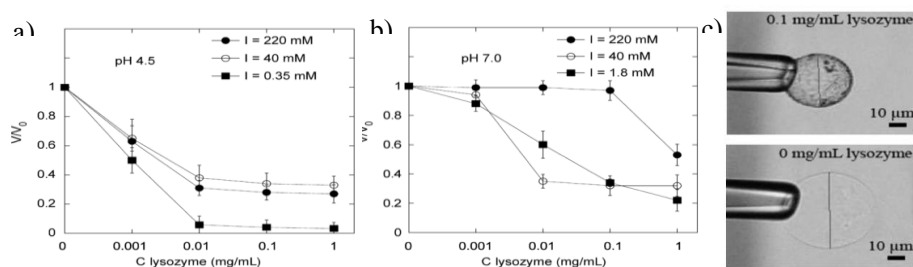


Figure 4: contraction de microgels de PAA en fonction de la concentration en lysozyme. a) pH 4.5 b) pH 7 pour différentes forces ioniques. Image confocale de microgels à pH 4.5 à force ionique 40 mM et différentes concentrations en lysozymes c) 0 mg/mL et 0.1 mg/mL.

Cette technique permet également d'étudier le relargage des protéines encapsulées. Le relargage peut se faire par désorption de la protéine en fonction du pH.

D'autres mécanismes de relargage sont considérés comme prometteurs, notamment ceux déclenchés par action enzymatique. Il a été montré que la présence de trypsine permet le relargage de la poly-L-lysine (PLL) utilisée comme peptide modèle et liée à des microgels de poly (acide acrylique-co-acrylamide) (p(AA-co-AAm)) de charges opposés (Figure 5 a). Le relargage est d'autant plus important que la concentration en trypsine est grande, que la densité de charge du microgel est faible et que la PLL a une petite masse molaire. Le relargage de la PLL est marqué par le gonflement du microgel (Figure 5 b et c) [36].

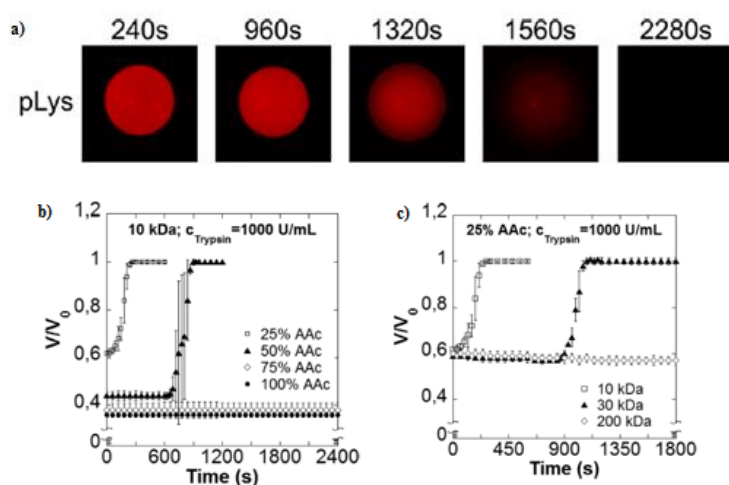


Figure 5: a) Image de microscopie confocale de gels de poly(acide acrylique-co-acrylamide) contenant 25% d'acide acrylique mettant en évidence le relargage de la poly-L-lysine par action enzymatique. b) Gonflement induit par la présence d'enzyme en fonction de la densité de charge des gels. c) Gonflement induit par la présence d'enzyme des gels en fonction de la masse molaire de la poly-L-lysine chargée.

3.1.3 Autres techniques

D'autres techniques sont utilisées. Nous en citons ici quelques-unes :

La spectroscopie dichroïque circulaire permet de déterminer les structures secondaires et tertiaires de protéines avant, pendant et après la complexation avec des polyélectrolytes [35], [37]–[40]. En effet, les protéines natives repliées ont une signature unique. Cette technique permet ainsi de déterminer si le maintien

de l'intégrité des protéines, et donc leur bioactivité est garanti lors de l'encapsulation et le relargage de protéines dans des systèmes de polyélectrolytes. La diffusion de neutrons aux petits angles permet de sonder la matière aux échelles spatiales allant de 0,5 et 50 nm, en déterminant les grandeurs moyennes qui caractérisent la taille et la forme des objets ainsi que leurs interactions [41],[42]. La rhéologie permet par des mesures viscoélastiques de mettre en évidence la présence d'interactions, et la formation de complexes protéines/polyélectrolytes [43]. La chromatographie par exclusion de taille permet grâce à la méthode de Hummel-Dreyer, de déterminer le nombre de liaisons entre une chaîne de polymère et une protéine [44]. L'électrophorèse capillaire, permet l'étude de la mobilité et de la concentration de ligand libre et lié. Cette technique est également utilisée pour l'étude des interactions protéines-polyélectrolytes [45]. Cependant, elle met en jeu des polymères linéaires en solution. La technique de résonance des plasmons de surface, sensible au changement d'index de réfraction, est utilisée pour étudier l'adsorption de protéines sur des surfaces d'or couvertes de polyélectrolytes, ou à l'inverse l'adsorption de polyélectrolytes sur des surfaces modifiées par des protéines. Elle nécessite l'immobilisation des objets [46],[47]. L'utilisation de microbalance à quartz permet de détecter des changements de masse de l'ordre du nanogramme par cm² et d'étudier les relations protéines/polyélectrolytes immobilisés en surface [48].

3.1.4 Choix des techniques utilisées

Dans ce projet, les études d'interactions entre les protéines et des hydrogels d'acide hyaluronique doivent pouvoir être faites « en direct », en fonction de différents stimuli, tel que la salinité, le pH ou la présence de glucose. Il est aussi intéressant de pouvoir étudier les gels mis en forme, et polymérisés plutôt que les précurseurs seuls, afin de pouvoir étudier simultanément les interactions en termes de chimie mais aussi en termes de changements structuraux. Il est également intéressant de pouvoir limiter la quantité de précurseurs utilisés, pour cela un objet unique de petite taille est étudié. Pour ces raisons, notre choix s'est principalement porté sur l'utilisation de la microscopie optique, afin de maîtriser les interactions et de contrôler l'encapsulation, la distribution, et le relargage des espèces, ainsi que la dégradabilité des matrices de gel.

3.2 Paramètres à étudier pour comprendre les interactions entre des protéines modèles et des gels

Les interactions entre les protéines et les polymères sont largement traitées dans la littérature. Ces interactions peuvent donner lieu à différents types de structures qui vont entraîner des différences de mobilité des chaînes de polymères entre elles, mais aussi des protéines par rapport aux chaînes de polymère. En solution, la formation de complexes protéine/polyélectrolytes solubles a été observée alors que pour des systèmes insolubles, on parle de coacervats. Enfin, l'étude de systèmes bidimensionnels et tridimensionnels tels que des systèmes layer-by-layer, gels ou brosses de polyélectrolytes permet de modéliser et de comprendre les interactions. Elles sont régies par différents paramètres abordés ci-dessous [49],[50].

3.2.1 Effets électrostatiques

3.2.1.1 Interactions électrostatiques avec un polyélectrolyte linéaire en solution

En raison de la nature hydrophile et chargée des protéines, les interactions de types électrostatiques ont un rôle clé dans les interactions entre les polyélectrolytes comme le HA, et les protéines. Ainsi, les polyélectrolytes interagissent par interactions électrostatiques avec les protéines de charges opposées, mais aussi avec la même charge nette grâce à une distribution de charge anisotrope et à la présence de « patches chargés » (Figure 6). Il s'agit de zones de la protéine, où la charge est localement opposée à la charge globale [51].

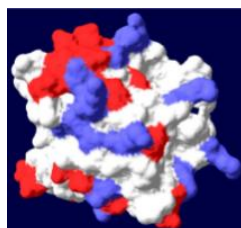


Figure 6 : charge de surface de la protéine β -lactoglobuline (BLG). Rouge : résidus acides négativement chargés; bleu: résidus basiques positivement chargés; blanc résidus neutres. La charge globale de la protéine est négative ($\text{pH} > \text{pI}$). Cependant, il y a de larges zones positives (patches). A $\text{pH} < \text{pI}$ la charge globale est positive due à plus grande protonation.

Si la densité de charge et la taille du patch sont suffisantes, les contre-ions présents dans le milieu se situent à proximité de la zone, créant une augmentation locale de la pression osmotique [52]. Lorsque la taille du patch est supérieure à la distance de Gouy-Chapman définie comme la distance proche du patch où se situe la moitié des contre-ions [52], alors l'effet de confinement des contre-ions près de la surface est significatif. A proximité des patches de même charge, la présence de contre-ions diminue les effets de répulsion coulombienne qui peuvent affecter la conformation du polymère [53]. A l'inverse, à proximité de patches de charges opposés, les chaînes de polymères s'adsorbent à la surface de la protéine agissant comme un contre-ion multivalent, remplaçant les contre-ions qui sont alors libérés. Ce mécanisme augmente l'entropie du système et est donc énergétiquement favorable [54]. A faible force ionique ce phénomène est irréversible, alors qu'à plus forte force ionique le polyélectrolyte peut se désorber de la protéine. Le confinement des contre-ions à la surface des protéines impacte la stabilité et l'activité enzymatique de ces dernières. Il est donc important de prendre en compte les contre-ions quand on considère l'activité biologique des protéines.

3.2.1.2 Cas des interactions électrostatiques entre des polyélectrolytes et des protéines en milieu confiné.

Lorsque les polyélectrolytes sont sous forme de brosses ou de gels, il y a un confinement plus marqué des contre-ions dû au potentiel électrostatique créé par le réseau hautement réticulé [49],[50]. Ces systèmes respectent le principe d'électroneutralité. Le réseau est gonflé par l'eau, et la concentration en contre-ions à l'intérieur et à l'extérieur des gels est définie par l'équilibre de Donnan. De la même manière qu'en milieu non confiné, une partie des contre-ions présents dans les gels est relarguée, en présence de protéines ayant

des patches de charges opposés au polyélectrolyte matriciel. Les protéines peuvent s'adsorber sur le gel, le relargage des contre-ions entraîne une réduction de la pression osmotique et induit une contraction du gel. Ce phénomène a notamment été mis en avant pour des hydrogels cœur écorce de poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide) p(NIPAM-co-AAm) où les interactions entre le polyélectrolyte et la protéine lysozyme entraînent la contraction des gels en raison du relargage des contre-ions dans le milieu (Figure 7) [55],[56].

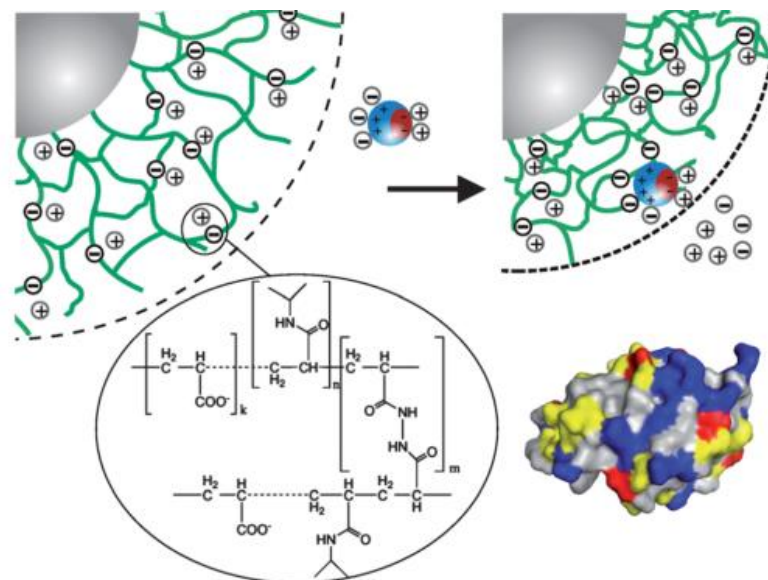


Figure 7 : interaction entre une protéine le lysozyme chargée positivement et un microgel négativement chargé de p(NIPAM-co-AA). La protéine se lie par interactions hydrophobes et électrostatiques entraînant la contraction du gel par relargage de contre-ions. (sur le lysozyme : bleu patches positifs, rouge patches négatifs, jaune zones polaires et gris zones hydrophobes) (extrait de [55]).

Ce phénomène est favorable énergétiquement. En utilisant l'approximation de Poisson Boltzmann, il a été calculé que l'énergie libre du système diminue lors de l'insertion d'une protéine globalement chargée négativement, dans un système de polyélectrolytes également chargé négativement. Les interactions des patches positifs avec le réseau de polyélectrolytes sont plus fortes que les répulsions des patches négatifs, et peuvent favoriser l'adsorption de la protéine du « mauvais » côté de son point isoélectrique. La taille des pores cependant peut limiter la diffusion de la protéine dans le gel [57],[58]. Il est important de noter qu'à plus forte force ionique la même protéine peut ne pas s'adsorber sur le polymère [50],[59].

De nombreux gels pH-sensibles sont étudiés dans la littérature et notamment des gels de taille micrométrique. La plupart du temps, les gels sont préparés à partir de polyacides ou de polybases tels que les poly(acide acrylique) ou les polysaccharides comme le chitosan ou acide hyaluronique.

L'affinité des protéines pour les hydrogels est grandement influencée par le **contraste de charge** entre les deux. Ainsi, l'incorporation d'un homopolypeptide, la poly-L-lysine dans des microgels de PAA et des gels de chlorure de poly(acrylamido propyle triéthylammonium), chargés positivement, a pu montrer que l'absorption du peptide sur le gel n'est observée que pour des gels de charges opposées [60].

L'effet de la **densité de charge** de microgels de p(AA-co-AAm) sur les interactions avec des peptides cationiques de charges opposées a été montré en faisant varier le pourcentage d'acide acrylique (Figure 8 a). La charge des microgels impacte fortement le taux de chargement en peptide, alors que la charge du peptide influe sur la cinétique de contraction des gels lors du chargement.

La **distribution de charge** a aussi un impact non négligeable, les gels de p(AA-co-AAm) chargés avec deux peptides, un dont la charge est uniformément répartie sur la chaîne et l'autre, où les charges sont placées en bout de chaîne l'ont montré. Ces microgels hautement chargés se contracteront beaucoup plus pour le deuxième peptide à la distribution de charges non homogène car localement sa densité de charge est plus élevée. Pour des gels moins chargés, cette différence n'est plus observable. La quantité de peptide encapsulée suit les mêmes tendances. Ces résultats montrent l'importance de la distribution de charge quand les deux partenaires ont des grands contrastes de charge (Figure 8 b et c).

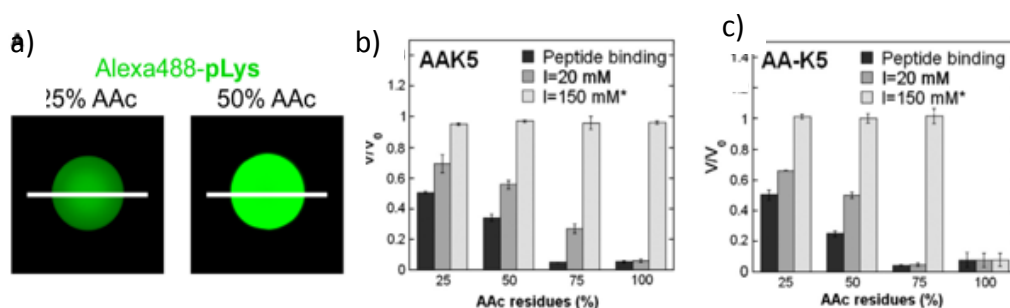


Figure 8 : a) Image de microscopie confocale représentant la distribution de poly-L-lysine fluorescente de masse molaire 10 kDa, dans des microgels de poly (AA-co-AAm) contenant 25% et 50% d'acide acrylique par rapport à l'acrylamide. Effet de la distribution de charge pour b) le peptide AAK5 (distribution homogène) et c) le peptide AA-K5 (charges localisées en bout de chaîne) sur la contraction de gel de poly (AA-co-AAm) pour différents pourcentages de AA, et pour différentes forces ioniques.

L'importance des effets électrostatiques sur la plupart des systèmes, permet un relargage contrôlé des protéines grâce à des variations de pH ou à l'écrantage des charges à haute force ionique. Il a été montré que le relargage à haute force ionique, est plus important pour les peptides asymétriques [61].

Un autre exemple, décrit l'encapsulation du lysozyme, une protéine globulaire chargée positivement dont la forte affinité pour des microgels d'amidon négativement chargés a été démontrée, ainsi que la possibilité de moduler cette affinité en changeant le pH de la solution et la concentration en sels. L'augmentation de la force ionique diminue l'affinité entre les deux et augmente la cinétique de relargage. De même, l'augmentation du pH a le même effet car le nombre et la taille de patches positivement chargés sur la surface de la protéine diminue avec l'augmentation du pH [31],[62].

Un autre exemple est décrit à travers le cas du chargement d'un peptide de séquence ne contenant que des résidus alanines et histidines, impliquant une haute dépendance du système au pH. Ainsi, à faible pH, les résidus histidines sont protonés, le peptide est chargé positivement. Lorsque le pH est plus haut que le pKa des résidus histidines, le peptide devient neutre. Dans ce cas, sa désorption de microgels de poly(acide

acrylique) est observée quand le pH est augmenté de 5.5 à 7.4 (Figure 9 a). A l'inverse, un peptide ne contenant dans sa séquence que des résidus neutre alanine, lysine et arginine, qui ne présentent pas de variation de charges dans cette gamme de pH ne se désorbe pas du même microgel en changeant le pH [63],[27]. Le relargage a lieu en augmentant la force ionique dans une proportion corrélée à la charge des deux partenaires (Figure 9 b) [30].

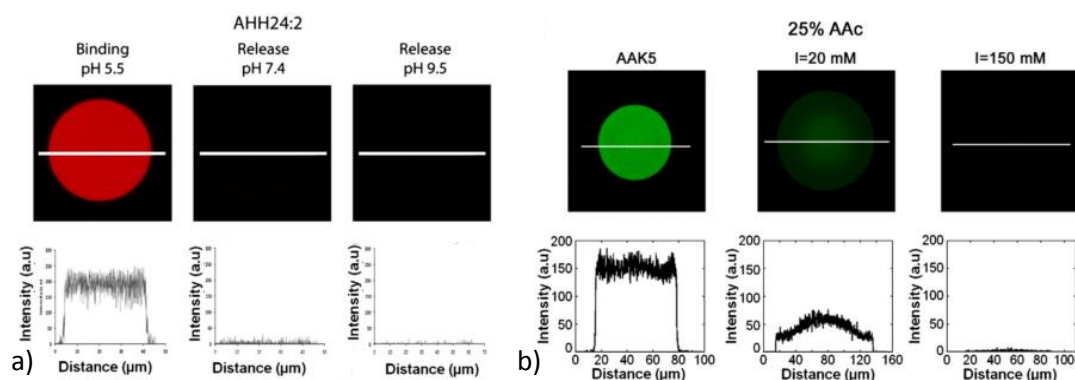


Figure 9 : Image de microscopie de confocale représentant a) la désorption du peptide AHH24 :2 composé d'alanine et d'histidine suivant la séquence AHHHAAHAAHHHAAHAAHHHAAHA de microgels de polyacide acrylique b) relargage du peptide composé de lysine et d'alanine suivant la séquence AAKAAKAAKAAKA de gels de poly(acide acrylique-co-acrylamide) 25% d'acide acrylique dû à la diminution des interactions électrostatiques en augmentant la force ionique du milieu.

3.2.2 Hydrophobie des partenaires

Les interactions hydrophobes sont souvent considérées comme la cause principale des interactions protéines/polymères [64],[65],[66]. Elles sont particulièrement importantes dans le cas des objets colloïdaux neutres ou peu chargés [64]. Elles peuvent aussi jouer un rôle prépondérant pour les polymères mis en forme. Ainsi, l'effet de l'hydrophobicité d'une chaîne peptidique de séquence contrôlée, et les conséquences sur son interaction avec des microgels de poly (acide acrylique-co-acrylamide) (p(AA-co-AAm)) de différentes densités de charges opposées ont été étudiés [61]. La perte de solubilité du peptide due à une augmentation de l'hydrophobie de la séquence permet d'augmenter l'affinité pour le microgel [67]. De plus, l'encapsulation du peptide et son affinité pour des gels augmentent avec la longueur de la partie hydrophobe terminale du peptide. De manière plus spécifique, les peptides étudiés dont la séquence ne contient pas de résidus tryptophane hydrophobes terminaux sont relargués à haute force ionique à l'inverse des peptides qui en contiennent dont le relargage est limité. Cette étude a pu montrer que même si les interactions électrostatiques sont dominantes dans les systèmes protéines/ polyélectrolytes, les autres types d'interactions dont font partie les hydrophobes ont des effets non négligeables [68].

3.2.3 Contraintes stériques dans des milieux tridimensionnels

Pour étudier les systèmes tridimensionnels, tels que des gels il est important de considérer les aspects stériques, comme la **taille de pores de la matrice** d'un gel ou les **dimensions de la protéine** à encapsuler. Ainsi, la nature poreuse des systèmes confinés tels que des microgels est liée à leur densité de réticulation, qui a un impact sur la distribution et la capacité d'encapsulation des protéines dans la matrice. Li *et al* ont démontré que la diffusion de lysozyme dans des microgels d'amidon oxydés est limitée par la réduction de la taille de pore, [13]. De plus cette absorption entraîne une contraction du gel et donc affecte également la taille de pore de la matrice par ce biais. Ainsi la distribution de la protéine dans le gel dépend de nombreux paramètres, tel que le pH, la force ionique ou la charge des deux partenaires, et peut conduire à une distribution homogène dans les gels ou limitée à la périphérie [35],[69],[32].

La taille de la protéine a une influence sur la biodistribution. Le rayon hydrodynamique d'une protéine globulaire ou la longueur de chaîne de peptide linéaire sont donc considérés. L'étude de la biodistribution de poly(L-lysines) de tailles diverses ($1 \text{ kDa} \leq M_w \leq 170 \text{ kDa}$) dans des microgels de poly(acide acrylique) a été menée. Les chaînes courtes rentrent dans tout le volume du gel, alors qu'à partir d'une certaine longueur elles sont confinées à la surface du gel, formant une coque qui limite la pénétration jusqu'au cœur. Dans les deux cas l'interaction induit une contraction du gel [70],[71] (Figure 10 a). Pour un peptide donné, la formation d'une coque peut être observée même pour une taille relativement faible comme une PLL de 10 kDa. En effet, l'état de contraction du gel va rentrer en jeu, et il dépend du milieu, par exemple à pH 4.5, les carboxyles du PAA sont à l'état neutre, entraînant une contraction du gel et donc une diminution de la taille de pores (Figure 10 b et c). Ainsi la taille limite de peptide pour obtenir une pénétration sur tout le volume dépend à la fois, de la densité de réticulation du gel, et de son degré de gonflement mais aussi de la charge des partenaires peptides et gels ainsi que de sa distribution et des facteurs extérieurs tels que le pH et la force ionique [63],[72]. Il est important de noter que le degré de pénétration d'un peptide dans le gel impacte son chargement (Figure 10 c), la vitesse de relargage, et la dégradation enzymatique potentielle du gel. Ces systèmes sont donc complexes.

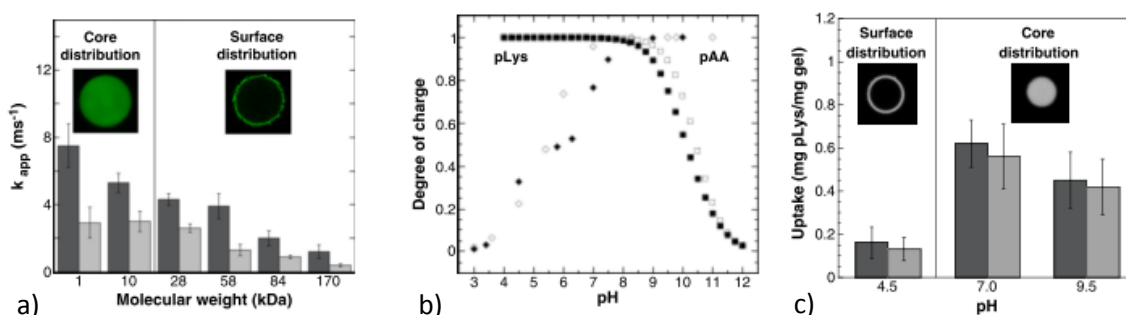


Figure 10 : Effet de la taille du peptide sur son chargement dans des microgels. A) vitesse de contraction apparente k_{app} et distribution de PLL dans des gels de polyacide acrylique en fonction de la masse moléculaire de la PLL à pH 7 et force ionique 20 (gris foncé) ou 220mM (gris clair) B) Effet du pH sur la charge globale de la PLL et des microgels. C) Distribution de PLL 10kDa dans des gels de PAA en fonction du pH.

3.2.4 Effet de la structure secondaire

L'étude en parallèle du chargement de poly-L-Lysine et de lysozyme dans des microgels de PAA a permis de déterminer l'importance de la conformation du peptide. La PLL contrairement au lysozyme peut changer de conformation, et ainsi pénétrer dans tout le volume du gel sans être confinée à la périphérie [71],[36]. La structure secondaire des peptides influe également sur le chargement. Ainsi, le taux de chargement est plus important lorsque le peptide de séquence, EFKRIVQRIKDFLRNLV s'organise sous forme d'hélice alpha, augmentant son amphiphilie. En effet, cette conformation notée a, est favorisée par le regroupement d'un côté des résidus polaires chargés, et de l'autre des résidus non-polaires hydrophobes (Figure 11 a). La substitution de certains acides aminés de la séquence a permis de supprimer la conformation elliptique, réduisant l'encapsulation de ce deuxième peptide noté d/a et la contraction du microgel associée (Figure 11 b et c) [68].

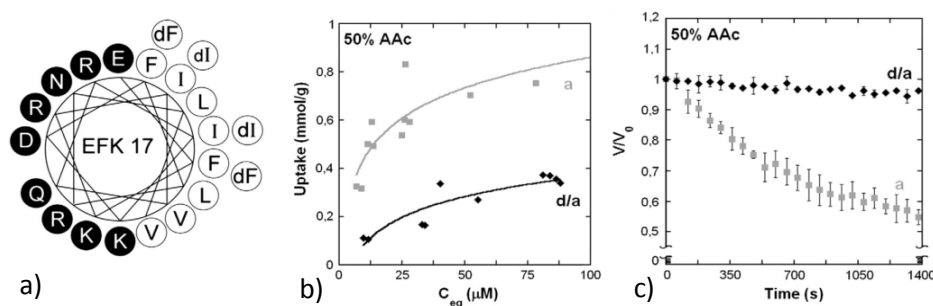


Figure 11 : Effet de la structure secondaire d'un peptide sur ses interactions avec un microgel de polyacide acrylique A) Schématisation de la structure elliptique formée par le peptide EFK 17-a de séquence, EFKRIVQRIKDFLRNLV en fonction de la polarité des résidus et de leur enchaînement. Impact de la conformation elliptique par substitution de certains résidus pour obtenir une séquence nommée EFK 17 d/a impliquant une baisse de l'affinité B) sur l'adsorption des peptides C) sur la variation de volume du gel.

4 Conclusion

Nous avons vu à travers cette étude bibliographique, que les systèmes protéines/polymères ne sont pas triviaux, en raison des structures complexes des protéines. De plus, l'étude des interactions avec des polymères de polyélectrolyte mis en forme doit prendre en compte différents aspects comme l'interaction des chaînes, mais aussi des aspects structuraux notamment pour l'étude d'hydrogels. Pour ce faire, la microscopie optique est un outil de choix. Afin de mener cette étude, des microgels de taille micrométrique doivent être préparés. De nombreux paramètres sont à prendre en compte pour les études, comme l'état de charge des partenaires, leur hydrophobie, et leurs dimensions vis-à-vis des tailles de pores. Ces paramètres peuvent varier localement pour les protéines en fonction des séquences d'acides aminés. De plus, les milieux d'étude en termes de salinité, et de pH définissent les interactions.

Références:

- [1] I. Lynch and K. A. Dawson, "Protein-nanoparticle interactions," *Nano Today*, vol. 3, no. 1–2, pp. 40–47, 2008.
- [2] D. E. Owens and N. A. Peppas, "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 307, no. 1, pp. 93–102, 2006.
- [3] D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch, and K. A. Dawson, "What the cell 'sees' in bionanoscience," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 16, pp. 5761–5768, 2010.
- [4] D. R. Lide, "CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th Edition, 2003-2004," *Handb. Chem. Phys.*, vol. 53, p. 2616, 2003.
- [5] T. R. Cechu, S. H. Damberger, and R. R. Guteli, "Representation of the secondary and tertiary structure of group I introns," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 1, no. 5, pp. 273–280, 1994.
- [6] R. Z. T. Luo, D. R. Beniac, A. Fernander, C. C. Yip, and F. P. Ottensmeyer, "Quaternary structure of the insulin-insulin receptor complex," *Science (80-.)*, vol. 285, no. 5430, pp. 1077–1080, 1999.
- [7] F. Sanger, "The free amino groups of insulin," *Biochem. J.*, vol. 39, no. 5, pp. 507–15, 1945.
- [8] A. P. Ryle, F. Sanger, L. F. Smith, and R. Kitai, "The disulphide bonds of insulin," *Biochem. J.*, vol. 60, no. 4, pp. 541–56, 1955.
- [9] H. Tuppy and F. Sanger, "The Amino-acid Sequence in the Phenylalanyl Chain of Insulin," *Biochem. Journals*, vol. 49, no. 4, pp. 463–481, 1951.
- [10] J. Brange, L. Andersen, E. D. Laursen, G. Meyn, and E. Rasmussen, "Toward Understanding Insulin Fibrillation," *J. Pharm. Sci.*, vol. 86, no. 5, pp. 517–525, May 1997.
- [11] S. Mauri, R. Pandey, I. Rzeznicka, H. Lu, M. Bonn, and T. Weidner, "Bovine and human insulin adsorption at lipid monolayers : a comparison," *Front. Phys.*, vol. 3, no. July, pp. 1–6, 2015.
- [12] R. Coppolino, S. Coppolino, and V. Villari, "Study of the Aggregation of Insulin Glargine by Light Scattering," *J. Pharm. Sci.*, vol. 95, no. 5, pp. 1029–1034, 2006.
- [13] M. J. Adams *et al.*, "Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals," *Nature*, vol. 224, no. 1, pp. 491–495, 1969.
- [14] T. L. Blundell *et al.*, "Atomic Positions in Rhombohedral 2-Zinc Insulin Crystals," *Nature*, vol. 231, pp. 506–511, 1971.
- [15] Y. Xu, D. Seeman, Y. Yan, L. Sun, J. Post, and P. L. Dubin, "Effect of heparin on protein aggregation: Inhibition versus promotion," *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 5, pp. 1642–1651, 2012.
- [16] V. Boeris, Y. Micheletto, M. Lionzo, N. P. Da Silveira, and G. Picó, "Interaction behavior between chitosan and pepsin," *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, no. 1, pp. 459–464, 2011.
- [17] V. Ball and C. Maechling, "Isothermal microcalorimetry to investigate non specific interactions in biophysical chemistry," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 8, pp. 3283–3315, 2009.
- [18] G. Baier *et al.*, "BSA Adsorption on Differently Charged Polystyrene Nanoparticles using Isothermal Titration Calorimetry and the Influence on Cellular Uptake," *Macromol. Biosci.*, vol. 11, no. 5, pp. 628–638, 2011.
- [19] S. Al-Qadi, M. Alatorre-Meda, M. Martin-Pastor, P. Taboada, and C. Remuñán-López, "The role of hyaluronic acid inclusion on the energetics of encapsulation and release of a protein molecule from chitosan-based nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 141, pp. 223–232, 2016.
- [20] J. L. Asensio, F. J. Cañada, M. Bruix, A. Rodriguez-Romero, and J. Jimenez-Barbero, "The Interaction of Hevein with N-acetylglucosamine-containing Oligosaccharides: Solution Structure of Hevein Complexed to Chitobiose," *Eur. J. Biochem.*, vol. 230, no. 2, pp. 621–633, 1995.
- [21] K. F. Morris and C. S. Johnson, "Diffusion-ordered Two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, pp. 3139–3141, 1992.
- [22] D. Šmejkalová and A. Piccolo, "Aggregation and disaggregation of humic supramolecular assemblies by NMR diffusion ordered spectroscopy (DOSY-NMR)," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, no. 3, pp. 699–706, 2008.
- [23] Y. Aso, S. Yoshioka, and S. Kojima, "Determination of the diffusion coefficient of insulin and lysozyme in crosslinked dextran hydrogels by pulsed-field-gradient NMR," *Chem Pharm Bull*, vol. 46, no. 11, pp. 1836–1839, 1998.
- [24] M. Carmen Fernández-Alonso, D. Díaz, M. Á. Berbis, F. Marcelo, J. Cañada, and J. Jiménez-Barbero, "Protein-carbohydrate interactions studied by NMR: from molecular recognition to drug design," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 13, no. 8, pp. 816–830, 2012.
- [25] R. Dronov *et al.*, "Self-Assembly of S-Layer-Enveloped Cytochrome c Polyelectrolyte Multilayers," *Langmuir*, vol. 24, no. 17, pp. 8779–8784, 2008.

- [26] G. Olanya, E. Thormann, I. Varga, R. Makuška, and P. M. Claesson, "Journal of Colloid and Interface Science Protein interactions with bottle-brush polymer layers : Effect of side chain and charge density ratio probed by QCM-D and AFM," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 349, no. 1, pp. 265–274, 2010.
- [27] Z. She, M. N. Antipina, J. Li, and G. B. Sukhorukov, "Mechanism of Protein Release from Polyelectrolyte Multilayer," *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 1241–1247, 2010.
- [28] Y. Li, Z. Zhang, H. P. van Leeuwen, M. a. Cohen Stuart, W. Norde, and J. M. Kleijn, "Uptake and release kinetics of lysozyme in and from an oxidized starch polymer microgel," *Soft Matter*, vol. 7, p. 10377, 2011.
- [29] S. Liu, Y. L. Cao, S. Ghosh, D. Rousseau, N. H. Low, and M. T. Nickerson, "Intermolecular interactions during complex coacervation of pea protein isolate and gum arabic," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 1, pp. 552–556, 2010.
- [30] W. Park and K. Na, "Polyelectrolyte complex of chondroitin sulfate and peptide with lower pI value in poly(lactide-co-glycolide) microsphere for stability and controlled release," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 72, no. 2, pp. 193–200, 2009.
- [31] Y. Li *et al.*, "Lysozyme uptake by oxidized starch polymer microgels," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 7, pp. 1754–1762, 2010.
- [32] C. Johansson, J. Gernandt, M. Bradley, B. Vincent, and P. Hansson, "Interaction between lysozyme and colloidal poly(NIPAM-co-acrylic acid) microgels," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 347, no. 2, pp. 241–251, 2010.
- [33] K. T. Oh, T. K. Bronich, V. A. Kabanov, and A. V. Kabanov, "Block polyelectrolyte networks from poly(acrylic acid) and poly(ethylene oxide): Sorption and release of cytochrome C," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 2, pp. 490–497, 2007.
- [34] Z. Liu, Y. Jiao, and Z. Zhang, "Calcium-Carboxymethyl Chitosan Hydrogel Beads for Protein Drug Delivery System," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 103, p. 3164, 2007.
- [35] C. Johansson, P. Hansson, and M. Malmsten, "Interaction between lysozyme and poly(acrylic acid) microgels," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 316, no. 2, pp. 350–359, 2007.
- [36] M. Malmsten, "Factors Affecting Enzymatic Degradation of Microgel-Bound Peptides," *Biomacromolecules*, vol. 14, pp. 2317–2325, 2013.
- [37] Y. F. Fan, Y. N. Wang, Y. G. Fan, and J. B. Ma, "Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption," *Int. J. Pharm.*, vol. 324, no. 2, pp. 158–167, 2006.
- [38] M. Mueller, B. Kessler, N. Houbenov, Z. Pientka, and E. Brynda, "pH Dependence and Protein Selectivity of Poly (ethyleneimine)/ Poly (acrylic acid) Multilayers Studied by in Situ ATR-FTIR Spectroscopy," *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 1285–1294, 2006.
- [39] B. Sarmiento, D. C. Ferreira, L. Jorgensen, and M. van de Weert, "Probing insulin's secondary structure after entrapment into alginate/chitosan nanoparticles," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 65, no. 1, pp. 10–17, 2007.
- [40] K. Yoshida, K. Sato, and J. Anzai, "Layer-by-layer polyelectrolyte films containing insulin for pH-triggered release," *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 8, pp. 1546–1552, 2010.
- [41] J. Gummel, F. Cousin, J. M. Verbavatz, and F. Boué, "Wide scale range structure in polyelectrolyte-protein dense complexes: Where sans meets freeze-fracture microscopy," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 29, pp. 8540–8546, 2007.
- [42] S. Lindhoud, L. Voorhaar, R. De Vries, R. Schweins, M. A. C. Stuart, and W. Norde, "Salt-induced disintegration of lysozyme-containing polyelectrolyte complex micelles," *Langmuir*, vol. 25, no. 19, pp. 11425–11430, 2009.
- [43] H. Bohidar, P. L. Dubin, P. R. Majhi, C. Tribet, and W. Jaeger, "Effects of protein-polyelectrolyte affinity and polyelectrolyte molecular weight on dynamic properties of bovine serum albumin-poly(diallyldimethylammonium chloride) coacervates.," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 3, pp. 1573–1585, 2005.
- [44] J. Xia and P. L. Dubin, "Chromatographic evaluation of the binding of lysozyme to poly(dimethyldiallylammonium chloride)," *J. Chromatogr. A*, vol. 667, no. 1–2, pp. 311–315, 1994.
- [45] J. McKeon and L. A. Holland, "Determination of dissociation constants for a heparin-binding domain of amyloid precursor protein and heparins or heparan sulfate by affinity capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 9, pp. 1243–1248, 2004.
- [46] M. Futamura, P. Dhanasekaran, T. Handa, M. C. Phillips, S. Lund-Katz, and H. Saito, "Two-step mechanism of binding of apolipoprotein E to heparin: Implications for the kinetics of apolipoprotein E-heparan sulfate proteoglycan complex formation on cell surfaces," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 7,

- pp. 5414–5422, 2005.
- [47] A. Kusumo, L. Bombalski, Q. Lin, K. Matyjaszewski, J. W. Schneider, and R. D. Tilton, “High capacity, charge-selective protein uptake by polyelectrolyte brushes,” *Langmuir*, vol. 23, no. 8, pp. 4448–4454, 2007.
- [48] J. Watanabe, H. Shen, and M. Akashi, “Alternate drop coating for forming dual biointerfaces composed of polyelectrolyte multilayers,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 3, pp. 759–765, 2009.
- [49] M. Ballauff and O. Borisov, “Polyelectrolyte brushes,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 11, no. 6, pp. 316–323, 2006.
- [50] M. Ballauff, “Spherical polyelectrolyte brushes,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 10, pp. 1135–1151, 2007.
- [51] W. Kopaciewicz, M. A. Rounds, J. Fausnaugh, and F. E. Regnier, “Retention model for high-performance ion-exchange chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 266, no. C, pp. 3–21, 1983.
- [52] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 2nd editio. 1992.
- [53] O. V. Borisov, E. B. Zhulina, and T. M. Birshtein, “Polyelectrolyte molecule conformation near a charged surface,” *J. Phys.*, vol. 4, no. 6, pp. 913–929, 1994.
- [54] M. Record, C. F. Anderson, and T. M. Lohman, “Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity,” *Quarterly Rev. Biophys.*, vol. 11, pp. 103–178, 1978.
- [55] N. Welsch, A. L. Becker, J. Dzubiella, and M. Ballauff, “Core–shell microgels as ‘smart’ carriers for enzymes,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 5, p. 1428, 2012.
- [56] A. L. Becker, N. Welsch, C. Schneider, and M. Ballauff, “Adsorption of RNase A on cationic polyelectrolyte brushes: A study by isothermal titration calorimetry,” *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 11, pp. 3936–3944, 2011.
- [57] F. A. M. Leermakers, M. Ballauff, and O. V. Borisov, “On the mechanism of uptake of globular proteins by polyelectrolyte brushes: A two-gradient self-consistent field analysis,” *Langmuir*, vol. 23, no. 7, pp. 3937–3946, 2007.
- [58] W. M. De Vos, F. A. M. Leermakers, A. De Keizer, M. A. C. Stuart, and J. M. Kleijn, “Field theoretical analysis of driving forces for the uptake of proteins by like-charged polyelectrolyte brushes: Effects of charge regulation and patchiness,” *Langmuir*, vol. 26, no. 1, pp. 249–259, 2010.
- [59] C. Czeslik *et al.*, “Salt-induced protein resistance of polyelectrolyte brushes studied using fluorescence correlation spectroscopy and neutron reflectometry,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 6, pp. 5557–5563, 2004.
- [60] H. Bysell and M. Malmsten, “Interactions between Homopolypeptides and Lightly Cross-Linked Microgels,” *Langmuir*, vol. 25, no. 1, pp. 522–528, 2009.
- [61] H. Bysell, P. Hansson, and M. Malmsten, “Effect of charge density on the interaction between cationic peptides and oppositely charged microgels,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 21, pp. 7207–7215, 2010.
- [62] Y. Li, J. M. Kleijn, M. a. Cohen Stuart, T. Slaghek, J. Timmermans, and W. Norde, “Mobility of lysozyme inside oxidized starch polymer microgels,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 5, p. 1926, 2011.
- [63] H. Bysell, A. Schmidtchen, and M. Malmsten, “Binding and Release of Consensus Peptides by Poly (acrylic acid) Microgels,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 8, pp. 2162–2168, 2009.
- [64] D. Chandler, “Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly,” *Nature*, vol. 437, no. 7059, pp. 640–647, 2005.
- [65] S. Lindman, I. Lynch, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, and S. Linse, “Systematic Investigation of the Thermodynamics of HSA Adsorption to N-iso-Propylacrylamide/N-tert-Butylacrylamide Copolymer Nanoparticles. Effects of Particle Size and Hydrophobicity,” *Nano Lett.*, vol. 7, no. 4, pp. 914–920, 2007.
- [66] A. E. Nel *et al.*, “Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface,” *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 7, pp. 543–557, 2009.
- [67] H. Bysell, P. Hansson, A. Schmidtchen, and M. Malmsten, “Effect of Hydrophobicity on the Interaction between Antimicrobial Peptides and Poly (acrylic acid) Microgels,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 3, pp. 1307–1313, 2010.
- [68] R. Månsson, H. Bysell, P. Hansson, A. Schmidtchen, and M. Malmsten, “Effects of Peptide Secondary Structure on the Interaction with Oppositely Charged Microgels,” *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 2, pp. 419–424, 2011.

- [69] C. Johansson, P. Hansson, and M. Malmsten, "Mechanism of Lysozyme Uptake in Poly (acrylic acid) Microgels," *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 18, pp. 6183–6193, 2009.
- [70] H. Bysell and M. Malmsten, "Visualizing the Interaction between Poly- L -lysine and Poly (acrylic acid) Microgels Using Microscopy Techniques : Effect of Electrostatics and Peptide Size," *Langmuir*, vol. 22, no. 12, pp. 5476–5484, 2006.
- [71] H. Bysell, P. Hansson, and M. Malmsten, "Transport of poly-l-lysine into oppositely charged poly(acrylic acid) microgels and its effect on gel deswelling," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 323, no. 1, pp. 60–69, 2008.
- [72] T. Hoare and R. Pelton, "Impact of Microgel Morphology on Functionalized Microgel - Drug Interactions," *Langmuir*, vol. 24, no. 3, pp. 1005–1012, 2008.

Chapitre 3:

Préparation de gels d'acide

hyaluronique à plusieurs échelles.

Introduction au chapitre

Le but de ce chapitre est de décrire les différents procédés de synthèse mis en jeu pour obtenir des matériaux à base d'hydrogel. Ainsi, nous souhaitons produire des particules d'hydrogel de taille contrôlée, et ce, à différentes échelles : à l'échelle nanométrique en vue de la préparation d'objets injectables contenant l'insuline, et à l'échelle micrométrique afin de servir d'outils pour bien comprendre les interactions entre l'insuline et les matrices de gel.

Les hydrogels peuvent être classés en fonction de leur taille, d'après la nomenclature IUPAC [1], on parle de macrogels, microgels ou nanogels. Les microgels sont eux-mêmes classés en deux catégories, les gels colloïdaux, dont la taille est inférieure au micron et les gels non-colloïdaux de l'ordre du micromètre ou plus. Les microgels et nanogels ont de nombreux avantages liés à leur taille. Leur ratio surface sur volume est grand impliquant des transports de masse efficace de, et vers la matrice de polymère. De plus, leur comportement en termes de gonflement montre des temps de réponse plus courts en diminuant la taille des gels [2]. Cependant, leur taux de chargement en insuline est également limité par leur taille. Pour la formulation d'un nouveau traitement pour traiter le diabète de type 1, il est possible d'envisager des nanogels injectables ou des micro/macrogels administrables sous forme de dépôt

Lors de ces travaux, nous appellerons nanogels les gels mesurant quelques centaines de nanomètres, microgels, les objets de quelques centaines de micromètres et enfin, macrogels les objets de taille supérieure au millimètre.

Dans ce chapitre, une première partie est consacrée à présenter le concept de la préparation d'hydrogels en milieu confiné pour justifier le choix des méthodes. Dans un second temps, les précurseurs choisis pour préparer les gels, ainsi que leurs voies de synthèse sont décrits. Nous nous intéressons ensuite à la préparation d'hydrogels de taille micrométrique et à leur caractérisation, à travers la présentation d'une librairie de gels. Puis, les hydrogels de HA de taille nanométrique et leur préparation sont présentés. Les microgels et nanogels sont caractérisés en termes de variation de gonflement en fonction du milieu et de sensibilité aux sucres. Enfin pour conclure ce chapitre, les propriétés de dégradation des matrices sont discutées.

1 Réticulation des précurseurs en milieu confiné

Pour produire des particules d'hydrogels de taille contrôlée, différents procédés existent. Leur choix dépend des réactifs initiaux et de leur solubilité. Dans notre cas, nous partons de solutions de polymères et voulons les réticuler pour former des réseaux. Dans un premier temps il faut rendre ces polymères réactifs grâce à des modifications chimiques et ensuite procéder à leur réticulation sous forme sphérique de taille contrôlée. Pour ce faire, trois méthodes existent :

1. Le confinement des chaînes dans un compartiment qui va servir de micro/nano réacteur ;
2. La préorganisation des chaînes entre elles par des interactions physiques (techniques d'assemblage) converties en liaisons covalentes dans un second temps ;
3. La réticulation localisée où les particules sont produites une par une [3].

La deuxième stratégie citée mettant en jeu des phénomènes d'autoassemblages interchaînes, nécessite que les chaînes soient porteuses de motifs responsables des interactions attractives. Or nous souhaitons modifier les chaînes à minima, afin de préserver leur caractère biocompatible et biodégradable. Dans ce contexte, les chaînes de HA sont très solubles en milieu aqueux et ne possèdent pas, à priori, de propriétés d'autoassemblage.

La troisième méthode, quant à elle, ne permet pas de produire des ensembles de matériaux acceptables pour l'industrie en raison de la complexité des systèmes, et des quantités de particules produites. Pour ces raisons, nous avons choisi d'utiliser la méthode 1 et de confiner les chaînes dans des micro/nano réacteurs.

1.1 Présentation des différents modes de confinement

Afin de confiner les chaînes de polymère, différentes méthodes sont disponibles.

1.1.1 Confinement en compartiment solide

L'utilisation de moules obtenus par photolithographie ou moulage permet de préparer des gels dans une gamme de taille dépassant le micromètre. Ces techniques permettent de préparer des gels aux morphologies et formes variées. Des moules généralement réalisés en poly (diméthylsiloxane) (PDMS) sont utilisés comme empreinte. Les macromères sont ensuite introduits dans ces empreintes et la gélification des structures est déclenchée (Figure 1). Une des méthodes utilisées, nommée PRINT (pour « particle replication in non-wetting templates »), permet par dépôt d'une solution de macromères sur une surface non mouillante, suivi de la réticulation du système, d'obtenir des objets individualisés de manière reproductible [3], [4]. Cependant ces techniques nécessitent la fabrication de moules ou d'empreintes qui sont relativement coûteux et le nombre de répliques réalisés est limité.

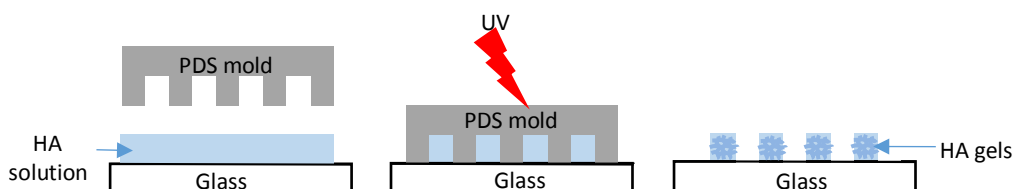


Figure 1 : Représentation schématique de micromoulage de HA photopolymérisé dans des empreintes (méthode PRINT, [4]).

1.1.2 Confinement en compartiment liquide

L'utilisation de compartiments liquides peut se faire par la préparation de gouttes grâce à des émulsions eau-dans-huile, huile-dans-eau ou eau-dans-eau, ou par la préparation de capsules notamment des liposomes. Les gouttes de solution aqueuse permettent de confiner les précurseurs polymériques hydrosolubles.

1.1.2.1 *Emulsion eau-dans-eau*

Les émulsions eau-dans-eau permettent de séparer des polymères non miscibles entre eux pour former deux phases: polymère 1-eau et polymère 2-eau (Figure 2). Cette technique a un intérêt pour les applications biomédicales en raison de l'absence de solvant organique. Paradossi a ainsi préparé des microgels de dextran

méthacrylate en utilisant le PVA/dextran comme couple de polymères non miscibles menant à des microgels de l'ordre du micron [5]. Cependant, peu de couples de polymères ont été à ce jour identifiés. On peut citer également les couples NIPAM/PVA [6], amidon/PEG [7], alginate/caséinate [8].

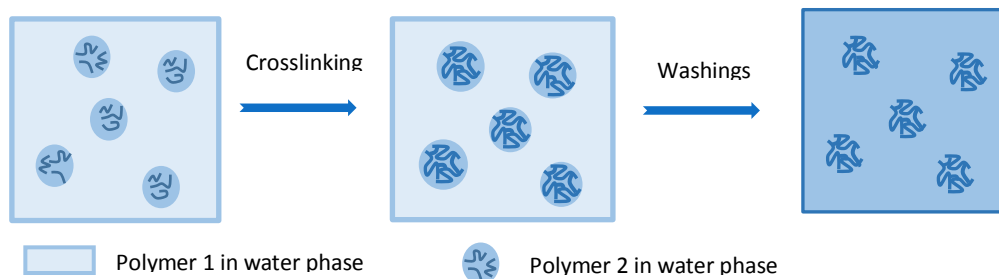


Figure 2 : Représentation schématique de l'utilisation d'une émulsion eau-dans-eau pour réticuler des hydrogels en milieu confiné.

1.1.2.2 *Utilisation de liposomes*

Une autre approche en milieu aqueux a été développée en utilisant le confinement de macromères dans des liposomes utilisés comme nanoréacteurs avant l'amorçage de la réticulation (Figure 3). Ainsi des nanogels de dextran-méthacrylate ont été préparés en réhydratant un film lipidique dans une solution de dextran-méthacrylate en présence de photoamorceur. La réticulation des gels est amorcée par irradiation UV [9]. Des nanogels d'acide hyaluronique ont également été préparés par cette méthode par nos partenaires du CERMAV [10].

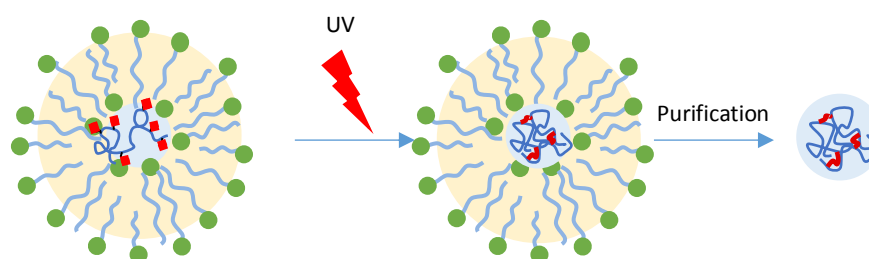


Figure 3: Représentation schématique de la préparation de nanogels par confinement des précurseurs dans la cavité aqueuse de liposomes jouant le rôle de nanoréacteurs.

1.1.2.3 *Emulsion en milieu hétérogène*

L'utilisation d'émulsions inverses comme matrice pour préparer des nanogels ou des microgels est couramment utilisée (Figure 4). La réticulation est déclenchée tant que le polymère est confiné dans les gouttes. Après lavage et redispersion, des gels dont la taille est corrélée à la taille des gouttes sont collectés. Afin, d'obtenir des gels de taille nanométrique, des émulsions inverses de phases hexane et PBS ont été reportées. Le HA modifié par des fonctions glycidyle méthacrylate a été confiné en émulsion, puis réticulé dans les gouttes par amorçage thermique. Les nanogels obtenus ont une taille proche de 300 nm [11]. Lors de travaux précédents réalisés dans notre groupe, des gels de HA-MA d'environ 200 nm ont été préparés par polymérisation radicalaire en miniémulsion en présence d'octane ou d'hexane [12].

Des microgels de taille micrométrique peuvent être produits par émulsification inverse. Des microsphères d'acide hyaluronique modifié par des hydrazides ont été préparées en confinant le HA en présence de dihydrazide adipique dans une émulsion inverse constituée d'un mélange huile minérale/span 80/eau. La dihydrazide permet la réticulation du HA dans les gouttes pour conduire à la formation de microgels de taille comprise entre 5 et 15 μm [13].

Pour les méthodes suscitées, la taille du compartiment et les propriétés de gonflement fixent la taille de la particule d'hydrogel. Compte-tenu de la simplicité de mise en œuvre et de la possibilité de produire des gels à plus grande échelle, la voie des compartiments liquides est choisie. De plus, les chaînes de HA sont hydrosolubles. Nous privilégions donc la préparation d'émulsions eau-dans-huile, qui permettent de confiner la totalité des chaînes dans les gouttes.

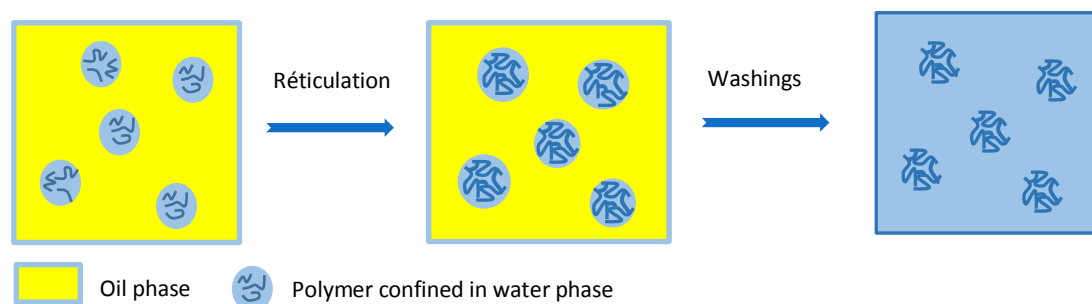


Figure 4 : Schéma général de réticulation des gels en milieux confinés grâce à une émulsion eau dans huile.

Pour contrôler la taille des objets fabriqués, il est nécessaire de préparer des gouttes de taille plus uniforme. La technique d'émulsification va donc contrôler la taille des compartiments aqueux. Elle doit avoir lieu lorsque la phase aqueuse est à l'état fluide, c'est-à-dire avant que la réticulation ait lieu. Des techniques comme l'utilisation de dispositifs microfluidiques ou des techniques d'émulsification membranaire sont envisagées. L'enjeu pour produire des tailles de particules d'hydrogel contrôlées, sera donc de produire des émulsions de taille contrôlée. Il faudra également maîtriser le confinement des chaînes et le déroulement de la réaction de réticulation, qui peut être en compétition avec une éventuelle déstabilisation des gouttes.

1.2 Contrôle des émulsions eau-dans-huile

1.2.1 Concept des émulsions eau-dans-huile

Lors de la préparation d'émulsions eau-dans-huile, deux phases sont mises en présence : la première, la phase aqueuse ou phase dispersée contient les macromères en solution, la deuxième phase contient le ou les tensioactifs dans un milieu organique: on parle de phase continue (Figure 5 a). Par apport d'énergie occasionnant une fragmentation, la dispersion de la phase aqueuse dans la phase organique peut avoir lieu, entraînant la formation de gouttes d'eau dans la phase organique (Figure 5 b et c). L'énergie de surface engendrée par l'augmentation de l'interface eau-huile est ainsi compensée. Ces systèmes ne sont pas stables thermodynamiquement, la présence de tensioactifs pour stabiliser les gouttes est nécessaire pour éviter leur retour à un système biphasique. Le tensioactif présent en solution peut également s'organiser sous forme de micelles qui cohabitent avec les gouttes. Les tensioactifs sont des espèces amphiphiles qui peuvent mener à

la formation d'émulsions eau-dans-huile ou huile-dans-eau en fonction de leur structure chimique. Afin de prédire l'orientation de l'émulsion induite par un tensioactif, une échelle semi-empirique a été développée par Griffin [14]. Elle permet de classer les tensioactifs en fonction de leur balance hydrophile-lipophile (HLB). Cette échelle est établie grâce au pourcentage relatif de fonctions hydrophiles et lipophiles dans la structure du tensioactif. Ainsi, plus la HLB est élevée, plus le tensioactif est soluble dans l'eau, et favorise la formation d'émulsions directes eau-dans-huile. Pour la formation d'émulsions inverses, nous devons donc choisir un tensioactif soluble dans l'huile de faible HLB.

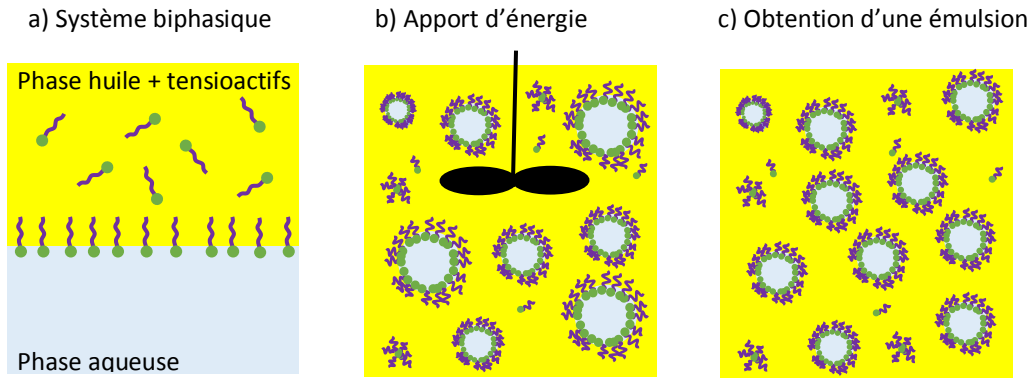


Figure 5 : Représentation conceptuelle de la préparation d'une émulsion eau-dans-huile. a) système biphasique à émulsionner, le tensioactif est dans la phase huile b) apport d'énergie entraînant la dispersion de la phase aqueuse dans la phase huile. c) représentation de l'émulsion obtenue. Dans le milieu, coexistent des gouttes d'huile stabilisées par le/les tensioactifs, des micelles gonflées et des unimères de tensioactifs.

1.2.2 Contrôle de la taille des émulsions

La taille des gouttes obtenue lors de l'étape de fragmentation des émulsions dépend de l'énergie mécanique introduite dans le système. Le principe de la fragmentation consiste à déformer, sous contrainte de cisaillement ou élongationnelle, un fluide dans un autre. L'excès de surface développée lors de cette déformation entraîne la rupture du fluide en gouttes plus petites (Figure 6). Ces phénomènes sont décrits par Taylor [15].

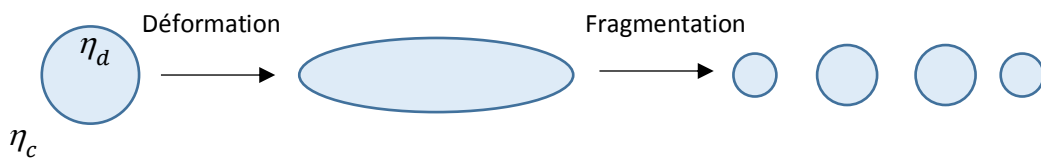


Figure 6: Fragmentation d'une goutte η_d et η_c sont respectivement les viscosités de la phase dispersée et de la phase continue

La déformabilité d'une goutte est caractérisée par la pression de Laplace $P = \frac{2\gamma}{R}$ où R et γ sont respectivement la taille de la goutte à fragmenter et la tension de surface entre les deux liquides. Plus la pression de Laplace est élevée, moins la goutte est déformable. Lors de l'application d'un cisaillement, la goutte est soumise à une contrainte visqueuse définie par $\tau = \eta_c G$ où η_c est la viscosité de la phase continue et G le gradient de cisaillement appliqué. La condition de rupture d'une goutte isolée pour un type d'écoulement donné ne

dépend que de deux paramètres adimensionnels : le rapport des viscosités des deux fluides $\rho = \eta_d / \eta_c$ et le rapport entre la contrainte de cisaillement et la pression de Laplace appelé nombre capillaire, $Ca = \frac{\tau}{P_l} = \frac{\eta_c G R}{2 \gamma}$ où η_d est la viscosité de la phase dispersée. Il quantifie la compétition entre le cisaillement, qui tend à déformer la goutte et la pression de Laplace, qui tend à conserver sa forme sphérique.

Lorsque le nombre capillaire mis en jeu dépasse une valeur critique et lorsque ρ reste inférieur à quelques unités, la goutte se déforme progressivement et se fragmente en plusieurs gouttelettes [16].

1.2.2.1 *Emulsification par haut taux de cisaillement*

Plusieurs techniques sont disponibles afin de fragmenter des émulsions dans l'optique d'obtenir des gouttes nanométriques. On parle de techniques à fort taux de cisaillement ou à haute énergie. L'ultrasonication est un procédé simple, bien décrit dans la littérature, pour la fabrication de nanogels de polymère hydrophile par miniémulsion inverse [17], [18]. L'émulsification est assurée par la génération de bulles de cavitation par ultrason. L'implosion des bulles provoque des cisaillements extrêmes entraînant la fragmentation.

Une autre technique est l'utilisation de dispositifs microfluidiques à haute pression : les homogénéiseurs à haute pression ou microfluidiseur (MF). Ces dispositifs sont utilisés principalement pour la formulation de nanoémulsions directes, cependant il est possible de les utiliser pour des émulsions inverses [12]. Cette technique est moins simple et plus coûteuse à mettre en œuvre que l'ultrasonication mais les émulsions obtenues sont plus fines. La fragmentation se fait par circulation sur plusieurs cycles des phases aqueuses et organiques dans des canaux micrométriques ($\approx 100 \mu\text{m}$) à des pressions de élevées de l'ordre de 100 kPa. Cette technique est décrite plus en détail en partie expérimentale.

1.2.2.2 *Emulsification par faible taux de cisaillement*

L'utilisation de techniques à plus faible taux de cisaillement telles que l'émulsification membranaire ou par voie microfluidique permettent d'accéder à des émulsions ayant de plus grande taille de gouttes, généralement supérieure au micromètre.

La préparation de microgels par voie membranaire, correspond à la fabrication d'une émulsion à travers une membrane, suivi de la gélation des monomères dans les gouttes. L'émulsion est préparée par injection d'une phase dispersée pure ou d'une phase pré-émulsionnée à travers une membrane poreuse derrière laquelle se trouve la phase continue. Des gouttes se forment à l'interface membrane/phase continue (Figure 7) [19]–[21]. Pour la fabrication d'hydrogels, les membranes utilisées sont hydrophobes [22].

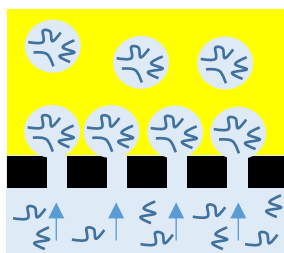


Figure 7: Représentation schématique du principe d'émulsification membranaire par injection d'une phase dispersée contenant des précurseurs polymériques hydrosolubles.

La préparation de microgels par voie microfluidique, met en œuvre un système multiphase, et a lieu en trois étapes (Figure 8). Dans un premier temps, la phase dispersée est émulsifiée dans un milieu continu grâce à l'utilisation de puces microfluidiques [23]. Elles permettent la rencontre de deux fluides immiscibles dans un canal microfluidique qui aboutit à la formation d'émulsions. Dans la phase dispersée, se trouvent les précurseurs dans l'eau, ils peuvent être sous forme de macromères ou de monomères, [21],[22]. Une fois confinés, la gélification est déclenchée par voie thermique, ou photonique [26]–[29], entraînant la formation de particules de gel. La polymérisation peut avoir lieu directement dans la puce ou lorsque les gouttes sont collectées en sortie. Elle dépend de plusieurs paramètres tels que la largeur des canaux, le débit des deux phases et le temps d'exposition au déclencheur. Dans le cas où la polymérisation est déclenchée dans la puce, la géométrie et la morphologie des gels sont définies par la forme des gouttes dans la puce. Enfin les gels formés doivent être transférés dans une phase aqueuse après avoir été préalablement purifiés pour enlever la phase continue et le tensioactif. La purification peut impliquer de déstabiliser l'émulsion par coalescence.

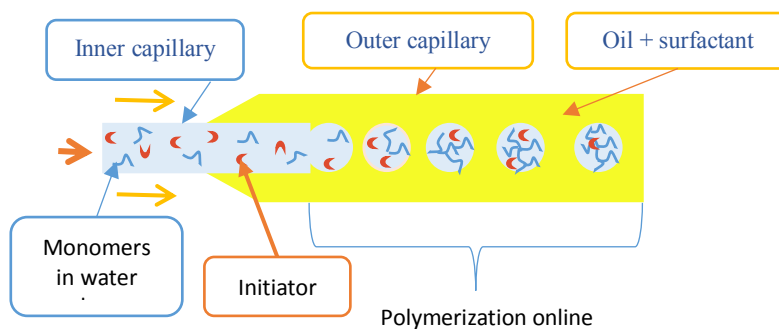


Figure 8 : Représentation schématique du principe d'émulsification par voie microfluidique pour la formation d'hydrogels (Exemple de l'utilisation de capillaire en écoulement parallèle).

Lors de la première étape, qui est l'étape de fragmentation, les deux phases sont mises en contact dans des puces de géométries définies, les plus fréquentes sont celles dites de jonction en T [30] et celles dites de focalisation de flux [31]. Dans ces deux cas, la phase dispersée est comprimée par la phase continue. Les gouttes de phase aqueuse sont formées une à une et entraînées par la phase continue. Le débit de formation des gouttes peut être très rapide avec des fréquences pouvant monter au MHz [32].

Le comportement des phases et des interfaces entre les phases dans un microcanal dépend de plusieurs paramètres : la géométrie du canal, les propriétés des deux phases notamment leurs propriétés de mouillage et les conditions de l'écoulement. Ces grandeurs physiques, sont reliées entre elle par des nombres adimensionnels, tels que le nombre de Reynolds Re et le nombre capillaire Ca . Le nombre de Reynolds représente le rapport entre les forces inertielles et les forces visqueuses, et est défini comme :

$$Re = \frac{\rho v l}{\mu}$$

Où ρ est la densité du fluide, l est une longueur caractéristique, v est une vitesse caractéristique du fluide, μ est la viscosité dynamique de la phase continue.

En microfluidique, les écoulements des phases sont de type laminaire, ils ont de faible taux de Reynolds et les forces visqueuses dominent.

Le nombre Capillaire a été défini paragraphe 1.2.2. Pour entraîner la fragmentation, il faut dépasser une valeur de nombre capillaire critique. Plusieurs leviers sont disponibles notamment la modification de la tension de surface entre les phases grâce au tensioactif ou la modification du rapport des viscosités par le choix de l'huile.

La microfluidique permet de limiter la distribution de taille des gouttes et donc d'obtenir des gels de taille extrêmement régulière. Ainsi des gouttes avec une variation de taille de moins de 1% ont été reportées dans la littérature [33],[34]. L'utilisation de la microfluidique permet d'obtenir une grande flexibilité dans le modèle de puce utilisé. Différents paramètres peuvent être ajustés pour faire varier la taille des objets [35],[36], leurs morphologies [37],[38], leur propriété de gonflement [39],[40], leur dégradabilité [41],[42], ainsi que leur fonctionnalisation. Parmi ces paramètres, se trouvent la géométrie du modèle, les propriétés physico-chimiques des phases continues et dispersées, et surtout de leurs débits respectifs [43]. Enfin la microfluidique permet d'utiliser très peu de précurseurs polymériques [33],[34], car les gouttes sont fragmentées une par une permettant de contrôler précisément la quantité d'objet que l'on produit. Nous privilégions ce type de fragmentation pour préparer des gels de taille micrométrique de quelques centaines de micromètres.

1.2.2.3 Phénomènes de déstabilisation

Les tailles des gouttes peuvent évoluer dans le temps en raison de phénomènes de déstabilisation. Les phénomènes de vieillissement auxquels sont soumises les émulsions sont : la sédimentation, la floculation, la coalescence et le mûrissement d'Ostwald. Les deux derniers modes conduisent à une évolution de la taille des gouttes, qui peut être en compétition avec la réticulation des microgels dans les compartiments. Nous les présentons plus en détails ci-dessous.

La *coalescence*, est une déstabilisation irréversible due à la rupture du film interfacial entre les gouttes, qui fusionnent pour former une goutte plus grande menant à la restitution d'un système biphasique et à la diminution de l'énergie de surface (Figure 9). La coalescence est favorisée dans le cas de gouttes de grande taille qui ont une plus grande surface de contact. En l'absence d'agent de surface comme des tensioactifs permettant de retarder le phénomène, la coalescence a lieu spontanément.

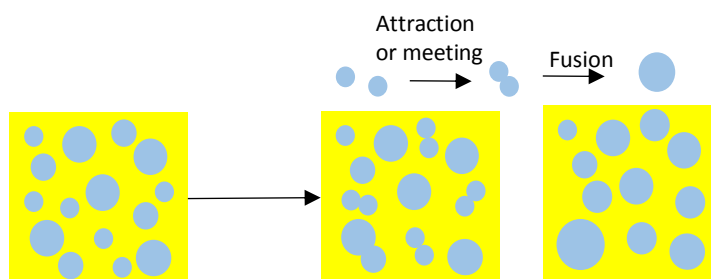


Figure 9 : Représentation schématique du phénomène de coalescence pour l'exemple d'une émulsion inverse.

Le *mûrissement d'Ostwald* est également un phénomène de vieillissement irréversible. Il correspond à un flux de matières des petites gouttes vers les grosses par diffusion via la phase continue, résultant de la différence des pressions de Laplace entre les gouttes (Figure 10). Le mûrissement est dû à une solubilité partielle de la phase dispersée dans la phase continue. Il est d'autant plus rapide que la différence de pression de Laplace entre les gouttes est grande et la solubilité de la phase dispersée dans la phase continue élevée.

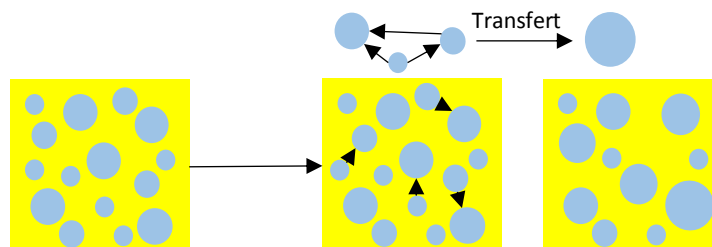


Figure 10: Représentation schématique du phénomène de mûrissement d'Ostwald pour l'exemple d'une émulsion inverse.

La préparation d'émulsions dans un dispositif microfluidique tel que nous avons choisi pour la préparation de microgels, est un processus continu, les gouttes sont fragmentées l'une après l'autre, et irradiées l'une après l'autre. A l'inverse, la préparation de nanoémulsion se fait par batch, un volume défini de chaque phase est mis en contact et les gouttes sont fragmentées simultanément. De plus, pour la préparation de microgels, la photopolymérisation a lieu dans le dispositif, limitant les possibilités de déstabilisation des gouttes, alors que pour les nanoémulsions, la photopolymérisation a lieu dans un deuxième temps, la question du maintien de la stabilité des gouttes est alors primordiale.

1.3 Contrôle de la réticulation

Une fois les précurseurs confinés dans des émulsions de taille contrôlée, la réticulation doit être déclenchée de manière contrôlée. Différents paramètres ont été choisis de manière à maîtriser ce processus.

1.3.1 Choix du précurseur

Les précurseurs confinés dans les gouttes sont des précurseurs d'acide hyaluronique. Cependant, afin de pouvoir former un réseau tridimensionnel à partir de ces polymères linéaires, il faut introduire sur les chaînes des fonctions réticulables. Comme présenté dans le chapitre bibliographique, il existe différents types de réticulation, comme la création de liaisons covalentes permanentes ou réversibles, ou une réticulation mettant en jeu des liaisons hôte/invité ou des interactions ioniques. Nous avons choisi de privilégier des liaisons covalentes permanentes pour maintenir le réseau. Elles peuvent avoir lieu par condensation ou addition grâce à des fonctions thiol, halocétate, dihydrazide, aldéhyde ou tyramide. La réticulation peut se faire par chimie click, par réaction de Diels-Alder ou de Mickaël. Enfin, les liaisons permanentes peuvent avoir lieu par photopolymérisation en utilisant la chimie thiol-ène [44] ou des fonctions méthacrylates [45]. Nous avons choisi de nous concentrer sur des systèmes dont la chimie est bien connue qui consiste à utiliser des fonctions méthacrylates. Les concepts sont transposables à la chimie thiol-ène [44].

1.3.2 Choix de la méthode d'amorçage

Les méthacrylates peuvent réagir entre eux par voie radicalaire de manière à créer des liaisons covalentes. Les réactions radicalaires permettent le contrôle du déclenchement. Elles peuvent être amorcées par voie thermique, lumineuse (par irradiation UV) ou redox (par addition d'un accélérateur dans la phase continue) et permettent de travailler en milieu aqueux. Les précurseurs confinés doivent être modifiés chimiquement de manière à pouvoir être réticulé. Or, nous souhaitons que la réticulation soit déclenchée de manière externe, une fois les précurseurs confinés dans les gouttes. Pour ce faire, la réaction doit être contrôlée spatialement et temporellement. Nous utiliserons donc des précurseurs hydrosolubles d'acide hyaluronique modifiés par des fonctions méthacrylate HA-MA et pour amorcer la réticulation, notre choix s'est porté sur une réticulation par voie UV qui permet un bon contrôle spatio-temporel [46].

1.3.3 Contrôle de la réaction

Afin de maîtriser la formation de gel et leur taille, la polymérisation a lieu lorsque les précurseurs sont confinés dans des gouttes d'émulsion eau-dans-huile. L'émulsion doit être cinétiquement stable à l'échelle du temps du procédé, afin d'obtenir des populations de gels monodisperses. La cinétique de déstabilisation doit être supérieure à la cinétique de réaction.

En outre, contrairement à la préparation de macrogels qui correspond à une gélification en solution où une seule phase aqueuse est mise en jeu, la méthode de fabrication des gels a lieu en milieu biphasique. Certaines espèces, comme le photoamorceur, présentes dans la phase aqueuse peuvent se trouver confinées dans les gouttes d'eau de manière partielle en raison de l'existence d'un coefficient de partage entre les deux phases. La composition des phases doit être adaptée.

2 Préparation des précurseurs de HA

Afin de préparer des hydrogels d'acide hyaluronique, nous voulons introduire des fonctions méthacrylates sur les chaînes pour pouvoir créer un réseau tridimensionnel [47]. De plus, pour obtenir des gels adressables sensibles au glucose, des fonctions spécifiques tels que les acides phénylboroniques doivent être introduites. Différents précurseurs ont donc été préparés pour avoir à disposition une gamme de macromères de HA réticulables avec différents degrés de fonctionnalisation, et des macromères fonctionnalisés avec des ligands du glucose PBA de différents taux de greffages.

2.1 Préparation de dérivés de HA réticulables (HA-MA)

Plusieurs méthodes ont été décrites pour greffer des fonctions méthacrylates sur des chaînes de HA. La fonctionnalisation se fait majoritairement dans des conditions douces sur les fonctions hydroxyles [1],[2], mais des greffages sur des groupements carboxyles ont également été reportés [50],[51]. Plusieurs types de méthacrylates ont été greffés au HA : l'anhydride méthacrylate (AMA) [52],[53] ou le glycidyle méthacrylate (GMA) [48]. La réaction a été décrite par l'équipe de Grinstaff qui l'a conduite en milieu aqueux par introduction d'un excès d'anhydride méthacrylate (20 fois plus que de HA) dans une solution de HA à

2 w/v%. La réaction est conduite à pH 8 pendant 24h à 5°C. En raison du choix du milieu, le taux de greffage obtenu lors de cette réaction est limité aux alentours de 30 %. Ces faibles taux de greffage s'expliquent par la mauvaise solubilité des fonctions méthacrylates et leur capacité à s'hydrolyser. Le taux de fonctionnalisation peut être augmenté en réalisant la synthèse dans un milieu où l'eau est mélangée à un solvant organique miscible [49],[54]. Ainsi, il a été montré la possibilité d'atteindre des taux de fonctionnalisation de 90 % de GMA sur la chaîne de HA dans un mélange eau/diméthylformamide (DMF) à pH physiologique mais en laissant la réaction avoir lieu plus longtemps (10 jours) [49].

Nous avons choisi d'utiliser l'anhydride méthacrylate pour introduire des fonctions réticulables sur la chaîne de HA grâce au protocole optimisé par nos partenaires du CERMAV [45]. Pour ce faire, les fonctions hydroxyles de l'acide hyaluronique vont réagir avec de l'anhydride méthacrylate par une réaction d'estérification dans un mélange eau/DMF. Le greffage a lieu principalement sur le carbone C-6 du groupe hydroxyle du sucre N-acétylglucosamine en raison d'une meilleure réactivité des alcools primaires (Figure 11).

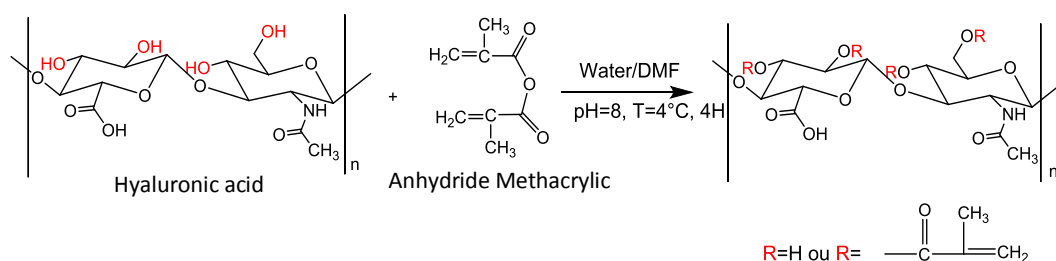


Figure 11: Représentation schématique de la réaction de greffage de l'anhydride méthacrylique sur des chaînes de HA.

Les protocoles de synthèse mis en œuvre sont décrits en partie expérimentale. Plusieurs synthèses ont été réalisées afin de faire varier le taux de greffage. La modulation du degré de méthacrylation (DM) permet de faire varier la réticulation des gels préparés à partir des macromères de HA-MA. D'autres paramètres rentrent en jeu pour les caractéristiques des gels obtenus, notamment la longueur de chaîne du HA, et sa concentration. Des synthèses ont été effectuées pour obtenir différents taux de méthacrylation. Ces derniers sont déterminés par RMN du proton. Un spectre type obtenu pour un DM de 20 % est décrit Figure 12.

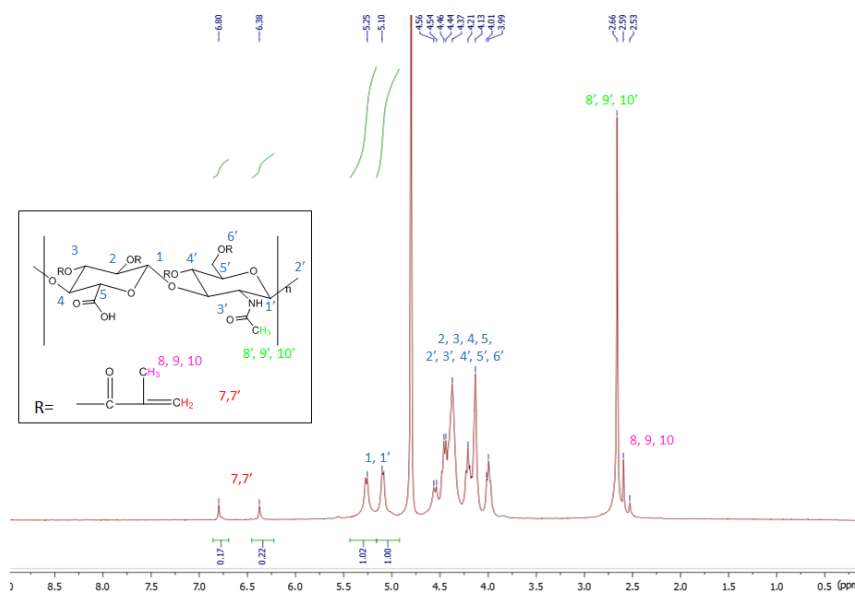


Figure 12: Spectre ^1H -RMN du précurseur HA-MA-2 100 K DM 20 %; ^1H NMR (400 MHz, D_2O , 80 C): δ (ppm) : 2.5 (s, 3H CH_3 (MA)), 2.6 (s, 3H, CH_3CO), 3.9-4.5 (m, 9H), 5.1 (d, 1 H anomérique), 5.2 (d, 1 H anomérique), 6.4 (d, 1 H $\text{CH}_2=$), 6.8 (d, 1H $\text{CH}_2=$).

Les pics à environ 6,5 ppm sont caractéristiques des liaisons $=\text{CH}_2$ présentes sur les fonctions méthacrylates greffées. Afin de déterminer le taux de greffage il faut comparer l'intensité de ces pics avec ceux d'un proton caractéristique de la chaîne de HA. Les protons anomériques situés à 5,1 et 5,2 ppm sont choisis. Ainsi, le taux de méthacrylation est déterminé car il correspond au ratio des intégrations des pics des méthacrylates à 6,4 et 6,8 ppm et des pics des protons anomériques de la chaîne de HA. Les autres pics du spectre sont attribués de la manière suivante : les 9 autres protons de la chaîne de HA présents sur les deux unités saccharides forment un large signal entre 3,9 et 4,5 ppm. Les protons des groupements méthyles présents sur les méthacrylates et la chaîne de HA sont visibles respectivement à 2,5 et 2,6 ppm.

Nous voulons préparer une gamme de précurseur avec des taux de méthacrylation de 10, 20 et 40 %. Pour cela nous faisons varier les quantités de réactifs introduits dans les synthèses. En fin de synthèse, les degrés de méthacrylation réellement obtenus sont déterminés par ^1H -RMN. Les conditions expérimentales des synthèses et les degrés de méthacrylation visés et obtenus sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Bilan des synthèses HA-MA réalisées.

DM visés (%)	Equivalent en AMA/HA	DM obtenus par RMN (%)
10	0,5	10
20	1	15-23
40	2	30

La proportion de méthacrylate introduite lors de la synthèse est proportionnelle au degré de méthacrylation obtenu par RMN pour les faible taux 10 et 20 %. Pour la préparation de précurseurs avec des taux de méthacrylation supérieurs, le greffage est moins efficace et 30 % des fonctions sont modifiées par des

méthacrylates. Il est possible qu'au fur et à mesure de la réaction les chaînes perdent en mobilité, conduisant à une baisse de la réactivité.

La synthèse visant à obtenir des précurseurs HA-MA contenant 20 % de méthacrylates a été reproduite plusieurs fois. Les taux obtenus sont compris entre 15 et 23 %. On peut considérer que cette synthèse est reproductible.

2.2 Préparation de dérivés de HA réticulables modifiés par le PBA

Pour obtenir des précurseurs de HA sensibles au glucose, des fonctions d'acide phénylboroniques PBA, sont greffées de manière covalente sur la chaîne de polymère. Cette modification est réalisée à partir de dérivés de HA préalablement modifiés par des fonctions méthacrylates réticulables, telles que décrites dans le paragraphe précédent 1.1. Une fois le précurseur purifié et lyophilisé, le greffage des fonctions PBA est effectué par couplage peptidique de la fonction amine de l'acide amino phénylboronique sur les fonctions carboxyliques du HA. Cette réaction est réalisée dans un mélange éthanol/eau, en présence de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et d'hydroxybenzotriazole (HOBt) qui servent respectivement à activer les fonctions carboxyliques et améliorer l'efficacité de l'activation. L'EDC seul permet l'activation des fonctions carboxyliques, qui mène à la formation d'un intermédiaire réactionnel activé et de produits secondaires. Lors de l'ajout d'HOBt, ce dernier réagit avec l'intermédiaire réactionnel et permet de limiter la formation de produits secondaires. En effet, la réaction de greffage du dérivé aminé PBA est plus rapide que les réactions de transfert pouvant avoir lieu et qui peuvent notamment mener au greffage de l'EDC [55]. Le mécanisme de couplage est présenté en partie expérimentale. Pour cette raison, un équivalent d'HOBt est introduit pour un équivalent d'EDC.

La réaction est décrite Figure 13. L'utilisation de couplage peptidique en présence d'EDC est largement décrite dans la littérature, notamment pour la modification des chaînes d'acide hyaluronique à pH 4,75 [56]. Le taux de greffage est contrôlé par la quantité d'EDC et de HOBt et par la quantité d'APBA disponible.

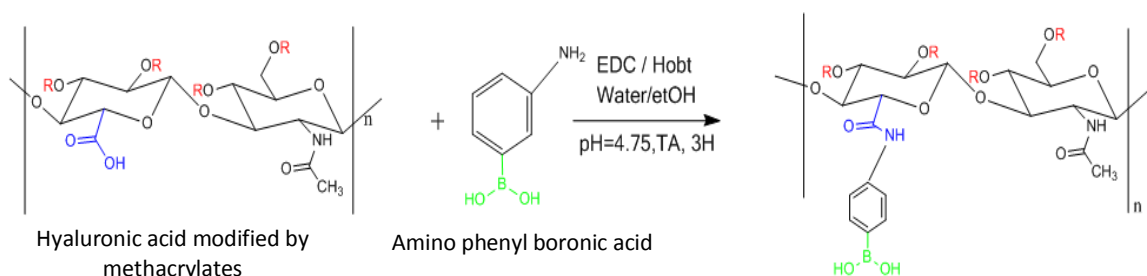


Figure 13 : Stratégie de synthèse pour la préparation de dérivés d'acide hyaluronique réticulables et sensibles au glucose HA-MA-PBA à partir de précurseurs HA-MA.

Différentes conditions de synthèse ont été mises en œuvre afin d'obtenir une gamme de polymères ayant différents degrés de substitution en PBA. Les synthèses ont été réalisées à partir de différents précurseurs de HA-MA ayant des taux de méthacrylation de 20 %. Les conditions de synthèse sont inspirées des travaux réalisés lors de la thèse de Léa Messager [57]. Chaque taux de greffage est déterminé par RMN du proton, en effet il correspond au ratio de l'intensité relative des protons aromatiques des fonctions PBA à 7,6 ppm

avec les protons anomériques de la chaîne de HA à 5 ppm. L'intensité des pics correspondant aux protons aromatiques peut également être comparée aux protons =CH₂ des fonctions méthacrylates à 6,0 ppm (Figure 14).

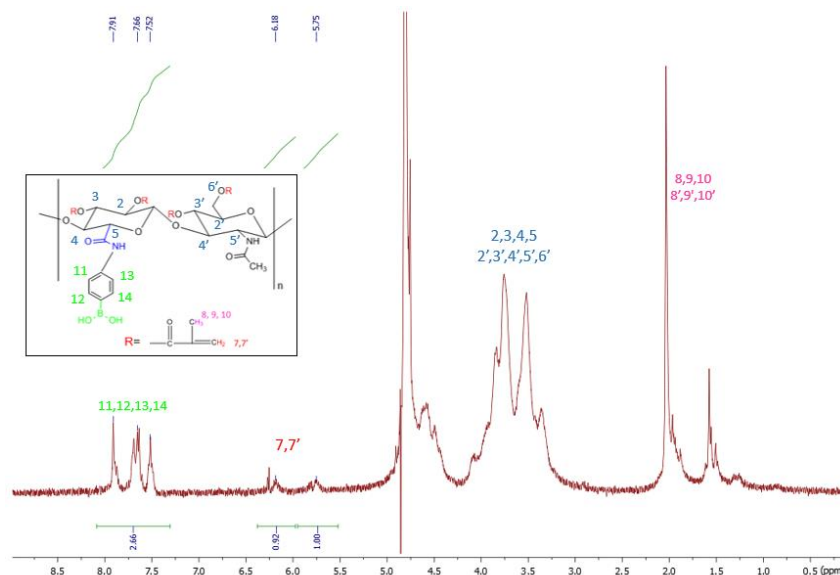


Figure 14: Spectre RMN du proton obtenu pour le HA-MA-PBA DS 20 %, ¹H NMR (400 MHz, D₂O, T° ambiante) δ (ppm) : 1,9 ppm (s, 3H, CH₃ (MA)), 2,0 ppm (s, 3H, CH₃CO), 3,3-3,8 ppm (m, 9H, HA), 5,8 et 6,2 ppm (d, 2H CH₂=), 7,6 (dd, 4H, aromatiques).

Les conditions expérimentales, ainsi que les caractéristiques des synthèses obtenues sont décrites dans le Tableau 2. Les synthèses ont toutes été réalisées à partir de HA 100 kDa.

Tableau 2: Bilan des synthèses de HA-MA-PBA.

DM HA-MA (%)	Equivalent en PBA/HA	Equivalent en EDC/HA	Equivalent en HOBt/HA	DS obtenu par RMN (%)
20 %	0,33	0,33	0,33	10
20 %	0,33	1	1	20
20 %	1	1	1	30

On remarque qu'en faisant varier les proportions d'EDC et d'HOBt pour un taux constant de PBA, les taux de greffage varient. Ainsi, en diminuant le nombre d'équivalent par trois, le taux de substitution en PBA est diminué par deux. L'activation des fonctions carboxyles semble ne pas être assez efficace pour greffer toutes les fonctions PBA présentes. De plus, pour un nombre d'équivalents en EDC et en HOBt constant, le taux de greffage observé par RMN dépend du nombre d'équivalents en PBA.

A partir de ces différents précurseurs, des hydrogels peuvent être préparés. Les premiers gels décrits sont des gels de taille micrométrique.

3 Préparation de gels de HA de taille micrométrique

3.1 Préparation de microgels par photopolymérisation dans un dispositif microfluidique

Pour préparer des gels monodisperses de manière reproductible, nous avons choisi d'utiliser une émulsion inverse micrométrique comme matrice où les gouttes formées servent de microréacteurs. Parmi les techniques présentées pour préparer des gels de taille micrométrique, la microfluidique a été choisie car elle permet de préparer des objets monodisperses de manière reproductible en utilisant une faible quantité de macromère [33],[34]. De plus la photopolymérisation peut être conduite *in situ* dans le dispositif.

3.1.1 Présentation du montage

La fragmentation des gouttes se fait en utilisant des capillaires en verre pour introduire la phase aqueuse et la phase organique avec des débits contrôlés. Le capillaire utilisé pour la phase continue est traité pour être rendu hydrophobe et favoriser un bon écoulement de la phase organique (le protocole d'hydrophobisation est présenté en partie expérimentale et met en jeu l'écoulement d'un dérivé silane dans le capillaire). La géométrie de la puce utilisée est une géométrie en T (Figure 15).

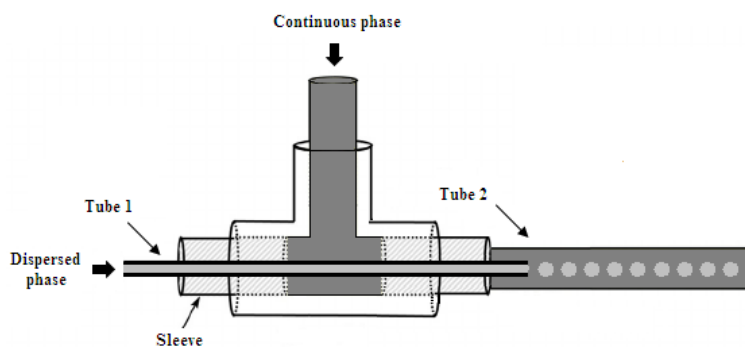


Figure 15 : Représentation schématique de la jonction en T d'un dispositif microfluidique servant à créer une émulsion d'une phase dispersée dans une phase continue.

Les écoulements des phases organiques et aqueuses sont parallèles. Les gouttes se font par entrainement de la phase dispersée. Le protocole de fabrication des microgels à partir de dérivés HA est décrit en partie expérimentale.

3.1.2 Choix des paramètres de formulations

3.1.2.1 Composition des deux phases de l'émulsion

Deux phases sont préparées :

La **phase organique** est composée d'une huile et d'un tensioactif. Afin d'obtenir des gouttes définies, qui ne coalescent pas lors de leur formation et de leur transport dans la puce, le choix d'un tensioactif et d'une huile adaptés est crucial. Nous avons choisi de travailler avec deux types d'huile : l'octane et l'huile de soja. L'octane utilisé pour préparer une première série de microgels est une huile relativement volatile. Dans un

second temps, nous avons transposé les systèmes à l'utilisation de l'huile de soja qui est une huile biocompatible, moins volatile que l'octane, et surtout plus visqueuse. L'utilisation d'un tensioactif n'est pas nécessaire à proprement parler dans le processus de formation des gouttes, mais il facilite la fragmentation en diminuant la tension interfaciale entre les deux phases [58]. Il est également nécessaire pour assurer la stabilité des gouttes, lors de leur transport dans les canaux et durant le stockage en cas de polymérisation en dehors des puces. Il permet de prévenir la coalescence entre des gouttes adjacentes pouvant mener à une séparation de phase avant polymérisation. Le tensioactif utilisé doit avoir une HLB faible. Le choix du tensioactif s'est porté sur le Span 80, de HLB =4,3. La quantité utilisée doit être supérieure à la concentration micellaire critique (CMC) qui est de $1,8 \times 10^{-5}$ mol/L [59]. Pour cette étude, deux concentrations ont été testées 2 et 20 wt% soit 0,03 et 0,3 mol/L. Des essais ont également été menés en utilisant un mélange de tensioactif Span 80/Tween 80 (HLB 15) en proportion 3/1. L'effet synergique de cette association de tensioactifs pour la préparation d'émulsions inverses a été reporté, la tension interfaciale entre l'eau et l'huile est abaissée par rapport à l'utilisation de Span 80 seul [60]. Les formules développées de ces tensioactifs sont présentées en partie expérimentale.

La **phase aqueuse** contient les macromères de HA réticulables, un amorceur et éventuellement un second réticulant, le N, N' méthylènebisacrylamide (BIS). La quantité de polymère doit être supérieure à une valeur limite dite concentration critique de recouvrement des chaînes C^* . En dessous de cette concentration le polymère est en régime dilué, au-dessus de cette concentration les chaînes de polymères sont enchevêtrées. La formation d'un gel nécessite le contact entre les chaînes de polymères et donc une concentration supérieure à la concentration C^* . Pour le HA de 100 kDa, la concentration C^* estimée est de 1,8 g/L, le calcul de la concentration C^* est détaillé en annexe 4.2 [57],[61]. La concentration en polymère C_p utilisée est de 1,5 wt% ou 3 wt%. Des microgels ont pu être préparés dans les mêmes conditions en utilisant les précurseurs de types HA-MA et HA-MA-PBA. Le photoamorceur 1-[4-(2-Hydroxyéthoxy)-phényl]-2-hydroxy-2-méthyl-1-propane-1-one (Irgacure 2959) a été sélectionné. Sa formule développée est présentée en partie expérimentale. Il est soluble dans l'eau et réputé pour sa biocompatibilité [62]. Différentes concentrations ont été étudiées de 0,05 wt%, qui permet d'obtenir des macrogels de manière rapide et efficace, à 0,5 wt% [45]. Du chlorure de sodium a également été introduit dans la phase aqueuse ($[NaCl]=0,1$ M).

La composition des deux phases a été optimisée. En effet certains paramètres étudiés n'ont pas permis d'obtenir des microgels ayant une bonne tenue mécanique ou n'ont pas apporté de bénéfices notables justifiant leur adoption.

Ainsi, concernant la phase organique, 2 wt% de Span 80 sont suffisants pour stabiliser les gouttes dans le capillaire. De plus, l'utilisation d'un mélange Span 80/Tween 80 ayant une tension interfaciale avec l'eau différente, ne permet pas d'améliorer la fragmentation des gouttes. Nous fixons donc le tensioactif à 2 wt% de Span 80. Les deux types d'huiles ont également permis la préparation de microgels. Dans le cas de l'utilisation de l'octane, des phénomènes d'évaporation ont pu être observés. Les débits de phase peuvent au besoin être ajustés pour compenser ces phénomènes.

Concernant la phase aqueuse, des microgels de HA-MA ont été obtenus avec une concentration en polymère C_p de 1,5 et de 3 wt%. Pour la suite de l'étude la concentration est fixée à 1,5 wt%.

La quantité d'amorceur est un paramètre qui a été optimisé. En effet, à 0,05 wt% en Irgacure 2959, nous n'avons pas réussi à obtenir de microgels, contrairement aux concentrations utilisées en phase aqueuse pour faire des macrogels. A partir de 0,08 wt% des gels stables ont pu être obtenus pour les deux huiles, cette concentration est donc suffisante pour assurer l'amorçage de la photopolymérisation des gels. La concentration en Irgacure a donc été fixée à 0,1 wt%.

3.1.2.2 Choix des paramètres de procédés

De nombreux paramètres de procédés peuvent être ajustés lors de la mise en place du système microfluidique. La taille des capillaires notamment doit être choisie en fonction de la taille des gels voulue et de la viscosité des phases. Le capillaire interne contient une solution du dérivé de HA, très visqueuse, l'écoulement à faible débit à travers un capillaire de 50 μm n'est pas possible en utilisant nos pompes. Nous avons donc choisi un capillaire de diamètre 75 μm . Le capillaire externe, préalablement traité pour devenir hydrophobe doit être significativement plus grand que le diamètre externe du capillaire interne, car ce dernier est inséré à l'intérieur du capillaire externe. De plus, les gels obtenus auront une taille dans le même ordre de grandeur que le capillaire externe. Nous avons donc choisi un capillaire de diamètre interne de 250 μm . La taille des gouttes va influencer sur le temps nécessaire pour polymériser chaque gel, car elle définit la quantité de macromère à réticuler dans chaque microréacteur. Il est important de noter que la taille des gels obtenus n'est pas forcément la même que celle du capillaire externe dans lequel les gouttes qui ont servi de microréacteurs ont été formées. En effet, une fois redispersés dans l'eau, les gels peuvent gonfler et leur taille sera définie par l'équilibre entre les forces osmotiques et les forces élastiques. Le débit des phases est également un paramètre à optimiser. En effet, un ratio de $\frac{1}{2}$ est couramment utilisé, la phase continue s'écoulant deux fois plus rapidement que la phase continue, de manière à entraîner chaque goutte de phase aqueuse formée à l'extrémité du capillaire interne. Le débit des phases est aussi optimisé pour permettre un temps de parcours assez long pour que la polymérisation soit suffisante. Enfin, la géométrie de la puce influe sur le détachement de la goutte de phase aqueuse. Dans la géométrie à écoulements parallèles choisie, les gouttes ont dans le capillaire externe une forme allongée car elles sont formées lors du régime de compression. Dans ce cas, le nombre capillaire est très faible $Ca < 0,002$ [63],[64]. La polymérisation ayant lieu dans les gouttes cette forme peut être figée et se retrouver pour les gels.

3.1.2.3 Choix des paramètres réactionnels

Enfin, la dernière catégorie de paramètres à prendre en compte concerne la réaction de réticulation des gels par photopolymérisation. Afin d'amorcer la polymérisation, une lampe UV est positionnée au-dessus du capillaire externe à une distance fixée à 3,5 cm du bord du capillaire externe. Le faisceau est placé de manière à irradier le capillaire externe sur 2 cm, chaque goutte va ainsi passer sous le rayonnement UV lors du parcours cette portion de capillaire, la réaction est donc contrôlée spatialement. Toutes les gouttes subissent la même irradiation. En effet, la quantité de photons reçue par chaque goutte est régie par le temps de parcours sous le faisceau UV. Ce temps de parcours dépend du débit des deux phases, et de la taille du capillaire externe. Afin d'obtenir le plus grand temps de parcours possible les débits des phases aqueuses et organiques sont respectivement fixés à 2 et 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ pour l'utilisation de l'huile de soja peu volatile, 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ étant le

débit minimum que peuvent assurer de manière régulière et continue les pousses seringues utilisés pour alimenter le montage microfluidique. Dans ces conditions, le temps d'irradiation de chaque goutte est de 6,5 secondes, la réaction est ainsi contrôlée temporellement, le moment et la durée de l'irradiation sont contrôlés. Lorsque la phase continue est l'octane, les débits sont augmentés tout en gardant un rapport $\frac{1}{2}$ entre le débit de la phase aqueuse et celui de la phase organique, ceci afin de compenser l'évaporation de l'octane, les débits maximums utilisés sont de 5 et 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Enfin, les paramètres d'irradiation de la lampe sont modifiables, la lampe utilisée permet une irradiation dans des longueurs d'ondes comprises entre 300 et 450 nm centrée à 365 nm. La lampe est utilisée à pleine puissance, dans ce cas-là l'irradiation est de 4500 mW/cm^2 à une distance de 3,5 cm. Le schéma de principe de la préparation de gels par voie microfluidique, est présenté Figure 16:

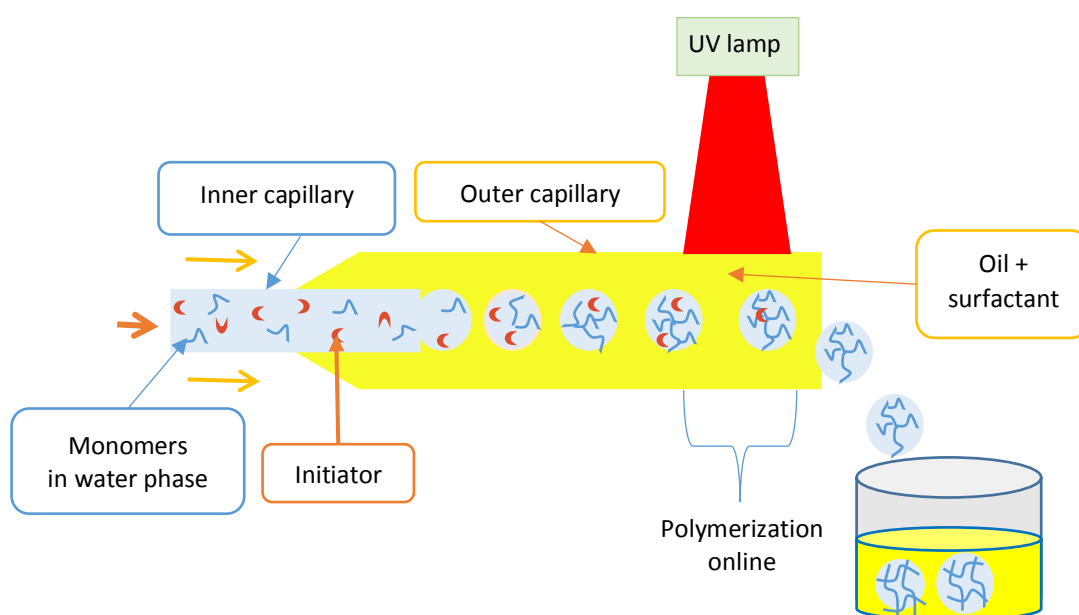


Figure 16 : Schéma du dispositif microfluidique composé de capillaires en verre: la polymérisation à lieu en ligne dans les gouttes.

3.1.3 Vérification préliminaire

Dans un premier temps, la bonne conduite de la polymérisation de la phase aqueuse est vérifiée. Un petit volume de 100 à 200 μl de phase aqueuse est polymérisé pendant 10 secondes dans les mêmes conditions de photopolymérisation. Si la formation de gels est observée, le système est transposé au système microfluidique. Dans le cas où la polymérisation n'est que partiellement engagée, la phase aqueuse devient visqueuse dû à un début de polymérisation non suffisant pour obtenir un gel stable mécaniquement. Le temps d'irradiation est alors augmenté lors d'un nouvel essai. Dans le cas où la phase aqueuse ne polymérise toujours pas après plusieurs minutes d'irradiation, les paramètres de composition de la phase aqueuse doivent être optimisés.

3.1.4 Purification des microgels

Les gels sont ensuite lavés de manière à enlever l'huile et le tensioactif. Le procédé de purification est présenté en (Figure 17). Le THF est choisi comme solvant pour les lavages. Il est soluble avec l'octane, l'huile de soja et l'eau cependant, ce n'est pas un bon solvant pour l'acide hyaluronique. Introduire du THF, permet de faire précipiter les gels obtenus. Puis, ils sont centrifugés et le surnageant constitué d'un mélange THF/huile/tensioactifs est enlevé (étapes a à c). Ce procédé est répété 5 fois puis les gels précipités sont mis à sécher pour enlever le maximum de THF (étape d) et enfin mis à redisperser dans l'eau (étape e) et lyophilisés. Les lavages permettent d'enlever toute trace d'eau, huile et tensioactifs. Les conditions de centrifugation sont décrites en partie expérimentale.

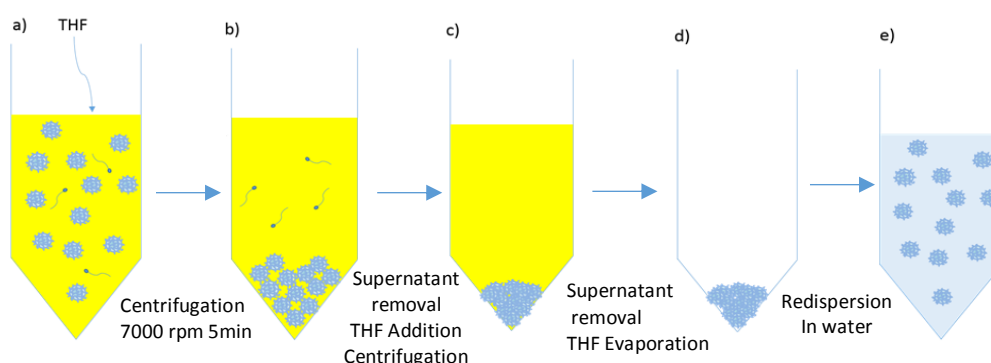


Figure 17: Procédé de purification des microgels par précipitation dans le THF avant étape de lyophilisation.

3.1.5 Commentaire sur le taux de conversion des méthacrylates

Il est important de noter que les méthacrylates sont potentiellement toxiques *in vivo*. Il faut donc maximiser le taux de conversion des méthacrylates pour contourner cette limitation. La préparation d'hydrogels de HA-MA en solution aqueuse est décrite dans la littérature notamment par nos collaborateurs du CERMAV [45]. Afin de suivre l'avancement de la réaction de photopolymérisation, ils ont mené des études de photorhéologie pour des gels de HA-MA préparés à partir de précurseurs ayant une large gamme de degrés de méthacrylation. Il a été suggéré que le suivi du module élastique G' permet de connaître la durée de photopolymérisation nécessaire pour obtenir un taux de conversion des méthacrylates de 100 %. Lorsque c'est le cas, le module élastique, qui augmente au cours de la polymérisation, devient constant. Différents facteurs influent sur le temps d'irradiation nécessaire comme la concentration en photoamorceur, la puissance de la lampe, ou de degré de méthacrylation. L'augmentation du module élastique commence après un temps d'induction variable, et est très rapide en raison de la formation de réticulation intermoléculaire, le module de perte, lui, augmente de manière négligeable. La stabilisation de la valeur du module élastique, est due à la fin du processus de gélification. Lorsque ce régime permanent est atteint, G' représente l'élasticité du gel (Figure 18) [45].

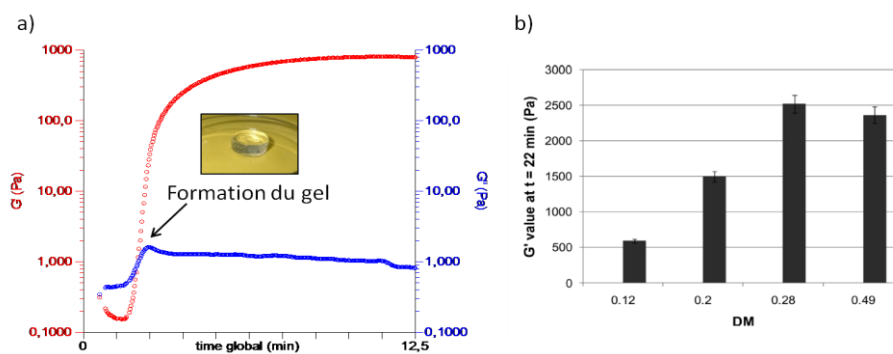


Figure 18 : Propriétés des gels de HA-MA obtenues par photorhéologie. a) la formation du gel a lieu quand le module élastique G' devient supérieur au module visqueux G'' . b) le module élastique dépend du degré de méthacrylation du macromère. Extrait de [45].

Une série de mesures a été réalisée pour des macrogels préparés en solution aqueuse à partir de précurseurs HA-MA contenant 20 % de méthacrylate à 1,5 wt% en faisant varier la puissance de la lampe, et la concentration d'amorceur permettant d'identifier des temps de gélification quasi-complète variant de 40 s à 2 min pour une irradiation de 50 mW/cm². A plus forte puissance, des phénomènes d'évaporation de l'eau sont observés, entraînant une chute de la valeur au plateau. Les taux de conversion obtenus sont quasi-totaux mais pas exactement de 100 % en raison de la baisse drastique de mobilité des fonctions méthacrylates au fur et à mesure de la gélification, particulièrement pour des DM supérieurs à 50 %. L'élasticité des gels obtenus augmente avec le degré de méthacrylation qui définit ainsi le taux de réticulation des gels.

A l'échelle nanométrique, l'irradiation des gels a été modulée en faisant varier le temps d'irradiation et la puissance de la lampe utilisée. La conversion des méthacrylates a été suivie par RMN. Les pics caractéristiques des méthacrylates à 5,8 et 6,2 ppm disparaissent en augmentant la puissance de la lampe. Ils ont totalement disparu pour une irradiation à 100 % soit 4500 mW/cm². Simultanément, des pics caractéristiques des méthacrylates ayant réagi apparaissent à 1,3 et 0,9 ppm. Leurs intensités augmentent avec la puissance et le temps d'irradiation [12]. Le taux de conversion en méthacrylates peut donc être déterminé en fonction des conditions d'irradiation (Figure 19).

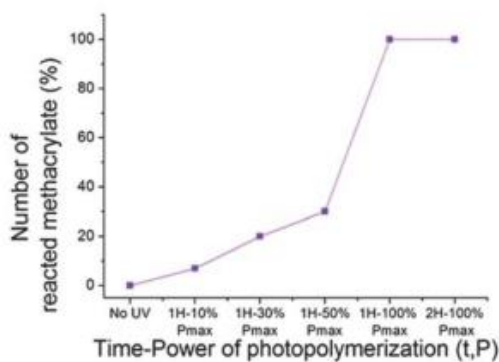


Figure 19 Degré de conversion des méthacrylates en fonction des conditions de photopolymérisation pour des nanogels préparés à partir de HA-MA₂₅. Extrait de [12].

Ces résultats sont donnés à titre informatif. En effet, en raison de la présence d'huile qui peut absorber dans les gammes de longueurs d'onde d'irradiation lors du processus en microfluidique, de l'utilisation d'une lampe UV différente ou de la différence de volume des solutions de macromères par rapport aux microgouttes formées en microfluidique, ces conditions expérimentales ne peuvent pas être directement transposées pour prévoir une conversion complète des méthacrylates.

De plus nos systèmes sont biphasiques, ce qui peut entraîner une migration d'une partie de l'amorceur vers la phase huile. En effet, l'Irgacure est une molécule comportant des cycles aromatiques, qui absorbe pour des longueurs d'onde inférieures à 300 nm. Les absorbances d'une solution d'Irgacure mise en contact avec l'huile de soja ou avec de l'octane ont été comparées. L'intensité du signal est directement proportionnelle à la concentration en Irgacure. L'absorbance dans l'octane est plus élevée de 30 % montrant que l'Irgacure est plus soluble dans l'huile de soja. Pour une même quantité d'Irgacure introduite dans la phase aqueuse, la conversion des méthacrylates sera plus efficace en présence d'octane.

3.2 Synthèse et caractérisation des microgels de HA-MA

3.2.1 Synthèse des microgels de HA-MA

Dans un premier temps nous nous sommes concentrés sur la préparation de gels de HA-MA avec ou sans BIS en utilisant les paramètres optimisés. Les différents précurseurs ont été utilisés dans des conditions simples : en présence de NaCl 0,1 M, et d'amorceur Irgacure 2959 0,1 wt% ainsi que 0,2 wt% de tensioactif Span 80 dans la phase organique composée d'octane.

Les microgels synthétisés à partir de précurseurs HA-MA sont caractérisés par leur degré de méthacrylation et la présence éventuelle de BIS. Les notations utilisées dans le manuscrit pour un gel de taux de méthacrylation x % préparé sans second réticulant seront HA-MA $_x$. Les gels préparés en présence d'une quantité y de BIS par rapport au HA seront notés HA-MA $_x$, BIS $_y$. Il est primordial de redisperser les gels dans un milieu aqueux pendant des temps supérieurs à une semaine de manière à permettre aux gels de gonfler jusqu'à leur état d'équilibre.

En absence de BIS, des gels ont été obtenus à partir des trois précurseurs synthétisés de DM respectivement 10, 20 et 30 %. Cependant les gels obtenus à partir du HA-MA $_{10}$ ne sont pas stables mécaniquement. En effet, le taux de conversion des fonctions méthacrylates ne suffit pas pour créer un gel ayant une bonne tenue mécanique. Il est possible que la probabilité de rencontre de ces fonctions lors des quelques secondes d'irradiation soit faible, ne permettant pas une réticulation suffisante. Pour les gels préparés à partir de précurseurs à plus haut taux de méthacrylation, des objets uniformes sont obtenus (Figure 20). La longueur des gels est uniforme, elle dépend du nombre capillaire et donc du ratio entre les débits de phase dispersée et continue et de la composition du système. La largeur des gels lors de la polymérisation est fixée par le diamètre du capillaire. La largeur mesurée après lavage dépend du gonflement des gels dans l'eau.

Les gels préparés à partir de HA-MA $_{30}$ ne sont pas toujours homogènes. Il est possible que les fonctions méthacrylates hydrophobes se concentrent localement, en amorçant la polymérisation, ces inhomogénéités sont figées dans la structure du gel. Pour la suite de l'étude nous nous sommes concentrés sur des gels de HA-MA $_{20}$ qui sont homogènes, ont une bonne tenue mécanique et sont réguliers (Figure 20 b).

Afin, de moduler la porosité des gels obtenus un second réticulant est ajouté dans la phase aqueuse introduite dans l'étape de microfluidique. Il s'agit du BIS. Ce dernier est introduit dans des proportions variant entre 0 et 100 % par rapport à la quantité d'acide hyaluronique. Dans ces conditions, des gels homogènes ont été préparés.

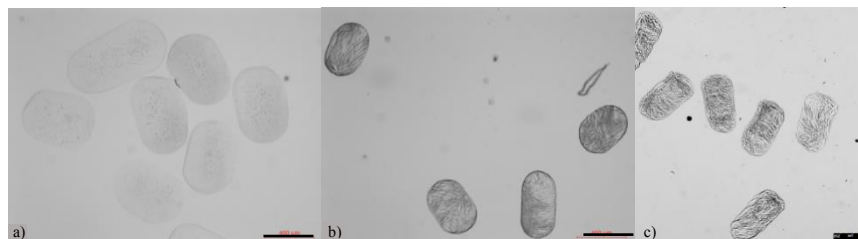


Figure 20: Microgels de a) HA-MA₂₀ b) HA-MA₂₀, BIS₂₀ c) HA-MA₂₀, BIS₁₀₀. Echelles a) et b) 400µm c) 250 µm.

Le contraste du gel observé par microscopie en transmission est proportionnel à la quantité de BIS introduite, et donc au taux de réticulation du gel et à son élasticité (Figure 20 a et b). Les gels préparés de HA-MA₂₀, BIS₁₀₀, sont très contrastés et allongés, ils ne regonflent presque pas dans l'eau, leur diamètre est d'environ 250 µm ce qui correspond au diamètre des capillaires (Figure 20 c). Les gels moins réticulés sont plus grands que ce diamètre car ils regonflent dans l'eau. Les mesures faites pour les gels de HA-MA avec et sans BIS conduisent à l'obtention de gels de taille variant de 250 à 450 ± 24 µm. Les différences de taille comme la différence de contraste en présence de BIS s'expliquent par une densité de réticulation plus importante en présence de co-réticulant.

3.2.2 Etude de gonflement

L'étude des variations de gonflement utilise la technique de microscopie optique assistée par micromanipulateur, qui permet de mesurer les changements de diamètre et donc de volume des gels en réponse à des changements de salinité ou de pH. Cette technique consiste à immobiliser un microgel unique au bout d'un microcapillaire en verre maintenu par un micromanipulateur et à l'immerger dans une chambre d'observation microscopique connectée à une pompe péristaltique permettant de changer la composition du milieu. Les gels de HA sont chargés négativement dans du tampon PBS à pH 7,4, ce sont des gels de polyélectrolytes. Leur sensibilité à la force ionique du milieu est examinée en changeant le milieu d'immersion des gels. Les variations de dimension des gels sont mesurées en temps réel par microscopie à transmission et permettent de déterminer des variations volumiques. La dimension de référence pour un gel de composition donné est son diamètre dans l'eau ultrapure qui est associé à un volume de référence noté $V_{\text{ultrapure water}}$, il est comparé au volume à l'équilibre V déterminé par la mesure du diamètre dans des milieux de différentes salinités. Les gels sont d'abord immergés dans de l'eau pure, le milieu est substitué par du PBS ($I=0.15$ M) puis du PBS avec 1 M de NaCl ($I=1,138$ M). Les images de microscopie obtenues pour l'exemple d'un gel de HA-MA₂₀, sont présentées Figure 21. On constate une contraction du gel au fur et à mesure de l'augmentation de la force ionique du milieu.

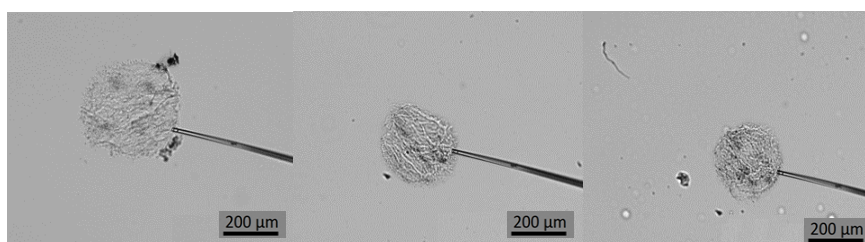


Figure 21: Exemple de contraction de gels HA-MA₂₀, dans a) de l'eau pure b) du PBS c) du PBS + 1M NaCl. Echelle 200 μm.

Les gels de polyélectrolytes se contractent. Ils contiennent des charges et des contre-ions associés. Ces gels absorbent de l'eau, et lorsque les groupes chargés sont ionisés, la concentration en contre-ions et donc la pression osmotique à l'intérieur du gel augmente. Pour compenser cette pression, le gel absorbe plus d'eau ce qui induit son gonflement. Les répulsions électrostatiques entre les charges du gel, contribuent également au gonflement. Par conséquent, le taux de gonflement diminue avec la concentration en sel dans la solution externe en raison de la différence de pression osmotique à l'intérieur et à l'extérieur des gels ou pour une baisse du degré de réticulation du gel. En effet, en plus de la contribution des ions, le gonflement du gel est influencé par l'élasticité du gel, et donc par des paramètres comme la distance entre les charges, ou le taux de réticulation. Afin d'étudier l'effet de la réticulation, les gels contenant du BIS ont également été immergés dans des solutions de différentes salinités. Les variations relatives de gonflement pour des gels de différentes compositions sont présentées Figure 22. Les gels sont d'abord immergés dans de l'eau pure, le milieu est substitué par du PBS ($I=0,15$ M) puis du PBS avec 1 M de NaCl ($I= 1,138$ M). Enfin, ils sont à nouveau immergés dans du tampon PBS pour étudier la réversibilité des variations de volume.

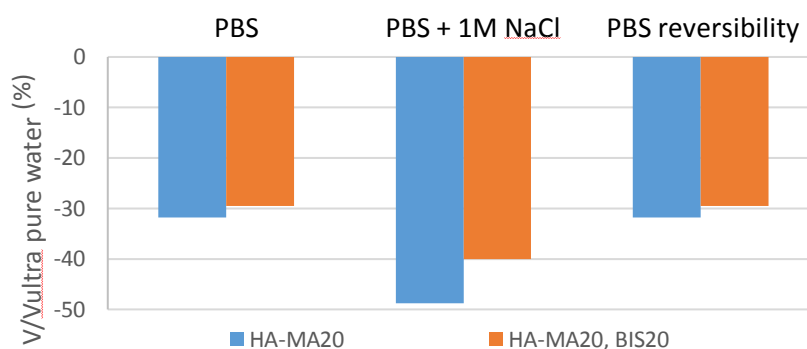


Figure 22: Variations de gonflement relatif de différents gels, HA-MA₂₀ (bleu) et HA-MA₂₀ BIS₂₀ (orange) de différents degrés de réticulation en fonction de la force ionique du milieu, $V_{ultrapure\ water}$ étant l'état de référence correspondant au gonflement du gel dans l'eau ultrapure.

Pour tous les gels étudiés, une contraction est observée, les gels préparés à partir de HA-MA₂₀ ont une plus grande amplitude de contraction de -32 et -49 % pour des milieux de salinités respectivement PBS et PBS +1 M NaCl. En présence de BIS comme second réticulant, les gels préparés à partir de précurseurs HA-MA₂₀, BIS₂₀ subissent une contraction plus faible, de -29 et -40%, en raison également d'une plus grande densité de réticulation. La réversibilité de cette contraction est totale. Les gels regonflent pour atteindre le volume mesuré lors de leur première incubation dans le PBS.

3.2.3 Estimation de la porosité des gels de HA-MA

Différents lots de microgels sont préparés à partir d'une phase aqueuse identique. On distingue deux séries qui ont été réalisées avec une composition de phase organique différente. La première série est réalisée dans l'octane alors que la seconde l'est dans l'huile de soja. Nous avons déterminé les taux de gonflement des gels des deux séries. Le taux de gonflement massique des gels q_M , peut être déterminé grâce à la définition présentée dans le chapitre 1. Il correspond au ratio de la masse d'un gel hydraté à l'équilibre dans un solvant donné W_s , par rapport à la masse du gel sec W_d . Le volume est déterminé à partir des dimensions mesurées en microscopie. La masse du gel sec peut être assimilée à la quantité de précurseur HA-MA présente dans une goutte confinée dans le système microfluidique. Pour cela, nous connaissons le volume de la goutte dans le capillaire, en présumant d'un gonflement homothétique des gels, et en utilisant le diamètre du capillaire externe comme diamètre des gouttes ou diamètre initial du microgel lors de la synthèse. Connaissant la concentration en précurseur en phase aqueuse, on peut déduire la masse de gel sec.

Nous avons entrepris d'estimer la porosité des gels préparés à partir des précurseurs HA-MA sans BIS préparés en présence des différentes huiles de manière théorique. Un exemple de ce calcul est proposé en Annexe 4.3. En effet, il est possible de calculer le paramètre de maille du réseau en fonction du gonflement des microgels. Le taux de gonflement volumique q_e peut-être déterminé grâce à q_M [65]:

$$q_e = 1 + \frac{\rho_P}{\rho_S} (q_M - 1)$$

Où ρ_P est la masse volumique de polymère sec (1,229 g/cm³ pour l'acide hyaluronique), et ρ_S correspond à la masse volumique de l'eau.

Le taux de gonflement volumique permet d'accéder à la masse molaire moyenne entre deux nœuds de réticulation, M_c . En effet, d'après la théorie de Flory-Rhener, on peut dans le cas de réseaux peu réticulés gonflés dans un bon solvant écrire l'équation suivante :

$$q_e^{5/3} \cong \frac{M_c}{\rho_p V_1} \left(\frac{1}{2} - \chi \right)$$

Où M_c est la masse molaire moyenne entre deux nœuds de réticulation, V_1 est le volume molaire du solvant (18 cm³/mol⁻¹ pour l'eau), χ est le paramètre de Flory décrivant les interaction polymère solvant (il est de 0,473 pour l'acide hyaluronique dans l'eau) [66].

On peut ainsi accéder au paramètre de maille. Pour cela il faut déterminer la densité volumique de réticulation z qui correspond au ratio de la densité du polymère par la masse molaire moyenne entre deux nœuds de réticulation. Ainsi, dans un volume de 1L le nombre de nœuds de réticulation peut s'écrire $z * N_{av}$ où N_{av} correspond au nombre d'Avogadro. Chaque nœud de réticulation occupe un volume : $V = \frac{1}{z * N_{av}}$. En apparentant ce volume et donc les pores de la matrice à une sphère de diamètre D , on peut déterminer la taille des pores comme étant :

$$D = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi z N_{av}}}$$

Ce calcul a été fait pour les gels de HA-MA préparés en utilisant l'huile de soja et l'octane. Les taux de gonflement sont déterminés dans du tampon PBS. Les résultats sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Tailles des pores calculées pour des gels dans du tampon PBS en fonction de la composition de la phase organique utilisée lors du procédé de fabrication.

	DM	q_M	q_e	M_c (g/mol)	z (mol/L)	D (nm)
HA-MA ₁₅ Octane	15	116	142	3,2 x10 ⁶	3,8x10 ⁻⁴	20
HA-MA ₂₀ Soybean oil	20	186	228	6,9 x10 ⁶	1,8x10 ⁻⁴	26
HA-MA ₃₀ Soybean oil	30	109	133	2,6 x 10 ⁶	6,15 x10 ⁻⁴	17

On peut comparer ces résultats à un paramètre de maille calculé grâce à des mesures de rhéologie. En effet, un gel est un réseau élastique dont le module élastique peut-être déterminé expérimentalement et permettre de calculer le paramètre de maille du réseau. Le module élastique G' , est proportionnel au nombre de réticulation et peut s'écrire :

$$G' = R T z$$

Où RT représente l'énergie thermique et z la densité volumique de réticulation, qui permet comme décrit plus haut de remonter au paramètre de maille.

Nos collaborateurs du CERMAV, ont réalisé des mesures de rhéologies sur des gels de HA-MA préparés en solution [45]. Ces travaux ont été présentés dans le paragraphe 3.1.5. Les taux de gonflement obtenus sont dans l'eau ultrapure. Le résumé des dimensions des pores calculés à partir de ces mesures de rhéologie est présenté dans le Tableau 4

Tableau 4 : Tailles des pores calculées pour différents gels de HA-MA de différents degré de méthacrylation grâce à la mesure du module élastique [45]

DM	G'	z (mol/L)	D (nm)
20	1500	1x10 ⁻⁴	17
28	2500	6, x10 ⁻⁴	15

Ces résultats sont proches de ceux obtenus en estimant le gonflement des gels par microscopie.

De plus, d'après nos calculs, on observe une légère différence en fonction des paramètres de composition de la phase huile. Il est intéressant de noter que les gels préparés à partir d'huile de soja ont une taille de pores légèrement plus grande, que ceux préparés à partir d'octane. Il est probable que dans ces conditions, les taux de conversion de méthacrylates atteints lors de la polymérisation soient plus faibles qu'en présence d'octane. Cette variation peut s'expliquer par une différence de la solubilité du photoamorceur dans les deux huiles, qui entraînerait une perte d'efficacité de la polymérisation due à un transfert de l'Irgacure plus important vers l'huile de soja comme discuté paragraphe 3.1.5. De plus, les taux de conversion obtenus lors de la préparation des microgels peuvent être plus faibles en raison du temps de polymérisation limité dans le capillaire, induisant des paramètres de maille plus petits pour les microgels.

Pour la suite de l'étude lorsqu'un paramètre sera discuté, les gels comparés seront préparés avec la même huile.

3.3 Synthèse et caractérisation des microgels de HA-MA-PBA

3.3.1 Synthèse des microgels de HA-MA-PBA

Des gels de première génération modifiés avec des fonctions PBA ont été préparés à partir de précurseurs synthétisés. Tous les précurseurs utilisés ont un degré de méthacrylation de 20%, et un degré de substitution en PBA compris entre 10 et 30 %. Les microgels sont notés HA-MA-PBA_x, x étant le degré de substitution en PBA. Enfin, dans certains cas les microgels sont préparés en présence de 10 ou 20 % de BIS par rapport au HA. Ils sont notés HA-MA-PBA_z, BIS_y avec z le degré de substitution en PBA et y la quantité de BIS par rapport au HA. La concentration en polymère dans la phase aqueuse est fixée à Cp=1,5 wt%. Enfin, concernant les microgels de HA-MA-PBA, seuls les microgels préparés en présence de co-réticulant ont une bonne tenue mécanique et une morphologie proche de ceux obtenus avec les précurseur HA-MA. Il est probable que la réaction de polymérisation soit moins efficace à cause de la nature des précurseurs. En effet, la présence de groupes hydrophobes PBA sur le squelette de HA, peut influencer sur la mobilité des chaînes. Les groupements PBA peuvent se placer préférentiellement dans l'huile et ainsi être distribués de manière non homogène dans le volume du gel [67]. Il est donc nécessaire d'ajouter un second réticulant pour obtenir des gels à partir de précurseurs HA-MA-PBA. La difficulté rencontrée pour préparer des gels de HA-MA-PBA sans BIS, peut s'expliquer par la présence de groupements PBA hydrophobes sur la chaîne de HA. En effet, les motifs PBA sont aromatiques et peuvent donc absorber une partie du rayonnement UV. Les taux de conversion atteints peuvent ainsi être diminués, entraînant une perte de tenue mécanique des gels.

3.3.2 Vérification de la présence de PBA et étude de leur distribution

Pour vérifier la présence de fonctions PBA et connaître leur distribution dans les microgels de HA-MA-PBA nous avons utilisé le rouge alizarine. En effet, cette espèce non fluorescente en solution, peut s'associer avec des dérivés PBA, grâce à la présence d'un diol dans sa structure, entraînant un transfert de proton vers un état excité qui provoque la fluorescence (Figure 23). Cette méthode a été initialement utilisée pour déterminer les constantes d'association de l'acide phénylboronique avec les diols mais peut aussi servir pour déterminer la distribution des PBA dans les gels par microscopie [68].

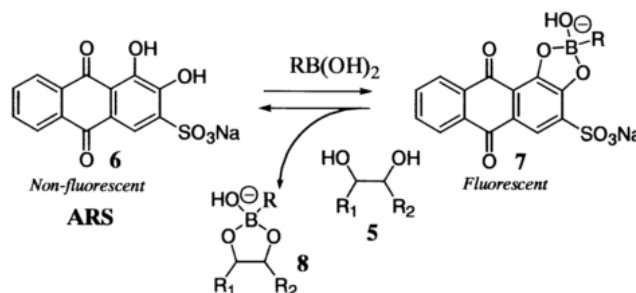


Figure 23: Schéma de complexation du rouge alizarine avec les PBA et état de fluorescence servant à la détermination des constantes de complexation.

En substituant le milieu d'immersion du gel par une solution aqueuse de rouge alizarine (0,17 mmol/L), et en observant le gel dans ce milieu par microscopie confocale, la distribution des fonctions PBA peut être connue. Ainsi les gels obtenus à partir du précurseur HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀, ont montré une distribution des fonctions PBA dans tout le volume du gel. Cependant, la distribution n'est pas parfaitement homogène: des domaines apparaissent plus fluorescents notamment en périphérie du gel, dont les bords sont bien marqués. Cette observation peut appuyer notre hypothèse, mais peut également venir d'une partition non homogène du rouge alizarine entre l'intérieur du gel et le milieu extérieur (Figure 24).

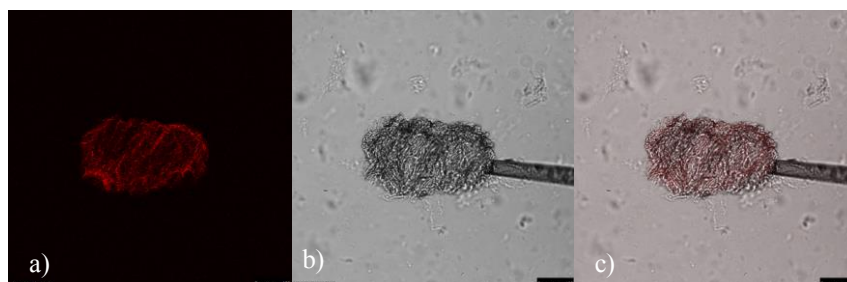


Figure 24 : Etude de la distribution des fonctions PBA par introduction de rouge alizarine dans le milieu. Image de microscopie confocale de gels préparés à partir de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ a) en fluorescence à $\lambda = 596$ nm longueur d'onde d'émission du rouge alizarine ; b) en transmission c) cumulée transmission et fluorescence. Echelle 100 μ m.

3.3.3 Etude du gonflement en présence de fructose

Le milieu composé de tampon PBS est substitué grâce à la pompe péristaltique par du tampon contenant 20 mM de fructose. La variation de volume observée correspond à un gonflement de +33 % du volume (Figure 25).

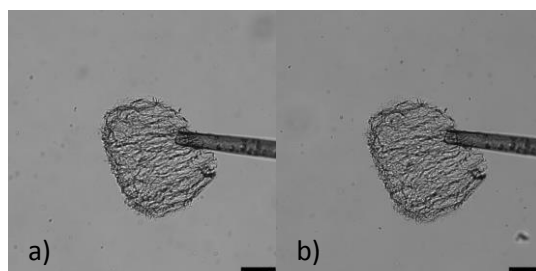


Figure 25: Variation de gonflement en présence de fructose d'un microgel de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ dans a) du PBS b) du PBS contenant 20 mM de Fructose. Echelle 100 μ m.

3.4 Préparation de gels de porosité macroscopique

Les gels présentés jusqu'à présent ont une porosité assez fine, corrélée aux choix de formulation, notamment les paramètres influant sur le degré de réticulation, comme le degré de méthacrylation du précurseur HA-MA ou l'introduction d'un second réticulant. Afin d'augmenter les taux d'encapsulation en protéines, nous avons mis au point des microgels ayant deux tailles de pores différentes : des micropores similaires à ceux des microgels régis par les paramètres de formulation, et des macropores présents dans la matrice de gel grâce à l'introduction de gouttes d'huile qui sont ensuite retirées.

L'introduction de gouttes d'huile dans la matrice de gel, a été réalisée lors de la venue dans le laboratoire de Carlos Busatto, doctorant de l'institut INTEC de l'université nationale du littoral et du CONICET, à Santa Fé (Argentine).

3.4.1 Présentation du concept

Afin d'introduire des macropores dans la matrice, nous avons choisi d'utiliser une émulsion double huile-dans-eau-dans-huile ($O_1/W/O_2$) préparée par voie microfluidique.

Ainsi, dans un premier temps, une émulsion huile-dans-eau appelée émulsion primaire est formée par ultrasonication.

Dans un second temps, les gouttes d'eau dans l'huile O_2 sont préparées par microfluidique en introduisant, en plus de la phase aqueuse contenant les macromères et le photoamorceur, l'émulsion primaire. Les macromères de HA-MA formant la matrice de gels ne sont pas introduits lors de la fabrication de l'émulsion primaire car ils sont hautement visqueux ce qui influence la taille des nanogouttes. De plus, les molécules de HA sont sensibles aux processus d'ultrasonication qui clivent les chaînes de HA [11],[66]. Dans le dispositif microfluidique, l'émulsion double est irradiée afin de réticuler les gels. Les gouttes d'huile se retrouvent encastrées dans la matrice (Figure 26):

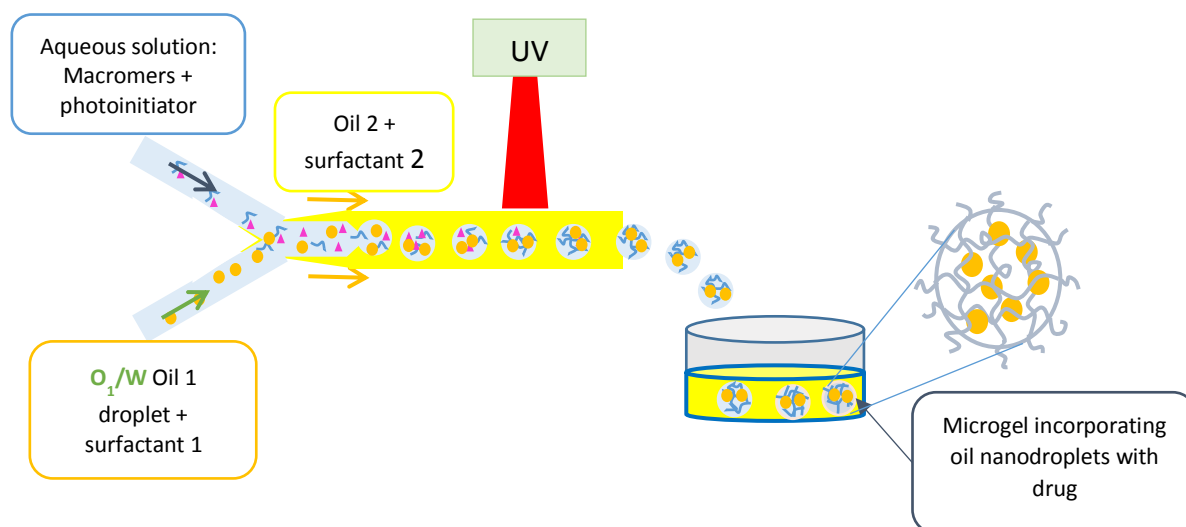


Figure 26: Représentation schématique de microgels contenant des gouttes d'huile insérées dans la matrice de gel. Enfin, dans un troisième temps, un lavage est réalisé afin d'enlever l'huile contenue dans les gouttes insérées dans la matrice de gel. L'huile enlevée, la porosité induite par la présence de l'émulsion primaire est remplie de phase aqueuse créant ainsi des macropores en plus de la structure microporeuse du gel (Figure 27).



Figure 27: Représentation schématique de microgels HA-MA macroporeux avant et après lavage, apparition des macropores.

3.4.2 Procédés de préparation

3.4.2.1 *Préparation de l'émulsion primaire*

Afin d'introduire une porosité contrôlée, de taille plus importante que celle introduite par la formation du réseau de polymère, une nano-émulsion huile-dans-eau est préparée. Il est important de contrôler la distribution de taille de l'émulsion ainsi que sa fraction volumique. Il faut notamment que la taille des gouttes d'huile soient largement inférieure à celle des gouttes d'eau de la double émulsion (O1/W/O2). Un procédé hautement énergétique est utilisé pour la fragmentation : l'ultrasonication est choisie car c'est une méthode facile d'utilisation. L'émulsion primaire est composée de deux phases, une phase organique contenant de l'hexadecane comme phase dispersée (10 vol%) et un agent de surface le caséinate de sodium qui est soluble dans l'eau à hauteur de 5 wt%. Après préparation l'émulsion contenant du sodium caséinate a pour diamètre 350 nm, elle est stable dans le temps.

3.4.2.2 *Préparation de microgels en utilisant une double émulsion.*

Pour mettre en œuvre l'étape de microfluidique deux phases sont préparées. La phase aqueuse contenant 1,5wt% de HA-MA₁₀, du BIS comme second réticulant à hauteur de 67 wt% par rapport au HA, un photoamorceur l'Irgacure 2959 et l'émulsion primaire. La phase organique contient de l'huile de soja biocompatible et un tensioactif le Span 80. Le débit des deux phases introduites dans le dispositif microfluidique par des pousses seringues a été fixé respectivement à 3 et 6 $\mu\text{L}/\text{min}$. Notons, que ce protocole est similaire à celui utilisé pour préparer des microgels de HA-MA précédemment décrit.

Après irradiation, des microgels sont collectés. Ils sont monodisperses avec une forme de balle, due à la modification de mouillabilité sur le capillaire externe [70]. Cette forme est différente de la forme allongée obtenue dans les mêmes dispositifs à écoulements parallèles pour la préparation de microgels microporeux qui elle, est due à la compression des gouttes dans les capillaires durant la photopolymérisation. La présence du second agent de surface de l'émulsion change la tension interfaciale [48]. Les gouttes sont de taille trop petite pour être observées par microscopie optique. Afin de confirmer leur emprisonnement dans les matrices de gel, un composé liposoluble fluorescent est introduit dans la phase organique de l'émulsion primaire : le rouge de Nil est sélectionné. Ainsi, la présence des gouttes d'huile à l'intérieur des microgels a pu être confirmée par microscopie de fluorescence (Figure 28).

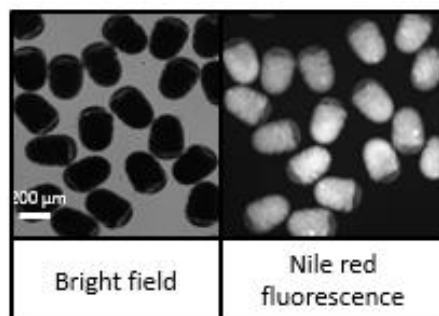


Figure 28: Image en transmission et en fluorescence de microgels contenant des nanogouttes d'huiles dans lesquelles du rouge de Nil est encapsulé. Echelle 200 μm .

3.4.2.3 *Lavage des microgels : retrait des nanogouttes d'huile*

Enfin, pour retirer les gouttes d'huile les microgels sont lavés. Le procédé de lavage est le même que celui utilisé pour les microgels microporeux. L'huile et l'excès de tensioactif sont retirés. Les gels macroporeux sont très contrastés dans l'eau en raison de leur forte densité de réticulation (Figure 29). De plus leur structure semble moins homogène que les gels microporeux. Cet aspect est probablement dû à leur double porosité.

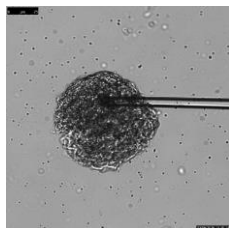


Figure 29 : Image de microscopie à transmission d'un microgel macroporeux. Echelle 75 μm .

3.4.3 Etude de l'effet de la force ionique sur le gonflement des gels macroporeux

L'effet de la force ionique a été étudié comme précédemment en immergeant les microgels immobilisés grâce à un capillaire dans des solutions de différentes salinités (Eau ultra pure, PBS, PBS + 1 M NaCl). Les variations de volume sont mesurées grâce à la microscopie optique en prenant comme référence le volume dans l'eau pure $V_{\text{ultrapure water}}$ déterminé en mesurant le diamètre du gel. (Tableau 5). Les images de microscopie obtenues sont présentées Figure 30.

Tableau 5 : Résumé de la contraction relative du gel macroporeux HA-MA₂₀, BIS₆₇ en fonction de la salinité

	PBS	PBS + 1 M NaCl	PBS reversibility
$V/V_{\text{ultrapure water}} (\%)$	-15 %	-30 %	-15 %

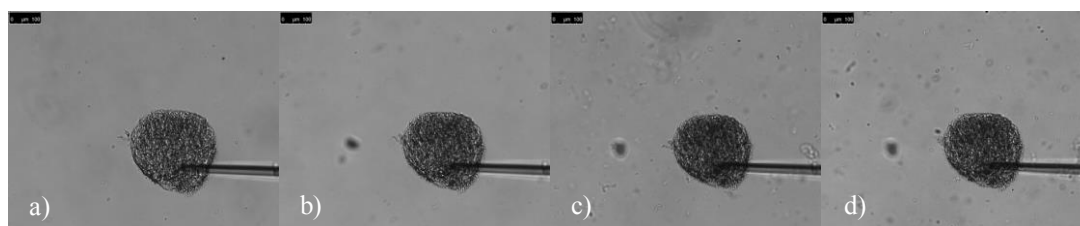


Figure 30: Variation de volume des gels macroporeux en fonction de la salinité du milieu. Images de microscopie de gels microporeux dans: a) de l'eau ultrapure b) du PBS c) du PBS + 1 M NaCl d) du PBS à nouveau pour étudier la réversibilité. Echelle 100 μm

Les microgels se contractent très peu en augmentant la salinité. Ils sont donc extrêmement rigides par rapport aux gels étudiés précédemment. Ce résultat s'explique par le taux de BIS par rapport au HA, qui est de 67wt% ce qui est trois fois plus élevé que pour les microgels de HA-MA₂₀, BIS₂₀ présentés dans le paragraphe 3.2.

3.4.4 Application pour la délivrance d'actifs hydrophobes

Il est possible d'utiliser les microgels dans lesquels sont confinés des nanogouttes d'huile pour la délivrance d'actifs hydrophobes. Pour cela, l'actif d'intérêt doit être introduit dans la phase organique avant la préparation de l'émulsion primaire. Cette dernière doit avoir une taille de goutte suffisamment petite pour

promouvoir la diffusion rapide de l'actif hors des gouttes. Il est possible de libérer les gouttes contenues dans les gels, par dégradation enzymatique de la matrice de HA (Figure 31). Les gouttes libérées peuvent être de taille suffisamment petite pour rejoindre la circulation sanguine et libérer le principe actif localement. Nous avons montré que la cinétique de dégradation de la matrice et donc du relargage de l'actif était proportionnelle à la concentration enzymatique.

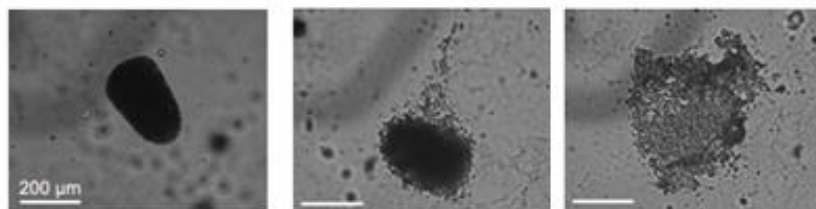


Figure 31 : Dégradation progressive de microgel de HA-MA, BIS₆₇ dans lesquels des gouttes contenant un actif hydrophobe sont encastrées. Echelle 200 μm.

L'ensemble des résultats de mise au point de fabrication des microgels contenant des gouttes d'huile et du relargage contrôlé des principes actifs encapsulés, pour les exemples du rouge de Nil et de la progestérone sont présentées dans la publication « Oil-in-microgel strategy for enzymatic-triggered release of hydrophobic drugs » Busatto *and al*, Journal of Colloid and Interface Science 493 (2017) 356–3664 présentée en Annexe 5.

Nous disposons maintenant, d'une librairie de gels contrôlés de taille micrométrique. Dans le paragraphe suivant, la préparation de gels de taille nanométrique est abordée.

4 Préparation de gels de HA de taille nanométrique

Nous avons voulu préparer des gels d'acide hyaluronique à l'échelle nanométrique. La stratégie générale est similaire à celle utilisée pour les microgels : une émulsion inverse est utilisée comme matrice, les gouttes servent de réacteurs. Pour préparer des nanogels, les gouttes doivent être de taille nanométrique, les techniques d'émulsification utilisées doivent être à fort taux de cisaillement comme présenté dans le paragraphe 1.2.2.1.

4.1 Résumé des travaux préalables et améliorations proposées

Lors des travaux préalables réalisés par notre équipe et en particulier lors des travaux de thèse de Léa Messenger des nanogels de HA-MA et de HA-MA-PBA ont été développés [57]. Ils sont préparés par polymérisation radicalaire d'une nanoémulsion contenant les précurseurs de HA dans les gouttes aqueuses. La fraction volumique de gouttes est relativement faible (inférieure à 10 % afin garder chaque goutte bien individualisée). Les méthodes de fragmentation par ultrasonication et par homogénéiseur à haute pression ont été comparées, et la première a montré des limitations. Les émulsions préparées vieillissent rapidement notamment par sédimentation, limitant le temps disponible pour mener à bien la photopolymérisation. De plus le HA est dépolymérisé sous effet des ultrasons et une coalescence importante est observée, due à la

sensibilité des émulsions à la puissance d'irradiation [45]. Enfin les nanogels obtenus ont une distribution large de 300 nm et un pic d'agrégation est observé [57]. A l'inverse, les émulsions préparées par homogénéiseur à haute pression sont cinétiquement stables durant plusieurs jours (c'est-à-dire un temps supérieur au temps nécessaire à l'étape de réticulation) et monodisperses. Pour ces raisons, nous favoriserons l'utilisation d'un microfluidiseur.

Lors des travaux précédents, l'étape de photopolymérisation a été menée sur des aliquots placés dans des cellules en quartz et sous agitation mis à distance fixe de la lampe UV pour des durées variant de 1 à 6 h et des puissances de la lampe variant de 10 à 100 %. Contrairement aux essais menés par ultrasonication, les émulsions restaient stables même à forte puissance de la lampe. Cependant, cette technique implique une irradiation localisée sur un côté de la cuve, alors que le volume d'émulsion est important (>2 mL), malgré l'agitation rien ne garantit que chaque goutte subisse la même irradiation. Afin de s'assurer d'une irradiation complète et homogène, le facteur temps d'irradiation avait été augmenté. Ce protocole avait pu être appliqué aux nanogels de HA-MA. Le taux de gonflement des nanogels de HA-MA dépend des conditions de photopolymérisation, du degré de méthacrylation, de la masse molaire du macromère et des conditions environnementales tel que le pH. Pour le HA-MA-PBA, le protocole de photopolymérisation avait échoué. Des nanogels de HA-MA-PBA avaient pu être préparés en amorçage redox. La préparation d'un batch à l'autre présentait toutefois des problèmes de reproductibilité.

Dans cette thèse, nous avons tenté de finaliser ce travail, en tirant profit des connaissances issues de la mise au point des microgels par voie microfluidique. Les protocoles définis antérieurement sur l'élaboration des nanogels ont donc été repris et l'étape de photopolymérisation a été améliorée en proposant une photopolymérisation en ligne de la nanoémulsion, dans un capillaire irradié par la lampe UV, comme représenté sur la Figure 32.

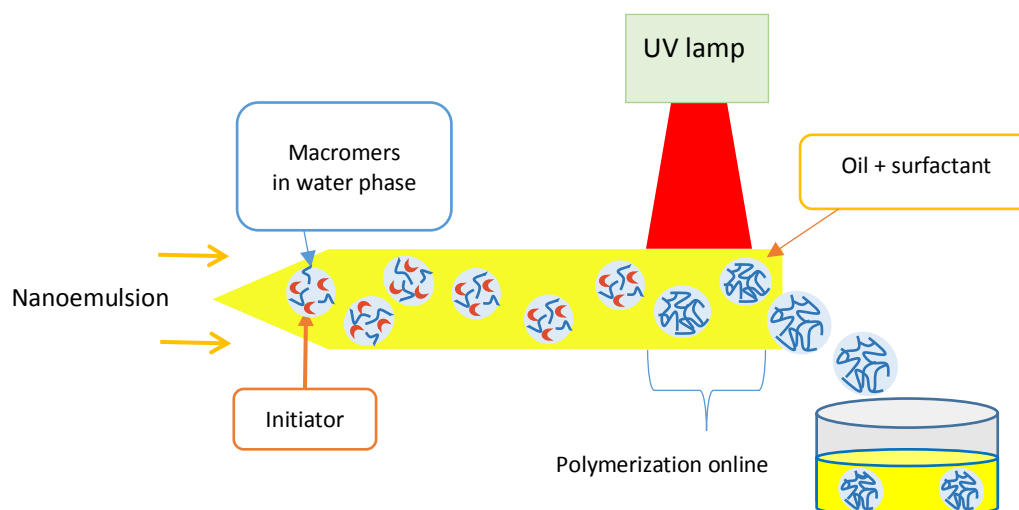


Figure 32: Polymérisation en ligne de macromères confinés dans une nanoémulsion matricielle eau-dans-huile.

Dans ce procédé, comme dans la méthode de photopolymérisation mise au point pour la préparation de microgels par microfluidique, la dose de photons reçue est primordiale. Cela met en jeu le temps d'irradiation, qui peut être contrôlé par la vitesse d'injection, mais aussi les propriétés optiques de l'émulsion. Dans ce contexte, l'émulsion doit donc être la plus transparente possible. Or, de par la différence d'indice de réfraction

entre l'eau et l'huile, les émulsions sont généralement turbides, à moins de diminuer suffisamment la taille des gouttes pour minimiser les phénomènes de diffusion de lumière.

La thèse de Léa Messenger a permis de déterminer les conditions de préparation des nanoémulsions matricielles cinétiquement stable, à l'échelle du temps du procédé, ainsi que leur composition. L'émulsion inverse préparée devra remplir certaines spécifications afin d'assurer la préparation de nanogels monodisperses. Ainsi, comme pour l'émulsion préparée par microfluidique, l'émulsion doit avoir des gouttes de taille contrôlée lors des étapes de procédé de fragmentation et ce jusqu'à la fin de la photopolymérisation et l'émulsion doit être cinétiquement stable à l'échelle du temps du procédé. Cependant, certaines spécifications supplémentaires sont nécessaires. Afin de mener à des nanogels dans la même gamme de taille que les nanogouttes et de limiter la turbidité des émulsions pour que la photopolymérisation ait lieu dans un milieu le plus transparent possible, l'émulsion doit être de petite taille, monodisperse avec un diamètre de goutte $D < 1 \mu\text{m}$. Les émulsions diffusent la lumière, leur turbidité dépend de l'indice de réfraction entre l'eau et l'huile, du nombre de gouttes et du volume de chaque goutte [71]. Il est ainsi primordial de limiter la turbidité. Des émulsions transparentes sont généralement obtenues dans le cas des nanoémulsions.

Lors des travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons voulu optimiser la composition des phases et l'étape de photopolymérisation, pour assurer une irradiation plus homogène sur tout le volume de la nanoémulsion. Les propriétés de gonflement des nouveaux matériaux sont également étudiées.

4.2 Choix des formulations

4.2.1 Compositions des phases mises en jeu dans l'émulsion

Lors de la préparation d'une nanoémulsion inverse, deux phases sont mises en contact : une phase aqueuse dite phase dispersée et une phase organique dite phase continue. Pour la composition de ces phases, nous nous sommes inspirés des travaux préalables réalisés dans notre laboratoire. Les formulations des deux phases choisies sont décrites ci-dessous.

La **phase aqueuse** contient les macromères hydrosolubles, éventuellement le deuxième réticulant, le BIS et un photo-amorceur qui va servir à initier la réticulation des gels par photopolymérisation. Les macromères sont introduits dans une concentration $C_p = 1,5 \text{ wt\%}$ supérieure à la concentration critique de recouvrement des chaînes de HA C^* . L'Irgacure 2959 a été conservé comme photoamorceur hydrosoluble en raison de sa faible toxicité vis-à-vis des cellules [62]. Sa concentration a été fixée à $0,1 \text{ wt\%}$ comme pour la synthèse de microgels. Enfin du chlorure de sodium a été introduit à $[\text{NaCl}] = 0,15 \text{ M}$ afin de limiter les phénomènes de murissement.

La **phase organique** est composée d'une huile, et d'un tensioactif. Les choix sont inspirés de la préparation des microgels (paragraphe 3.1.2). L'huile choisie est l'octane, une huile assez volatile qui est compatible avec le matériel utilisé pour préparer l'émulsion. Le tensioactif utilisé est le Span 80 de $\text{HLB} = 4,3$. Notre choix concernant la nature et la concentration de tensioactifs fait suite à des travaux préalables menés dans notre équipe par Léa Messenger [12]. Le Span 80, a été sélectionné car il donnait lieu aux émulsions les plus stables sous irradiation UV. Pour produire des nanogels, les gouttes préparées par émulsification doivent être de taille nanométrique, la quantité d'interface entre l'huile et la phase aqueuse est plus importante que lors

de la préparation des microgels. Pour cette raison, la quantité de tensioactif utilisée est quatre fois supérieure à celle utilisée pour les microgels préparés par microfluidique. La phase organique contient une quantité de Span 80 fixée à 8 wt% par rapport à l'octane. Cette concentration est 10 fois supérieure à la CMC du Span 80 [11],[69],[70] et permet d'obtenir des émulsions de taille homogène stable plus de 48h [57].

Trois compositions de nanogels sont étudiées, des nanogels préparés à partir de précurseur HA-MA DM 20% sans second réticulant notés HA-MA₂₀, des nanogels préparés à partir de précurseurs de HA-MA DM 20% en présence de 20 % de BIS par rapport au HA notés HA-MA₂₀, BIS₂₀, et enfin des nanogels préparés à partir de précurseurs HA-MA-PBA DM 20 % DS 20 % en présence de BIS à hauteur de 20 % par rapport au HA, ces nanogels seront notés HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀.

4.3 Amélioration de la préparation des nanogels

4.3.1 Procédé d'émulsification par utilisation d'un microfluidiseur

4.3.1.1 *Description du procédé de fragmentation*

Les deux phases préparées sont mises en contact et pré-émulsionnées par agitation magnétique pendant 15 min, puis elles sont introduites dans le microfluidiseur où elles passent dans des canaux microfluidiques afin d'obtenir une émulsion fine. Durant tout le processus, la cellule est refroidie. La pression de l'homogénéiseur et le nombre de passages en continu de la pré-émulsion dans les canaux ont été fixés à 400 kPa et 50 cycles respectivement. Les émulsions sont caractérisées par granulométrie après le processus de fractionnement. Le protocole et les techniques de caractérisation sont décrits en partie expérimentale.

4.3.1.2 *Caractérisation des émulsions après fabrication*

Les émulsions obtenues sont relativement translucides (ou légèrement bleutées), ces observations indiquent que les gouttes sont de taille nanométrique. Elles sont caractérisées par DLS après fabrication, et l'évolution de leur taille est suivie sur deux jours à t_{0h} , t_{24h} et t_{48h} . Les résultats sont présentés Figure 33.

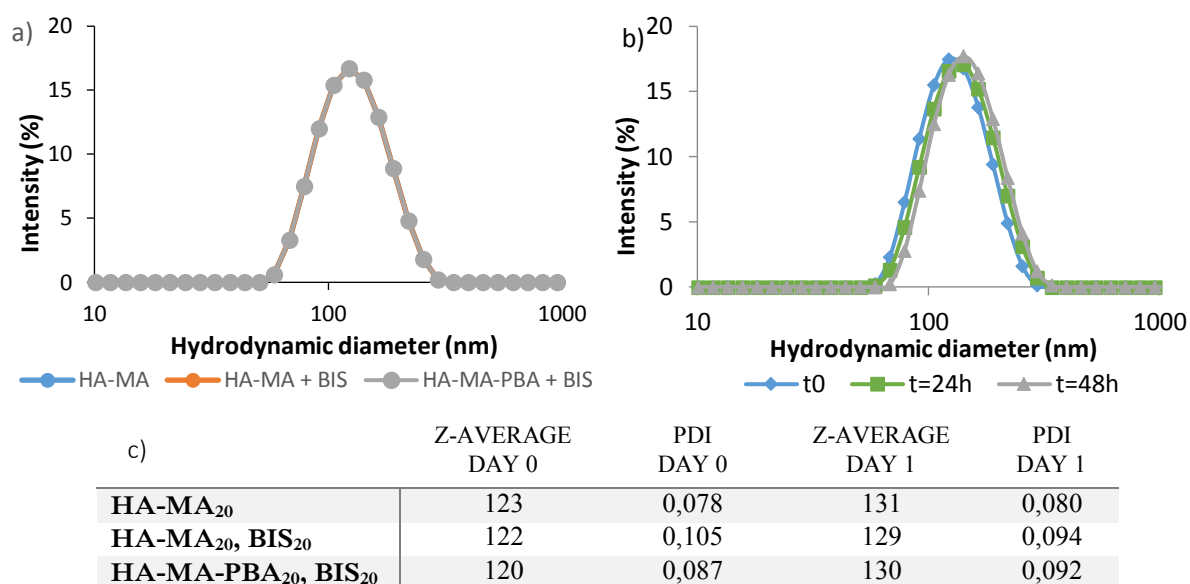


Figure 33: Caractérisation des émulsions par DLS a) profils après passage au microfluidiseur, t_{0h} pour les différentes compositions b) profils en fonction du vieillissement des émulsions exemple de HA-MA₂₀, à t_{0h} , t_{24h} et t_{48h} c) tableau récapitulatif de l'évolution de taille des émulsions obtenues (Z-average) et de leur indice de polydispersité (pDI).

Les mesures de diamètre hydrodynamique réalisées par DLS confirment la taille des émulsions. Elles sont monodisperses. Pour toutes les compositions de phase aqueuse étudiées, la taille des émulsions est centrée sur 120 nm, les profils de taille des trois émulsions sont parfaitement superposables indiquant un bon contrôle du procédé.

On observe une légère augmentation de la taille des émulsions lors de la première journée qui peut être due au phénomène de mûrissement d'Ostwald bien que la dispersité reste relativement constante. Une journée après fabrication, les émulsions ont une taille de 130 nm et leur taille reste constante le jour d'après. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats de l'étude précédente [11],[54]. La stabilité des émulsions dans le temps est bonne, les gels évoluent peu en taille sur 48h, les émulsions sont de bonnes candidates pour servir de nanoréacteurs pour la préparation de nanogels.

4.3.2 Etape de photopolymérisation des nanoémulsions

4.3.2.1 Description du procédé de photopolymérisation

Afin d'améliorer les conditions d'irradiation, pour obtenir une irradiation homogène sur tout le volume de l'émulsion, nous nous sommes inspirés de la préparation de microgels par voie microfluidique, La nanoémulsion, dont la taille des gouttes n'évolue plus, est introduite dans un capillaire en verre de 400 μm de diamètre dont la surface a été traitée pour devenir hydrophobe. La lampe UV est placée à une distance fixe de 3,5 cm au-dessus du capillaire de manière à irradier 2 cm de longueur. La puissance de la lampe est de 100 % soit 4500 mW/cm^2 . La totalité de l'émulsion, introduite à un débit constant de 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ ou de 120 $\mu\text{L}/\text{min}$ grâce à des pousses seringues, est ainsi irradiée pour des durées respectives de 2,5 et de 1,25 secondes suivant le débit utilisé. Les débits choisis ont d'abord été fixés pour avoir un temps d'irradiation similaire à celui utilisé pour les microgels (6,5 secondes). Cependant, ils ont été augmentés pour limiter

l'évaporation de la phase continue. Le montage est représenté Figure 32 (paragraphe 4.1). On peut considérer au vu du faible diamètre du capillaire que l'irradiation est homogène sur toute la section.

4.3.2.2 Caractérisation des émulsions après photopolymérisation

Les émulsions photopolymérisées sont caractérisées après irradiation par DLS, le diamètre hydrodynamique est mesuré par DLS et les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des émulsions pour des temps d'irradiation de 1,25 et 2,25 secondes

	Z-AVERAGE (2,5 SECONDS)	PDI (2,5 SECONDS)	Z-AVERAGE (1,25 SECONDS)	PDI (1,25 SECONDS)
HA-MA ₂₀ 20	137	0,134	130	0,096
HA-MA ₂₀ , BIS ₂₀	126	0,094	129	0,093
HA-MA-PBA ₂₀ , BIS ₂₀	127	0,066	128	0,071

Après irradiation de l'émulsion, la distribution de taille reste monomodale avec peu d'évolution de la taille de l'émulsion centrée à 130 nm. Le confinement des précurseurs dérivés de HA est préservé pendant l'irradiation.

4.3.2.3 Influence du temps d'irradiation et du procédé d'irradiation

Le temps d'irradiation des émulsions dépend du débit auquel l'émulsion est passée sous la lampe UV. Pour les deux temps testés, la taille des émulsions après irradiation reste comparable (Tableau 6). La taille et la dispersité de l'émulsion préparée à partir des précurseurs HA-MA₂₀ sont légèrement supérieures pour un temps d'irradiation plus long. Les émulsions irradiées ont les mêmes caractéristiques que les émulsions non irradiées en termes de taille.

Les méthodes d'irradiation utilisées précédemment, ont mené à une augmentation de la taille des gouttes et à une distribution plus étroite pour une utilisation de la lampe à forte puissance. Il semblerait que ce phénomène de vieillissement de l'émulsion sous l'effet de l'irradiation soit évité avec la nouvelle méthode de photopolymérisation, qui implique également une utilisation de la lampe à forte puissance mais sur un petit volume pendant un temps beaucoup plus faible.

4.3.3 Purification des nanogels et redispersion en milieu aqueux

Afin de purifier les nanogels, pour retirer la phase continue et le tensioactif, le procédé est le même que pour les microgels (paragraphe 3.1.1). Du THF est introduit dans l'émulsion à hauteur de 4 volumes de THF pour un volume d'eau. Le mélange devient transparent par ajout du THF. L'émulsion traitée est alors centrifugée et le surnageant est enlevé et remplacé à nouveau par du THF. Le procédé est réitéré 5 fois avec une centrifugation de 13000 tr/min pendant 1 h. Après le dernier lavage et le retrait du maximum de surnageant, la fraction de polymère est laissée une nuit à l'air libre, puis séchée sous vide pour évaporer le THF. Enfin, les nanogels sont redispersés en milieu aqueux dans de l'eau ultrapure sous agitation pour plusieurs jours.

Cependant, des agrégats sont visibles à l'œil nu et ne sont pas redispersables dans l'eau même après des temps longs. Deux hypothèses sont possibles, les nanogels collapsés à l'état sec, forment un réseau

interpénétré très difficile à dissocier sur les échelles de temps de l'étude. La deuxième hypothèse est que la polymérisation, continuant durant le lavage, ait conduit à réticuler des agrégats de nanogels qui précipitent. Un mélange de nanogels individualisés et de macrogels serait alors obtenu.

4.3.4 Caractérisation et comportement des nanogels en solution

Les nanogels obtenus sont caractérisés par DLS. Leur taille est étudiée en fonction de la nature du milieu, en faisant varier notamment la force ionique. Après redispersion des nanogels, leur concentration dans le milieu est de 7,5 g/L. Les nanogels sont dans un premier temps dilués 10 fois, 24 h avant la mesure dans l'eau ultrapure. Pour observer l'influence de la force ionique sur le gonflement des nanogels, ils sont également dilués 10 fois, 24h avant la mesure dans de l'eau en présence de 150 mM de NaCl ou dans du PBS.

Les nanogels sont également caractérisés par microscopie électronique à transmission (TEM). Les gels observés sur les grilles sont à l'état sec, le dépôt est fait 24h avant l'observation. Les gels posés sur la grille sont marqués par un agent de contraste, l'acétate d'uranyle. Le dépôt a été fait sur des grilles hydrophiles et hydrophobes.

4.3.5 Etude des nanogels de HA-MA₂₀

Le diamètre des gels redispersés dans l'eau est plus important que celui des gouttes des émulsions matricielles. Lorsque les gels sont confinés dans les gouttes, leur gonflement est restreint par la taille de celles-ci. Après la rupture de l'émulsion lors du lavage les gels peuvent gonfler jusqu'à leur état d'équilibre. L'effet de la force ionique est observé (Figure 34). L'influence de la force ionique sur le gonflement des nanogels est étudié, en effet, les nanogels sont des polyélectrolytes, ils sont sensibles à la pression osmotique engendrée par les contre-ions mobiles présents à l'intérieur et à l'extérieur des gels.

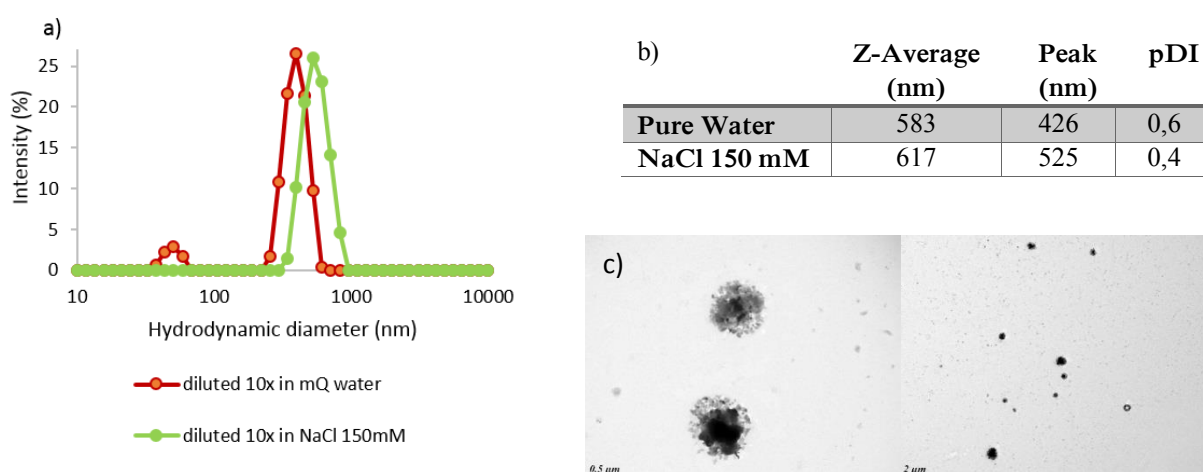


Figure 34: a) Profil DLS des nanogels de HA-MA₂₀ pour différentes forces ioniques b) détail des résultats obtenus par DLS c) Images de TEM (barre d'échelle 0,5 µm à gauche et 2 µm à droite) . Nanogels irradiés 1,25 secondes.

Les nanogels ont une taille de 600 nm environ. Cependant l'évolution de la taille des gels en milieu salé n'est pas en adéquation avec les propriétés des gels de polyélectrolytes. Compte-tenu de la dispersité assez élevée, l'influence du sel est peu visible.

Les gels sont observés en TEM. Quelque soit la nature de la grille, hydrophile ou hydrophobe peu de gels sont observés. Il est possible que les gels n'aient pas une assez bonne tenue mécanique. Les gels observés par TEM ont des tailles comprises entre 750 nm et 1,5 µm (Figure 34 c).

4.3.6 Etude des nanogels de HA-MA₂₀, BIS₂₀

Comme précédemment, l'impact de la salinité sur le gonflement des gels est étudié (Figure 35).

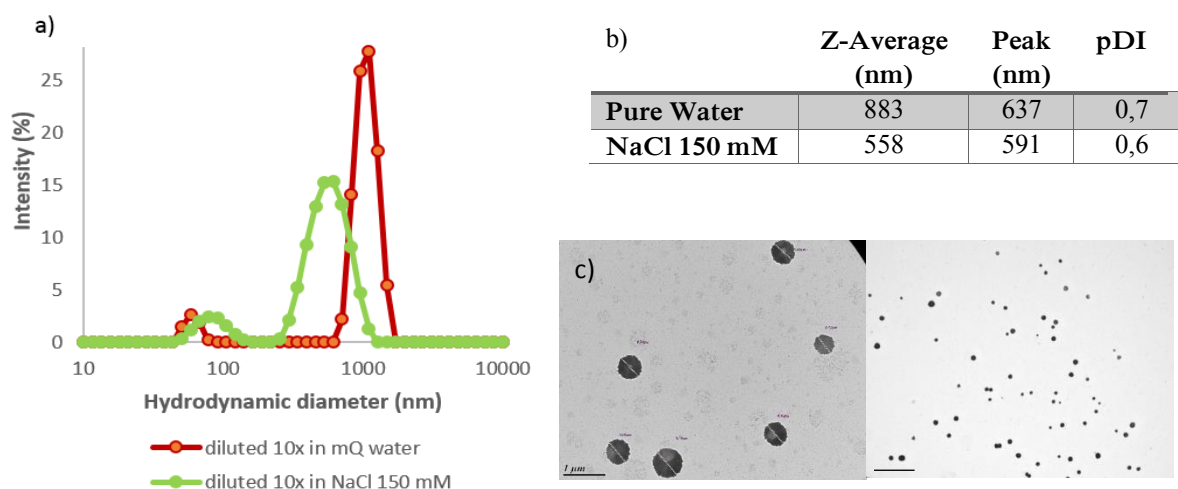


Figure 35 : a) Profil DLS des nanogels de HA-MA₂₀, BIS₂₀ pour différentes forces ioniques b) détail des résultats obtenus par DLS c) Images de TEM (barre d'échelle 1 µm à gauche et 5 µm à droite) . Nanogels irradiés 2,5 secondes.

Pour les nanogels de HA-MA₂₀, BIS₂₀, le comportement des gels en augmentant la force ionique est en adéquation avec le comportement de gels de polyélectrolytes. Ils se contractent en augmentant la force ionique.

Les nanogels ont été observés par microscopie TEM (Figure 35 c). Les grilles utilisées pour leur observation sont des grilles de cuivre recouvertes d'un film de carbone, leur surface est donc hydrophobe. Les premiers essais menés n'ont pas permis d'observer plus de quelques nanogels. Deux raisons peuvent expliquer cela, soit il n'y a pas ou peu de nanogels stables, soit les nanogels ne se fixent pas sur la grille. Pour discriminer parmi ces deux interprétations, les nanogels sont déposés sur des grilles traitées par plasma pour être rendues hydrophiles. Les nanogels sont dans ce cas, observés en nombre sur les grilles ce qui confirme que les nanogels préparés à partir de chaînes de polymère hydrophile ont des difficultés à se fixer sur les grilles de TEM hydrophobes. Les nanogels sont bien définis et contrastés, de texture homogène légèrement dentelés en périphérie. Les tailles observées sont comprises entre 200 et 700 nm ce qui est en adéquation avec les tailles déterminées par DLS qui sont d'environ 800 nm dans l'eau.

4.3.7 Etude des nanogels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀

Enfin, les gels préparés à partir des précurseurs HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ sont étudiés (Figure 36).

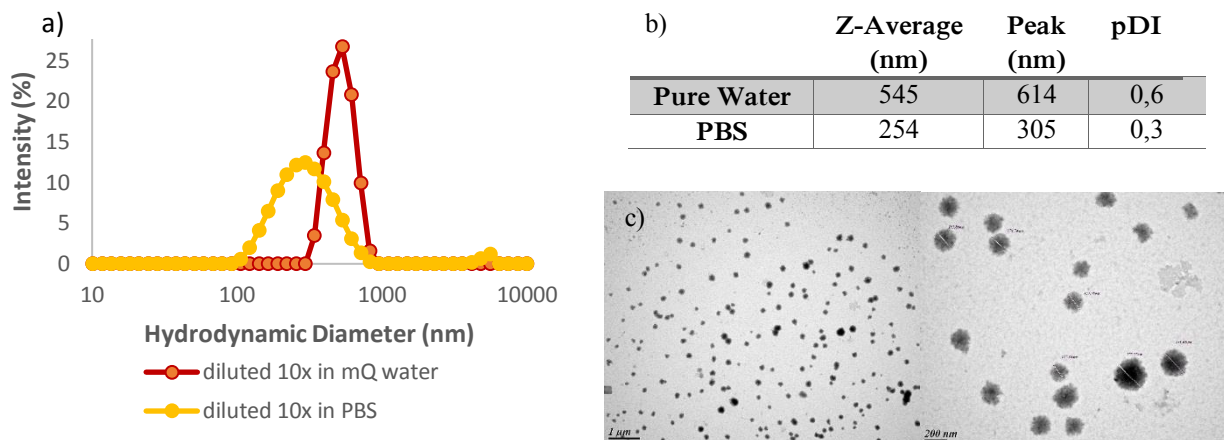


Figure 36 : a) Profil DLS des nanogels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ pour différentes forces ioniques b) détail des résultats obtenus par DLS c) Images de TEM (barre d'échelle 1 μm à gauche et 5 μm à droite) . Nanogels irradiés 2,5 secondes

Les gels préparés à partir de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ sont légèrement plus petits que ceux préparés à partir de HA-MA₂₀, BIS₂₀ (Figure 35). Il est possible que les fonctions PBA aient un rôle stabilisant et que leur hydrophobie joue un rôle dans la taille des gels. Les gels se contractent en augmentant la force ionique ce qui est en accord avec le caractère polyélectrolyte des gels. Ils atteignent 46 % de leur volume dans l'eau ultra pure.

De nombreux gels sont observés par microscopie TEM, qu'ils soient déposés sur des grilles traitées ou non en raison de la nature amphiphile de la chaîne de polymère (Figure 36 c). Les gels sont bien contrastés, homogènes et dentelés en périphérie. Observés à l'état sec, ils ont une taille comprise entre 150 et 300 nm. Ces images confirment que les gels préparés à partir de précurseurs HA-MA-PBA sont légèrement plus petits que ceux préparés avec des précurseurs HA-MA.

L'influence des saccharides sur le gonflement des gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ est également étudiée en les diluant 10 fois dans une solution de PBS contenant 20 mM de fructose. Les résultats sont décrits Figure 37.

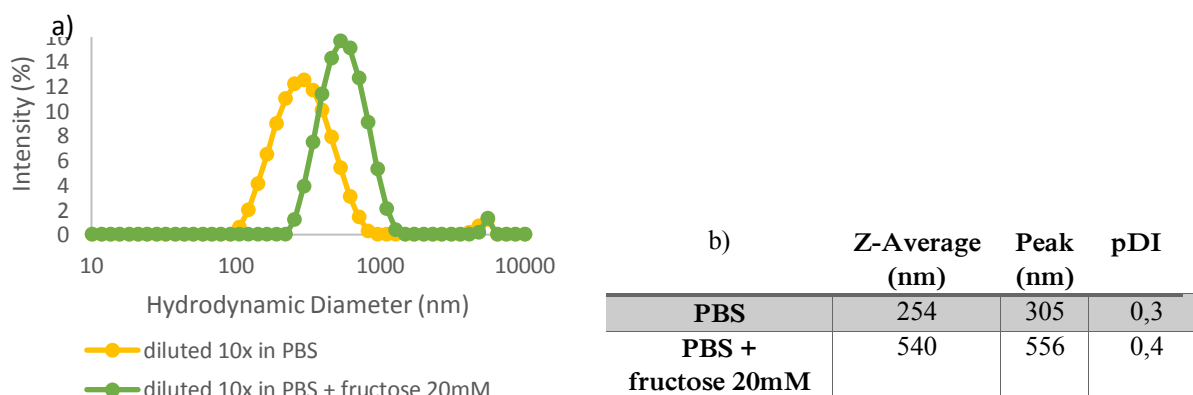


Figure 37 : a) Profil DLS des nanogels préparés à partir de précurseurs de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ avec et sans fructose b) détail des caractéristiques des nanogels obtenus. Nanogels irradiés 2,5 secondes.

Les nanogels gonflent en présence de fructose. Le gonflement du gel est expliqué par l'augmentation de la charge du polymère qui se complexe avec le fructose. Les nanogels préparés sont bien sensibles au sucre.

4.3.8 Stabilité des gels obtenus dans le temps

La stabilité des gels préparés avec les différents précurseurs avec ou sans BIS a été suivie sur un mois. Les gels obtenus à partir des précurseurs HA-MA₂₀, ont perdu 50 % de leur volume, il semblerait qu'ils ne soient pas stables dans le temps. Ces résultats sont en adéquation avec l'hypothèse de la faible stabilité mécanique des gels en l'absence de second réticulant, ce qui explique qu'ils soient peu observés par microscopie TEM. Les gels préparés à partir de HA-MA₂₀, BIS₂₀ ont augmenté de volume de 130 %. Il est possible que leur gonflement soit à l'équilibre après des cinétiques très longues, ou que des chaînes de HA soient partiellement réticulés et se réarrangent en périphérie des gels. Finalement, les gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ sont extrêmement stables. Les fonctions PBA peuvent avoir un rôle stabilisateur en présence de l'émulsion matricielle qui permet d'obtenir des gels mieux réticulés.

4.3.9 Etude de zétamétrie

Les nanogels sont étudiés par zétamétrie. Cette technique permet de mesurer la mobilité électrophorétique et d'accéder à la charge portée par les nanogels. Des informations sur les groupements ioniques présents sur les chaînes de HA lors des étapes de fonctionnalisation peuvent être apportées par cette analyse. Dans le cas de l'étude des nanogels, qui sont des objets mous, dont l'interface avec l'eau n'est pas bien définie, la mobilité électrophorétique dépend de la charge des nanoobjets mais aussi de leur état de gonflement [74]. La mobilité est ainsi plus forte en valeur absolue lorsqu'ils sont contractés et que leur densité de charge de surface est également plus élevée. La mobilité électrophorétique est étudiée sur une gamme de pH entre 4 et 9 (Figure 38).

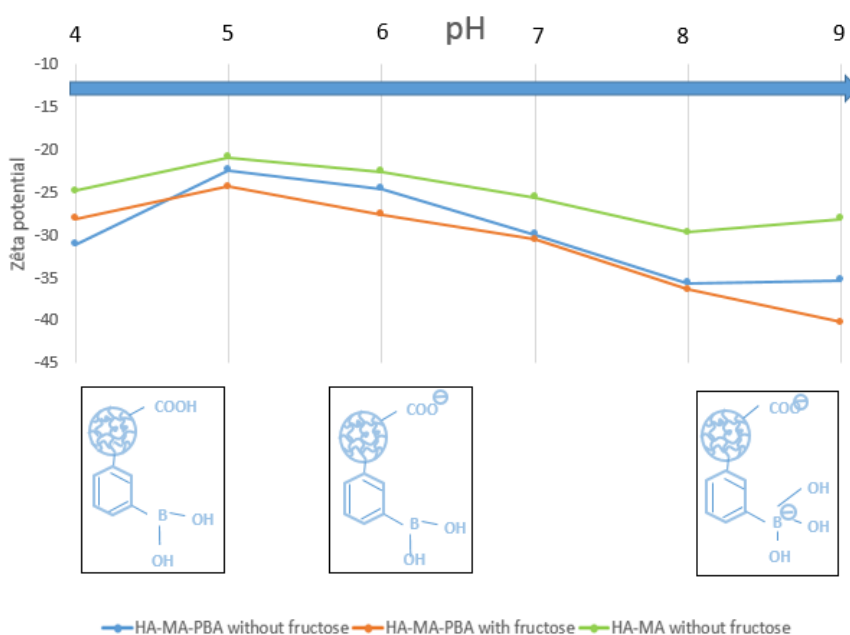


Figure 38: Mesures de potentiel zéta de nanogels de HA-MA₂₀, BIS₂₀ et HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ dans du tampon PBS pour une gamme de pH de 4 à 9 avec et sans fructose. Représentation schématique des différents états de charges des nanogels en fonction du pH.

Les nanogels de deux compositions sont étudiés, HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ et HA-MA₂₀, BIS₂₀. Ils suivent tous le même profil. Le potentiel zêta diminue en valeur absolue entre pH 4 et 5 avant d'augmenter jusqu'à pH 8. A pH 4, proche du pKA du HA, les microgels sont de charge négative et sont peu gonflés. A pH 5, la densité de charge augmente sur la chaîne de polymère, cependant les microgels restent gonflés du fait de la différence de pression osmotique liée aux contre-ions. La densité de charge de surface diminue donc. Les valeurs à pH 9 ne suivent pas les mêmes tendances mais sont à regarder avec précaution en raison de l'augmentation simultanée de la conductivité observée lors de ces mesures.

Tous les potentiels zêta mesurés sont négatifs en raison de la forte densité de charges portée par les chaînes d'acide hyaluronique. On n'observe pas de différence entre les profils mesurés avec ou sans fructose. La différence de charge en valeur absolue, est due à l'état gonflé des gels en présence de fructose qui implique un ratio charge/volume différent.

4.4 Conclusion intermédiaire

Nous avons montré qu'il était possible de préparer des nanogels de HA-MA et de HA-MA-PBA en utilisant une nanoémulsion inverse comme matrice. La stabilité mécanique des nanogels obtenus, est assurée par la présence d'un second réticulant. De plus, le procédé de fabrication a été amélioré en réalisant la photopolymérisation sur des petits volumes d'émulsion de manière, à assurer une exposition aux UV similaire pour toutes les gouttes.

5 Dégradabilité des gels

5.1 La hyaluronidase, une enzyme spécifique

L'acide hyaluronique est dégradé soit par hydrolyse en milieu acide, soit par action d'enzymes spécifiques appelées hyaluronidases. Ces enzymes dégradent aussi dans une moindre mesure la chondroïtine et ses dérivés sulfatés [75]. Ces hyaluronidases sont présentes *in vivo* dans certains organes comme le foie, les reins ou la peau et dans des fluides tels que le sang, le liquide lacrymal et le sperme [76]. Il existe différents types de hyaluronidases [77], pour chacune d'entre elles le mécanisme de dégradation est différent (Figure 39) :

(i) La hyaluronidase d'origine mammalienne (classe EC 3.2.1.35) fait partie des enzymes qui agissent sur les carbohydrates par modification ou clivage des liaisons glycosidiques. La dégradation enzymatique a lieu par clivage du lien glycosidique β -1,4 entre l'acide D-glucuronique et la N-acétyl-D-glucosamine du HA. Différents produits de dégradation sont obtenus, ce sont majoritairement des tétrasaccharides mais aussi quelques hexasaccharides ou monosaccharides. Ces fragments présentent la N-acétyl-D-glucosamine comme motif terminal réducteur.

(ii) La hyaluronidase présente dans les glandes salivaires des sangues (classe EC 3.2.1.36). Dans ce cas, le clivage s'effectue au niveau du lien glycosidique β -1,3 et conduit à des tétrasaccharides et hexasaccharides comme fragments finaux.

(iii) La hyaluronidase d'origine bactérienne (classe EC 4.2.2.1) est une enzyme de la famille des lyases, isolée de différents microorganismes, dégradant la chaîne de HA par un mécanisme de β -élimination. Les produits issus de cette dégradation sont principalement des disaccharides insaturés.

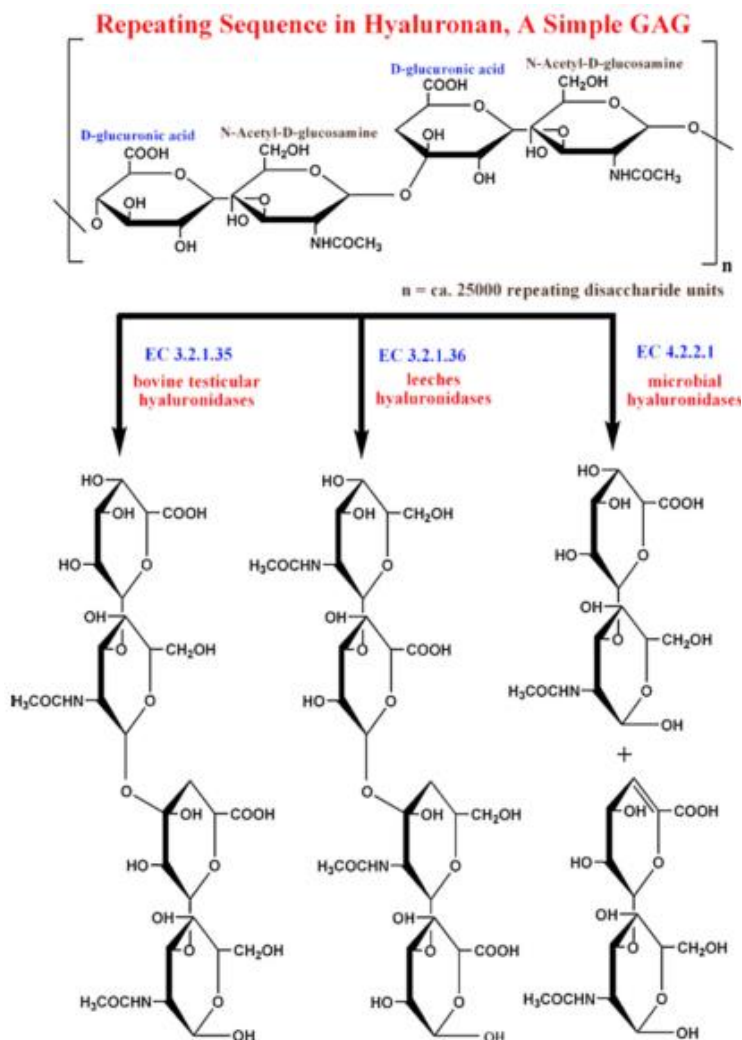


Figure 39: Classification des hyaluronidases selon leur mode d'action. Extrait de [78].

Nous nous sommes intéressés à la première classe d'enzyme, la Hase d'origine mammalienne. Cette enzyme de poids moléculaire de 61 kDa est un tétramère constitué de quatre sous-unités, chacune ayant une masse molaire de 14 kDa. Le clivage du lien glycosidique β -1,4 est une réaction d'hydrolyse par catalyse acido-basique. Elle fait intervenir l'acide glutamique 113 de la séquence de l'Hase qui joue le rôle de donneur. L'effet donneur du Glu 113 est favorisé par le maintien de l'orientation de ses groupes voisins par l'acide aspartique Asp 11131. Dans notre cas, la dégradation des microgels peut être observée de manière directe par microscopie. Cependant, pour des systèmes non observables en directs comme des nanogels, il est possible de doser les produits de dégradation. Il existe diverses méthodes pour doser la dégradation du HA qui peuvent être de type chimique par dosage des sucres obtenus ou physico-chimiques en suivant la turbidité, ou la viscosité du milieu [76],[78].

5.2 Dégradabilité des microgels de HA-MA

5.2.1 Dégradation d'un gel de HA-MA₂₀

L'activité de la Hase dépend de nombreux paramètres tels que le pH, la force ionique, la concentration en substrat ou la température. La dégradabilité des gels de HA-MA₂₀ a été vérifiée en incubant un gel tenu par un microcapillaire dans une solution de Hase de concentration 500 U/mL chauffée à 37°C afin de favoriser l'activité enzymatique qui suit une loi d'Arrhenius thermodépendante. (Figure 40).

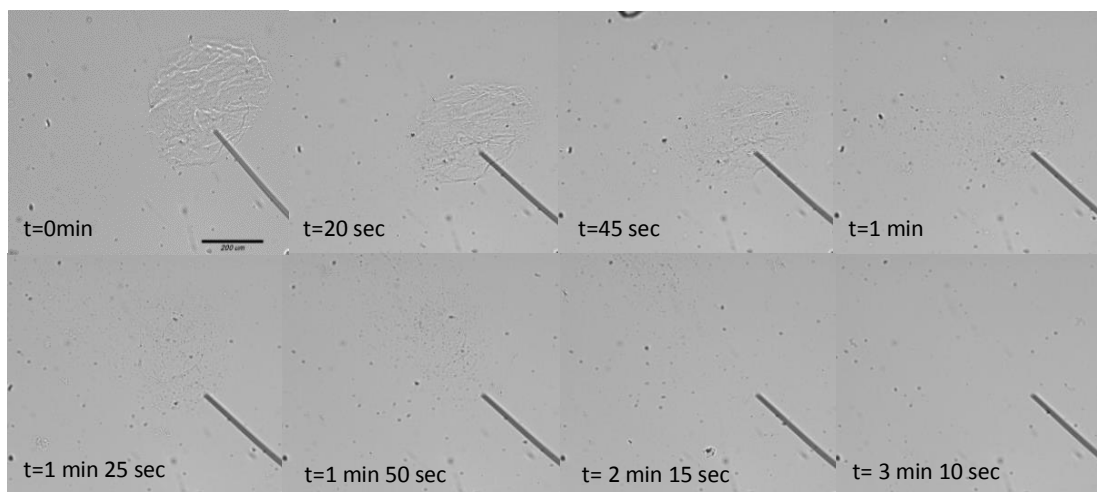


Figure 40: Dégradation enzymatique d'un gel HA-MA₂₀ par action de la hyaluronidase 500 U/mL dans du PBS pH 7,4 à 37°C. Barre d'échelle 200 µm.

Le volume du gel diminue lors de la dégradation en raison de l'exposition à l'enzyme. L'érosion de la surface du gel est due à la diffusion de l'enzyme à travers la matrice qui vient dégrader les chaînes de HA en clivant la liaison glycosidique β -1,4. Ce comportement a été observé pour des gels d'acide hyaluronique ayant différents type de réticulations dont celles mettant en jeu des fonctions méthacrylates [45],[80]. La diminution du volume peut aussi être induite partiellement par l'interaction entre des produits de dégradation du HA chargés positivement et les fonctions acides carboxyliques du HA chargées négativement [52]. Les gels de HA-MA₂₀, et HA-MA₂₀, BIS₂₀ micrométriques produits par microfluidique sont dégradés totalement en quelques minutes.

5.2.2 Considération cinétique : effet du degré de méthacrylation

Différents facteurs affectent la cinétique de dégradation des gels, il a notamment été montré que l'augmentation de la concentration en macromère augmente la cinétique de dégradation proportionnellement [52]. Pour cette étude, les essais de dégradation ont été menés pour des gels préparés avec des précurseurs de degré de méthacrylation 15 % ou 30 %. Dans les deux cas les gels sont dégradés, cependant les cinétiques de dégradation sont différentes (Figure 41).

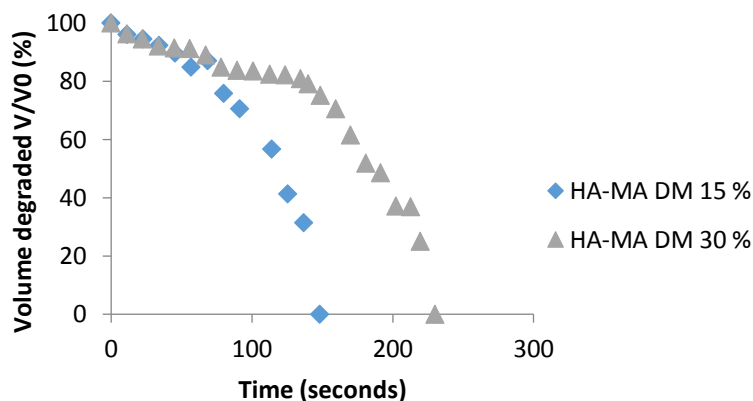


Figure 41: Cinétique de dégradation des gels de HA-MA en fonction du degré de réticulation en présence de 500U/mL de hyaluronidase dans du tampon PBS pH 7,4 à 37°C.

Les profils sont similaires : la dégradation débute lentement, l'accessibilité des chaînes de HA est freinée par la réticulation des gels. Au fur et à mesure que la Hase pénètre dans le réseau et clive les chaînes, la réticulation diminue et l'enzyme peut pénétrer et accéder aux chaînes de HA plus facilement, la dégradation s'accélère avec l'augmentation progressive de la porosité. La fin de la dégradation est extrêmement rapide en raison de la bonne solubilisation des chaînes de HA quand le réseau devient peu réticulé. Pour cette raison, la dégradation des gels moins réticulés, est donc plus rapide et la cinétique de dégradation est corrélée au degré de méthacrylation des gels et à la teneur en second réticulant. Les gels préparés à partir de précurseurs HA-MA₂₀ se fait en 2 minutes et 45 secondes, alors que ceux préparés à partir des précurseurs de HA-MA₃₀ se fait en 3 minutes et 50 secondes.

Plusieurs études ont également montré que les cinétiques de dégradation sont proportionnelles à la concentration enzymatique [52]. Nous avons notamment montré que des gels de HA-MA contenant des nanogouttes d'huile préparés à partir de précurseurs HA-MA présentaient des cinétiques de dégradation dépendantes de la concentration en Hase pour des concentrations de 0, 100 et 300 U/mL (Publication [81] en Annexe 5).

Il est important de noter que ces résultats représentent une comparaison relative des cinétiques de dégradation et ne sont pas représentatifs des cinétiques de dégradation *in vivo*, qui dépendent des concentrations enzymatiques locales et de la distribution de la Hase dans l'organisme qui est par exemple de 60 ng/mL dans le sérum humain [82].

5.2.3 Dégradabilité des gels de HA-MA-PBA

De la même façon que pour les gels de HA-MA, des gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ ont été mis à incuber dans une solution de hyaluronidase à 37°C pendant une heure. Aucune dégradation n'est observée pour ces gels-là. On trouve dans la littérature des exemples de gels d'acide hyaluronique modifiés dont la cinétique de dégradation dépendait simultanément des conditions tel que le pH et du degré de modification de la chaîne de HA. Nous n'avons pas étudié les cinétiques de dégradation de ces gels sur des temps plus longs, ni fait varier les conditions de pH de la solution de hyaluronidase. La dégradabilité des gels dans les conditions mises en jeu est inhibée lorsque que la chaîne de HA est modifiée avec des fonctions PBA.

Un approfondissement de l'étude pour déterminer si les gels de HA-MA-PBA sont toujours dégradables et dans quelles conditions serait indispensable en vue d'applications *in vivo*.

5.3 Dégradabilité des nanogels

La dégradabilité des nanogels a été étudiée par DLS à 37°C, en analysant à la fois l'évolution du diamètre et l'intensité diffusée. Des nanogels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ et HA-MA-₂₀, BIS₂₀ sont dilués dans du PBS en présence de Hase. Différentes concentrations de Hase sont introduites, 30 U/mL, 100 U/mL et 300 U/mL pour moduler les cinétiques de dégradation. La taille, la polydispersité et l'intensité de diffusion sont suivies simultanément. Les résultats sont comparés avec des nanogels dilués dans du PBS seul. La campagne d'expériences n'a pas permis de conclure sur la dégradation ou la non dégradation des nanogels, et ce, quelle que soit leur nature.

5.4 Conclusion intermédiaire

Les gels composés de HA-MA avec ou sans BIS sont dégradables, et les cinétiques de dégradation peuvent être modulées en fonction de la réticulation des gels et de la concentration en Hase. Dans les conditions de l'étude, les gels modifiés à partir de HA-MA-PBA ne sont plus dégradables. Il a été montré que le degré de modification ainsi que la nature des modifications de la chaîne de HA impacte les cinétiques de dégradation de gels d'acide hyaluronique [83]. A l'échelle nanométrique, l'étude de la dégradation n'a pas pu être réalisée en raison de la difficulté à trouver une technique d'analyse adéquate.

6 Conclusion

Au terme de cette étude, nous avons amélioré la méthode développée par Léa Messenger concernant la synthèse de nanogels d'acide hyaluronique et nous avons mis en place une méthode générique pour la synthèse de microgels d'acide hyaluronique.

La polymérisation nécessite dans les deux cas une préparation contrôlée de gouttes qui servent de micro/nanoréacteurs. La préparation de gouttes de manière reproductible est assurée par des techniques de microfluidique ou des homogénéiseurs haute pression suivant la taille des gels que l'on souhaite obtenir.

Dans le premier cas, des nanogels ont été préparés à partir de différents précurseurs de HA. L'étape de photopolymérisation a été optimisée de manière à obtenir une irradiation plus homogène sur l'ensemble des nanoréacteurs. Le degré de réticulation est un facteur prépondérant pour obtenir des gels mécaniquement stables. Les propriétés de gonflement des nanogels ont été étudiées notamment pour des nanogels sensibles au sucre.

Dans le second cas, après optimisation des paramètres de formulation, procédés et polymérisation, nous avons obtenu une gamme de microgels de taille, réticulation et rigidité contrôlées, ce qui impacte les propriétés de gonflement des gels. Les microgels sont préparés à partir de dérivés d'acide hyaluronique dont certains sont modifiés avec des fonctions PBA sensibles aux sucres. La nature des modifications de la chaîne de HA, notamment l'ajout de fonctions PBA impacte la dégradabilité des gels par action enzymatique.

Références :

- [1] J. Alemán *et al.*, “Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 79, p. 1801, 2007.
- [2] T. Tanaka and D. J. Fillmore, “Kinetics of swelling of gels,” *J. Phys. Chem.*, vol. 70, p. 1214, 1979.
- [3] M. E. Helgeson, S. C. Chapin, and P. S. Doyle, “Hydrogel microparticles from lithographic processes: Novel materials for fundamental and applied colloid science,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 106–117, 2011.
- [4] A. Khademhosseini *et al.*, “Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment,” *J. Biomed. Mater. Res. part A*, vol. 79, no. 3, pp. 5–11, 2006.
- [5] S. V Ghugare, E. Chiessi, B. Cerroni, M. T. F. Telling, V. Garcia Sakai, and G. Paradossi, “Biodegradable dextran based microgels: a study on network associated water diffusion and enzymatic degradation,” *Soft Matter*, vol. 8, pp. 2494–2502, 2012.
- [6] S. V Ghugare, P. Mozetic, G. Paradossi, and R. Tor, “Temperature-Sensitive Poly (vinyl alcohol)/ Poly (methacrylate- co - N -isopropyl acrylamide) Microgels for Doxorubicin Delivery,” *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 1589–1596, 2009.
- [7] B. Li, L. Wang, D. Li, B. Adhikari, and Z. Mao, “Preparation and characterization of crosslinked starch microspheres using a two-stage water-in-water emulsion method,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 88, no. 3, pp. 912–916, 2012.
- [8] I. Capron, S. Costeux, and M. Djabourov, “Water in water emulsions: phase separation and rheology of biopolymer solutions,” *Rheol. Acta*, vol. 40, no. 5, pp. 441–456, 2001.
- [9] T. G. Van Thienen, B. Lucas, F. M. Flesch, C. F. Van Nostrum, J. Demeester, and S. C. De Smedt, “On the Synthesis and Characterization of Biodegradable Dextran Nanogels with Tunable Degradation Properties,” *Macromolecules*, vol. 38, no. 20, pp. 8503–8511, 2005.
- [10] E. Hachet, N. Sereni, I. Pignot-Paintrand, V. Ravaine, A. Szarpak-Jankowska, and R. Auzély-Velty, “Thiol-ene clickable hyaluronans: From macro-to nanogels,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 419, pp. 52–55, 2014.
- [11] J. E. Prata, T. A. Barth, S. A. Bencherif, and N. R. Washburn, “Complex Fluids Based on Methacrylated Hyaluronic Acid,” *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 3, pp. 769–775, 2010.
- [12] L. Messenger *et al.*, “Photochemical crosslinking of hyaluronic acid confined in nanoemulsions: towards nanogels with a controlled structure,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, pp. 3369–3379, 2013.
- [13] Y. H. Yun, D. J. Goetz, P. Yellen, and W. Chen, “Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting,” *Biomaterials*, vol. 25, pp. 147–157, 2004.
- [14] W. C. Griffin, “Classification of surface-active agents by ‘HLB,’” *J. Soc. Cosmet. Chem.*, vol. 1, no. 5, pp. 311–326, 1949.
- [15] I. Taylor G, “The Formation of Emulsions in Definable Fields of Flow,” *Proc. R. Soc. London. Ser. A, Contain. Pap. a Math. Phys. Character*, vol. 146, no. 858, pp. 501–523, 1934.
- [16] H. P. Grace, “Dispersion phenomena in high viscosity immiscible fluid systems and application of static mixers as dispersion devices in such systems,” *Chem. Eng. Commun.*, vol. 14, no. 3–6, pp. 225–277, 1982.
- [17] M. Antonietti and K. Landfester, “Polyreactions in miniemulsions,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 27, pp. 689–757, 2002.
- [18] J. K. Oh, C. Tang, H. Gao, N. V Tsarevsky, and K. Matyjaszewski, “Inverse Miniemulsion ATRP: A New Method for Synthesis and Functionalization of Well-Defined Water-Soluble / Cross-Linked Polymeric Particles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 30, pp. 5578–5584, 2006.
- [19] T. Nakashima, M. Shimizu, and M. Kukizaki, “Membrane emulsification by microporous glass,” *Key Eng. Mater.*, vol. 61–62, pp. 513–516, 1991.
- [20] T. Nakashima, M. Shimizu, and M. Kukizaki, “Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 45, no. 1, pp. 47–56, 2000.
- [21] K. Suzuki, I. Shuto, and Y. Hagura, “Characteristics of the Membrane Emulsification Method Combined with Preliminary Emulsification for Preparing Corn Oil-in-Water Emulsions,” *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, vol. 2, no. 1, pp. 43–47, 1996.
- [22] Y. Mi *et al.*, “Preparation of water-in-oil emulsions using a hydrophobic polymer membrane with 3D bicontinuous skeleton structure,” *J. Memb. Sci.*, vol. 490, pp. 113–119, 2015.
- [23] C. Choi, J. Kim, J. Nam, S. Kang, S. Jeong, and C. Lee, “Microfluidic Design of Complex Emulsions,” *Chem. Chim. Phys.*, vol. 15, pp. 21–29, 2014.

- [24] P. J. Flory, *Principles of polymer chemistry*, First Edit. Cornell University Press, 1953.
- [25] P. J. Flory and J. Rehner, "statistical theory on chain configuration and physical properties of high polymers," *J. Chem. physics*, vol. 11, p. 512, 1943.
- [26] Y. Ma, M. P. Neubauer, J. Thiele, A. Fery, and T. S. Huck, "Artificial microniches for probing mesenchymal stem cell fate in 3D," *Biomater. Sci.*, vol. 2, p. 1661, 2014.
- [27] U. Shimanovich *et al.*, "Protein Microgels from Amyloid Fibril Networks," *ACS Nano*, vol. 9, no. 1, pp. 43–51, 2015.
- [28] S. Seiffert and D. A. Weitz, "Microfluidic fabrication of smart microgels from macromolecular precursors," *Polymer (Guildf.)*, vol. 51, no. 25, pp. 5883–5889, 2010.
- [29] M. Seuss, W. Schmolke, A. Drechsler, A. Fery, and S. Sei, "Core – Shell Microgels with Switchable Elasticity at Constant Interfacial Interaction," *Appl. Mater. interfaces*, vol. 8, no. 25, pp. 16317–16327, 2016.
- [30] H. Liu and Y. Zhang, "Droplet formation in a T-shaped microfluidic junction," *J. Appl. Phys.*, vol. 34906, no. 2009, 2011.
- [31] S. L. Anna, N. Bontoux, and H. A. Stone, "Formation of dispersions using " flow focusing " in microchannels," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 82, no. 3, pp. 364–366, 2003.
- [32] J. Shim *et al.*, "Ultrarapid generation of femtoliter microfluidic droplets for single-molecule-counting immunoassays," *ACS Nano*, vol. 7, no. 7, pp. 5955–5964, 2013.
- [33] M. Leman, F. Abouakil, A. D. Griffiths, and P. Tabeling, "Droplet-based microfluidics at the femtolitre scale," *Lab Chip*, vol. 15, no. 3, pp. 753–765, 2015.
- [34] S. Teh, R. Lin, L. H. Hung, and A. P. Lee, "Droplet microfluidics," *Lab Chip*, vol. 8, no. 2, pp. 198–220, 2008.
- [35] F. Di Lorenzo and S. Seiffert, "Effect of Droplet Size in Acrylamide-Based Microgel Formation by Microfluidics," *Macromol. React. Eng.*, vol. 10, no. 3, pp. 201–205, 2016.
- [36] D. M. Headen, G. Aubry, H. Lu, and A. J. García, "Microfluidic-Based Generation of Size-Controlled , Biofunctionalized Synthetic Polymer Microgels for Cell Encapsulation," *Adv. Mater.*, vol. 26, no. 19, pp. 3003–3008, 2013.
- [37] R. Studart *et al.*, "Droplet Microfluidics for Fabrication of Non-Spherical Particles," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 31, pp. 108–118, 2010.
- [38] S. Xu *et al.*, "Generation of Monodisperse Particles by Using Microfluidics: Control over Size, Shape, and Composition," *Angew. chemie Int. Ed.*, vol. 44, pp. 724–728, 2005.
- [39] S. Seiffert, "Sensitive Microgels as Model Colloids and Microcapsules," *J. Polym. Sci. part A Polym. Chem.*, vol. 52, pp. 435–449, 2014.
- [40] N. M. B. Smeets and T. Hoare, "Designing Responsive Microgels for Drug Delivery Applications," *J. Polym. Sci. part A Polym. Chem.*, vol. 51, pp. 3027–3043, 2013.
- [41] J. Rüb *et al.*, "Tailored and biodegradable poly (2-oxazoline) microbeads as 3D matrices for stem cell culture in regenerative therapies," *Biomaterials*, vol. 79, p. 1, 2016.
- [42] D. Renard and B. Cathala, "Microfluidic Generation and Selective Degradation of Biopolymer-Based Janus Microbeads," *Biomacromolecules*, vol. 13, pp. 1197–1203, 2012.
- [43] T. P. Lagus *et al.*, "Droplet based microfluidics," *Reports Prog. Phys.*, vol. 75, 2011.
- [44] J. Mergy, A. Fournier, E. Hachet, and R. Auzély-Velty, "Modification of Polysaccharides Via Thiol-Ene Chemistry : A Versatile Route to Functional Biomaterials," *J. Polym. Sci. part A*, vol. 50, pp. 4019–4028, 2012.
- [45] E. Hachet, E. Bayma, and M. R. Block, "Design of Biomimetic Cell-Interactive Substrates Using Hyaluronic Acid Hydrogels with Tunable Mechanical Properties," *Biomacromolecules*, vol. 13, pp. 1818–1827, 2012.
- [46] C. Decker, "Photoinitiated crosslinking polymerisation," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 21, pp. 593–650, 1996.
- [47] K. A. Smeds and M. W. Grinstaff, "Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 54, no. 1, pp. 115–121, 2000.
- [48] X. Jia *et al.*, "Synthesis and Characterization of in Situ Cross-Linkable Hyaluronic Acid-Based Hydrogels with Potential Application for Vocal Fold Regeneration," *Macromolecules*, vol. 37, pp. 3239–3248, 2004.
- [49] S. A. Bencherif, A. Srinivasan, F. Horkay, J. O. Hollinger, K. Matyjaszewski, and N. R. Washburn, "Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 1739–1749, 2008.
- [50] Y. D. Park, N. Tirelli, and J. A. Hubbell, "Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 893–900, 2003.

- [51] S. Kwang, J. Kyu, T. Tomimatsu, and T. Shimoboji, "Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 40, pp. 374–380, 2007.
- [52] J. A. Burdick, C. Chung, X. Jia, M. A. Randolph, and R. Langer, "Controlled Degradation and Mechanical Behavior of Photopolymerized Hyaluronic Acid Networks," *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 386–391, 2005.
- [53] G. Pitarresi, P. Pierro, F. S. Palumbo, G. Tripodo, and T. Farmaceutiche, "Photo-Cross-Linked Hydrogels with Polysaccharide - Poly (amino acid) Structure : New Biomaterials for Pharmaceutical Applications," *Biomacromolecules*, vol. 7, pp. 1302–1310, 2006.
- [54] M. H. M. Oudshoorn, R. Rissmann, J. A. Bouwstra, and W. E. Hennink, "Synthesis of methacrylated hyaluronic acid with tailored degree of substitution," *Polymer (Guildf.)*, vol. 48, no. 7, pp. 1915–1920, 2007.
- [55] V. Ibrahimova, "Development of polypeptide-based multifunctional nano-assemblies for a theranostic approach," University of Bordeaux, 2016.
- [56] J. Kuo, D. A. Swann, and G. D. Prestwich, "Chemical Modification of Hyaluronic Acid by Carbodiimides," *Bioconjug. Chem.*, vol. 2, pp. 232–241, 1991.
- [57] L. Messenger, "Nanogels de polysaccharides pour la délivrance d'insuline," Université de Bordeaux I.
- [58] S. Seiffert, F. Friess, A. Lendlein, and C. Wischke, "Faster droplet production by delayed surfactant-addition in two-phase microfluidics to form thermo-sensitive microgels," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 452, pp. 38–42, 2015.
- [59] L. Peltonen, J. Hirvonen, and J. Yliruusi, "The Behavior of Sorbitan Surfactants at the Water – Oil Interface : Straight-Chained Hydrocarbons from Pentane to Dodecane as an Oil Phase," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 276, pp. 272–276, 2001.
- [60] Z. Fu, M. Liu, J. Xu, Q. Wang, and Z. Fan, "Stabilization of water-in-octane nano-emulsion . Part I : Stabilized by mixed surfactant systems," *Fuel*, vol. 89, no. 10, pp. 2838–2843, 2010.
- [61] E. Fouissac, M. Milas, and M. Rinaudo, "Shear-Rate, Concentration, Molecular Weight, and Temperature Viscosity Dependences of Hyaluronate, a Wormlike Polyelectrolyte," *Macromolecules*, vol. 26, no. 25, pp. 6945–6951, 1993.
- [62] C. G. Williams, A. N. Malik, T. Kyun, P. N. Manson, and J. H. Elisseeff, "Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 1211–1218, 2005.
- [63] T. Fu, Y. Ma, D. Funfschilling, C. Zhu, and H. Z. Li, "Squeezing-to-dripping transition for bubble formation in a microfluidic T-junction," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 65, no. 12, pp. 3739–3748, 2010.
- [64] J. H. Xu, S. W. Li, J. Tan, and G. S. Luo, "Correlations of droplet formation in T-junction microfluidic devices: From squeezing to dripping," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 5, no. 6, pp. 711–717, 2008.
- [65] E. Marsano, S. Gagliardi, F. Ghioni, and E. Bianchi, "Behaviour of gels based on (hydroxypropyl) cellulose methacrylate," *Polymer (Guildf.)*, vol. 41, no. 21, pp. 7691–7698, 2000.
- [66] J. B. Leach, K. A. Bivens, C. W. Patrick, and C. E. Schmidt, "Photocrosslinked Hyaluronic acid hydrogels : Natural , Biodegradable Tissue Engineering Scaffolds," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 82, p. 578, 2003.
- [67] Q. Chen, M. R. Hill, W. L. A. Brooks, A. Zhu, B. S. Sumerlin, and Z. An, "Boronic Acid Linear Homopolymers as Effective Emulsifiers and Gelators," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 39, pp. 21668–21672, 2015.
- [68] G. Springsteen and B. Wang, "A detailed examination of boronic acid-diol complexation," *Tetrahedron*, vol. 58, no. 26, pp. 5291–5300, 2002.
- [69] G. Journal and I. Medicine, "Depolymerization of hyaluronan by sonication," pp. 435–439, 1993.
- [70] B. M. Jose and T. Cubaud, "Formation and dynamics of partially wetting droplets in square microchannels," *RSC Adv.*, vol. 4, pp. 14962–14970, 2014.
- [71] J. Zou, C. C. Hew, E. Themistou, Y. Li, and C. Chen, "Clicking Well-Defined Biodegradable Nanoparticles and Nanocapsules by UV-Induced Thiol-Ene Cross-Linking in Transparent Miniemulsions," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 23, pp. 4274–4277, 2011.
- [72] T. G. Mason, J. N. Wilking, K. Melenson, C. B. Chang, and S. M. Graves, "Nanoemulsions : formation , structure , and physical properties," *J Phys Condens Matter*, vol. 18, pp. 635–666, 2006.
- [73] T. Delmas, P. Poulin, and M. E. Cates, "How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions," *Langmuir*, vol. 27, no. 16, pp. 1683–1692, 2011.
- [74] B. Sierra-Martan, M. . Romero-Cano, A. Fernandez-Nieves, and A. Fernandez-Barbero, "Thermal Control over the Electrophoresis of Soft Colloidal Particles," *Langmuir*, vol. 22, no. 8, pp. 3586–3590, 2006.

- [75] R. Stern and M. J. Jedrzejewski, "Hyaluronidases : Their Genomics , Structures , and Mechanisms of Action," *Chem. Rev.*, vol. 106, pp. 818–839, 2006.
- [76] J. R. E. Fraser, T. C. Laurent, and U. B. G. Laurent, "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover," *J. Intern. Med.*, vol. 242, pp. 27–33, 1997.
- [77] N. S. El-safory, A. E. Fazary, and C. Lee, "Hyaluronidases , a group of glycosidases : Current and future perspectives," *Carbohydr. Polym.*, vol. 81, no. 2, pp. 165–181, 2010.
- [78] K. Meyer, *Hyaluronidases*, 3rd ed. New-York, London, 1971.
- [79] W. Thomas, J. Morgan, and L. A. Elson, "A colorimetric method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine," *Biochem. Journals*, vol. 28, no. 3, pp. 988–995, 1934.
- [80] G. D. Prestwich, D. M. Marecak, J. F. Marecek, K. P. Vercruyse, and M. R. Ziebell, "Controlled chemical modification of hyaluronic acid : synthesis , applications , and biodegradation of hydrazide derivatives," *J. Control. Release*, vol. 53, pp. 93–103, 1998.
- [81] C. A. Busatto *et al.*, "Hydrogel strategy for enzymatic-triggered release of hydrophobic drugs," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 493, pp. 356–364, 2017.
- [82] G. I. Frost, T. B. Cso, T. Wong, and R. Stern, "Purification , Cloning , and Expression of Human Plasma Hyaluronidase 1," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 15, no. 236, pp. 10–15, 1997.
- [83] P. Bulpitt and D. Aeschlimann, "New strategy for chemical modification of hyaluronic acid : Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 47, no. 2, pp. 152–169, 1999.

Chapitre 4:

**Etude des interactions entre des
microgels de HA et des protéines
modèles : vers la libération contrôlée
d'insuline.**

L'objectif de ce chapitre est dans une première partie, d'étudier le chargement d'hydrogels d'acide hyaluronique en protéines modèles. Le rôle des interactions sur le chargement et le comportement physico-chimique des gels sera étudié. Dans une deuxième partie, des gels de première génération préparés à partir de précurseurs de HA-MA-PBA ayant des fonctions sensibles aux saccharides seront étudiés. Enfin dans une troisième partie, une stratégie d'encapsulation et de relargage contrôlé de protéines qui ne présentent pas d'interactions avec les matrices de gel sera présentée. Afin de nous rapprocher des conditions physiologiques, le pH et la salinité des milieux sont fixés. L'étude est menée dans du tampon PBS à pH 7,4. Les effets de la force ionique et du pH sur les interactions ne sont pas abordés.

1 Etude du chargement de protéines modèles

1.1 Présentation des méthodes choisies

Afin de mener à bien cette étude nous avons choisi de travailler à l'échelle micrométrique, pour pouvoir étudier simultanément les interactions moléculaires entre les matrices de gel et les protéines modèles à encapsuler mais également les changements structurels des gels. Dans le chapitre 3, nous avons présenté les techniques de préparation de microgels d'acide hyaluronique. L'étude décrite dans ce chapitre utilise la technique de microscopie optique assistée par micromanipulateur, qui permet de mesurer les changements de volume des gels en réponse à différentes salinités, différents pH ou en réponse au chargement d'actifs tels que des protéines. Cette technique consiste à immobiliser un microgel unique au bout d'un microcapillaire en verre et à l'immerger dans une chambre d'observation microscopique connectée à une pompe péristaltique permettant de changer la composition du milieu (Figure 1).

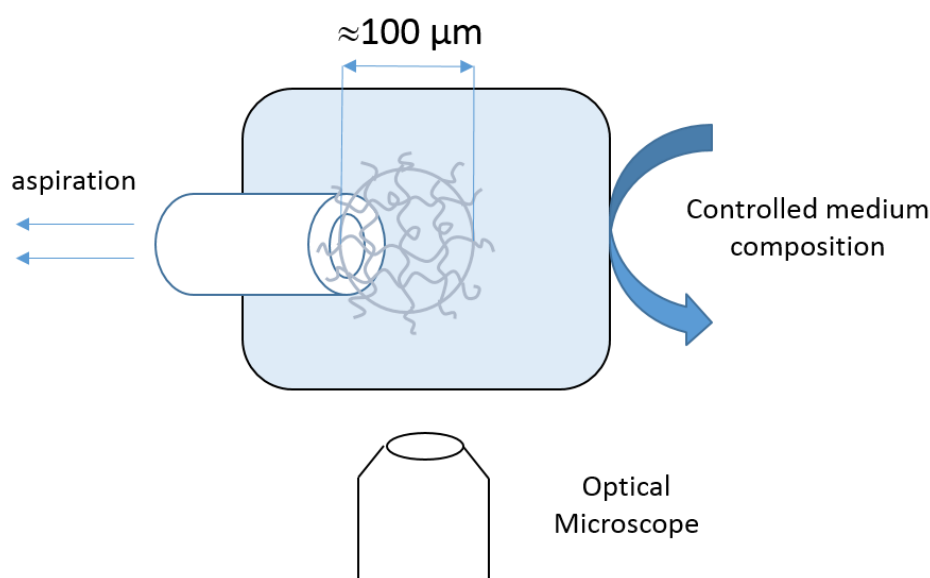


Figure 1: Représentation schématique d'un microgel immobilisé à l'aide d'un microcapillaire et placé dans une chambre d'observation dont le milieu est contrôlé par une pompe péristaltique. Le montage est situé sous un microscope optique.

Les microcapillaires ont une section comprise entre 10 et 20 μm , et sont mis en contact à la surface du microgel, une aspiration permet de maintenir le microgel immobilisé. Le protocole de préparation des microcapillaires est décrit en partie expérimentale. L'aspiration est induite grâce à un microinjecteur connecté au microcapillaire. Une fois le microgel au contact, les chaînes de microgels sont aspirées superficiellement au niveau de la section du microcapillaire, assurant le maintien des gels dans le champ du microscope. L'impact de la déformation sur les propriétés du gel est négligeable en raison de la grande différence de taille entre la section du capillaire et les dimensions des microgels, le volume aspiré est de l'ordre de quelques picolitres, soit plus de 1000 fois inférieur au volume du gel. Le procédé de fabrication des microcapillaires et la description de la chambre d'observation reliée à la pompe péristaltique sont présentés en partie expérimentale.

Les microgels sont ainsi maintenus en immersion dans la solution, ils ne sont pas déposés sur la lame de fond de la chambre d'observation, et ne sont ainsi pas déformés. De plus les microgels sont au contact avec le milieu sur presque toute leur surface. Les microgels peuvent être chargés en protéines, et le phénomène peut être suivi en observant les variations de gonflement du microgel induit par microscopie en transmission. Le taux de gonflement/contraction correspond à V/V_0 où V est le volume à un instant t dans un certain milieu, et V_0 le volume à l'instant t_0 dans les conditions de références. Le temps de référence t_0 , correspond à l'entrée du nouveau milieu dans la chambre d'observation. Le microgel est placé au centre de la chambre d'observation, un délai d'environ 15 secondes existe avant que le nouveau milieu, l'atteigne pour un débit de pompe de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, débit utilisé pour substituer le milieu. Il est également possible de suivre les protéines chargées si elles sont marquées par des fluorophores. Pour cela la microscopie confocale est un outil de choix utilisé pour de nombreuses applications et disciplines [1]. La microscopie confocale (CLSM) peut notamment être utilisée pour évaluer la distribution d'espèces fluorescentes. Le principe de ce type de microscopie est décrit en partie expérimentale. Dans le cadre de cette étude, la CLSM est utilisée pour déterminer la distribution de protéines ou peptides fluorescents dans les matrices de gel. L'avantage principal de cette technique est que les images du plan focal sur une épaisseur définie, peuvent être enregistrées avec une résolution de l'ordre du micromètre. Il est ainsi possible de réaliser des reconstructions tridimensionnelles d'objets, ou de savoir à quel niveau de profondeur se trouvent les protéines à encapsuler. De plus, des lasers de différentes longueurs d'ondes peuvent être employés en même temps permettant le suivi simultané de différentes espèces.

1.2 Comportement des gels en présence de macromolécules modèles.

Dans un premier temps, nous avons voulu caractériser le comportement des microgels placés en présence de macromolécules modèles. Nous commençons par l'étude de la porosité des gels. Afin de scanner la porosité des gels, des macromolécules modèles de différentes tailles sont introduites dans le milieu. Nous avons choisi une espèce neutre, et notre choix s'est porté sur le dextran. Le dextran est un polymère ramifié de dextrose,

c'est un polysaccharide, neutre dans du tampon PBS (Figure 2). Ce polysaccharide est couramment utilisé pour scanner la porosité de systèmes tridimensionnels tels que des gels [2].

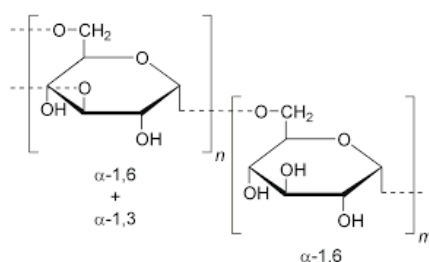


Figure 2: Représentation schématique des chaînes de dextran.

1.2.1 Estimation de la taille de pores des gels

1.2.1.1 Méthode pour l'estimation de la porosité des gels par exclusion stérique

Le dextran peut être de longueur de chaîne variable, et en régime dilué se présente sous forme de pelote. Le rayon hydrodynamique de cette pelote, dépend de la longueur de chaîne du dextran donc de sa masse moléculaire. Nous avons utilisé 4 dextrans de masses moléculaires différentes, 4, 10, 40 et 70 kg/mol. Ils sont tous modifiés par un fluorophore, la fluorescéine (FITC). Une estimation du rayon hydrodynamique de chaque dextran est présentée dans le Tableau 1 [3]. Les dextrans utilisés sont disponibles commercialement.

Tableau 1 : Rayon hydrodynamique de différents dextrans fluorescents en fonction de la masse moléculaire [3].

Masse molaire du Dextran- FITC	Estimation du rayon hydrodynamique (nm)
4 kg/mol	1.4 nm
10 kg/mol	2.3 nm
40 kg/mol	4.5 nm
70 kg/mol	6.5 nm

Les microgels sont mis à incuber pendant une nuit dans des solutions de dextran-FITC de différentes tailles à 0,1 wt% dans du tampon PBS, de manière à laisser le temps aux molécules de dextran de diffuser au cœur des microgels. Les gels sont ensuite étudiés par microscopie confocale assistée par micromanipulateur. Il est possible d'obtenir une estimation de la porosité des gels par exclusion stérique (Figure 3) [4],[5]. En effet, si le dextran est suffisamment petit pour pénétrer dans la matrice de gel, la microscopie confocale ne permettra pas de distinguer le microgel du milieu fluorescent (Figure 3 a). A l'inverse, si le dextran est trop grand pour pénétrer dans la matrice de gel, le microgel apparaîtra non fluorescent dans un milieu qui l'est, il sera négativement contrasté (Figure 3 c).

Différents microgels sont étudiés, lors du chapitre précédent, nous avons présenté une librairie de microgels préparés à partir de précurseurs HA-MA réticulables. Afin de faire varier le degré de réticulation des gels, différents leviers sont utilisés. Tout d'abord, le degré de méthacrylation introduit sur les chaînes de HA peut

être modulé. Plus il y a de méthacrylates sur la chaîne, plus le gel peut être réticulé par photopolymérisation, les microgels sont notés HA-MA_x où x représente le taux de méthacrylates. Le deuxième levier utilisé est l'ajout d'un second réticulant le N,N'-méthylènebisacrylamide (BIS), les microgels sont notés HA-MA_x, BIS_y où y est le pourcentage massique de BIS introduit par rapport au HA. Il est introduit dans différentes proportions : 10, 20, 100 %. Plusieurs de ces gels ont été mis à incuber une nuit en présence de solutions de dextran-FITC de différentes masses moléculaires afin d'estimer la porosité de chaque composition et de comprendre comment elle est affectée par le degré de réticulation des gels.

1.2.1.2 *Influence de la taille du dextran et de la réticulation des microgels*

Les images de microscopie confocale représentant les microgels immergés dans les solutions de dextran sont présentés en Figure 3.

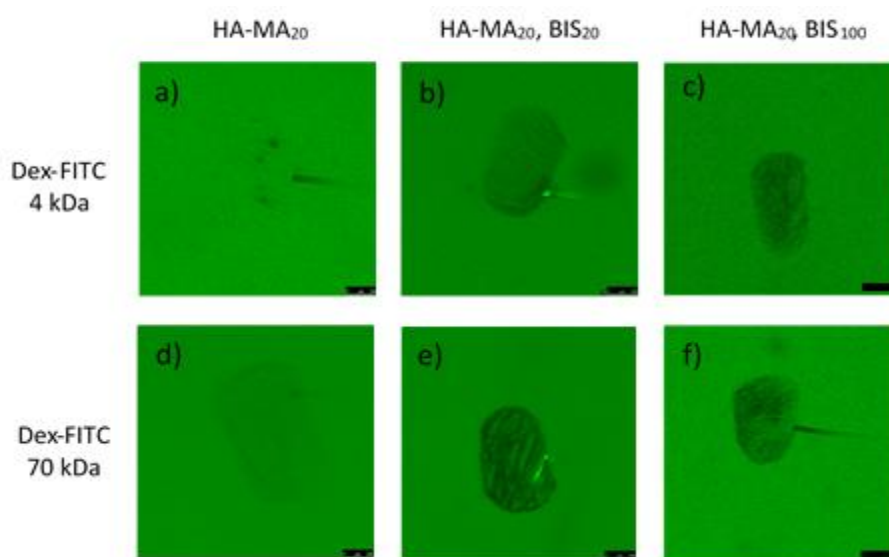


Figure 3 : Pénétration de dextrans fluorescents dans les matrices de gel. Images CLSM. a à d représentent les gels immergés dans des solutions de dextran 4 kg/mol à 0,1 wt%, d à f les gels immergés dans des solutions de dextran 70 kg/mol à 0,1 wt%. Les gels a et d sont des gels de HA-MA₂₀, les gels b et e sont des gels de HA-MA₂₀, BIS₂₀ et les gels c et f sont des gels de HA-MA₂₀, BIS₁₀₀. Echelle : 100 μ m.

Les microgels de HA-MA₂₀ sont difficilement discernables dans les solutions de dextran fluorescent 4 et 70 kg/mol. Cela signifie que ces dextrans peuvent pénétrer dans la matrice. La porosité de ces gels est donc supérieure à 13 nm (Figure 3 a et d). A longueur de dextran constante, pour le gel HA-MA₂₀, BIS₂₀, le contraste négatif est beaucoup plus marqué. Le dextran-FITC 4 kg/mol entre partiellement dans le gel (Figure 3 b), alors que le dextran FITC 70 kg/mol ne rentre que sur certaines zones (Figure 3 e). Ce point semble indiquer que la porosité n'est pas homogène. Les gels contenant 100 % de BIS par rapport au HA sont encore plus contrastés pour le dextran de petite taille (Figure 3 c). Les zones sombres possèdent donc une taille de pores inférieure à 3 nm.

Grâce à ces résultats, nous avons pu vérifier que la taille de pores diminue lorsque le taux de réticulation augmente. Cette observation est corroborée par l'évolution de la taille des gels avec le taux de réticulation. La série d'images prise à même échelle, montre que les gels sont d'autant moins gonflés qu'ils sont réticulés,

preuve que le paramètre de maille du gel diminue. L'estimation quantitative du paramètre de maille est discutée dans le chapitre 3 paragraphe 3.2.1.

1.2.2 Comportement des microgels chargés en dextran

1.2.2.1 Comportement des gels chargés en dextran lors du rinçage des gels par du tampon PBS

L'incubation de microgels dans les solutions de dextrans permet aussi de mettre en avant la présence d'interactions entre les protéines encapsulées et les matrices de microgels. En effet, en cas d'interaction attractive, la protéine fluorescente va s'accumuler à l'intérieur des gels où la fluorescence sera alors plus marquée en comparaison avec le milieu environnant [4],[6]. Il est ainsi possible de déterminer si le dextran encapsulé est absorbé dans la structure poreuse du gel, ou s'il est adsorbé sur les chaînes de HA-MA composant la matrice du gel.

Lorsque le dextran pénètre dans les gels de HA-MA avec ou sans BIS, les images de microscopie confocale ne présentent pas de contraste positif. Cela signifie que les dextrans sont distribués de façon équivalente entre l'intérieur et l'extérieur du gel. A priori il n'y a donc pas d'interaction attractive entre la matrice et la protéine modèle. Ce résultat est confirmé par la réversibilité du processus. Lors du rinçage des gels par du tampon PBS, les gels sont facilement lavés. Le dextran entre et sort dans la matrice de gel de façon réversible.

1.2.2.2 Aspect cinétique du rinçage des microgels chargés en dextran

Lors de la substitution du milieu contenant les dextrans fluorescents par du tampon PBS, une zone proche de la surface du microgel est identifiée où la fluorescence persiste plus longtemps que dans le milieu environnant. Cette couche en surface du gel correspond à une couche dite stagnante, représentée Figure 4. La fluorescence persistante (Figure 4 b), finit par disparaître pour une cinétique plus longue (Figure 4 c). Son épaisseur est contrôlée par le débit de la pompe péristaltique qui permet l'échange du milieu [7]. Lors du rinçage, le débit est fixé à 4 mL/min. Le volume de la chambre d'observation étant de 2 mL, le milieu est échangé en 30 secondes, alors que la fluorescence des dextrans disparaît en 3 minutes.

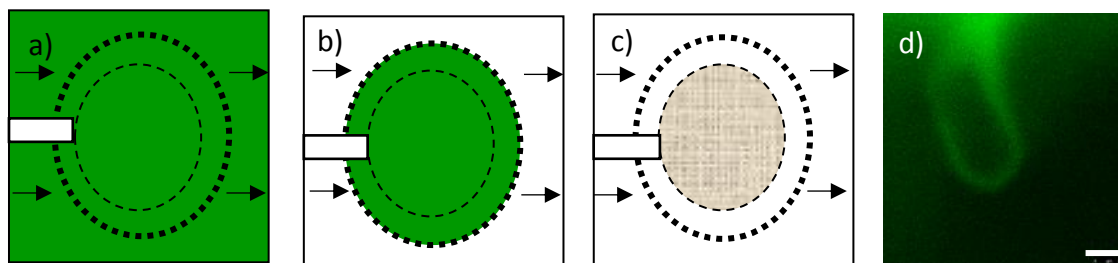


Figure 4 : Représentation schématique d'un microgel entouré de la couche stagnante a) immergé dans un milieu fluorescent, b) lors de la substitution du milieu fluorescent par du tampon non fluorescent en utilisant une pompe péristaltique c) après la complète substitution du milieu d) image représentant le halo de fluorescence persistante lors du rinçage d'un microgel de HA-MA₂₀, BIS₂₀ chargé en insuline à 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 130 secondes de rinçage. Echelle 100 μm .

Le rinçage du microgel, induit le mouvement de ce dernier pendant tout le processus, rendant les images obtenues floues. Le dispositif expérimental empêche la réalisation d'étude cinétique précise du rinçage du dextran par suivi de fluorescence.

1.2.3 Comportement des gels chargés en PLL

1.2.3.1 *Protocole d'étude*

Les interactions des macromolécules modèles telles que des homopeptides, des protéines ou des polymères sont fortement influencées par le caractère ionique de la macromolécule. Afin de favoriser une interaction avec la matrice de gel, notre choix s'est porté sur la poly-L-lysine, déjà utilisée comme modèle d'homopolymère cationique, capable d'interagir fortement avec des microgels anioniques [8]. La poly-L-lysine (PLL) est un peptide cationique, tout comme les peptides à base d'arginine ou d'histidine, elle possède de bonnes propriétés antimicrobiennes, et de pénétration dans les cellules [8],[9],[10]. Elle est également couramment utilisée pour promouvoir l'adhésion des cellules sur les surfaces solides en raison de sa forte densité de charges positives [11]. Sa structure est présentée Figure 5.

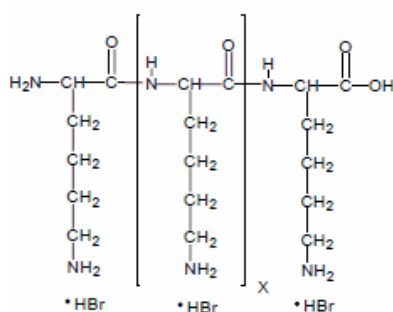


Figure 5: Structure chimique de la poly-L-lysine (PLL).

On utilisera des PLL de différentes masses molaires (15 et 150 kg/mol). De plus, les PLL sont marquées à l'aide d'un fluorophore, l'Alexa 488, greffé sur la fonction N terminale. Les Alexa sont des fluorophores couramment usités qui ont la particularité d'être très stables sur des larges gammes de pH et de salinité. Nous avons choisi l'Alexa 488 fonctionnalisé par des fonctions esters succinimidyles qui réagissent avec les fonctions amines des PLL. Le protocole de fonctionnalisation est décrit en partie expérimentale. Les marqueurs fluorescents sont des molécules assez larges, avec des masses moléculaires qui ont dans la plupart des cas un caractère ionique. De plus, marquer le peptide sur ses fonctions amines consiste souvent à attacher le fluorophore sur la chaîne d'acide aminé cationique, et change donc les propriétés de cette dernière, en particulier si elle est courte. Si la chaîne est plus longue, la présence de fluorophore a moins d'impact sur ses propriétés.

Pour l'étude des interactions des microgels en présence de PLL, ils sont immergés dans une solution de PLL à 0,01 wt% dans du PBS pH 7,4. L'étude est réalisée à 25°C. Si l'on se contente de mélanger les microgels avec la solution nous constatons qu'ils sont agrégés (Figure 6), signe que la PLL interagit avec les microgels et engendre des interactions attractives. Afin de limiter l'influence de l'agrégation, la suite des expériences sera réalisée sur un microgel unique immobilisé par la technique des micropipettes.

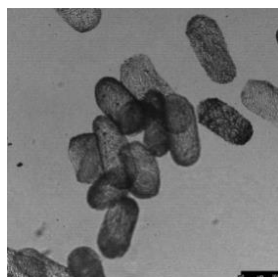


Figure 6 : Image illustrant l'agrégation de microgels de HA-MA mis à incuber 24h en présence de PLL. Echelle 200 μm .

De plus, on constate que les microgels sont plus contrastés que dans le tampon seul, en raison de leur contraction. Cette augmentation du contraste du microgel est due à l'augmentation de la densité de chaînes, associée à une contraction volumique.

1.2.3.2 Chargement de microgels déformables de HA-MA par de la PLL 15 kg/mol

Dans un premier temps, un microgel de HA-MA₁₅, est immergé dans une solution de PLL 15 kg/mol. On observe, une contraction du microgel (Figure 7). A l'équilibre, le microgel atteint 65 à 90 % de son volume initial, ce qui correspond à une diminution de son diamètre de 40 à 45 %. La même expérience a été menée, en mettant le microgel en présence de PLL non marquée par le fluorophore. Le même comportement est observé, le microgel se contracte de -80 % en termes de volume à l'équilibre. La présence d'un marqueur fluorescent n'a donc pas d'effet sur les interactions entre la PLL et les microgels de HA. Ainsi la suite de cette étude est menée pour les PLL 15 et 150 kg/mol marquées par le fluorophore Alexa 488. Les microgels sont observés en transmission et en fluorescence, les images sont parfaitement superposables.

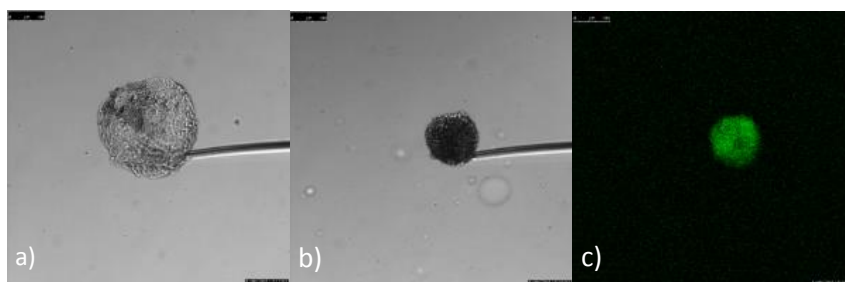


Figure 7 : Contraction des microgels de HA-MA₁₅, observée lors de la mise en présence de PLL 15 kg/mol à 0,01 wt%. Image en transmission a) à $t=0$ avant l'ajout de PLL, b) à l'équilibre après ajout de PLL, et en microscopie de fluorescence CLSM c) à l'équilibre après l'ajout de PLL.

Les interactions électrostatiques sont le moteur principal de l'association entre le réseau d'hydrogel et la PLL. Elles sont associées à un gain d'entropie dû au relargage de nombreux contre-ions dans le milieu. La PLL pénètre dans le réseau, tant que sa taille est plus petite que la maille du réseau. Les interactions entre la PLL et la matrice modifient les interactions polymère-solvant et donc l'état de gonflement du réseau. Ainsi, la contraction des gels peut s'expliquer par une combinaison entre une contraction élastique due à la

neutralisation des charges du réseau et à l'attraction provenant des systèmes poly-ioniques pouvant créer de la réticulation ionique entre les chaînes de la matrice.

L'observation des gels en présence de PLL par CLSM, est un bon indicateur de la forte interaction électrostatique mis en jeu dans ces systèmes. En effet, dans les conditions d'acquisition des images, les solutions de PLL à 0,01 wt% ne sont pas fluorescentes mais le deviennent dès que la PLL se concentre à l'intérieur du gel. Ce contraste positif témoigne des interactions fortes de la PLL avec les chaînes de HA-MA négativement chargées (Figure 7 c).

1.2.3.3 Comportement lors du rinçage des gels chargés en PLL 15 kg/mol par du tampon PBS

De plus, afin de confirmer ce résultat, le milieu est substitué par du tampon PBS. La fluorescence est maintenue sans perte d'intensité après avoir substitué le milieu grâce à la pompe péristaltique et après avoir rincé 10 minutes. La PLL n'est pas désorbée par une étape de rinçage, L'interaction attractive forte entre les microgels et la PLL est grande devant kT et n'a pas un caractère réversible. Les résultats sont les mêmes pour les gels formulés avec ou sans BIS.

1.2.3.4 Influence de la taille du peptide

Les interactions électrostatiques sont fortes et induisent une grande contraction des gels. Cependant, il est important de pouvoir identifier là où le peptide se trouve, pour savoir s'il est en périphérie ou sur la totalité du volume du gel. Pour étudier l'influence de la taille du peptide, les microgels sont mis à incuber dans des solutions de PLL 15 kg/mol et 150 kg/mol, les résultats sont présentés Figure 8.

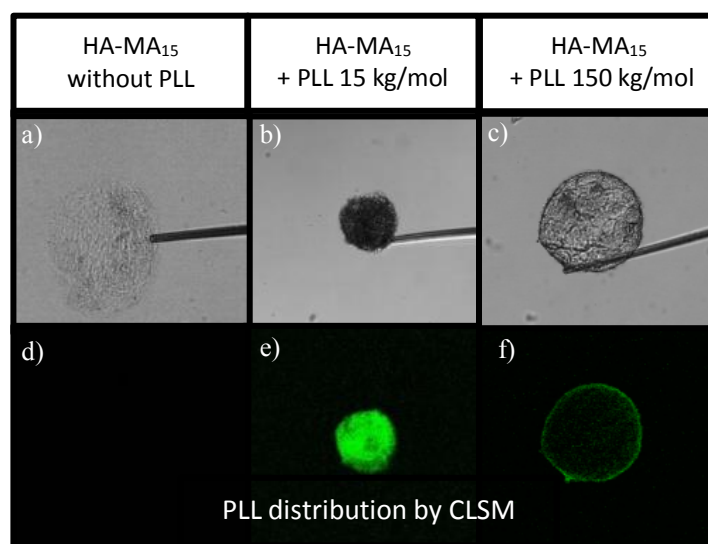


Figure 8 : Influence de la taille du peptide sur sa distribution à l'équilibre. Image de microscopie en transmission a à c) et en CLSM d à f) de microgels de HA-MA₁₅ a et d) en absence de PLL b et e) l'équilibre après ajout de PLL 15 kg/mol c et f) à l'équilibre après ajout de PLL 150 kg/mol.

Pour les gels de HA-MA₁₅, la distribution est homogène sur tout le volume pour le peptide de petite taille de 15 kg/mol alors que le peptide de plus grande taille (150 kg/mol) est confiné sur la partie externe du gel formant une sorte de coquille en périphérie. La PLL 150 kg/mol est trop grande pour pénétrer dans les pores

de la matrice de gel (Figure 8 c). Elle reste donc confinée en périphérie par principe d'exclusion. Il est également possible de considérer que la PLL pénètre une partie du réseau par diffusion en début de processus, mais l'interaction polymère matrice modifie la porosité du gel et peut limiter, par exclusion stérique, la pénétration ultérieure de la PLL plus au cœur du microgel. Une valeur limite de porosité inférieure au diamètre de la PLL en solution est atteinte. Dans le cas des PLL de plus petite taille, la pénétration dans la matrice pour une porosité donnée est facilitée. De même, les plus petites PLL peuvent subir des réarrangements internes, qui permettent une relaxation des tensions exercées sur la membrane externe [12]. Notamment, le repliement des chaînes en périphérie s'accompagne d'un déséquilibre osmotique entre l'intérieur et l'extérieur du gel [13],[14]. Des comportements similaires ont été observés lors du chargement de microgels de polyacide acrylique mis en présence de PLL [15]. Le degré de contraction est représentatif de la force de l'interaction, pour un degré de réticulation et une force ionique donnés.

1.2.3.5 Etude de la cinétique de contraction des microgels en présence de PLL

Nous nous sommes également intéressés à la cinétique de contraction. La variation du diamètre du gel au cours du temps est reportée en Figure 9. En présence de PLL 15 kg/mol, le gel atteint son nouvel état d'équilibre en 50 min. Cette cinétique s'avère reproductible.

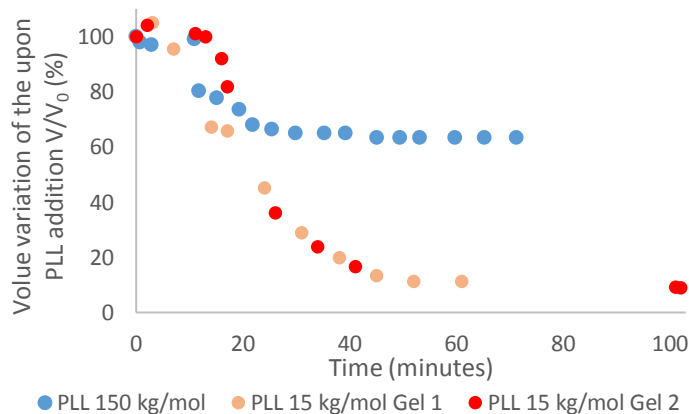


Figure 9 Cinétique de contraction de deux microgels de HA-MA₁₅ en présence de poly-L-lysine 15 kg/mol, 0,01 wt% (orange et rouge) et d'un gel de HA-MA₁₅ en présence de poly-L-lysine 150 kg/mol, 0,01 wt% (bleu). Variation du diamètre des microgels en fonction du temps. V₀ correspond au volume du gel avant ajout de PLL.

Il est intéressant de noter que dans les deux cas où un microgel est mis en présence de PLL 15 kg/mol, le volume à l'équilibre est atteint après environ 1h d'incubation et correspond à 10 % du volume initial du gel. En comparaison, un gel mis en présence de PLL 150 kg/mol atteint un état d'équilibre après 30 minutes donc plus rapidement. Cependant, sa contraction est moins importante le gel atteint 37 % de son volume initial

D'un point de vue cinétique, les interactions ont lieu d'abord en périphérie de gel, il se forme une couche où la PLL et le gel sont complexés, lorsque la PLL est en excès et assez petite pour passer cette couche dense, elle peut pénétrer sur la totalité du volume du gel et la couche dense s'épaissit jusqu'à en atteindre le cœur (Figure 10) [14]. Dans le cas de la PLL 150 kg/mol, la PLL reste confinée en surface et crée une couche de

complexe. La présence de cette couche peut également exercer une pression sur l'intérieur du gel encore gonflé et contribuer à sa contraction.

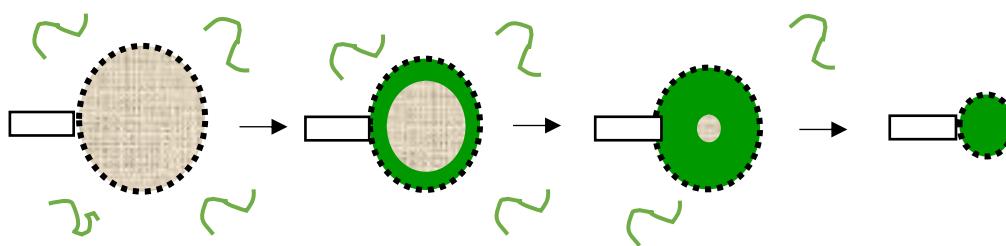


Figure 10 : Représentation schématique illustrant la formation d'une couche de complexe en surface des gels suite à l'introduction de polyions de charge opposée à la charge du gel et propagation de la couche de complexe entraînant la contraction du gel.

1.3 Lien entre le paramètre de maille et l'encapsulation des protéines.

Dans cette partie, nous allons confronter les paramètres de maille des différents microgels étudiés, aux propriétés d'encapsulation, en lien avec la porosité des gels. Dans le chapitre précédent, nous avons estimé les paramètres de mailles des microgels préparés à partir de HA-MA sans BIS. Pour ce faire, le gonflement des gels mesuré par microscopie confocale est utilisé. Nous avons noté une différence de paramètre de maille en fonction de la nature de l'huile utilisée, pour une composition de phase aqueuse et une quantité de tensioactif identiques. Les microgels de HA-MA₂₀ préparés en utilisant l'huile de soja ont donc une porosité plus large que ceux préparés à partir d'octane, de 26 nm et 20 nm respectivement. Cette différence s'explique par un taux de conversion en méthacrylates qui diffère suivant l'huile utilisée (Chapitre 3 paragraphe 3.2.3).

Les résultats obtenus sont en adéquation avec les observations faites lors de l'estimation de la taille de pores par exclusion stérique des dextrans fluorescents, où la taille de pores des gels préparés à partir de HA-MA₂₀ en présence d'huile de soja est estimée supérieure à 13 nm.

La différence de porosité en fonction de l'huile utilisée pour la synthèse, est mise en évidence expérimentalement lors du chargement de PLL 150 kg/mol (Figure 11). Les gels préparés en présence d'huile de soja, se contractent jusqu'à atteindre 20 % de leur volume initial et la PLL 150 kg/mol pénètre jusqu'au cœur (Figure 11 d). Ce résultat est comparable à celui obtenu lors du chargement de PLL 15 kg/mol, pour un gel de même composition préparé dans des conditions identiques, où ce dernier se contracte également jusqu'à atteindre à l'équilibre, après que la petite PLL est pénétrée au cœur du microgel, 20% de son volume initial (Figure 11 b). Précédemment, le chargement en PLL 150 kg/mol dans des gels préparés en présence d'octane a montré que la PLL restait confinée en périphérie car elle ne parvenait pas à pénétrer dans les gels (Figure 8 paragraphe 1.2.3.4). Dans ce second cas, le seuil de coupure des gels est donc inférieur à la taille de la PLL 150 kg/mol.

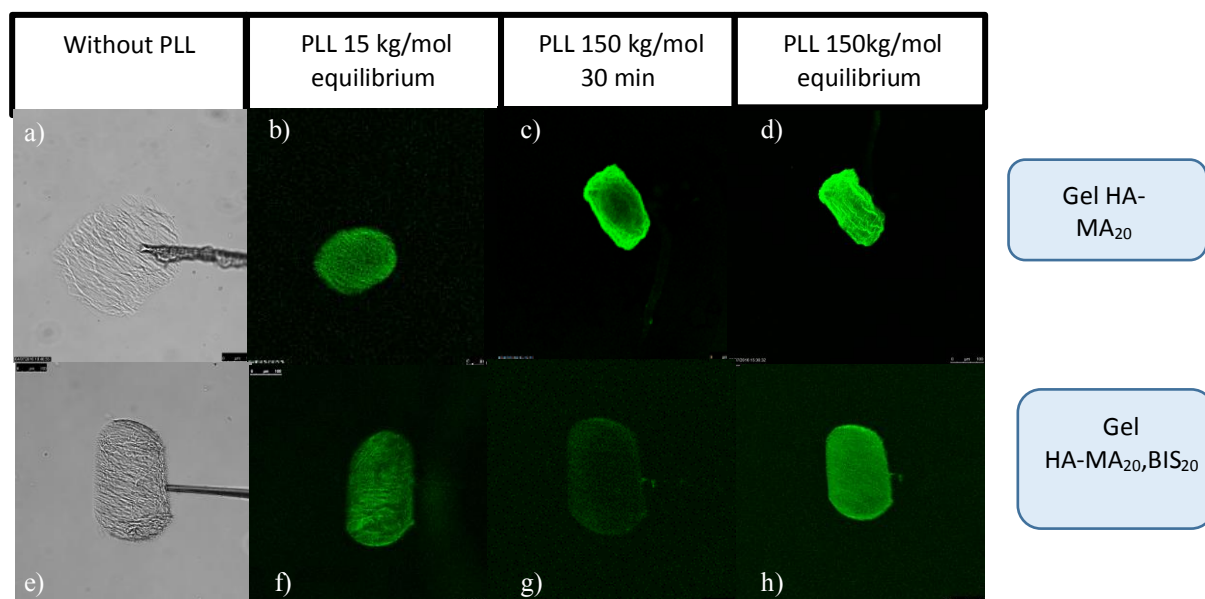


Figure 11 : Distribution des PLL 15 à l'équilibre (b et f), et 150 kg/mol en cours de chargement (c et g) et à l'équilibre (d et h) dans des gels de HA-MA₂₀ (a à d) et HA-MA₂₀, BIS₂₀ préparés dans l'huile de soja (e à h). Echelle 100 μ m.

La taille de pores du réseau peut être modifiée en jouant sur le taux de réticulation du réseau. Ce paramètre régit également la rigidité des microgels et leur capacité à répondre par des variations de volume à des modifications de leur environnement [16]. Afin de modifier le taux de réticulation, le taux de méthacrylates introduit sur la chaîne de HA peut-être modifié, et/ou un co-réticulant, le N,N' méthylène-bis-acrylamide (BIS) peut être introduit dans différentes proportions lors de la polymérisation des microgels de HA-MA. Les PLL de tailles 15 et 150 kg/mol sont introduites en présence de microgels de degré de réticulations différents préparés à partir de précurseurs HA-MA₂₀ ou HA-MA₂₀, BIS₂₀ (Figure 11).

A l'équilibre, la distribution des PLL en fonction de la taille est similaire dans les deux cas, les PLL pénètrent jusqu'au cœur des microgels. Cependant, le gel ayant la plus grande densité de réticulation ayant également du BIS dans sa formulation ne subit presque pas de variation de volume par addition de PLL contrairement au gel ne contenant pas de BIS préparé dans les mêmes conditions en raison de sa plus grande rigidité (Tableau 2).

Tableau 2 : Variations de volume des gels de HA-MA avec et sans BIS suite à l'ajout de PLL 15 ou 150 kg/mol. V₀ correspond au volume du gel avant l'ajout de PLL, c'est-à-dire à l'équilibre dans du tampon PBS.

	PLL 15 kg/mol (V/V ₀)	PLL 150 kg/mol (V/V ₀)
HA-MA ₂₀	-83%	-83%
HA-MA ₂₀ ,BIS ₂₀	-47%	-27%

Il est intéressant de noter que l'image prise par CLSM montre que la PLL pénètre tout de même sur tout le volume du gel. Ce dernier est plus rigide, en raison de la présence d'un second réticulant, il n'est pas contracté suite à l'addition de BIS. La capacité de pénétration du gel jusqu'au cœur des microgels, peut-être due à une structure non homogène. En effet, il a été reporté que des pores pouvaient être créés lors du processus de

fabrication d'hydrogel. La présence de ces pores peut être due à des phénomènes de séparation de phase [17],[18].

1.4 Cas des gels macroporeux

Les gels présentés ci-dessus ont une porosité corrélée aux choix de formulation, notamment les paramètres influant sur le degré de réticulation, comme le degré de méthacrylation du précurseur HA-MA ou l'introduction d'un second réticulant. Nous avons mis au point des microgels ayant deux tailles de pores différentes, des micropores similaires à ceux des microgels régis par les paramètres de formulation et des macropores, introduits dans la matrice de gel en utilisant l'insertion de gouttes d'huile. La synthèse de ces gels macroporeux est présentée dans le chapitre 3. Ils sont préparés en présence d'huile de soja.

1.4.1 Mise en évidence de la double porosité par imprégnation de dextrans fluorescents.

Les gels macroporeux ont la même composition moléculaire que les gels de HA-MA, ils contiennent également du BIS, seule leur structure change. Les gels macroporeux sont imprégnés de dextrans de tailles différentes afin d'étudier leur structure (Figure 12).

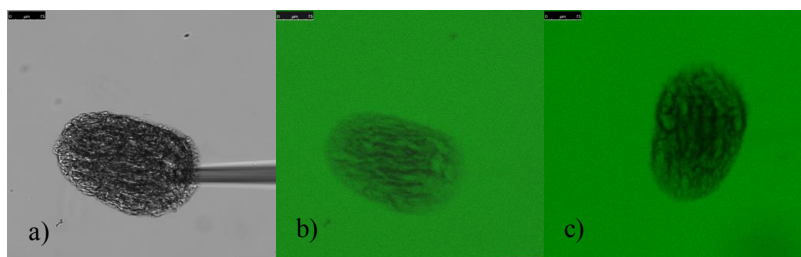


Figure 12 : Image de microscopie à transmission a) et confocale b) et c) de microgels macroporeux mis à incuber dans des solutions de dextrans fluorescents de 4 kg/mol b) et de 70 kg/mol c).

Il apparaît clairement que pour les deux tailles de dextrans présentées (4 et 70 kg/mol), il existe des zones dans le gel où le dextran pénètre et qui sont mises en évidence comme la présence de poches remplies de dextran fluorescent. Dans le reste de la structure les dextrans pénètrent peu ou mal, un contraste négatif est alors visible. Il est intéressant de noter que ce contraste est bien plus prononcé pour le dextran de plus grande taille (Figure 12 c). La présence de macropores, entraîne un niveau de porosité différent. La présence de ces poches dans la structure de gel peut permettre d'améliorer sensiblement le taux d'encapsulation de protéines qui n'interagissent pas avec la matrice de gel. Cependant, il faudrait confiner la protéine dans le gel afin de ne pas la relarguer dans le milieu par simple diffusion.

1.4.2 Comportement des gels macroporeux en présence de PLL

L'encapsulation de poly-L-lysine dans les gels macroporeux est également étudiée. Quelle que soit la taille de la PLL, un contraste positif est observé, confirmant la présence d'interactions électrostatiques fortes entre la matrice de gel négativement chargée et la PLL positivement chargée. Cependant, une différence de

distribution est observée en fonction de la taille du peptide. Pour la petite PLL, à l'équilibre, la distribution est homogène sur tout le volume du microgel, alors que pour la PLL de plus grande taille, elle est limitée en périphérie du gel. (Figure 13). Le comportement est similaire à celui observé pour les gels de HA-MA préparés dans l'octane, qui sont plus réticulés (Figure 8 paragraphe 1.2.3.4). Pour atteindre le seuil de coupure des gels à partir duquel la PLL 150 kg/mol ne pénètre pas jusqu'au cœur du microgel, la réticulation apportée par le co-réticulant doit être plus importante dans le cas des gels préparés en présence d'huile de soja. Par ailleurs, la présence de macropores ne favorise pas la pénétration de la PLL 150 kg/mol en profondeur dans la matrice.

Les contractions volumiques des gels observés sont plus faibles que précédemment en raison de la forte densité de réticulation et sont respectivement de -30 et -35 % par rapport au volume initial. Dans les deux cas, l'exaltation de la fluorescence due à l'encapsulation de la PLL a lieu au niveau des chaînes de polymères et non des macropores. En effet, la composition de la matrice de gel semble plus importante que le critère de porosité dans le cas d'une interaction attractive entre la matrice et la protéine.

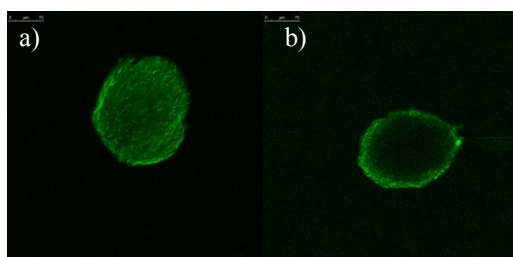


Figure 13: Distribution des PLL 115 et 150 kg/mol à l'équilibre dans des gels de HA-MA macroporeux (préparés dans l'huile de soja). Image de microscopie confocale de microgels macroporeux mis en présence de a) PLL 15 kg/mol et b) PLL 150 kg/mol.

1.5 Commentaires sur la rigidité des gels en fonction de leur composition

Lors de l'imprégnation des différents gels en PLL 15 et 150 kg/mol, les variations de volume du gel dues au chargement ont été mesurées. Les résultats sont résumés dans le Tableau 3 pour les différentes compositions.

Tableau 3 : Résumé de la contraction de gels V/V_0 du au chargement en PLL 15 et 150 kg/mol pour des gels de différents degrés de réticulation dans du tampon PBS. Le volume de référence V_0 correspond au volume du gel avant ajout de PLL.

	PLL 15kg/mol V/V_0	PLL 150kg/mol V/V_0
HA-MA ₂₀ octane	-85 %	-45 %
HA-MA ₂₀ Soybean oil	-83 %	-83 %
HA-MA ₂₀ , BIS ₂₀ Soybean oil	-47 %	-27 %
HA-MA ₂₀ , BIS ₆₇ Soybean oil (macroporous)	-30 %	-35 %

Pour les deux gels préparés à partir de HA-MA₂₀, mais avec des huiles différentes, seules les valeurs de contraction lors du chargement en PLL 150 kg/mol sont différentes, en raison de la porosité plus faible des gels préparés dans l'octane.

Pour les gels préparés dans l'huile de soja, une différence est observée en fonction de la concentration en BIS introduite dans la composition. Plus elle augmente, plus les gels sont rigides et moins ils se contractent en raison d'une plus forte densité de réticulation.

1.6 Comportement des gels en présence d'insuline

Les microgels présentés ci-dessus, ont été également mis en présence d'insuline. L'insuline a un rayon hydrodynamique de 1,34 nm lorsqu'elle est sous forme monomérique, cette taille est relativement similaire à celle du dextran de 4 kg/mol. L'insuline mise en présence de gel de HA-MA₂₀ pénètre jusqu'au cœur des microgels alors que pour des gels plus réticulés et plus rigides, qui contiennent 20% de BIS par rapport au HA, elle ne pénètre que partiellement (Figure 14). L'insuline est également chargée dans des gels macroporeux, elle pénètre dans les poches poreuse des gels.

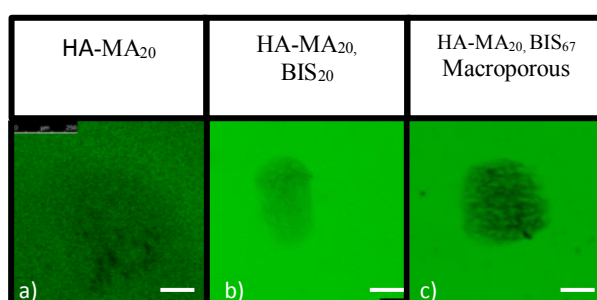


Figure 14: Microgels de différentes composition chargés en insuline-FITC, pour des microgels de HA-MA₂₀, HA-MA₂₀ BIS₂₀ et pour des gels macroporeux de HA-MA₂₀ BIS₆₇ 67%. Echelle 100 μ m.

Ces résultats sont donc similaires à ceux obtenus pour le dextran-FITC 4 kg/mol. On peut donc conclure que l'incubation des gels dans des solutions de dextrans fluorescents est un bon outil pour estimer la porosité des gels et leur capacité à encapsuler l'insuline.

De la même manière, les microgels chargés en insuline sont rincés par du tampon PBS, entraînant une perte complète de la fluorescence de l'insuline qui n'interagit pas de manière spécifique avec les microgels de HA-MA avec ou sans BIS. L'insuline est négativement chargée dans le PBS, il n'y a donc pas d'interaction électrostatique et aucun autre type d'interaction n'est observé.

1.7 Dégradabilité des gels chargés en macromolécules

La dégradabilité des gels de HA-MA₂₀ est étudiée en présence des macromolécules imprégnées dans le réseau. Pour ce faire, les gels sont mis à incuber en présence de la macromolécule. Une fois que cette dernière a pénétré dans le gel jusqu'à atteindre un état d'équilibre, l'enzyme hyaluronidase est ajoutée pour obtenir

une concentration finale dans le milieu de 500 U/mL, après avoir chauffé le milieu à 37°C pour favoriser la cinétique de dégradation. On notera que les gels de HA-MA non chargés sont dégradables avec ou sans BIS comme discuté dans le chapitre 3.

1.7.1 Dégradabilité des gels chargés en dextran

La dégradabilité enzymatique des microgels est étudiée en présence de dextran. Le dextran 4 kg/mol est sélectionné car sa taille permet une pénétration sur tout le volume du gel. Le gel est totalement dégradé en 2,5 minutes. Les temps mis pour dégrader la totalité du gel de HA-MA₂₀ sont comparables pour les gels dans du tampon PBS ou pour des gels dans du tampon PBS après pénétration de dextran fluorescent au cœur des matrices. La présence de dextran dans la matrice n'interfère pas avec les mécanismes de dégradation des microgels.

1.7.2 Dégradabilité des gels chargés en PLL

Deux microgels de HA-MA₂₀ sont étudiés, l'un est chargé en PLL 15 kg/mol et l'autre en PLL 150 kg/mol. Les gels ne sont pas dégradables après plus d'une heure d'incubation.

Des cas ont été reportés où la Hase utilisée peut former des complexes électrostatiques avec le HA dans certaines conditions de salinités et de pH. Dans ce cas-là, si le ratio Hase/Ha est faible, l'activité catalytique de la réaction enzymatique est presque nulle et la dégradation n'a lieu qu'en présence de large excès de Hase. En présence d'une protéine ou macromolécule qui peut se complexer avec le HA, l'activité enzymatique dépend de la capacité à former ces complexes, qui, si elle est plus importante pour la protéine va entraîner la libération de la Hase, et donc la réactivation de la dégradation. Cependant, au fur et à mesure que la protéine se complexe elle empêche l'accès à la chaîne de HA et inhibe à nouveau la dégradation [19],[20]. Dans notre cas où un large excès de Hase est utilisé, ces mécanismes ne doivent pas s'appliquer.

En revanche, il a été montré que les interactions entre des microgels et des macromolécules, pouvaient inhiber la dégradation de la matrice. En effet, la présence de liaisons entre la macromolécule et le gel peut limiter la diffusion de l'enzyme à l'intérieur du réseau. De plus, le microgel lié à la macromolécule de manière irréversible entraîne une protection des chaînes de polymère, le substrat n'est plus accessible pour l'enzyme, restreignant ou inhibant la capacité de dégradation des matrices. Ainsi, il a été montré que la dégradation de microgels de dextran, est liée à l'accès au substrat et à la taille des pores. Les gels de dextran interagissent avec de la Con A. Ainsi, la dégradabilité du gel est liée à la Con A présente dans la matrice. En présence de glucose, la dégradation est à nouveau possible car le glucose permet le détachement de la Con A restaurant la porosité et l'accessibilité des chaînes [21].

1.7.3 Dégradabilité des gels chargés en insuline

La dégradation enzymatique des gels chargés en insuline est également étudiée. Les cinétiques de dégradation des gels chargés et non chargés, sont similaires : les gels sont totalement dégradés en 2,5 minutes environ (Figure 15).

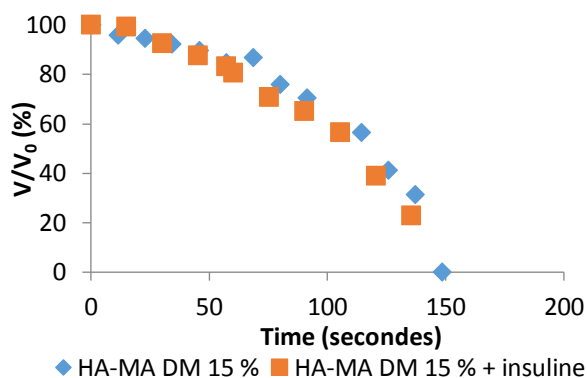


Figure 15 : Cinétique de dégradation des microgels de HA-MA₁₅ chargés en insuline ou non en présence de Hase 500 U/mL, à 37 °C dans du tampon PBS.

La présence d'insuline n'interfère pas avec les mécanismes de dégradation des gels.

1.8 Conclusion intermédiaire

Ainsi, les gels de polyelectrolytes, chargés négativement, préparés à partir de précurseurs HA-MA avec ou sans BIS, interagissent fortement avec des protéines modèles portant des charges positives. La pénétration de ces protéines dans la matrice dépend du rapport de taille entre la protéine et les pores, c'est à dire de la masse molaire des protéines et du paramètre de maille des microgels. Les protéines modèles neutres ou chargées négativement, dont l'insuline fait partie, n'ont pas d'affinité pour la chaîne de HA, la distribution de la protéine dépend uniquement de la porosité du gel. Il est possible d'augmenter la porosité des gels en introduisant des macropores mais ceux ci n'ont pas d'effet sur l'encapsulation s'ils ne sont pas fermés par une matrice très réticulée. Dans le cas du chargement en protéines qui interagissent avec la matrice par des interactions électrostatiques, l'interaction entraîne une contraction du gel qui dépend de la rigidité de ce dernier et le taux d'encapsulation est régi par la quantité de chaîne de polymère disponible.

2 Applications aux gels sensibles au glucose

Les gels étudiés dans la première partie de ce chapitre sont des structures simples composées d'acide hyaluronique comme matrice de gel, de méthacrylates afin d'assurer la réticulation et éventuellement de BIS pour moduler la porosité et la rigidité des gels. Afin d'introduire une sensibilité au glucose, des fonctions acide phénylboronique (PBA) sont greffées sur la matrice de gel qui sont ainsi préparés à partir de précurseurs HA-MA-PBA. L'étude des interactions entre ces autres formulations de gels et des protéines modèles est abordée dans ce paragraphe. Les fonctions PBA, sont composées d'un cycle aromatique qui leur donne un caractère hydrophobe. Les chaînes de polymères composant la matrice comportent 20% de taux de fonctionnalisation. Les gels sont préparés en présence de BIS à hauteur de 10 ou 20% par rapport au HA. Les microgels seront notés HA-MA-PBA_x, BIS_y, avec x le taux de substitution en PBA et y la quantité de BIS par rapport au HA. Le taux de méthacrylation est constant et de 20%.

2.1 Etude de l'imprégnation des gels de HA-MA-PBA par des macromolécules modèles

2.1.1 Comportement des gels de HA-MA-PBA en présence de PLL

Compte tenu des faibles taux de substitution, les chaînes de HA-MA-PBA composant la matrice sont globalement chargées négativement du fait des fonctions carboxylates. Cette composition entraîne donc également de fortes interactions électrostatiques lors de l'introduction d'homopolypeptides chargés positivement comme la PLL. Une contraction des gels est observée, les PLL de tailles 15 et 150 kg/mol parviennent au cœur des microgels, l'exemple des microgels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ est présenté (Figure 16 c et f).

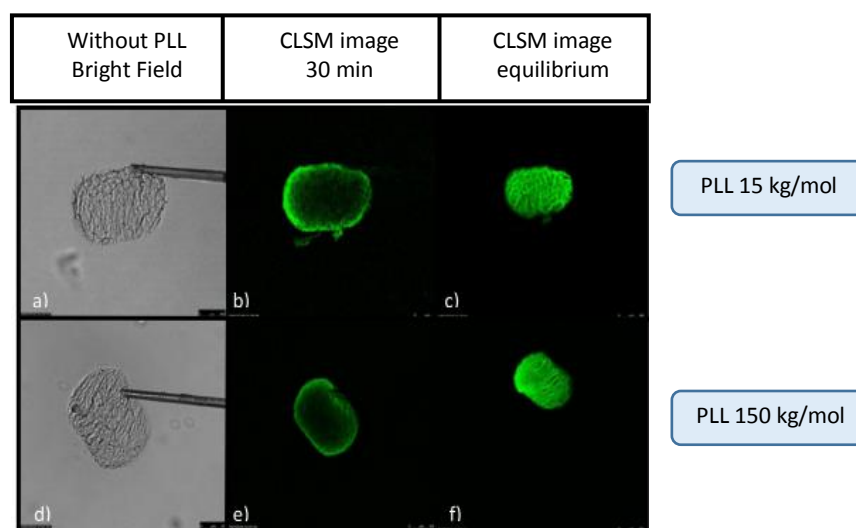


Figure 16: Chargement de microgels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀, en PLL, 15 kg/mol (a, b et c) et 150 kg/mol (d, e et f). a et d montrent des images en transmission à t=0h, c, d, e, et f sont des images de microscopie confocale prises après 1h et 3h.

On peut ici observer clairement la formation de la couche de complexe qui petit à petit s'épaissit jusqu'à atteindre à l'équilibre le cœur du microgel (Figure 16 b et e). Le scénario semble donc identique à celui observé pour les microgels de HA-MA non fonctionnalisés. Quelle que soit la masse molaire, l'état final est le même. La PLL finit par pénétrer l'ensemble de la matrice et induit une contraction de l'ensemble du volume. La cinétique observée est similaire pour les deux masses molaires. De fait, le microgel de HA-MA-PBA se comporte comme un gel assez peu réticulé, il se contracte jusqu'à atteindre à l'équilibre un volume représentant 25% de son volume initial. Cette contraction est supérieure à celle observée pour les microgels de HA-MA contenant également 20% de BIS par rapport au HA. Cette différence peut s'expliquer par une conversion des méthacrylates moins importante, due à une baisse de réactivité des précurseurs contenant les fonctions hydrophobes PBA. Le polymère en solution peut former des zones hydrophobes par regroupement des fonctions PBA, qui entraînent une plus faible mobilité des chaînes de polymère lors de l'étape de réticulation.

2.1.2 Comportement des gels de HA-MA-PBA en présence de dextran

De la même manière les gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ sont immergés en présence de dextrans fluorescents de différentes masses moléculaires. Les dextrans fluorescents sont neutres, il n'y a pas d'interactions électrostatiques attendues. Les images de microscopie obtenues sont présentées Figure 17. Comme pour les microgels ne contenant pas de fonctions PBA, le plus petit dextran de 4 kg/mol entre sur tout le volume du gel, mais la fluorescence est plus marquée dans le gel que dans le milieu environnant. Ce contraste positif de la fluorescence prouve que les chaînes de HA-MA-PBA interagissent avec le dextran-FITC. Ces interactions peuvent provenir de la complexation entre les diols présents sur les chaînes de dextran avec les fonctions PBA présentes sur la matrice de gel conduisant à la formation d'esters cycliques par liaisons covalentes (Figure 17 b). Le dextran de plus grande masse molaire 70 kg/mol est trop grand pour pénétrer sur tout le volume du gel, il reste confiné à l'extérieur, on observe un contraste négatif au cœur du microgel. Cependant, les chaînes interagissent en périphérie, et l'interaction est confirmée, la fluorescence est renforcée par rapport au milieu extérieur (Figure 17 d). Après rinçage du gel chargé en dextran par du PBS on constate la persistance de la fluorescence due aux interactions du dextran et de la matrice de gel (Figure 17 c).

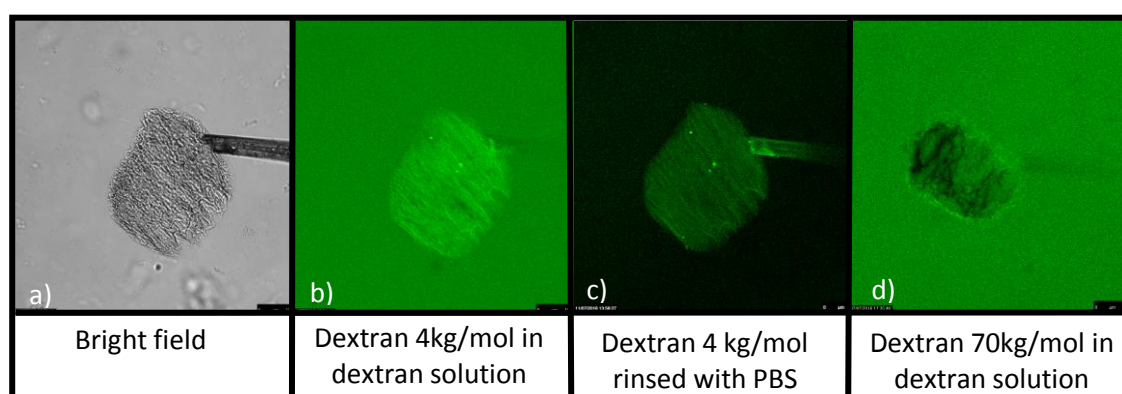


Figure 17: Microgel de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ a) en absence de dextran par microscopie à transmission b), en présence de dextran 4kg/mol obtenue par microscopie confocale c) après chargement en dextran 4kg/mol suivi d'une étape de rinçage par du PBS et d) en présence de dextran 70 kg/mol obtenue par microscopie confocale. Les images b et d sont prises après une nuit d'incubation et l'image c) après 10 minutes de rinçage.

La fluorescéine est très peu présente sur la chaîne de dextran, un fluorophore par chaîne. Dans du tampon PBS elle est chargée négativement. De plus, lors de la synthèse des précurseurs HA-MA-PBA, l'EDC est utilisé pour activer les fonctions carboxyliques, il peut être partiellement greffé sur la chaîne et entraîner la présence de quelques charges positives sur les matrices de gel. Afin de savoir si les interactions observées peuvent s'expliquer par la présence potentielle de ces charges opposées sur les deux partenaires, un autre gel de HA-MA-PBA est imprégné dans une solution de dextran modifié par un autre fluorophore, la rhodamine. Cette dernière est chargée positivement dans du tampon PBS. Le même comportement est observé pour les gels chargés en dextran-rhodamine. Les interactions observées ne sont donc pas électrostatiques.

L'incubation n'a pas été réalisée en direct, la cinétique de pénétration du dextran 4kg/mol ainsi que les variations de volume pendant le chargement ne sont pas étudiés.

2.1.3 Comportement des gels de HA-MA-PBA en présence d'insuline

De la même manière les gels sont placés en contact d'une solution d'insuline avant d'être observés par microscopie confocale (Figure 18 a et b).

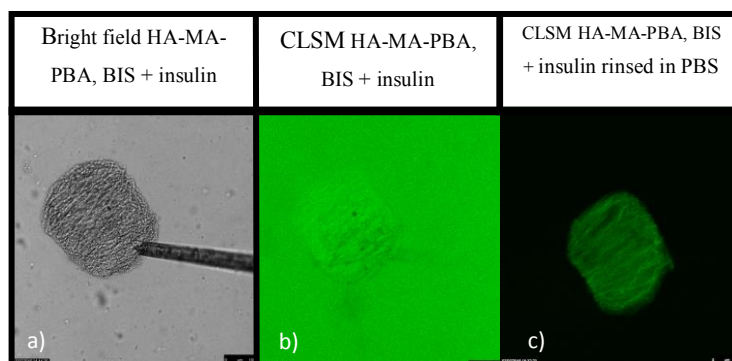


Figure 18: Gel de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ en présence d'insuline-FITC (0,01 wt%). Image a) en transmission, et en microscopie confocale du gel immergé b) dans la solution d'insuline-FITC pendant une nuit c) dans du PBS après 10 minutes de rinçage.

Comme pour le dextran 4 kg/mol ; l'insuline rentre sur tout le volume du gel. Le dextran 4 kg/mol a un rayon hydrodynamique de 1,4 nm, qui est proche du rayon hydrodynamique de l'insuline monomérique qui est de 1,34 nm [3]. La fluorescence de l'insuline est plus marquée que dans le milieu extérieur (Figure 18 b), prouvant une interaction entre l'insuline et la matrice de gel. Après rinçage du milieu par du tampon PBS, la fluorescence est toujours visible dans le gel : l'insuline interagit avec le gel. Cependant, l'origine de cette interaction n'est pas clairement identifiée, l'insuline n'est pas connue pour former des interactions avec les boronates, il peut s'agir d'interactions hydrophobes, entre des patches hydrophobes de la protéine et les fonctions PBA.

2.2 Etude de la libération des protéines dans les microgels sensibles au glucose

A ce stade, l'origine des interactions entre les différents systèmes étudiés et les microgels de HA-MA-PBA est encore floue. Elles peuvent être de différentes natures, en effet les PBA peuvent interagir avec des diols, en formant des liaisons covalentes réversibles, ils peuvent également interagir avec des fonctions hydrophobes présentes sur les protéines en raison de la présence de cycles aromatiques dans les fonctions PBA. Afin de mieux appréhender ces mécanismes, nous étudions le rôle du fructose, qui peut se lier avec le PBA et moduler les interactions de celui-ci avec les protéines. Le fructose est un monosaccharide connu pour avoir l'une des constantes d'association les plus élevées avec les fonctions PBA [22].

2.2.1 Etude de la libération du dextran

Afin d'étudier les interactions entre le dextran et les chaînes de HA-MA-PBA, le milieu est rincé à un débit de 2 mL/min avec du PBS ou du PBS contenant 20 mM de fructose. Les microgels chargés sont observés en direct par microscopie confocale et l'intensité de la fluorescence due à la présence du dextran est enregistrée.

En rinçant avec du PBS pendant 30 min, on observe une perte d'intensité de fluorescence de 6 %. Cette légère diminution de la fluorescence peut être expliquée par la présence de dextran fluorescent en excès en solution dans les pores et qui n'interagit pas avec les chaînes de HA-MA-PBA devenues inaccessibles suite à la saturation de l'adsorption du dextran-FITC (Figure 19). En rinçant avec du PBS contenant 20 mM de fructose on observe une perte de fluorescence bien plus marquée qui correspond à 40 % de la fluorescence de départ sur un temps de 20 minutes (Figure 19). Dans ce cas, l'interaction ne peut pas être de nature hydrophobe et les interactions doivent être dues à la présence de nombreux diols sur les dextrans pouvant interagir avec les PBA. L'ajout de fructose permet de libérer le dextran par compétition avec les interactions PBA/diol.

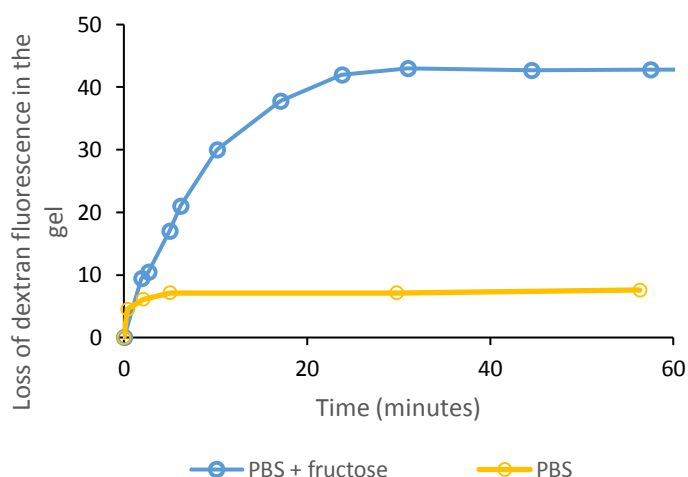


Figure 19: Perte de fluorescence provenant du dextran-rhodamine chargé dans des microgels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ en fonction du temps, lors du rinçage par du PBS (orange) ou du PBS + fructose (bleu).

La perte de fluorescence en présence de fructose a été comparée pour les temps courts, à un modèle qui présume que le dextran est libéré dans le milieu extérieur par diffusion en suivant la loi de Fick (courbe en annexe 4.4). Le modèle et la courbe expérimentale sont en accord, confortant cette hypothèse.

La perte de fluorescence est déterminée en mesurant la fluorescence restante dans le gel. Cette évolution de la fluorescence dans le microgel est associée à une augmentation du gonflement du volume du gel de +12 % par rapport au volume avant l'ajout de fructose. Ce phénomène, n'est pas observé lors du rinçage par du tampon PBS. Le gonflement est dû simultanément à la présence de fructose et à la libération du dextran.

2.2.2 Etude de la libération de l'insuline

De la même manière les interactions entre l'insuline et les matrices de gels HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ sont étudiées, en rinçant les microgels chargés en insuline et immobilisés par des microcapillaires par du PBS ou du PBS contenant 20 mM de fructose. En rinçant avec du PBS, la fluorescence du milieu perd seulement 5% de son intensité en trente minutes (Figure 20). Cette perte est dans le même ordre de grandeur que lorsque le dextran est chargé. Elle peut s'expliquer de la même manière par la présence d'insuline non liée présente dans les pores. En rinçant avec du PBS contenant du fructose 20 mM la perte observée sur la même période de temps est beaucoup plus importante de l'ordre de 30 % par rapport à la fluorescence initiale (Figure 20).

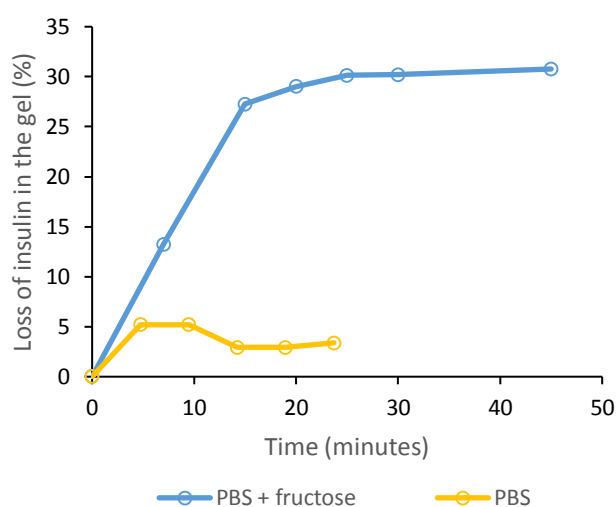


Figure 20 : Perte de fluorescence provenant de l'insuline-FITC chargée dans des microgels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ en fonction du temps, lors du rinçage par du PBS (orange) ou du PBS + fructose (bleu).

La perte de fluorescence est également associée à une augmentation du volume du gel de +22 % par rapport au volume du gel avant l'ajout de fructose. Ce phénomène, n'est pas observé lors du rinçage par du tampon PBS. Le gonflement du gel est du même ordre de grandeur que celui observé lors de la libération de dextran en présence de fructose.

Nous avons émis l'hypothèse que les interactions avec l'insuline étaient des interactions hydrophobes, or dans ce cas rien ne justifierait la perte de fluorescence en présence de fructose. Si les interactions sont sensibles à la présence de sucres, elles sont probablement dues à des interactions impliquant les fonctions PBA. De plus la phénoménologie est similaire pour les dextrans, qui ne présentent pas de patches hydrophobes. L'insuline contient plusieurs résidus qui portent des fonctions alcools, pouvant se trouver à proximité l'une de l'autre lors du repli de l'insuline sous forme de pelote. Dans ce cas, ces résidus pourraient être vus comme des diols par les fonctions PBA. Les résidus identifiés sont deux résidus thréonine (résidu 8 chaîne A et résidu 27 chaîne B), trois résidus sérine (résidu 9 et 12 chaîne A, résidu 9 chaîne B) certains présents vers l'extérieur dans le cas d'insuline monomérique.

2.2.3 Rôle de la structure du microgel dans la libération de la protéine

Le relargage de l'insuline en présence de PBS + fructose 20 mM est réalisé pour des gels de différentes rigidités préparés à partir de précurseurs HA-MA-PBA₂₀ et en contenant 10 ou 20% de BIS par rapport au HA. Les pertes de fluorescence mesurées, reflétant les quantités relarguées pour les différents taux de réticulation sont représentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Quantités libérée d'insuline et de dextran 4 kg/mol à partir de gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₁₀ et HA-MA-PBA₂₀, BIS₁₀ en présence de fructose, et variations de gonflement des observés simultanément (V_0 est le volume avant ajout de fructose)

Released specie	HA-MA-PBA ₂₀ , BIS ₂₀		HA-MA-PBA ₂₀ , BIS ₁₀	
	Quantity released	Swelling variation V/V_0	Quantity released	Swelling variation V/V_0
Dextran 4 kg/mol in 30 min	38 %	+12%		
Insulin in 30 min	29 %	+15%	21 %	+10%

Il est intéressant de noter que dans tous les cas, le relargage de la protéine modèle (dextran ou insuline) a lieu. La quantité relarguée est plus faible pour les gels contenant de l'insuline et également pour le gel contenant moins de BIS. Ce dernier résultat est surprenant on pourrait s'attendre à ce que les gels de porosité plus faible donc moins réticulé relarguent l'insuline plus rapidement en raison d'une meilleure diffusion dans la matrice. La variation de gonflement des gels quelque soit l'espèce encapsulée correspond à un gonflement de + 10 à + 15% du gel. Ce gonflement est comparable pour les gels de différents taux de réticulation malgré la différence de rigidité. Les variations de gonflement sont dues simultanément à l'ajout de fructose et à la libération de l'espèce encapsulée.

2.3 Conclusion intermédiaire

La présence d'interactions spécifiques entre les microgels de HA-MA-PBA et des protéines modèles comme l'insuline ou le dextran a été démontré. Ces interactions semblent être réversibles en présence de fructose. Cette particularité ouvre la voie à une étude plus approfondie des capacités d'encapsulation et relargage de ces protéines encapsulées dans des gels de HA-MA-PBA. Ces notions seront développées dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

3 Confinement de protéines dans des microgels obturés par complexation

Les résultats présentés précédemment prouvent que les interactions entre les protéines et les matrices de gels sont particulièrement importantes pour contrôler l'encapsulation et le relargage des espèces. Nous avons montré que lorsque des interactions existent, les protéines sont encapsulées en se liant directement sur la matrice de gel, résistant ainsi aux changements de milieu si les interactions sont assez fortes. Ces interactions peuvent être de différentes natures, électrostatiques (cas des gels de HA-MA chargés en PLL) ou chimiques (cas des interactions PBA/diols pour des gels de HA-MA-PBA chargés en dextran ou en insuline).

Cependant, en l'absence d'interaction, le chargement dans des gels par diffusion dans les pores de la matrice ne résiste pas à un changement de milieu, et à la dilution. Un gel chargé en protéine, administré à un patient, perd son chargement par diffusion sans contrôle de la délivrance en termes de dosage et de cinétique. Plusieurs stratégies sont envisageables afin d'encapsuler des protéines qui n'interagissent pas avec les matrices de gels. Tout d'abord il est possible de jouer sur la porosité, en imprégnant les gels dans une solution de protéine lorsqu'ils sont à l'état gonflé. Dans ce cas, la protéine peut entrer par diffusion dans le gel. Elle peut être encapsulée en changeant le milieu de manière à induire une contraction des gels et donc une baisse de leur porosité. Ainsi, la protéine serait emprisonnée dans la structure. Cette diminution de la porosité peut avoir lieu en changeant le pH ou la force ionique par exemple. Cependant, ces systèmes sont difficilement applicables *in vivo*, il faut que les valeurs seuils de pH ou de force ionique qui entraînent le gonflement du gel correspondent au pH ou force ionique *in vivo* précisément dans les zones où la protéine doit être relarguée. De plus, les cinétiques de gonflement et de relargage par diffusion doivent être précisément contrôlées.

Nous souhaitons mettre en place une stratégie alternative. A partir des résultats précédents, nous avons montré que la complexation des microgels avec les PLL de grandes masses molaires se faisait en surface du microgel, n'affectant pas ses propriétés internes de porosité (le changement de volume est resté faible). En revanche, la dégradabilité du gel est sérieusement remise en question. Ainsi, la PLL joue le rôle de bouche-pores. Il est donc envisageable d'utiliser avantageusement la PLL pour confiner des protéines au sein des microgels sans avoir recours à une modification chimique du gel. Ce concept doit pouvoir être exploité à tout type de complexation d'une macromolécule en surface d'un microgel, en particulier à la complexation boronate-diol.

3.1 Stratégie de formation de la membrane

Les stratégies utilisant l'obstruction des pores pour favoriser l'encapsulation d'espèces sont particulièrement présentes dans la littérature pour confiner des actifs dans des nanoparticules poreuses comme des particules de silice. Par exemple des particules de chitosan modifié par de la Con A peuvent être obturées par l'ajout de dextran [23]. Des microgels entourés de membranes de polyélectrolytes déposés couche par couche ont également été décrits pour encapsuler des espèces [24]. Pour les systèmes sensibles au glucose, différents

exemples existent mettant en jeu des fonctions glucose oxydase ou acides phénylboroniques pour obstruer les pores de particules de silice [25],[26],[27],[28] . Nous avons adapté ces stratégies de blocage de pores pour encapsuler des protéines qui ne présentent pas d'interactions avec les matrices de gels.

3.1.1 Concept

Nous avons choisi de mettre en œuvre l'encapsulation de protéines modèles qui n'interagissent pas avec la matrice en ajoutant une macromolécule qui peut boucher les pores pour confiner la protéine d'intérêt. Cette stratégie peut être universelle et s'appliquer ainsi à une gamme large de protéines. Certains paramètres sont prérequis pour le bon fonctionnement de ces systèmes. La macromolécule doit être de taille assez importante pour se lier à plusieurs chaînes de HA et bloquer la porosité, et finalement empêcher la diffusion de la molécule hors du gel. Les interactions doivent être assez fortes pour assurer le maintien de la macromolécule. Nous avons illustré cette stratégie en jouant sur deux types d'interactions: les interactions électrostatiques et les interactions spécifiques mettant en jeu les fonctions PBA. Le processus d'encapsulation et de libération contrôlée est en quatre étapes.

Dans un premier temps, les microgels sont chargés par incubation. Ils sont sélectionnés pour avoir une porosité suffisamment grande pour que la protéine d'intérêt pénètre dans le microgel sur tout le volume afin de favoriser le taux d'encapsulation (Figure 21 1). Dans un deuxième temps, une solution contenant une macromolécule qui interagit avec la matrice de gel est introduite dans le milieu. Elle est choisie de grande masse molaire afin d'avoir une grande longueur de chaîne, et favoriser son confinement à l'extérieur des gels. Ainsi, en raison des interactions entre cette macromolécule et la matrice de gel, une membrane va se former en surface du microgel et boucher les pores (Figure 21 2). Dans une troisième étape, le milieu est rincé pour enlever l'excès de macromolécule et de protéine d'intérêt. Cette étape permet de vérifier la bonne conduite de l'encapsulation. En effet, les espèces mises en jeu sont marquées par des fluorophores, il est ainsi possible de vérifier que la protéine est bien présente et encapsulée sur tout le volume du gel et de connaître la distribution de la macromolécule (Figure 21 3). Enfin, dans une dernière étape le relargage de l'espèce doit être déclenché. Différents mécanismes sont envisageables. Il est ainsi possible de choisir une macromolécule dégradable qui peut être clivée en segments plus petits, qui ne boucheront plus les pores par pontage (Figure 21 4a). Enfin, si les interactions sont modulables, il est possible de détacher la macromolécule de la matrice de gel, en jouant sur l'interaction de la macromolécule avec une biomolécule introduite dans le milieu (Figure 21 4b).

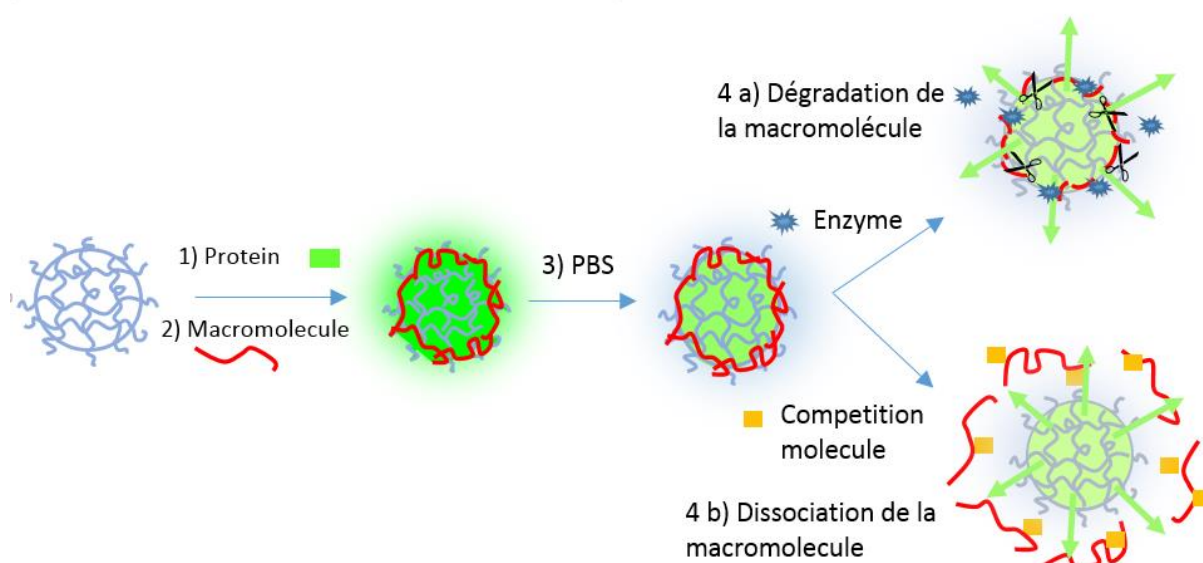


Figure 21 : Stratégie de confinement de protéine fluorescente (vert) par ajout dans le milieu d'une macromolécule (rouge) interagissant avec la matrice de gel (bleu), suivi de la libération de la protéine 1) chargement en protéine dans la matrice de gel par diffusion 2) formation d'une membrane en périphérie du gel par interaction entre la macromolécule et le gel 3) rinçage des gels pour enlever les excès de macromolécules et de protéines ; et vérifier l'encapsulation de la protéine 4) libération de la protéine encapsulée, par dégradation de la membrane complexée : a) dégradation de la macromolécule elle-même, par exemple par voie enzymatique, ou b) par dissociation du lien microgel-macromolécule par compétition de complexation par exemple.

3.2 Stratégie d'encapsulation basée sur la complexation de polyélectrolytes

Dans un premier temps, nous cherchons à valider le concept en utilisant la PLL comme agent complexant et la matrice de HA-MA. Le dextran joue le rôle de la protéine. Le concept sera par la suite appliqué à l'insuline. La protéine et la macromolécule sont toutes deux fonctionnalisées avec un fluorophore de manière à pouvoir être suivies par fluorescence en utilisant la microscopie confocale, durant toutes les étapes. Pour être observées simultanément, la protéine d'intérêt est marquée, par la fluorescéine qui est excitée à 492 nm et qui émet à 512 nm, alors que la PLL est marquée avec de l'Alexa 633 qui est excitée à 621 nm et émet à 639 nm. Pour cette observation simultanée, on utilise deux lasers différents du microscope confocal. L'étude est réalisée sur des microgels uniques, maintenus à l'aide d'un microcapillaire dans une chambre d'observation placée sous un microscope et connecté à une pompe péristaltique pour introduire des espèces ou changer le milieu.

3.2.1 Encapsulation

La taille de pore des gels de HA-MA₂₀ est suffisamment large pour permettre la pénétration des protéines modèles étudiées : le dextran 4 kg/mol et l'insuline (Figure 22 b). Les microgels sont mis à incuber une nuit dans des solutions à 0,1 wt% de protéines marquées par la fluorescéine. Ce temps est suffisant pour que la molécule diffuse jusqu'au cœur du microgel. (Figure 22 images a à d: étape 1).

La PLL, est ensuite introduite dans le milieu contenant la protéine à hauteur de 0,1 wt%. Comme attendu, la PLL, vient se fixer sur la matrice de gel. Elle est confinée à l'extérieur en raison de la taille sélectionnée de 150 kg/mol (Figure 22 images g: étape 2). On observe une contraction des gels chargés, qui était déjà observée sur les gels vides en présence de PLL (Figure 22 e à h). Le chargement en dextran, ne nuit pas à l'interaction de la PLL, car la protéine est présente dans les pores, sans interagir avec les chaînes de polymères composant le gel qui restent accessibles.

Afin de vérifier que la protéine est bien encapsulée, les gels sont rincés par du PBS, jusqu'à disparition de la fluorescence du milieu extérieur au bout de 3 minutes (Figure 22 j). La fluorescence de la protéine chargée est toujours visible dans le volume du gel, de même que la fluorescence de la PLL en périphérie du gel (Figure 22 k). Cet état reste stationnaire pendant au moins 30 minutes. Ainsi, la présence de PLL permet d'encapsuler la protéine modèle (Figure 22 images i à l étape 3). L'encapsulation est constatée de manière qualitative. Les détails du protocole expérimental sont présentés en annexe.

Les différentes étapes 1 à 3 sont représentées en Figure 22 pour l'exemple de gels de HA-MA₂₀, chargés en insuline. Le confinement est assuré par l'ajout de PLL comme macromolécule. Le même protocole a été réalisé pour les gels HA-MA₂₀, BIS₂₀ chargés en dextran-FITC 4kg/mol ou en insuline. Dans tous les cas, l'encapsulation de ces protéines est un succès. Les gels se contractent dans différentes proportions en fonction de leur composition. Les variations de volume des gels suite à l'ajout de la PLL sont présentées dans le Tableau 5.

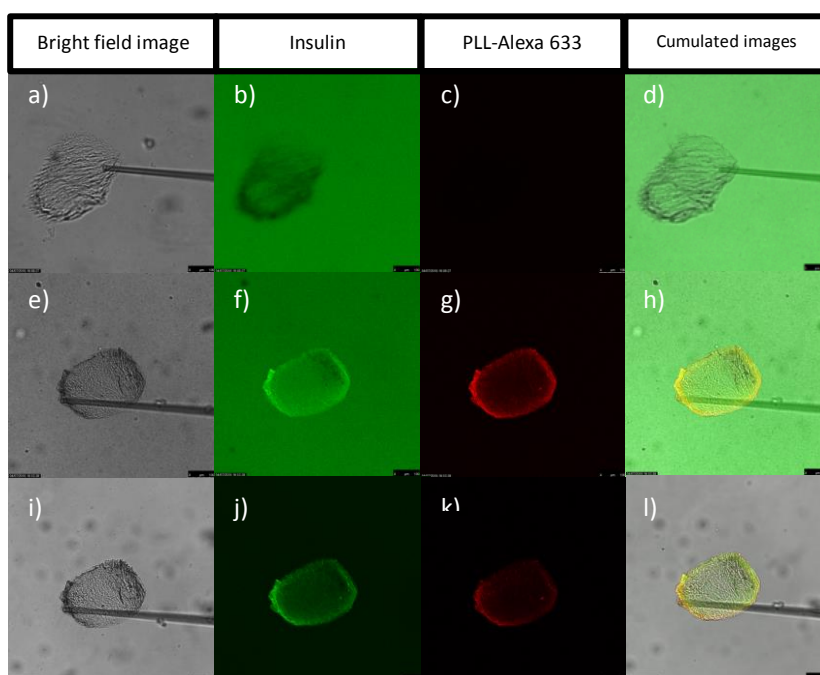


Figure 22 : Suivi de l'encapsulation de protéine ici l'insuline par formation d'une membrane de PLL en périphérie de gel de HA-MA₂₀. Image de microscopie à transmission a, e, i) et confocale b, f, j) fluorescence de la protéine encapsulée ici l'insuline, c, g et k) fluorescence de la PLL, macromolécule formant une peau imperméable autour des gels d, h, l) images cumulées en transmission et en fluorescence des microgels. Les images a à d représentent l'étape 1 de chargement de la protéine d'intérêt. Les images e à h représentent l'étape 2 la formation d'une macromolécule ici la PLL en périphérie du microgel. Les images i à l représentent l'étape3 : étape de rinçage où les excès de PLL et de d'insuline sont enlevés mettant en avant l'encapsulation de la protéine d'intérêt.

Tableau 5 : variation de volume des microgels de différentes compositions lors de l'ajout de PLL 150 kg/mol . V_i correspond au volume avant l'ajout de PLL.

	Swelling variation V/V_i (%)
HA-MA ₂₀	-85
HA-MA ₂₀ , BIS ₂₀	-36

Les taux de contraction observés sont en adéquation avec ceux observés pour les gels non chargés. La présence de protéine dans la matrice de gel, n'interfère pas dans le processus d'interaction de la PLL et du gel.

3.2.2 Relargage par dégradation de la PLL peau

Afin de libérer la protéine encapsulée, différentes stratégies sont disponibles, certaines sont physicochimiques en jouant sur les caractéristiques du milieu, d'autres sont moléculaires, en cassant les chaînes de macromolécules par dégradation. Le relargage peut être provoqué par un changement de pH qui induit une baisse de la densité de charge de la PLL [29], ou une variation importante de la concentration en électrolyte [12], [30].

Cependant, ces modifications du milieu peuvent induire des changements de conformation de la protéine encapsulée. Nous choisissons donc une autre stratégie, qui consiste à cliver la macromolécule en plus petit segments par dégradation.

La PLL est dégradable par une enzyme appelée trypsine. De classe enzymatique EC 3.4.21.4, c'est une peptidase du suc pancréatique participant à la digestion des protéines. Elle hydrolyse les liaisons peptidiques d'un résidu lysine ou arginine. Pour ce faire, la trypsine coupe les acides aminés en formant un C-terminal. En d'autres termes, elle transforme les chaînes polypeptidiques en chaînes plus courtes pour permettre la digestion. Nous avons choisi d'utiliser cette spécificité pour neutraliser l'effet obstruant de la PLL présente en périphérie de gel et ainsi, pouvoir libérer la protéine d'intérêt. Pour cela, une solution concentrée de trypsine est ajoutée dans le milieu afin d'avoir une concentration de 0,01 wt% en trypsine, dans du tampon PBS à pH 7,4. Dans ces conditions la PLL est dégradée.

L'encapsulation et le relargage de protéine modèle par clivage de la PLL sont représentés en Figure 23 pour l'exemple de gels de HA-MA₂₀, chargé en insuline comme protéine modèle, et confiné grâce à l'ajout de PLL comme macromolécule.

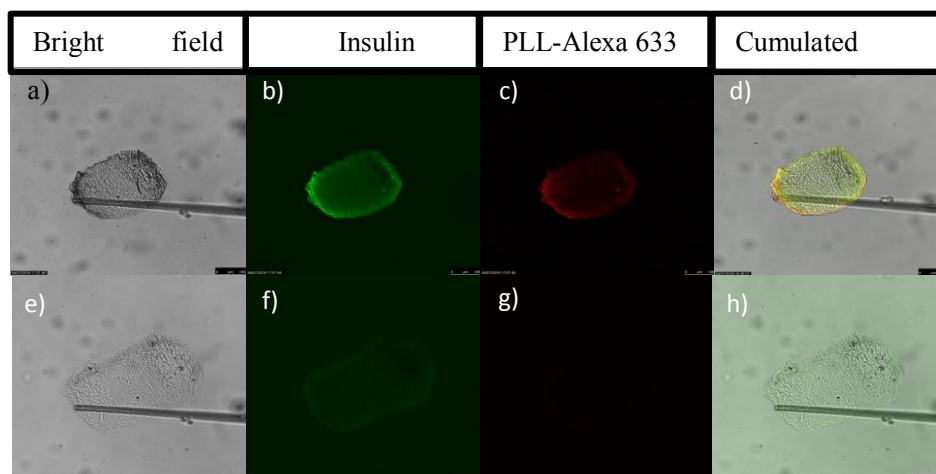


Figure 23 : Libération de la protéine encapsulée par clivage de la PLL à travers l'exemple d'un gel de HA-MA₂₀ Images en transmission a et e) et en microscopie confocale b, c, d, f, g, h) de microgels images a à d) protéine ici insuline, confinée par la présence de PLL comme macromolécule peau images e) à h) libération de l'insuline par ajout de trypsine clivant la PLL et induisant un regonflement des microgels.

Simultanément à la perte de fluorescence, les variations de volume des gels sont mesurées. En effet, sous l'effet du relargage en protéine modèle, les gels regonflent. Ce phénomène correspond à l'inversion de la contraction observée lors du chargement. Le relargage de dextran 4 kg/mol et d'insuline a été réalisé à partir de gels de HA-MA₂₀ et HA-MA₂₀, BIS₂₀. Les gels étudiés ont ainsi des élasticités différentes. Les résultats obtenus en termes de perte de fluorescence représentant la quantité de protéine libérée, et en termes de gonflement représentant la variation de volume en réponse à la dégradation de la PLL sont présentés dans le tableau 6. Les variations de volume sont mesurées à l'équilibre et l'état de référence correspond au volume à l'état initial V_i ; c'est-à-dire le volume du gel à l'équilibre dans du tampon PBS contenant la protéine, avant ajout de la PLL.

Tableau 6 : Relargage de dextran-FITC 4 kg/mol et d'insuline encapsulés dans des gels de HA-MA₂₀, BIS₂₀ et HA-MA₂₀ et taux de gonflement par rapport à l'état initial (V_i est le volume du gel avant ajout de PLL).

	HA-MA ₂₀		HA-MA ₂₀ , BIS ₂₀	
	Release after 30 min	V/V _i	Release after 30 min	V/V _i
Dextran 4kg/mol	83%	+82%	95%	+88
Insulin	64%	+87%	61%	+100%

Il apparait que les taux de relargage sont similaires pour les différents gels étudiés : supérieur à 80 % pour le dextran et avoisinant les 60 % pour l'insuline. Pour l'encapsulation de l'insuline en fin de mesure, une partie de la fluorescence est toujours visible en périphérie de gel, là où se trouve la PLL. Au centre du gel la fluorescence est perdue. Il est possible que les résidus de PLL puissent retenir une partie de l'insuline par interaction électrostatique. Une fois les charges de la PLL saturées, l'insuline n'est plus retenue, elle est libérée par diffusion. Le dextran lui, n'est pas retenu par la PLL.

Suite au clivage de la PLL, les gels regonflent. Leurs volumes correspondent à plus de 80 % du volume qu'ils avaient avant l'ajout de PLL et ce, pour les deux taux de réticulation. Ainsi, les gels peu réticulés gonflent plus.

Ces résultats sont importants car ils montrent que le relargage de protéines modèles de dextran 4 kg/mol et d'insuline encapsulées dans des gels de HA-MA avec ou sans BIS ne sont pas régis par le gonflement du gel et les changements de porosité. Par contre, la libération de protéines est dictée par les interactions entre les partenaires protéines et matrice de gel. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus précédemment avec les gels de HA-MA-PBA.

3.3 Stratégie d'encapsulation basée sur des interactions moléculaires spécifiques

Le concept précédent repose sur une complexation forte d'une macromolécule de grande taille avec la matrice d'hydrogel. Dans le contexte du développement de microgels sensibles au glucose, nous souhaitons l'appliquer à la complexation boronate-diol, qui pourrait ensuite être dissociée par compétition avec un monosaccharide présent dans le milieu. Pour ce faire, il est nécessaire de synthétiser des microgels porteurs de fonctions diols. La macromolécule « bouche-pore » sera porteuse des fonctions boronates. Nous avons choisi de privilégier la présence de diols sur la matrice de gel et la présence de PBA sur la macromolécule plutôt que l'inverse. En effet, compte tenu de nos résultats précédents (partie 2), les microgels de HA-PBA ne seront pas de bons modèles dans la mesure où ils encapsulent les protéines même en absence de macromolécule.

3.3.1 Cahier des charges pour le design des partenaires microgels/macromolécule

La macromolécule porteuse de fonctions boronates doit être longue et multifonctionnelle. Il faut, pour assurer un ancrage de la macromolécule qui bouche la porosité, que la macromolécule interagisse avec le gel à différents endroits simultanément. En effet, les liaisons PBA/diols sont des liaisons réversibles covalentes, le système est dynamique et la présence de plusieurs points d'ancrage augmente la probabilité que la macromolécule soit toujours en interaction avec le gel. Elle doit être suffisamment fonctionnalisée, de manière à assurer une interaction assez forte avec la matrice de gel, et ainsi assurer l'étanchéité autour du gel afin de limiter la diffusion vers le milieu extérieur de l'espèce encapsulée.

Il est possible de préparer des microgels contenant de forts taux de diols bien répartis sur toutes les chaînes et donc sur tout le volume de gel. Différentes structures contenant de nombreux diols telles que les dextrans, ou des chaînes d'acide hyaluronique modifiées par des fonctions maltoses, sont hydrosolubles et peuvent être réticulés pour mener à des microgels par voie microfluidique. Le processus d'encapsulation et de libération de protéine en utilisant les interactions PBA/diols sont présentés Figure 24.

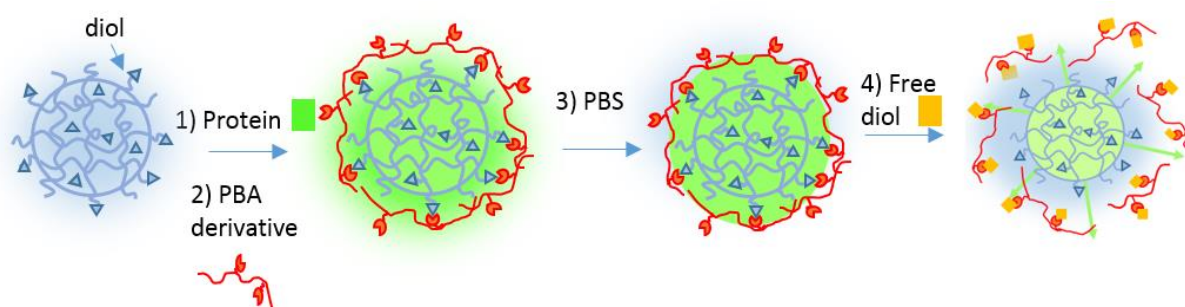


Figure 24 : représentation schématique du confinement de protéine par obstruction des pores d'une matrice de gel ayant des fonctions diols sur sa structure, par une macromolécule fonctionnalisée par des PBA suivi de la libération de la protéine par complexation plus favorable des fonctions PBA avec des diols libres ajoutés en solution.

3.3.2 Macromolécule fonctionnalisée avec les boronates

Nous avons choisi de travailler à partir d'une macromolécule d'acide hyaluronique fonctionnalisée avec des fonctions PBA. La chaîne de HA est choisie assez longue (60 kg/mol). Le protocole utilisé est similaire à la fonctionnalisation des HA-MA. Il est décrit en partie expérimentale. Les taux de greffage en PBA sont de l'ordre de 40 %. Les chaînes de HA-PBA sont dans un second temps fonctionnalisées avec un fluorophore de manière à pouvoir localiser sa distribution par rapport aux microgels. Pour ce faire, des molécules de fluorescéine sont greffées sur la chaîne (protocole en partie expérimentale). Cependant la fonctionnalisation n'est pas suffisante pour observer les chaînes de HA-PBA en microscopie de fluorescence. Afin de contourner cet écueil, une autre voie de marquage a été envisagée. Elle consiste à introduire dans le milieu du rouge alizarine, qui est un fluorophore ayant une fonction diol, comme décrit dans le chapitre 3. Lorsque le rouge alizarine est complexé avec des fonctions boronates, il devient fluorescent. L'introduction de rouge alizarine permet donc de connaître la distribution en HA-PBA.

3.3.3 Système utilisant des microgels dérivés d'acide hyaluronique

Les microgels d'acide hyaluronique, comme par exemple les gels de HA-MA, comportent des fonctions diols. Cependant, les constantes de complexation des diols des chaînes de HA avec les fonctions PBA sont faibles [31]. Pour cette raison nous avons choisi d'introduire sur les chaînes de HA des fonctions maltose qui présentent des diols pendants. Les précurseurs sont synthétisés au CERMAV et ont un degré de substitution en fonction maltose de 11 %.

Afin de préparer des microgels de HA-Maltose, des fonctions pentenoates libres sont également présentes sur le HA à hauteur de 14 %. Elles peuvent former des liaisons intrachânes par photopolymérisation. Nous avons choisi d'ajouter un réticulant : le PEG (SH)₂ M=3400 g/mol en proportion permettant une réticulation complète. La préparation de microgels de HA-Maltose se fait par microémulsion inverse en utilisant un procédé de microfluidique similaire à celui décrit dans le chapitre 3 pour la préparation de microgels de HA-MA. Les gels sont réticulés par photoamorçage en présence d'Irgacure 2959 comme photoamorceur introduit

à 0,1 wt%. La composition et le protocole de préparation des microgels sont décrits en partie expérimentale. La synthèse n'a pas permis d'obtenir des microgels de structure contrôlée. Les microgels obtenus ne sont pas réguliers, ils n'ont pas la forme des gouttes de l'émulsion matricielle, mais une forme cylindrique, suggérant un mauvais fractionnement des gouttes de phase aqueuse dans le capillaire externe. De plus, il est possible que la réticulation ne soit pas suffisante pour assurer une bonne homogénéité sur tout le volume des gouttes, la polymérisation est probablement partielle en raison d'une plus faible réactivité. Faute de temps, la préparation de ces microgels n'a pas été optimisée, il serait possible d'augmenter la quantité de fonctions pentenoates présentes sur les chaînes de HA-Maltose, afin d'augmenter la réticulation des gels ou de moduler la longueur de chaîne du réticulant. Il est également possible d'optimiser les conditions de polymérisation notamment en irradiant les gels plus longuement en adaptant le temps de parcours sous irradiation dans le capillaire. Malgré ces difficultés, les essais préliminaires réalisés avec les microgels synthétisés se sont révélés positifs. Ces microgels présentent une bonne affinité pour le HA-PBA et l'encapsulation de dextran 4 kg/mol et d'insuline a pu être observée.

3.3.4 Système utilisant des microgels de dextran

Pour le deuxième couple de partenaire microgel/macromolécule étudié, seule la nature du microgel est changée par rapport au système précédent. Nous avons choisi de préparer des microgels de dextran qui portent des fonctions diols en position cis sur leurs chaînes.

3.3.4.1 Préparation de microgels de dextran

Les microgels de dextran sont préparés en s'inspirant de la préparation de microgels de HA-MA. Pour ce faire, des dérivés de dextran méthacrylates (Dex-Ma) sont préparés à partir de dextran 40 kg/mol afin d'introduire des fonctions réticulables. La synthèse est similaire à la fonctionnalisation du HA par des fonctions méthacrylates. En bref, de l'anhydride méthacrylate réagit sur les alcools primaires du dextran dans des conditions douces. Les Dex-Ma fonctionnalisés ont un degré de méthacrylation de 10 mol%, déterminé par RMN et seront notés Dex-Ma₁₀ [32]. Le spectre RMN est reporté en partie expérimentale.

Les microgels sont fabriqués par réticulation du Dex-MA dans des gouttes préparées par microfluidique comme décrit dans le chapitre 3. Les compositions des phases aqueuses et organiques sont les mêmes que pour la préparation de microgels de HA-MA. Seule la concentration en précurseur Dex-Ma est augmentée à 5 wt% afin d'être au-dessus de la concentration critique de recouvrement des chaînes. Afin d'obtenir des gels stables, ils sont irradiés une deuxième fois en sortie de capillaire.

Cette fois les gels obtenus sont bien individualisés, et relativement sphériques, ils sont stables et peuvent être utilisés pour la suite de l'étude. Leur dégradabilité est observée en présence de l'enzyme spécifique dextranase introduite dans du PBS à hauteur de 50 U/mL à température ambiante.

3.3.4.2 Essai d'encapsulation de protéines modèles fluorescentes

Les microgels de Dex-Ma préparés sont incubés pendant 24h dans des solutions de dextran-FITC 4 kg/mol et d'insuline-FITC. Les microgels sont ensuite observés par microscopie confocale afin de déterminer la distribution des protéines dans les microgels. Comme présenté en Figure 25, les deux modèles de protéines (dextran et insuline) ne rentrent pas dans le gel, et ce, quelle que soit leur masse moléculaire. Cela montre que la porosité est de très petite taille (inférieure à 2,7 nm). Seule la molécule de petite masse molaire, la fluorescéine (MW= 332 g/mol) pénètre dans le gel. Afin d'augmenter la porosité des gels il est possible de diminuer la réticulation, en jouant, par exemple, sur le taux de méthacrylation des précurseurs de Dex-MA.

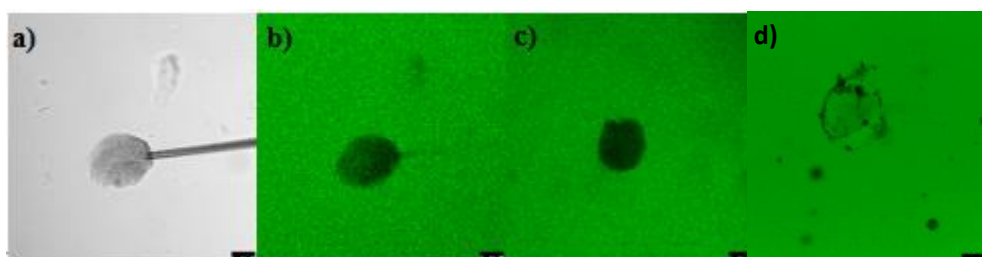


Figure 25: Distribution d'espèces fluorescentes dans des microgels de dextran Image a) de microscopie en transmission et b, c et d) de microscopie confocale de microgel de Dex-Ma₁₀ immergés dans une solution de b) dextran 4 kg/mol, c) d'insuline –FITC et d) de fluorescéine.

La fluorescéine pénètre jusqu'au cœur des microgels. L'encapsulation est réversible : en substituant le milieu par du PBS, la fluorescence est perdue car la fluorescéine n'est pas retenue dans la matrice de gel. Aucune interaction n'est observée. Pour la suite de l'étude, la fluorescéine sera choisie comme espèce encapsulée.

3.3.4.3 Complexation du HA-PBA avec les microgels de dextran

L'étude est menée dans un premier temps en absence de modèle de protéine dans le microgel (i.e. microgel non chargé). Afin de connaître la distribution des chaînes de HA-PBA, les propriétés du rouge alizarine sont utilisées. En effet, comme discuté précédemment le rouge alizarine (ARS) a la propriété de devenir fluorescent en interagissant avec les fonctions PBA. Une petite quantité de solution d'ARS concentrée est donc ajoutée dans le milieu. La quantité d'ARS introduite est plus de 6 fois inférieure à la quantité de fonctions PBA, présentes sur les chaînes de HA-PBA (0,17 mmol/L d'ARS pour 1,05 mmol/L de fonctions PBA). Cette précaution est nécessaire, en effet, les interactions avec les PBA sont des interactions dynamiques, il y a donc une compétition entre l'interaction PBA/ARS et PBA/diol de la matrice de dextran. Il ne faut pas introduire un excès d'ARS, qui pourrait entraîner le détachement de la molécule de HA-PBA et empêcher de savoir si le HA-PBA interagit avec le gel.

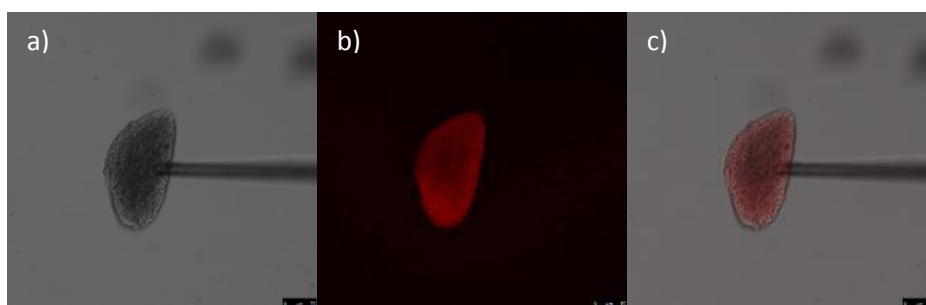


Figure 26: Image de microgel de dextran méthacrylate a) de microscopie en transmission b) de microscopie confocale, fluorescence du rouge alizarine c) images cumulées

De manière surprenante, la fluorescence est présente sur quasiment tout le volume du gel (Figure 26). Les macromolécules de HA-PBA de 60 kg/mol pénètrent donc dans tout le volume du gel, ce qui est intrigant. En effet, jusque là aucune macromolécule de masse molaire aussi élevée n'a pénétré à l'intérieur des microgels que nous avons synthétisés. L'absence d'exclusion laisse penser que ces molécules auraient un rayon hydrodynamique bien inférieur à celui de celles étudiées précédemment. La fonctionnalisation par l'acide phénylboronique, hydrophobe, peut modifier la solubilité des chaînes en solution.

En outre, aucune contraction du gel n'est observée. Bien qu'il existe une interaction attractive entre les deux partenaires, le réseau du microgel et la macromolécule complexante, cette interaction n'est pas suffisamment forte pour créer un réseau sous forme d'écorce. L'énergie d'interaction par liaison est plus faible que l'interaction électrostatique. En effet, contrairement à des liaisons électrostatiques fortes, les liaisons PBA/diols sont un équilibre en solution et donc se forment et se défont sans arrêt. Ainsi, on peut supposer que la pénétration du HA-PBA se fait progressivement, lorsqu'une liaison a lieu, une autre fonction PBA de la même chaîne de HA-PBA peut interagir plus en profondeur dans le gel sur des diols situés à proximité. La probabilité de rencontre peut être favorisée par le premier point d'ancrage qui garde la chaîne de HA-PBA à proximité de la chaîne de microgel. Le caractère dynamique permet de procéder à un avancement de proche en proche en profondeur dans le gel, au fur et à mesure que les liaisons se font et se défont.

Lors du rinçage du milieu avec du tampon PBS, la fluorescence due à l'ARS est toujours observée, les interactions entre le HA-PBA et les diols de la matrice de gel ne sont pas réversibles. La concentration en HA-PBA n'a pas besoin d'être maintenue constante dans le milieu.

3.3.4.4 Application au confinement de la fluorescéine

Pour connaître la capacité de confinement des systèmes matrice de Dex-Ma/macromolécule de HA-PBA les microgels sont d'abord chargés par incubation dans une solution de fluorescéine 0,1 wt% (Figure 27 a à c). En rinçant le microgel avec du tampon PBS, la fluorescence est perdue après quelques minutes. Si à l'inverse, on introduit dans le milieu une solution concentrée de HA-PBA à 0,1 wt % soit 2,6 mmol/L, le rinçage du microgel par substitution du milieu extérieur par du tampon PBS n'est pas suivi d'une perte de fluorescence (Figure 27 d à f). Une fois l'encapsulation constatée, du rouge alizarine est introduit dans le milieu pour avoir une concentration finale de 0,17 mmol/L et l'immobilisation du HA-PBA est vérifiée par fluorescence

(Figure 27 f). Les interactions du HA-PBA avec le microgel de dextran sont donc à l'origine du blocage de la fluorescéine dans la matrice.

On constate que, comme pour les microgels non chargés, l'ARS se distribue sur tout le volume du gel, et n'est pas confiné à la périphérie, (Figure 27 f). Cependant, la fluorescéine est bien encapsulée sur tout le volume du gel (Figure 27 e). Les microgels ne sont pas contractés par ajout de HA-PBA, peut-être du fait de leur rigidité importante, ce qui serait en accord avec leur faible porosité. La présence de HA-PBA peut entraîner une complexation avec les fonctions diols des chaînes de dextran, et ainsi boucher la porosité en créant des liaisons PBA/diols entre les chaînes de la matrice.

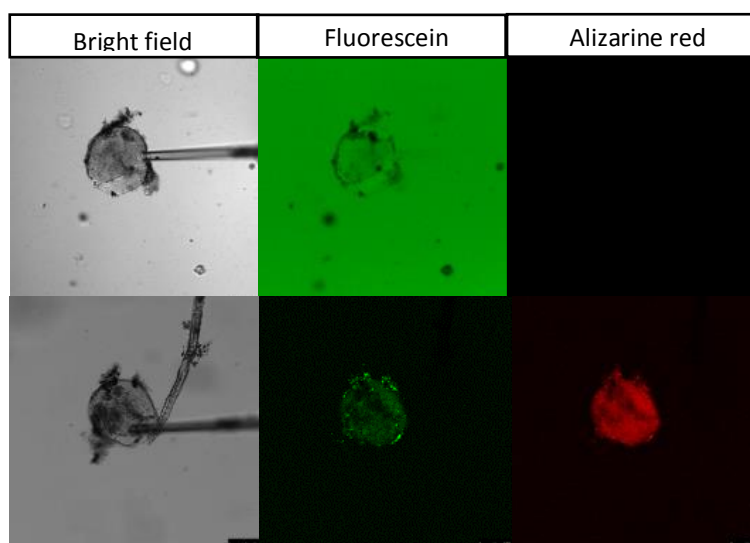


Figure 27 : Encapsulation de fluorescéine par obturation des pores d'un gel de dextran par une macromolécule de HA-PBA. Image d'un microgel de Dex-Ma₁₀ en transmission a, et d) et en fluorescence par CLSM b et e) fluorescence de la fluorescéine à $\lambda=512$ nm c et f) fluorescence de l'ARS à $\lambda=596$. Images a à c chargement en fluorescéine. Images d à f rinçage du milieu après ajout de HA-PBA 0,1 wt% (2,6 mmol/L) et après ajout d'ARS (0,17 mmol/L).

3.3.4.5 *Relargage contrôlé de la protéine d'intérêt*

Comme discuté dans le chapitre bibliographique, les fonctions acides phénylboroniques ont la capacité de se lier à des fonctions diols, et différentes constantes d'association entre les partenaires ont été déterminés. [22]. Il a ainsi été montré que la liaison du fructose avec les fonctions PBA était très favorable en raison de constantes d'association élevées. Cette propriété est utilisée pour essayer d'entraîner la dissociation des fonctions PBA de la macromolécule HA-PBA avec les fonctions diols de la matrice de gel, de manière à désobstruer les pores et ainsi libérer la fluorescéine par diffusion. Ainsi, le milieu contenant le microgel chargé en fluorescéine et contenant l'ARS introduit précédemment est rincé par du PBS contenant 20 mM de fructose dans du PBS en présence d'ARS, en utilisant la pompe péristaltique. Le fructose est donc introduit en large excès de manière à favoriser un détachement simultané du maximum de points de liaisons PBA/diols, la macromolécule contenant 1,05 mmol/L de fonctions PBA. Cependant, même après des temps très longs, de 1h de rinçage, la fluorescéine est toujours présente à l'intérieur du gel, montrant l'inefficacité du détachement des macromolécules de HA-PBA. Il est possible qu'en raison de la longueur de chaîne de la

macromolécule de HA-PBA et de son taux de fonctionnalisation en PBA important, un détachement simultané des différents points d'ancrage soit peu probable. Ainsi, malgré le caractère dynamique et réversible des liaisons PBA/diols, la macromolécule reste toujours partiellement attachée à la matrice de gel empêchant le relargage de la fluorescéine. Il est envisageable de moduler ses deux paramètres pour déclencher le relargage par ajout de fructose. Cependant, pour des macromolécules trop courtes les phénomènes de pontages ne seraient pas favorisés et pour de faibles taux de fonctionnalisation, le confinement de la molécule d'intérêt pourrait ne plus être assuré.

3.4 Conclusion intermédiaire

Nous avons développé une méthode générique pour encapsuler des protéines dans des gels, quand elles n'interagissent pas avec la matrice de gel. Pour ce faire, les protéines sont introduites par incubation dans des microgels dont la porosité est assez large pour permettre le chargement par diffusion. Dans un deuxième temps, une macromolécule qui interagit avec la matrice de gel est introduite dans le milieu. Elle est assez longue pour créer plusieurs ponts entre les chaînes pour une macromolécule. Ces pontages colmatent les pores de la matrice de gel et emprisonnent la protéine d'intérêt dans la structure complexée. Nous avons ainsi montré que des interactions électrostatiques ou des interactions plus spécifiques peuvent être utilisées. Le relargage de l'espèce peut être induit par la modification des paramètres physicochimiques (salinité, pH) dans le cas des interactions électrostatiques ou par l'ajout de molécules spécifiques tel que des enzymes qui dégradent les macromolécules qui confinent les protéines d'intérêts. L'utilisation de monosaccharides comme le fructose, pouvant dissocier les complexes macromolécules/microgels par compétition entre les liaisons HA-PBA/diols de la matrice et les liaisons HA-PBA/monosaccharides peut être considérée comme déclencheur de la libération de la protéine. Cependant, nous avons montré que le relargage n'avait pas lieu en présence de fructose seul, pour le système étudié. Il serait possible de moduler les propriétés de la macromolécule de HA-PBA notamment la longueur de chaîne et le taux de substitution. De plus, pour libérer une protéine comme l'insuline sur plusieurs cycles de manière réversible en fonction de la glycémie, la macromolécule devrait également être liée de manière covalente au gel, pour se détacher par ajout de monosaccharides, tout en restant à proximité du gel. Enfin, les conditions de dégradation des chaînes de HA modifiées par des fonctions PBA ne sont pas triviales pour le cas des précurseurs HA mis en forme sous forme de microgels. Une étude de la dégradation des macromolécules libres et liées aux microgels serait nécessaire. Enfin, des microgels de dextran moins réticulés pourraient être synthétisés.

4 Conclusion

Nous avons montré que la technique choisie, c'est-à-dire l'étude des interactions entre des gels à l'échelle microscopique et des protéines modèles par microscopie optique était pertinente et permettait d'obtenir de nombreuses informations sur les systèmes. Différents paramètres sont de première importance tels que la porosité des microgels qui impacte la distribution des protéines, ou leur réticulation qui impacte leur rigidité

et donc leur capacité à se contracter ou à gonfler. Les interactions peuvent être mises en avant, en chargeant des espèces fluorescentes, ou en étudiant les variations de gonflement de microgels peu rigides. Dans le cas où les protéines à encapsuler interagissent avec les matrices de gel, l'accès à l'intérieur des pores de la matrice ainsi que sa dégradation peuvent être inhibés. Les interactions peuvent être de nature électrostatiques, hydrophobes ou plus spécifiques. Dans le cas des protéines chargés n'interagissant pas avec les matrices de gel, des stratégies de confinement peuvent être mises en place pour encapsuler la protéine en rajoutant dans le milieu une macromolécule qui interagit avec la matrice de gel et en bouche les pores. Le relargage peut être déclenché par dégradation enzymatique de la macromolécule ou par son détachement. Nous avons montré que des interactions électrostatiques ou mettant en jeu des fonctions PBA et diols peuvent permettre le confinement de protéines. Cependant, pour les macromolécules utilisées le détachement en fonction du taux de sucre n'a pas pu être réalisé. Le design de la macromolécule pourrait être modifié pour optimiser ses systèmes. Enfin les matrices de gels de HA-MA-PBA interagissent avec les molécules de dextran et d'insuline. Nous avons montré de manière qualitative, que l'interaction est modulable par l'ajout de fructose dans le milieu, indiquant qu'elle met probablement en jeu les fonctions PBA des matrices de gel. Ces propriétés peuvent être utilisées pour encapsuler et relarguer l'insuline de manière sensible au glucose en vue du développement d'un traitement pour le diabète de type 1. Une étude quantitative de l'encapsulation et du relargage dans des gels de HA-MA-PBA est menée dans le chapitre suivant.

Références :

- [1] J. Pawley, *Handbook of confocal microscopy*, Plenum Pre. New-York, 1995.
- [2] S. V Ghugare *et al.*, "Structure and Dynamics of a Thermoresponsive Microgel around Its Volume Phase Transition Temperature," *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, pp. 10285–10293, 2010.
- [3] M. Kim, W. G. Chen, J. W. Kang, M. J. Glassman, K. Ribbeck, and B. D. Olsen, "Artificially Engineered Protein Hydrogels Adapted from the Nucleoporin Nsp1 for Selective Biomolecular Transport," *Adv. Mater.*, vol. 27, pp. 4207–4212, 2015.
- [4] S. V Ghugare *et al.*, "Structural Investigation on Thermoresponsive PVA / Poly (methacrylate- co - N -isopropylacrylamide) Microgels across the Volume Phase Transition," *Macromolecules*, vol. 44, pp. 4470–4478, 2011.
- [5] S. V Ghugare, E. Chiessi, B. Cerroni, M. T. F. Telling, V. Garcia Sakai, and G. Paradossi, "Biodegradable dextran based microgels: a study on network associated water diffusion and enzymatic degradation," *Soft Matter*, vol. 8, pp. 2494–2502, 2012.
- [6] S. G. Kupal, B. Cerroni, S. V Ghugare, E. Chiessi, and G. Paradossi, "hyaluronic acid microgels based on chemo-selective chemistry Biointerface properties of core-shell poly (vinyl alcohol) -hyaluronic acid microgels based on chemo-selective chemistry," *Biomacromolecules*, 2012.
- [7] A. Go and P. Hansson, "Shrinking Kinetics of Polyacrylate Gels in Surfactant Solution," *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, pp. 9203–9213, 2003.
- [8] W. Shafer, *Antimicrobial peptides and human disease*, Springer. 2006.
- [9] S. B. Fonseca, M. P. Pereira, and S. O. Kelley, "Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 11, pp. 953–964, 2009.
- [10] J. Tamsamani, P. Vidal, and J. Tamsamani, "The use of cell-penetrating peptides for drug delivery," *Drug Discov. Today*, vol. 9, no. 23, pp. 1012–1019, 2004.
- [11] B. . Jacobson and D. Branton, "Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads," *Science (80-)*, vol. 195, no. 4275, p. 302 304, 1977.
- [12] H. Bysell, P. Hansson, and M. Malmsten, "Transport of poly-l-lysine into oppositely charged poly(acrylic acid) microgels and its effect on gel deswelling," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 323, no. 1, pp. 60–69, 2008.
- [13] G. Eichenbaum, P. Kiser, S. Simon, and D. Needham, "pH and Ion-Triggered Volume Response of Anionic Hydrogel Microspheres," *Macromolecules*, vol. 31, no. 15, pp. 5084–93, 1998.
- [14] V. a Kabanov, V. B. Skobeleva, V. B. Rogacheva, and a B. Zezin, "Sorption of Proteins by Slightly Cross-Linked Polyelectrolyte Hydrogels: Kinetics and Mechanism," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 4, pp. 1485–1490, 2004.
- [15] H. Bysell and M. Malmsten, "Visualizing the Interaction between Poly- L -lysine and Poly (acrylic acid) Microgels Using Microscopy Techniques : Effect of Electrostatics and Peptide Size," *Langmuir*, vol. 22, no. 12, pp. 5476–5484, 2006.
- [16] G. M. Eichenbaum, P. F. Kiser, A. V. Dobrynin, S. A. Simon, and D. Needham, "Investigation of the swelling response and loading of ionic microgels with drugs and proteins: the dependence on cross-link density," *Macromolecules*, vol. 32, no. 15, pp. 4867–4878, 1999.
- [17] A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 18–23, 2012.
- [18] S. Matsui *et al.*, "Small-Angle X-ray Scattering Study on Internal Microscopic Structures of Poly(N -isopropylacrylamide- co -tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Complex Microgels," *Langmuir*, vol. 31, p. 150623124807009, 2015.
- [19] H. Lenormand, B. Deschrevel, F. Tranchepain, and J. Vincent, "Electrostatic interactions between hyaluronan and proteins at pH 4: How do they modulate hyaluronidase activity," *Biopolymers*, vol. 89, no. 12, pp. 1088–1103, 2008.
- [20] H. Lenormand, F. Tranchepain, B. Deschrevel, and J. Vincent, "The hyaluronan – protein complexes at low ionic strength : How the hyaluronidase activity is controlled by the bovine serum albumin," *Matrix Biol.*, vol. 28, no. 6, pp. 365–372, 2009.
- [21] R. Widenbring and M. Malmsten, "Chain and Pore-Blocking Effects on Matrix Degradation in Protein- Loaded Microgels," *Biomacromolecules*, vol. 15, pp. 3671–3678, 2014.

- [22] G. Springsteen and B. Wang, "A detailed examination of boronic acid-diol complexation," *Tetrahedron*, vol. 58, no. 26, pp. 5291–5300, 2002.
- [23] R. Yin, J. Han, J. Zhang, and J. Nie, "Glucose-responsive composite microparticles based on chitosan, concanavalin A and dextran for insulin delivery," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 76, no. 2, pp. 483–488, 2010.
- [24] B. G. De Geest, M. J. McShane, J. Demeester, S. C. De Smedt, and W. E. Hennink, "Microcapsules ejecting nanosized species into the environment," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 44, pp. 14480–14482, 2008.
- [25] P. Díez *et al.*, "Toward the design of smart delivery systems controlled by integrated enzyme-based biocomputing ensembles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 25, pp. 9116–9123, 2014.
- [26] M. Chen, C. Huang, C. He, W. Zhu, Y. Xu, and Y. Lu, "A glucose-responsive controlled release system using glucose oxidase-gated mesoporous silica nanocontainers," *Chem. Commun.*, vol. 48, no. 76, p. 9522, 2012.
- [27] Y. Tang and C. Li, "Preparation of Novel Amphiphilic Copolymer Microspheres and Their Drug-Release and Glucose-Sensitive Properties," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 107, no. 7, pp. 3848–3852, 2008.
- [28] A. Sinha, A. Chakraborty, and N. R. Jana, "Dextran-gated, multifunctional mesoporous nanoparticle for glucose-responsive and targeted drug delivery," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 24, pp. 22183–22191, 2014.
- [29] C. Wang and K. C. Tam, "Interaction between Polyelectrolyte and Oppositely Charged Surfactant : Effect of Charge Density," vol. 108, pp. 8976–8982, 2004.
- [30] H. Bysell and M. Malmsten, "Interactions between Homopolypeptides and Lightly Cross-Linked Microgels," *Langmuir*, vol. 25, no. 1, pp. 522–528, 2009.
- [31] J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, and B. Wang, "The relationship among pK_a , pH, and binding constants in the interactions between boronic acids and diols — it is not as simple as it appears," *Tetrahedron*, vol. 60, pp. 11205–11209, 2004.
- [32] W. N. E. Van Dijk-Wolthuis, O. Franssen, H. Talsma, V. Steenberg, K. Den Bosch, and W. E. Hennink, "Synthesis characterization and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran," *Macromolecules*, vol. 28, pp. 6317–6322, 1995.

Chapitre 5 :

**Etude quantitative de la libération
d'insuline encapsulée dans des
macrogels d'acide hyaluronique.**

Ce chapitre est consacré à l'analyse quantitative des performances d'encapsulation et de libération d'insuline pour les hydrogels développés dans le cadre de ce projet industriel, en collaboration avec le CERMAV à Grenoble. Pour des raisons analytiques, nous avons choisi de travailler à l'échelle des hydrogels macroscopiques, dits macrogels. Ceux-ci ont la capacité d'encapsuler des quantités plus importantes d'insuline, ce qui permet de mieux discriminer leurs performances, aussi bien du point de vue des taux encapsulés que des cinétiques de libération. La synthèse des macrogels est également plus simple à mettre en œuvre. Ce chapitre fait suite aux résultats obtenus sur les microgels où des gels simples de HA-MA-PBA ont montré des propriétés prometteuses. L'obtention de ces résultats sur les microgels de HA-MA-PBA de première génération, démontrant leur capacité à retenir l'insuline et à la libérer par l'action du fructose, ont suscité notre intérêt, menant à leur étude quantitative. Une seconde famille de gels, les gels de seconde génération est également étudiée dans ce chapitre, elle consiste en des gels doublement réticulés mettant en jeu des partenaires HA-PBA et HA-Maltose. Le chapitre est présenté d'un point de vue chronologique, les gels de seconde génération sont évalués en premier, sans a priori sur les capacités d'encapsulation/relargage.

Les méthodes et choix analytiques seront discutés. La quantification de l'insuline encapsulée et libérée est faite par HPLC ou par spectroscopie de fluorescence. La mise en évidence de certaines propriétés communes aux deux types d'hydrogels a suscité une partie complémentaire, visant à étudier les propriétés de chaînes d'acide hyaluronique modifiées par des PBA en solution.

1 Préparation de macrogels doublement réticulés de HA-PBA/HA-Maltose

Les premiers macrogels étudiés sont préparés à partir de précurseurs HA-PBA et HA-Maltose. Ces systèmes sont dits doublement réticulés. En effet, ils sont réticulés de manière permanente pour assurer le maintien de la stabilité mécanique des gels, et de manière dynamique en raison de la présence de fonctions PBA (HA-PBA) et de fonctions diols (HA-Maltose) sur les chaînes de HA. Ainsi, les liaisons dynamiques peuvent se faire et se défaire en fonction de la composition du milieu, tout en conservant la structure et l'intégrité des gels. La porosité de ces systèmes est donc modulable en fonction du taux de réticulation qui est dépendant des liaisons permanentes et des liaisons dynamiques HA-PBA/ HA-Maltose. L'intérêt de ces systèmes est d'avoir une porosité modulable pour encapsuler et relarguer l'insuline de manière dépendante à la glycémie.

Il est à noter que jusqu'à présent, seuls les hydrogels dynamiques avaient fait l'objet d'une étude détaillée. Ils semblaient prometteurs de par l'évolution des propriétés mécaniques en présence de glucose, et ce, à partir de dérivés boroniques peu fonctionnalisés.

1.1 Précurseurs HA-PBA et HA-Maltose

Les précurseurs utilisés ont été synthétisés par Robin Poirot, doctorant sous la direction de Pr. Rachel Auzély-Velty au CERMAV [1]. Le HA-PBA a un degré de substitution de 15 % en PBA. La chaîne de HA est également modifiée pour introduire des fonctions pentenoates pendantes pour réticuler le gel de manière permanente. La structure du précurseur est présentée en Figure 1. Le degré de substitution en diène pendant est de 20 %.

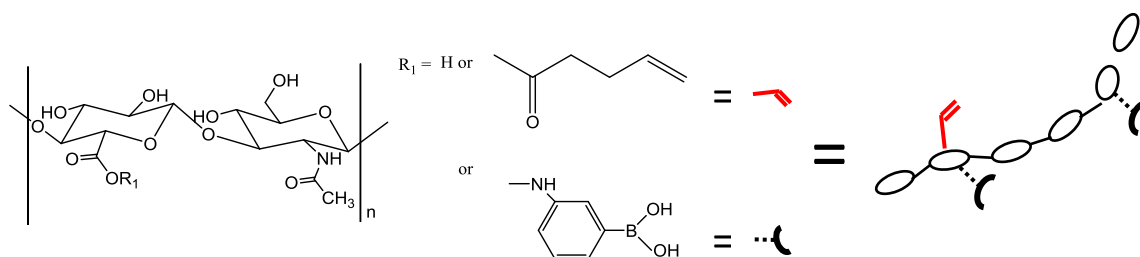


Figure 1: Représentation schématique de la structure des chaînes de HA-PBA.

Pour la synthèse de précurseurs HA-Maltose, le maltose est introduit à hauteur de 11 %. De plus, 14 % de fonctions pentenoates sont introduites pour réticuler les gels. [2]. La structure du HA-Maltose est présentée ci-dessous (Figure 2).

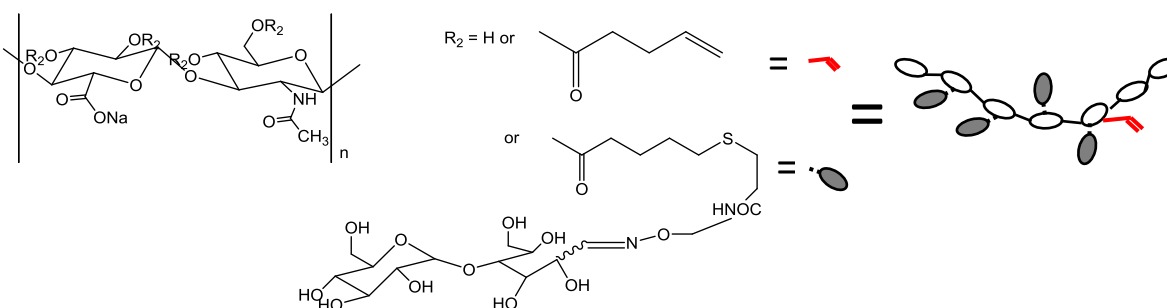


Figure 2: Représentation schématique de la structure des chaînes de HA-Maltose.

1.2 Présentation de la liaison PBA/Maltose : mécanisme

Le simple mélange des deux précurseurs HA-PBA et HA-maltose permet l'obtention d'un réseau, via la formation d'esters de boronate formant les nœuds de réticulation, comme décrit dans le chapitre 1, Figure 17. En l'absence de la liaison permanente, dans des conditions de dissociation des liaisons PBA, la stabilité des gels ne serait pas maintenue lors de l'immersion des gels en solution, en raison de la bonne solubilisation des précurseurs. Afin de mettre en évidence la dissociation des liaisons, le rapport des valeurs de viscosités complexes pour des mélanges de précurseurs HA-PBA/HA-Maltose sans glucose et après l'ajout de quantités successives croissantes de glucose dans le milieu est présenté

Figure 3. Pour les différents ratios [PBA]/[maltose] testés, une baisse des rapports de viscosité est observée, pour des concentrations de glucose croissante jusqu'à 50 mM. Ce résultat indique que la viscosité des

mélanges de précurseurs diminue en présence de glucose montrant que les liaisons PBA/Maltose sont bien sensibles au glucose, elles se dissocient, le réseau polymérique, se desserre. Pour les deux ratios [PBA/Maltose] la perte de viscosité n'est pas la même, montrant que la réponse au glucose peut être modulée.

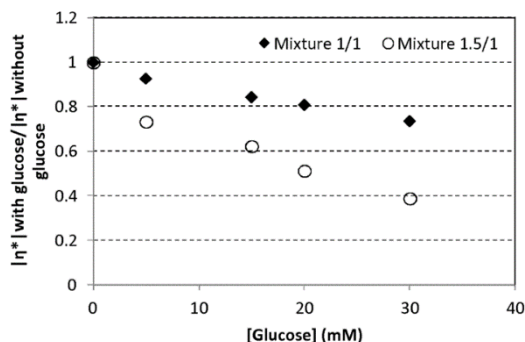


Figure 3 : Variation de $|\eta^*|_{\text{avec glucose}} / |\eta^*|_{\text{sans glucose}}$ (valeurs à 1 Hz) en fonction de la concentration en glucose pour des mélanges HA-PBA/HA-Maltose avec différents ratios [PBA]/[Maltose] (1/1 et 1,5/1). La concentration en polymère est de $C_p = 15$ g/L. Les mesures sont réalisées dans du tampon HEPES 0,01 M à pH 7,4 et à 37°C. Extrait de [3]

1.3 Formation du réseau permanent

Les précurseurs peuvent former des liaisons chimiques entre les deux précurseurs grâce à la présence de réticulant tel que le poly (éthylène glycol)-bis (thiol) (PEG(SH)₂) (Figure 4). La réaction de couplage thiol-ène des deux précurseurs est menée par irradiation UV centrée à $\lambda = 365$ nm pendant 5 min à pH 4 dans une solution saline en présence d'amorceur Irgacure 2959, et d'un agent réticulant. Le degré de réticulation peut être contrôlé par la quantité de fonctions thiols introduite par rapport aux fonctions diènes pendantes. Le réticulant est introduit pour avoir 100 % ou 50 % des pentenoates engagés dans la réticulation.

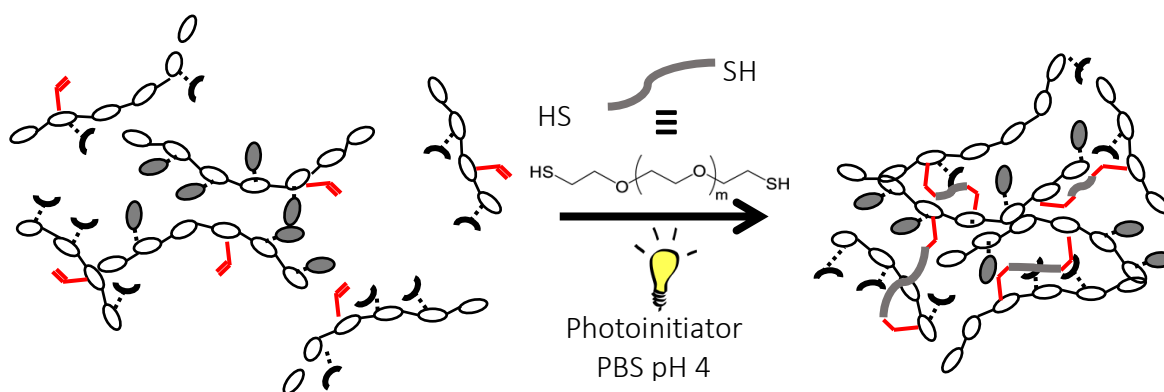


Figure 4: Représentation schématique de la formation de liaisons permanentes entre les précurseurs HA-PBA et HA-Maltose.

La création de cette liaison permanente assure une stabilité mécanique des gels en réticulant les chaînes de HA entre elles.

1.4 Composition et préparation des gels

Une concentration totale en précurseurs de $C_p=1,5$ wt% est solubilisée. Les quantités de HA-PBA et de HA-Maltose sont introduites pour avoir une quantité équivalente de pentonate libre provenant des précurseurs HA-PBA et des précurseurs HA-Maltose. Le réticulant est introduit pour avoir une réticulation de 50 ou 100% en PEG (SH)₂ et la photopolymérisation est amorcée sous UV en présence d'Irgacure 2959. Chaque gel a un volume de 150 μ l et est préparé par moulage dans des contenants cylindriques. Plusieurs séries ont été préparées, la première, par nos collaborateurs du CERMAV, a été irradiée 10 min à 40 mW/cm² en milieu PBS acidifié à pH 4 [1]. Les macrogels obtenus sont cylindriques de diamètre 6 mm et de hauteur 5 mm. La seconde série est préparée au laboratoire dans du tampon PBS à pH 7,4, en utilisant des puits cylindriques de dimension 7 mm et 4 mm pour respectivement le diamètre et la hauteur des puits. Après polymérisation, le démoulage des microgels est facilité par la rétraction des gels dans une solution saline NaCl 1 M dans les micropuits. Les macrogels sont purifiés par dialyse dans du tampon PBS en présence d'azide de sodium à 0,01 M ajouté comme conservateur.

1.5 Propriétés de gonflement des gels doublement réticulés

1.5.1 Protocole de détermination des variations de gonflement

Les gels étudiés ont été préparés à pH 4 et sont rehydratés dans un excès de tampon PBS à pH 4. Ils sont pesés après réception. Les valeurs de masses obtenues à pH 4 à la réception des gels sont considérées comme masses de référence ou masse de gel initial pour la détermination des variations de gonflement. Différentes solutions d'immersion sont sélectionnées pour étudier les variations de gonflement des macrogels. Chaque expérience est dupliquée. On étudie les paramètres suivants :

- l'influence de la présence de fructose : comparaison entre un milieu sans fructose et avec 20 mM
- l'influence du taux de réticulation : pour des gels de deux taux de réticulation, 50 et 100 % en PEG (SH)₂,
- l'influence de la température, à 25 et 37°C.

Les expériences sont menées en présence et en absence d'insuline.

Chaque microgel est immergé dans 2 mL de solution. A différents temps, après l'immersion dans les différentes solutions, les gels sont précautionneusement retirés des solutions d'immersion. L'excès de solution entraîné, est retiré délicatement à l'aide d'un papier filtre, et les gels sont pesés.

Le taux de gonflement est défini comme :

$$Q = \frac{\text{Masse de gel dans les conditions de l'étude}}{\text{masse de gel initiale}}$$

1.5.2 Etude du gonflement des macrogels en absence d'insuline

L'évaluation des variations de gonflement obtenues est présentée en Figure 5. Les gels sont plus gonflés à pH 4 qu'à pH 7.4. Ceci montre que les liaisons entre les fonctions PBA et maltose sont dissociées. Les gels sont donc moins réticulés. Cependant, on constate que la réticulation permanente joue bien son rôle. En effet, les gels possédant le plus de réticulations permanentes sont moins gonflés. Les variations relatives de gonflement des gels à 25°C lors du passage de pH 4 à pH 7,4 correspondent à une contraction de -13 % et -6 % pour les taux de réticulation respectifs de 50 et 100 % en PEG(SH)₂. Les taux de réticulation élevés limitent l'amplitude de variation de volume des gels lors des changements de milieu.

Les macrogels sont immergés dans des milieux tampon PBS à pH 7,4 avec et sans fructose. Le monosaccharide choisi est le fructose qui en raison d'une constante d'association avec les boronates élevée, amplifie ses capacités de liaison avec la matrice de gel. Il est introduit en excès à 20 mM. La mesure de variation de poids des gels est réalisée afin de déterminer l'impact du fructose sur les taux de gonflement des gels portant des fonctions PBA. Les mesures sont faites pour les deux degrés de réticulation à 25°C et 37°C (Figure 5).

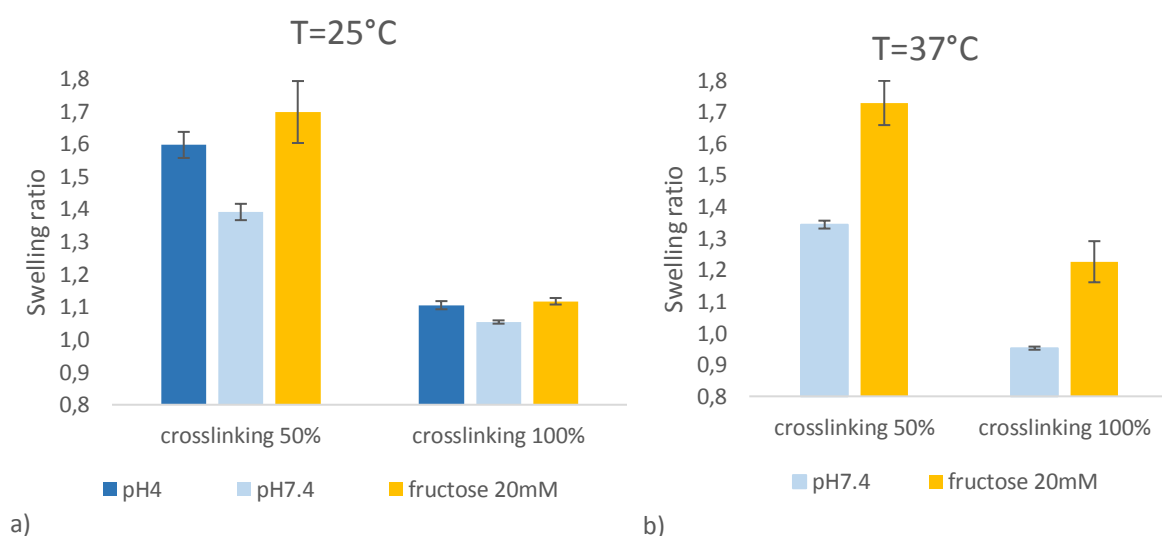


Figure 5: Variations de gonflement normalisées par la masse de gel à leur réception des macrogels observées par immersion des gels dans des solutions de tampon ou de fructose à température a) T=25°C, b) T=37°C.

En présence de fructose les macrogels sont très gonflés pour les petits taux de réticulation. Leur volume peut atteindre +70% du volume initial. Pour les gels les plus réticulés le gonflement est limité à +15 % en raison des contraintes du réseau permanent. La formation de liaisons entre les fonctions maltose et PBA est en compétition avec la formation de liaisons de complexation entre le fructose et les groupements PBA. La complexation du fructose est plus favorable, et entraîne la rupture de la réticulation secondaire des macrogels induisant son gonflement. La sensibilité au fructose est plus importante à 37°C car le taux de gonflement relatif (par rapport au gel dans un tampon de même pH sans fructose) est de +29 % en présence de fructose,

pour les deux taux de réticulation de 50 % et 100 % en PEG (SH)₂. De plus l'effet de la réticulation n'est pas visible. A l'inverse, les taux de gonflements relatifs des gels en présence de fructose par rapport au gel dans du PBA à 25°C sont plus faibles de +22 et +6 % pour les gels de réticulation 50 % et 100 % en PEG (SH)₂. La densité de réticulation affecte le gonflement des gels : ils gonflent moins quand ils sont plus réticulés.

Le comportement des gels en termes de gonflement, impacte la tenue mécanique des gels lors des différentes étapes de chargement et de libération en protéines. En effet ils sont préparés et réhydratés à pH 4. Puis dans les étapes de purification, de chargement et de relargage en protéines, ils sont immergés dans du tampon PBS à pH 7,4. Enfin lors de l'étude de la libération des protéines, le milieu peut contenir du fructose. La stabilité mécanique des gels évolue donc lors des différentes étapes de l'étude. Après démoulage, à pH 4 ils sont mous et fragiles car gonflés. Lors des étapes à pH 7,4, ils sont suffisamment stables pour être manipulés, et chargés en protéines car ils sont plus contractés. Lors de l'étape de libération les gels immergés dans du tampon contenant le fructose sont très gonflés et très fragiles.

1.5.3 Effet de la présence d'insuline sur le gonflement des macrogels

Les macrogels sont mis à incuber en présence d'insuline humaine à 1 mg/mL dans du tampon PBS pendant 5 jours à l'abri de la lumière. L'effet de la présence d'insuline sur le gonflement des gels est étudié pour les deux taux de réticulation (Figure 6).

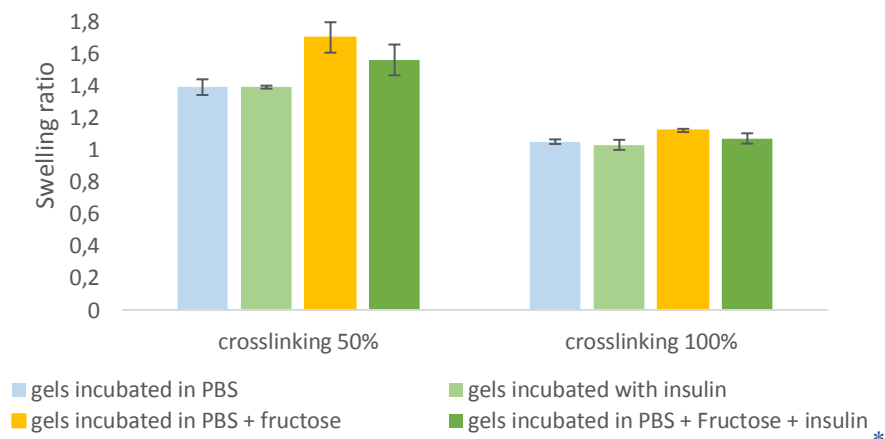


Figure 6: Comparaison des taux de gonflements normalisés de gels incubés dans du PBS et dans du PBS contenant de l'insuline humaine à 29 UI/mL pour deux taux de réticulations 50 et 100 % en PEG (SH)₂.

La présence d'insuline n'affecte pas le taux de gonflement des gels. Cette observation montre qu'il n'y a pas d'interactions significatives entre l'insuline humaine et les gels de cette composition entraînant la contraction de la matrice. En présence de fructose, les gels chargés en insuline gonflent, mais légèrement moins que les gels non chargés. L'insuline peut gêner l'accès aux fonctions PBA.

2 Etude des gels doublement réticulés chargés en insuline

Cette partie de l'étude a pour but de quantifier l'insuline encapsulée dans les macrogels de HA-PBA/HA-Maltose décrits précédemment et son relargage dans des milieux aqueux simples mais aussi en milieu plasmatique proche des conditions physiologiques.

2.1 Encapsulation de l'insuline

La protéine utilisée pour cette étude est l'insuline humaine. Elle est non fluorescente, et soluble à pH acide car son point isoélectrique est de 5,5. Une solution mère d'insuline à 50 mg/mL soit 1441 UI/mL est préparée dans une solution d'acide chlorhydrique à $5 \cdot 10^{-2}$ M. Cette solution est diluée 50 fois dans du tampon PBS à pH 4 pour obtenir un milieu d'incubation contenant 1 mg/mL soit 29 UI/mL d'insuline. Les macrogels, issus de l'étape de synthèse à pH 7,4, sont chargés par incubation dans 2 mL de solution d'incubation à température ambiante pour une durée de 5 jours à l'abri de la lumière.

2.2 Méthode de dosage par chromatographie liquide

2.2.1 Présentation du protocole de détection de l'insuline humaine par chromatographie liquide HPLC

2.2.1.1 Présentation de la méthode de dosage de l'insuline humaine par HPLC couplée à une détection par spectroscopie UV ou par spectroscopie de masse

Dans cette première étude quantitative, nous avons choisi la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), qui permet de doser l'insuline avec une bonne sensibilité, tout en séparant d'éventuels autres composés présents dans le milieu. Dans notre étude, nous nous focalisons dans un premier temps sur la libération de l'insuline à partir des gels dans des milieux aqueux simples. Nous utiliserons donc une méthode décrite dans la littérature sans chercher à optimiser le temps d'élution de l'insuline vis-à-vis d'autres espèces du milieu [4]. De même, le détecteur UV suffit pour avoir une sensibilité de l'ordre de 0,2 mg/mL, soit 5 UI/mL. Le détail de la méthode ainsi que le protocole sont décrits en partie expérimentale. L'insuline dans les conditions choisies (débit de la phase mobile et gradient d'élution) a un temps de rétention de 3 minutes.

Pour aller plus loin, une série d'essais a été menée avec un autre mode de détection, la spectroscopie de masse, afin de pouvoir analyser l'insuline dans des milieux plus complexes. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Dr. Fabien Xurueb, au laboratoire INSERM – Biologie des maladies cardiovasculaires.

2.2.1.2 Protocole de l'étude cinétique de libération de l'insuline en milieu aqueux

Les macrogels sont mis à incuber à température ambiante et à l'abri de la lumière dans des solutions de 2 mL d'insuline à 29 UI/mL dans du tampon PBS à pH 4 afin de charger l'insuline dans les macrogels par diffusion. Ils sont pesés comme décrit précédemment en fin de processus d'incubation. Enfin ils sont placés dans 2,5 mL

de solutions de différentes compositions pour étudier le relargage avec et sans monosaccharide. Afin d'obtenir une différenciation significative, la libération dans du PBS est comparée à la libération dans un excès de fructose à 20 mM.

Enfin, l'étude est menée à température ambiante et à température physiologique de 37°C. Les solutions de relargage étudiées sont :

- PBS pH 7.4, T=25°C
- PBS pH 7.4, fructose 20 mM, T= 25°C
- PBS pH 7.4, T=37°C
- PBS pH 7.4, fructose 20 mM, T=37°C

Chaque composition de solution de relargage est étudiée pour des gels de différentes densités de réticulation de 50 et 100 % en PEG (SH)₂. Chaque expérience est dupliquée. Une fois les macrogels placés dans ces solutions, des prélèvements de 200 µL sont réalisés à différents temps afin d'étudier les cinétiques de libération de l'insuline en fonction du milieu dans lequel se trouve le macrogel (Tableau 1). Le protocole expérimental est résumé Figure 7.

Tableau 1: temps auxquels des prélèvements sont effectués pour suivre la cinétique de relargage de l'insuline en milieu aqueux

T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
0h	1h	2h	4h	10h	24h	34h	48h	96h	168h

Afin d'éviter toute interférence sur la colonne, les prélèvements subissent une étape d'ultrafiltration sur des filtres Amicon ®, dont la membrane a un seuil de coupure de 100 kDa afin d'isoler l'insuline. La centrifugation a lieu pendant 5 min à 13 000 tr/min. Les échantillons sont ensuite stockés à 4°C jusqu'à leur analyse par HPLC.

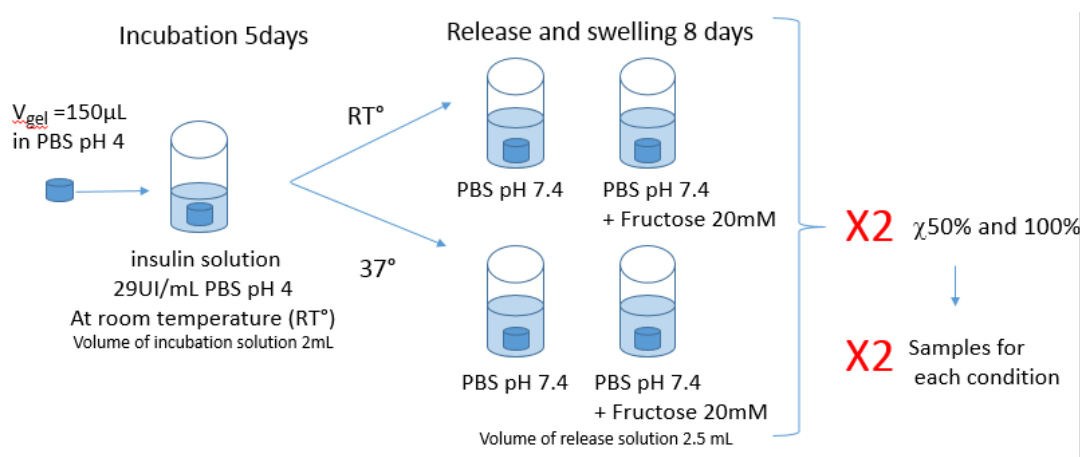


Figure 7: Représentation schématique du procédé de quantification de l'encapsulation et du relargage de l'insuline humaine en milieu aqueux.

2.2.1.3 Tests de contrôle

Plusieurs contrôles sont effectués en parallèle de l'étude de libération de l'insuline humaine de macrogels doublement réticulés. Premièrement, la stabilité de l'insuline dans le temps dans du tampon PBS est suivie.

La concentration d'insuline est choisie à 1,73 UI/mL ce qui correspond à la concentration attendue pour 100% de libération. Enfin, l'effet de la présence d'acide hyaluronique dans une solution contenant l'insuline est également étudiée. Une solution contenant 1,73 UI/mL d'insuline et d'acide hyaluronique 60 kDa $C_p=1,05$ g/L dans du tampon PBS est préparée. Des prélèvements sont réalisés afin de quantifier l'insuline de cette solution après filtration par les filtres Amicon®.

2.2.2 Résultats de l'étude cinétique de libération de l'insuline

2.2.2.1 Etude de l'encapsulation d'insuline humaine

Le chargement en insuline humaine se fait par simple diffusion à travers la matrice des macrogels. Le temps d'incubation est assez long, 5 jours, afin de favoriser la diffusion sur tout le volume du gel. Le milieu d'incubation contient de l'insuline à 29 UI/mL dans du tampon PBS acidifié à pH 4.

Visuellement, les macrogels changent d'aspect avant et après incubation. Les gels, initialement transparents, restent transparents lorsqu'ils sont incubés dans du tampon alors que ceux qui sont incubés dans du tampon contenant l'insuline humaine ont blanchi (Figure 8). L'apparition de cette opacité peut être expliquée par la précipitation de l'insuline dans les matrices de gels. De plus, en présence d'insuline, un précipité blanc est observé à l'interface eau/air (Figure 8).

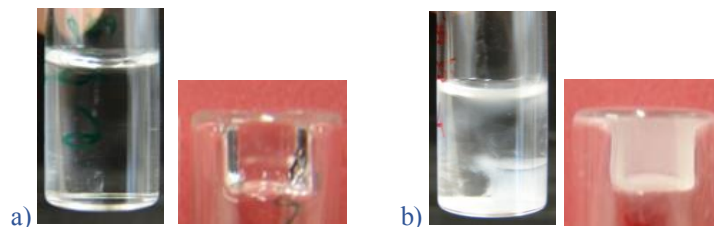


Figure 8: Observation visuelle de la précipitation de l'insuline dans des macrogels doublement réticulés dans leurs solutions d'incubation et après retrait des solutions. Cas de solutions d'incubation de a) tampon PBS, b) de tampon PBS contenant de l'insuline humaine.

Afin de mieux comprendre, le phénomène de précipitation de l'insuline observé, une solution d'acide hyaluronique dans du tampon PBS contenant de l'insuline est préparée et observée après conservation 5 jours à température ambiante à l'abri de la lumière. La solution reste transparente sur toute la durée de l'observation prouvant que l'acide hyaluronique seul ne fait pas précipiter l'insuline humaine. La précipitation pourrait être provoquée par la présence de modifications chimiques sur la chaîne de HA.

Il est possible d'estimer la quantité d'insuline encapsulée dans les macrogels en émettant l'hypothèse que le coefficient de partage de l'insuline entre les macrogels et les solutions d'incubation soit de 1 :1. La quantité d'insuline encapsulée dans chaque macrogel est comprise entre 1,5 et 3 UI en fonction de la taille de chaque macrogel étudié. Cette estimation peut être comparée, à la fraction dosée dans le milieu d'incubation.

2.2.2.2 Etude de la cinétique de relargage de l'insuline humaine

a) Remarque sur l'apparence des macrogels en fin de cinétique

Les macrogels sont ensuite placés dans différentes solutions d'incubation pour 168h et différents prélèvements sont réalisés. En fin de cinétique, les milieux contenant du PBS restent transparents et l'intégrité des macrogels est préservée. On observe la formation d'un précipité blanc à l'intérieur des macrogels (Figure 9 a et b). De plus, les macrogels présents dans les milieux de relargage contenant du fructose sont partiellement dégradés, ils ne présentent plus une forme cylindrique bien définie (Figure 9 c et d). La formation du précipité est beaucoup plus marquée en présence de fructose.

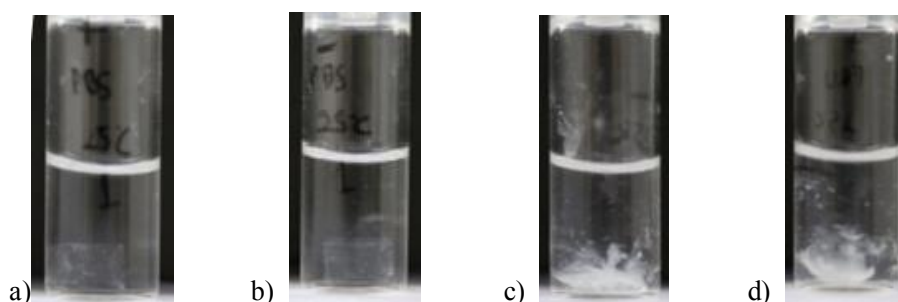


Figure 9: Observation des milieux de relargage et des macrogels immergés en fin de cinétique. a) Gel de réticulation 100% dans du PBS à pH 7.4 b) Gel de réticulation 50% en PEG (SH)₂ dans du PBS à pH 7.4 c) Gel de réticulation 100% en PEG (SH)₂ dans du tampon PBS à pH 7.4 en présence de fructose 20mM d) Gel de réticulation 50% dans du PBS à pH 7.4 en présence de fructose 20 mM.

b) Remarque sur les profils des chromatogrammes

Les prélèvements effectués à différents temps après la mise en incubation des macrogels dans des solutions de relargage de différentes compositions sont suivis de leur analyse par HPLC afin de quantifier l'insuline libérée dans le milieu en fonction du temps. Les solutions de contrôle sont également analysées. La première solution de contrôle contient uniquement de l'insuline en solution dans du tampon PBS. Le chromatogramme correspondant présente un pic unique correspondant à l'insuline dont le temps de rétention est de 3 min (Figure 10).

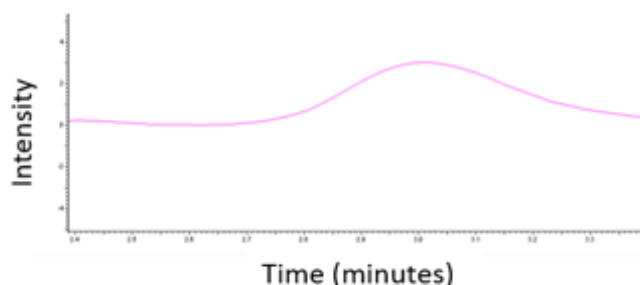


Figure 10: Pic de l'insuline observé pour la solution de contrôle contenant de l'insuline humaine solubilisée dans du tampon PBS.

Les profils obtenus pour les prélèvements effectués dans les solutions de relargage varient en fonction du temps auquel le prélèvement a été effectué (Figure 11).

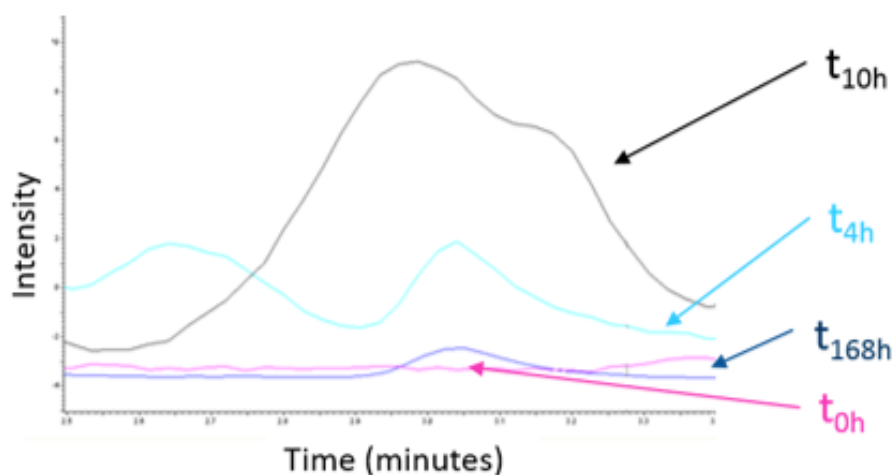


Figure 11: Evolution du profil des chromatogrammes en fonction du temps. Exemple d'un macrogel réticulé à 50 % où la cinétique de relargage de l'insuline humaine est suivie dans du tampon PBS à pH 7,4.

Le premier échantillonnage est fait à $t=0h$ juste après l'immersion du gel dans le milieu de relargage. Les chromatogrammes enregistrés à $t=0h$ ne présentent pas de pics car l'insuline présente dans le gel n'a pas eu le temps de diffuser vers le milieu de relargage. A $t=4h$, un pic pour un temps de rétention de 3 minutes est observé correspond à l'insuline relarguée dans le milieu. Un deuxième pic est présent à plus faible temps de rétention, il correspond à la présence d'une deuxième espèce non identifiée présente en solution. A $t=10h$, l'intensité des pics mesurée est plus importante, montrant que la quantité d'espèces libérée dans le milieu a augmentée. Cependant, les deux pics correspondant à l'insuline et à l'espèce non identifiée sont partiellement superposés, il n'est pas possible de déconvoluer les deux signaux et de quantifier l'insuline relarguée. Enfin à $t=168h$, le pic de l'insuline pour un temps de rétention de 3 minutes est de nouveau observable, tandis que le deuxième pic a disparu de la fenêtre de temps observée. De plus, on observe une baisse significative de l'intensité du signal du pic de l'insuline comparé aux pics à $t=4h$ et $t=10h$. Le pic non identifié peut être expliqué par la présence dans le milieu d'une espèce qui est également relarguée dans le milieu avec le temps. En raison de la présence de ce deuxième pic qui se superpose avec celui de l'insuline, la quantification de cette dernière n'est pas possible avec cette méthode analytique sur les prélèvements réalisés pour des temps intermédiaires.

Les chromatogrammes obtenus pour les prélèvements analysés ont des profils similaires pour les gels indépendamment de leur taux de réticulation ou de leur milieu de relargage (Figure 12).

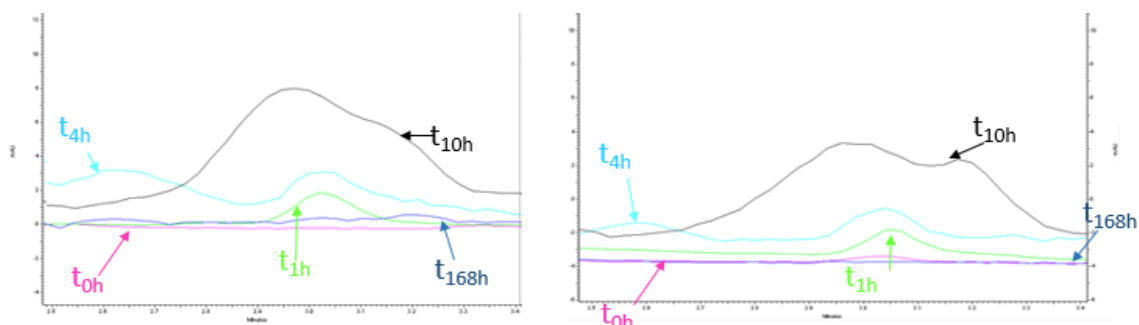


Figure 12: Profil des chromatogrammes obtenus a) pour un gel de réticulation 100 % placé dans du tampon PBS à pH 7,4 b) un gel de réticulation 100 % placé dans du tampon PBS à pH 7,4 en présence de fructose 20 mM à différents temps de prélèvements.

c) Résultats du relargage d'insuline

Les deux solutions de contrôle ont pu être analysées jusqu'à $t=168h$ à température ambiante, les chromatogrammes obtenus ne présentent qu'un seul pic pour un temps de rétention correspondant à celui de l'insuline. La première solution de contrôle, composée d'insuline dans du PBS, reste stable. La concentration en insuline mesurée correspond à une concentration de 1,73 UI/mL (Figure 13). La deuxième solution de contrôle, est composée d'insuline et d'acide hyaluronique. La quantité dosée d'insuline est bien plus faible que la quantité introduite 0,9 UI/mL au lieu de 1,73 UI/mL. Cependant, il est possible que la perte d'une partie de l'insuline présente soit due à un blocage partiel des pores des filtres Amicon® par l'acide hyaluronique en solution. A 37°C les mêmes contrôles sont effectués. La quantité d'insuline quantifiée dans du PBS reste constante sur 50 h.

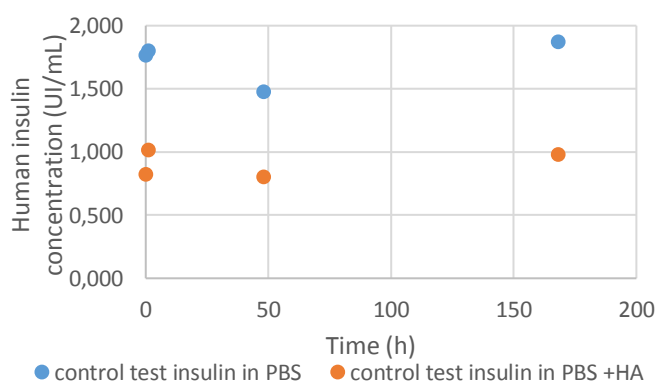


Figure 13: Quantification de l'insuline présente dans les solutions contrôles d'insuline humaine dans du tampon PBS (bleu) et insuline humaine dans du tampon PBS en présence d'acide hyaluronique en solution (orange) à $T=25^{\circ}C$.

Un exemple de profil de libération de l'insuline sur 168h est présenté pour un taux de réticulation de 50 % en PEG (SH)₂ (Figure 14).

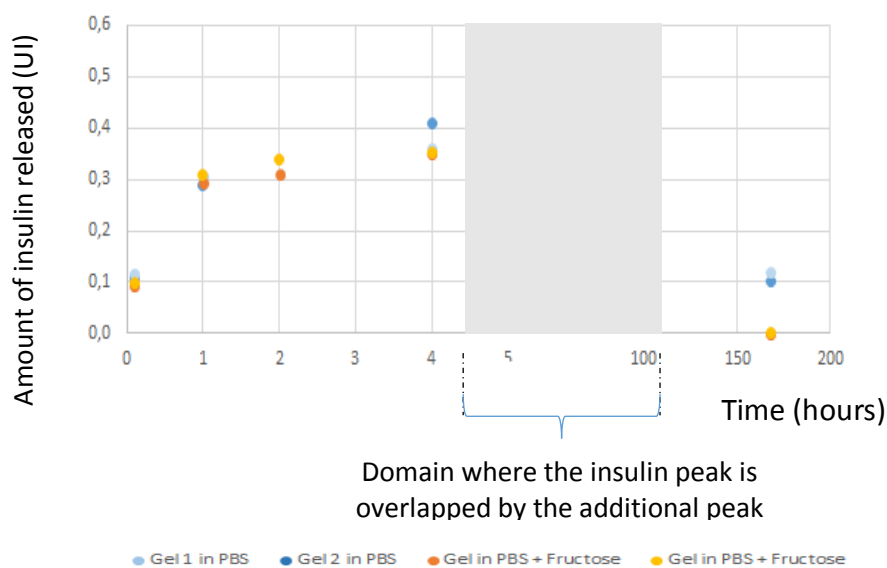


Figure 14: Quantification de l'insuline relarguée pour l'exemple d'un macrogel réticulé à 50 %.

Le taux d'insuline dosé augmente dans le milieu pendant les quatre premières heures, et il approche de zéro au dernier temps de prélèvement à $t=168h$. Cette évolution présente une anomalie majeure : la quantité d'insuline diminue au-delà d'un certain temps, alors qu'elle devrait rester stable si la totalité de l'insuline est libérée ou sinon, continuer à augmenter. De plus, la quantité maximale dosée correspond à $\sim 20\%$ de la quantité encapsulée (sur la base d'une estimation pour un coefficient de partage 1 :1 entre l'hydrogel et la solution). Si notre hypothèse de calcul est fautive, alors il est possible que la totalité de l'insuline soit libérée en 4 h. Cela signifierait qu'on incorpore beaucoup moins d'insuline que prévu. En tout état de cause, la chute ultérieure de la concentration en insuline paraît aberrante.

Notons que la quantité d'insuline relarguée n'est pas plus importante en présence de fructose. De plus, les résultats sont similaires pour les deux taux de réticulation.

A $37^{\circ}C$, le comportement général est le même. L'insuline est quantifiable sur une plage de temps plus longue avant que n'intervienne le pic parasite. La quantité d'insuline augmente pendant les dix premières heures mais les valeurs au maximum de libération sont très hétérogènes, et sans lien logique avec la présence de fructose.

d) Commentaire sur le pic parasite d'insuline et les observations faites sur la précipitation d'insuline dans le milieu.

Le milieu contenant le fructose semble accélérer la précipitation de l'insuline d'après les observations menées sur les milieux de relargage et l'apparence des macrogels décrites Figure 9. Pour les gels plus réticulés le signal quantifié augmente pendant 4h, puis est perdu. Finalement après 168h le signal de l'insuline est proche de zéro.

2.2.3 Analyse de la libération de l'insuline par spectrométrie de masse

Lors d'une étude en collaboration avec un laboratoire de l'INSERM de Bordeaux, visant à déterminer les cinétiques de libération de l'insuline en milieu plasmatique, une autre méthode d'analyse a été mise en place. Elle consiste à analyser les échantillons par HPLC, couplée à un spectromètre de masse. L'insuline est au préalable extraite de l'échantillon, par une extraction en phase solide (SPE). Le détail du protocole est décrit en partie expérimentale. La phase mobile est différente de celle utilisée précédemment, avec un gradient de composition. Dans ces conditions, l'insuline possède un temps d'éluion beaucoup plus long (entre 11,4 et 11,6 mn). Ce protocole a été appliqué aux solutions simples étudiées précédemment, dans le but d'isoler l'insuline de l'interfèrent, afin de pouvoir accéder à la totalité de l'information sur la cinétique de libération.

Le protocole est tout d'abord appliqué aux solutions d'insuline ayant servi de milieu d'incubation aux gels. Le résultat est présenté en Figure 15. Il montre que le signal de l'insuline (en bleu) se superpose avec d'autres pics, rendant également impossible la quantification de l'insuline avec cette deuxième technique analytique.

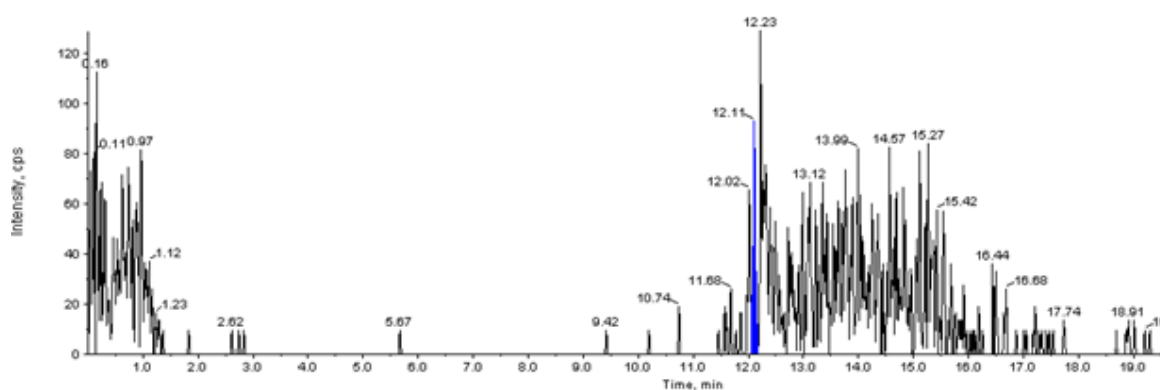


Figure 15: Chromatogramme de la solution d'encapsulation dans lequel un macrogel de réticulation 50% a été mis à incuber. Le pic de l'insuline est représenté en bleu. Détection par spectroscopie de masse.

Les échantillons provenant des milieux de libération sont analysés par la même méthode. Le pic de l'insuline dans les prélèvements est bien défini dans les milieux PBS et PBS contenant du fructose (Figure 16). Néanmoins, après intégration, il est montré que la quantité d'insuline décroît avec le temps, confirmant que l'insuline précipite ou forme des complexes avec des résidus de macrogels présents dans le milieu.

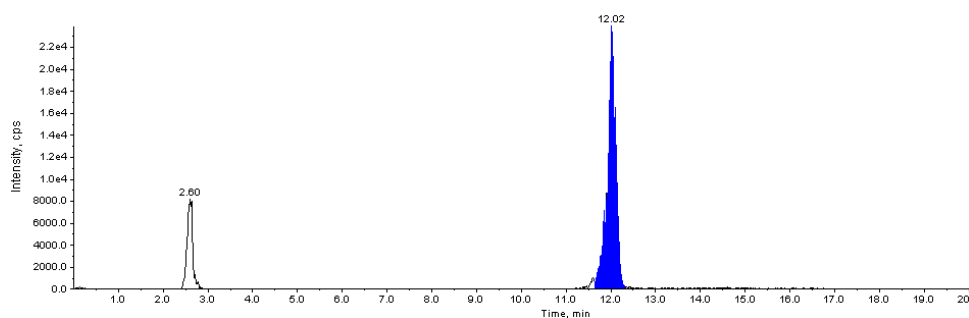


Figure 16 : Chromatogrammes de l'insuline dosée dans le milieu de libération d'un macrogel contenant du PBS à t=10h après l'immersion du gel.

2.2.3.1 *Etude en milieu plasmatique*

Il convient de noter que l'étude préalable en milieu plasmatique avait montré les mêmes écueils, à savoir une augmentation continue de l'insuline libérée pendant 24h maximum, puis la chute du signal sur des temps longs. A noter que toutes les précautions avaient été prises pour éviter d'éventuels problèmes liés à l'adsorption de l'insuline sur les parois de vials. Des coatings systématiques des contenants à l'aide de la BSA avaient été réalisés. Les résultats sont reportés en annexe 4.5.

Les similitudes entre cette étude et les études suivantes réalisées sur des milieux plus simples, démontrent la généralisation du phénomène : l'impossibilité de quantifier l'insuline dans le milieu de libération sur des temps longs. Ce phénomène semble bien lié à la présence du gel et non au protocole analytique. L'amélioration des techniques analytiques n'est pas poussée plus avant à ce stade de l'étude.

3 Préparation de gels de HA-MA-PBA de taille macroscopique

L'étude des interactions entre des protéines et les microgels d'acide hyaluronique a permis de mettre en évidence des interactions attractives entre ces deux partenaires dans le cas des matrices de HA-MA-PBA. En effet, ce type de microgels retient aussi bien les dextrans que l'insuline. Les fonctions PBA ont été identifiées comme responsables de ces interactions, car les microgels de HA-MA ne présentaient pas de contraste de fluorescence positif en présence des protéines modèles. De plus, le rôle prépondérant du groupe PBA a été démontré par la dépendance de ces interactions à l'ajout de fructose dans le milieu. Nous avons décidé d'évaluer de façon quantitative cette propriété, prometteuse pour l'application au traitement du diabète. Ce deuxième type de macrogels contient des PBA, cependant la structure des gels est plus simple. En effet, leur réticulation est uniquement composée de liaisons covalentes non réversibles. Ainsi, pour cette deuxième composition les fonctions PBA n'impactent pas la réticulation des macrogels.

Comme montré dans le paragraphe précédent, les milieux à analyser sont complexes et les choix analytiques ne sont pas triviaux. Nous avons choisi de continuer l'étude de l'encapsulation et du relargage de l'insuline modifiée par de la fluorescéine à partir de macrogels préparés à partir de précurseurs HA-MA-PBA. Les objectifs de cette étude sont de contourner les difficultés analytiques rencontrées lors du dosage par HPLC mais également de comprendre le rôle des paramètres de composition sur le relargage contrôlé de l'insuline et du dextran observé à l'échelle micrométrique. Dans un second temps, les macrogels doublement réticulés seront également étudiés en utilisant des méthodes de dosage par fluorescence.

3.1 Présentation des précurseurs

Les systèmes utilisent la même chimie que celle utilisée pour préparer les nanogels et les microgels, présentés dans les chapitres précédents. Les précurseurs utilisés sont des précurseurs de HA-MA-PBA La synthèse est présentée chapitre 3 dans le paragraphe 2.2. Le degré de méthacrylation des gels étudiés est de DM=20 %.

Les fonctions PBA sont introduites en différentes proportions. Les précurseurs obtenus ont des DS en PBA de 13 et 20%.

3.2 Préparation des macrogels

Les macrogels ont une concentration en polymère constante de $C_p = 1,5$ wt%, le photoamorceur utilisé est le même que pour la préparation de nanogels et de microgels: l'Irgacure 2959 est sélectionné. Pour certaines formulations, un second réticulant est introduit. Il s'agit généralement du N, N'-méthylènebisacrylamide (BIS). Différentes concentrations d'amorceur et de réticulant sont étudiées et leur impact sur les propriétés des gels seront discutées.

Pour produire les macrogels, nous avons choisi une stratégie de moulage similaire à celle utilisée pour préparer des macrogels de HA-PBA/HA-Maltose. 150 μ L de solution de précurseurs polymériques est introduite dans des micropuits. La polymérisation est amorcée par une minute d'irradiation UV, la fibre optique est placée à 3,5 cm de la surface des macrogels. Les caractéristiques de la lampe utilisée sont données en partie expérimentale. Après polymérisation, le démoulage des microgels est facilité par l'ajout d'une solution saline NaCl 1M dans les micropuits par-dessus les gels formés. Cette solution induit une contraction des microgels qui sont ainsi plus faciles à collecter. Les microgels sont purifiés par dialyse dans de l'eau ultrapure ou du PBS en présence d'azide de sodium à 0,01 M ajouté comme conservateur.

3.3 Caractérisation des macrogels

Les problèmes de tenue mécanique des gels ont été mis en évidence lors de la fabrication des gels. En effet, les gels préparés en l'absence de BIS ne sont pas manipulables, ils s'affaissent après l'étape de démoulage. Toutes les formulations utilisées pour la suite de l'étude contiennent donc du BIS comme second réticulant qui renforce la structure du gel. Lors d'essais préliminaires, l'étape de dialyse permettant d'extraire les molécules n'ayant pas réagi, en particulier l'excès d'amorceur, était menée dans l'eau pure. Les gels sont à l'état gonflé en raison d'une faible force ionique du milieu. En sortie de dialyse, leur stabilité les rend difficilement manipulables. Par la suite, cette étape de dialyse est donc réalisée avec du tampon PBS de salinité proche de $I=0,15$ M. A cette force ionique, les macrogels sont plus robustes et peuvent être utilisés pour mener des études de cinétique d'encapsulation et de relargage de protéine.

Les précurseurs utilisés pour préparer les gels sont caractérisés par le taux de PBA du précurseur HA-MA-PBA utilisé x , et par la quantité de BIS introduite, y (wt%). Pour la suite du chapitre, les gels sont notés HA-MA-PBA $_x$, BIS $_y$.

4 Etude de l'encapsulation de protéines modèles par fluorescence

4.1 Méthode de dosage de l'insuline par spectroscopie de fluorescence

Les macrogels issus de la dialyse dans le PBS sont mis à incuber dans des solutions d'insuline-FITC ou de dextran-FITC. Au moment de leur synthèse, ces gels ont un volume de 150 μ L, soit 2.25 mg de polymère. Les solutions d'incubation en dextran ont une concentration de 1 mg/mL dans du PBS. Les solutions d'incubation en insuline ont des concentrations de 0,1 ou de 0,25 mg/mL dans du PBS. Le volume des solutions d'incubation est de 1 mL. Les macrogels restent immergés dans leur milieu pendant 60 heures. La quantité de protéine modèle fluorescente encapsulée est mesurée par spectroscopie de fluorescence, par mesure de l'intensité émise à 519 nm. Elle correspond à la différence de protéine dosée avant et après l'incubation. Toutes les conditions sont dupliquées et les macrogels sont pesés avant et après incubation afin d'étudier l'impact du chargement sur le gonflement des macrogels.

4.2 Etude de l'encapsulation de protéines dans les gels de HA-MA-PBA

4.2.1 Encapsulation de dextran comme modèle

4.2.1.1 *Effet de la masse molaire du dextran*

Le Dextran-FITC est choisi comme modèle de protéine. Des Dextran-FITC de 3 masses molaires différentes (4, 40 et 70 kDa) sont évalués. Les macrogels étudiés pour l'encapsulation du dextran sont composés de 15 g/L de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ et 3,5 mM d'Irgacure 2959. Après incubation, un contraste positif est observé avec le dextran 4kDa (Figure 17 a). La fluorescence observée est plus importante dans les macrogels que dans le milieu d'incubation confirmant l'interaction des dextrans avec les matrices de gels. Pour les dextrans 40 et 70 kDa, les macrogels sont jaunes après incubation, mais sans contraste positif (Figure 17 b).

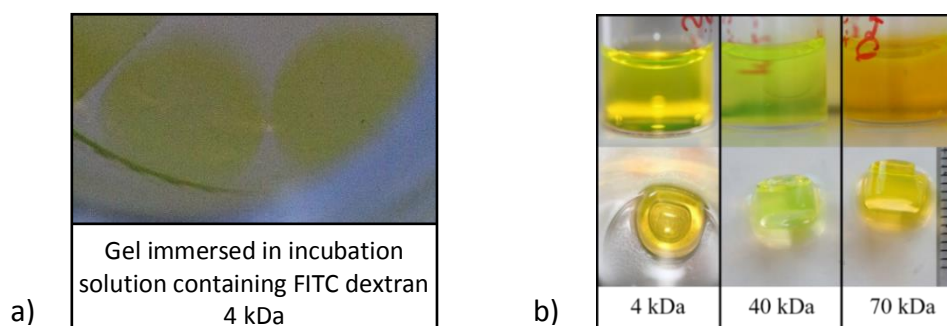


Figure 17 : a) Contraste positif observé pour les macrogels HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ chargés en dextran 4 kDa immergé dans le milieu d'incubation ; b) Comparaison des colorations des macrogels après chargement par des dextrans de différentes tailles et des solutions d'incubation.

Afin d'analyser les quantités de dextran encapsulées et de les relier à des paramètres de composition et de structure du gel (taille de pore), nous évaluons différents paramètres :

- la quantité incorporée dans le gel. Elle diffère selon la concentration d'incubation. Elle est gardée constante à 1 mg/mL pour l'étude des dextrans mais sera différente pour l'insuline (0,25 ou 0,1 mg/mL). L'encapsulation de l'insuline est étudiée dans le paragraphe 4.2.2,

- le coefficient de partage : il correspond au rapport entre la concentration dans le gel et celle dans le milieu. Il est estimé connaissant la quantité de dextran passée du milieu d'incubation vers le gel, et le volume du gel.

$$K = \frac{C_{gel}}{C_{solution}} = \frac{n_{moles} / V_{gel}}{n_{moles} / V_{solution-incubation}}$$

- le volume du gel après incubation.

Le Tableau 2 résume les données pour les 3 longueurs de dextran.

Tableau 2: Résultats de la quantification de l'encapsulation de dextran 4, 40 and 70 kDa dans des macrogels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ et variations de gonflement associées.

Encapsulated specie	Encapsulated quantity (µg/mg _{HA-MA-PBA})	Hydrodynamic diameter of dextran (nm)	Partition coefficient	Weight variation of the gel (%)
Dextran 4kDa	107	1.4	2.1	-11
Dextran 40 kDa	23	4.5	0.4	-16
Dextran 70 kDa	0	6.5	0.0	-16

La quantité de dextran encapsulée est directement corrélée à la taille des dextrans. Plus de diamètre hydrodynamique est petit, plus la quantité encapsulée est importante. Le coefficient de partage entre la solution d'incubation et le macrogel est supérieur à 1 pour le dextran 4 kDa, ce dernier a une taille adaptée pour une bonne pénétration dans la matrice où il se concentre grâce à sa capacité d'interaction. Pour les dextrans de plus grandes tailles, les coefficients de partage sont inférieurs à 1. Il est ainsi possible d'estimer la taille de pores des macrogels qui est entre 2,8 et 9,0 nm.

De plus, les macrogels se contractent suite au chargement des dextrans. La contraction est expliquée par la présence d'interactions entre le dextran et les chaînes de HA-MA-PBA. Pour les dextrans 40 et 70 kDa, les gels se contractent de -16 %, contre -11 % pour de dextran 4 kDa. Dans ce cas, on ne peut exclure une contribution de la pression osmotique du milieu, qui contient 1mg/mL de dextran dans la contraction des gels. La diffusion des dextrans 40 et 70 kDa dans les macrogels est limitée par la taille de pores des macrogels. Les interactions sont limitées spatialement, l'accumulation de dextran en périphérie des gels entraine également une contraction des macrogels.

Pour la suite de l'étude le dextran 4 kDa est sélectionné car il pénètre dans tout le volume des macrogels.

4.2.1.2 Effet du degré de réticulation du gel

L'effet du degré de réticulation est étudié en faisant varier le ratio BIS/HA entre 0 et 20 wt% pour des gels suffisamment rigides mécaniquement, c'est-à-dire pour des taux de BIS supérieur à 5 wt%. Les macrogels contenant 5, 10 et 20 wt% de BIS sont chargés de dextran 4 kDa. Les résultats sont décrits dans le Tableau 3.

Tableau 3: Résultat de l'encapsulation de dextran 4 kDa et effet sur les variations de gonflement des macrogels HA-MA-PBA₂₀, BIS_y (y = 5, 10 ou 20) afin d'étudier l'effet du degré de réticulation des macrogels.

BIS/HA concentration (wt%)	Encapsulated quantity ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{HA-MA-PBA}}$)	Partition coefficient	Weight variation (%)
5	131 \pm 3	2.8	+10
10	143 \pm 10	3.1	-3
20	107 \pm 20	2.1	-11

Les quantités de dextran 4 kDa encapsulées, et donc le coefficient de partage, sont plus importants pour un ratio BIS/HA de 10 wt% par rapport aux macrogels contenant 20 wt% de BIS/HA (Tableau 3). L'amélioration de l'efficacité d'encapsulation est peut être due à la différence de la taille des pores des deux macrogels qui est directement corrélée à la densité de réticulation modulée par la quantité de BIS. Le taux d'encapsulation paraît un peu plus faible pour la densité de réticulation la plus faible, alors qu'il devrait augmenter, mais cela peut s'expliquer par les difficultés de manipulations liées à la faible tenue mécanique des gels.

La concentration en réticulant a un impact significatif sur la stabilité mécanique des gels ainsi que sur leur taille de pores et peut ainsi limiter l'encapsulation en protéine.

4.2.2 Encapsulation de l'insuline

L'insuline sous sa forme monomérique a un diamètre hydrodynamique de 1,34 nm, sa taille comparable à celle du dextran 4 kDa est donc adaptée pour entrer dans les matrices de gels étudiées. Des solutions d'incubation de 0,1 ou 0,25 mg/mL sont utilisées pour une incubation de 60 heures. Lors de l'incubation dans le milieu contenant l'insuline fluorescente, aucun contraste visuel n'est observé, et ce, quelle que soit la composition utilisée. Les paramètres de composition des gels et leur impact sur l'encapsulation des macrogels sont étudiés.

4.2.2.1 Etude de l'encapsulation d'insuline dans des gels préparés à partir de HA-MA-PBA₂₀

Deux variables sont suivies pour étudier l'encapsulation de l'insuline : les variations de gonflement suite au chargement et la quantification par dosage. Les paramètres étudiés sont la nature et la quantité de réticulant mais aussi la concentration en amorceur UV introduite dans les systèmes. Les gels préparés à partir du second réticulant le PEG-diacrylate ont la même concentration molaire en second réticulant que les gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀. Les résultats sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Etude des variations de gonflements de macrogels de HA-MA-PBA₂₀, BIS_y (y= 5, 20 50 wt%) ou HA-MA-PBA₂₀, PEG-diacrylate₃₂ lors de l'encapsulation et étude de l'efficacité d'encapsulation en termes de quantité encapsulée, et de coefficient de partage de l'insuline entre les macrogels et le milieu d'incubation contenant 0,01% en insuline pour différentes compositions.

Irgacure concentration	BIS/HA (wt%)	Encapsulated quantity (µg/mg _{HA-MA-PBA})	Partition coefficient	Weight variation (%)
0,28 mM	5	23±3	1.7	-19
3,5 mM	20	25±8	1.9	-23
	PEG-diacrylate 32	26±2	2.0	-21
0,28 mM	20	17±2	1.2	-17
0,14 mM	20	26±3	2.0	-16
0,28 mM	50	26±1	2.0	-26

Les quantités d'insuline encapsulées sont plus faibles que pour le dextran car les concentrations de solution d'incubation sont plus faibles. Cependant, le taux de greffage en fluorophore de l'insuline étant plus élevé que pour le dextran, à concentration égale en espèce fluorescente, la fluorescence de la solution de dextran est beaucoup moins marquée. Pourtant, les gels ont une intensité de fluorescence comparable après chargement (Figure 18).

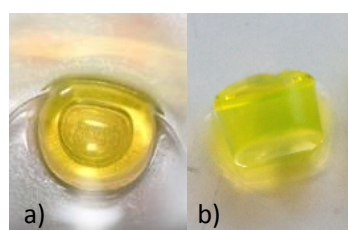


Figure 18 : Image de gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ après incubation dans une solution de a) dextran 4 kDa à 0,1 wt% b) insuline 0,01 wt%

La comparaison entre les deux systèmes ne peut se faire que sur le coefficient de partage. De manière générale, ils sont plus faibles que pour le dextran, ce qui témoigne que l'insuline a moins d'affinité pour la matrice. Néanmoins, ces valeurs sont supérieures à 1 et une contraction des matrices de gel est observée, ce qui montre que l'insuline est recrutée au sein du gel. La variation du taux de réticulation et la nature du réticulant ne semblent pas jouer un rôle majeur. Pire, les taux d'encapsulation sont plus élevés pour les taux de réticulation les plus forts, ce qui semble en contradiction avec l'observation faite pour le dextran. Ceci peut s'expliquer par le manque de stabilité mécanique des gels. Pour cette raison, une concentration en BIS de 20 wt% est sélectionnée pour la suite de l'étude. La quantité de photoamorceur utilisée n'a pas un impact majeur sur les taux encapsulés. La quantité introduite dans un premier temps de 3,5 mM est choisie pour avoir une concentration identique à celle utilisée pour la préparation de microgels (0,1 wt%). Cependant, comme précédemment discuté, le procédé de fabrication des macrogels n'implique pas de phase organique et la polymérisation n'est pas limitée au temps de passage devant la lampe. L'Irgacure 2959 est entièrement présent dans la phase aqueuse, dans un milieu transparent. Les conditions de photopolymérisation requièrent donc potentiellement moins de photoamorceur. C'est donc pour optimiser la quantité d'amorceur que différentes concentrations d'Irgacure 2959 sont testées pour une concentration en BIS constante de 20 wt%.

Les gels obtenus ont une stabilité mécanique équivalente, Cependant, l'excès d'Irgacure 2959 confère aux gels une couleur jaunâtre (Figure 19) et ne semble pas avoir d'effet sur l'encapsulation de l'insuline les coefficients de partage de l'insuline lors de l'encapsulation sont tous compris entre 1 et 2 (Tableau 4).

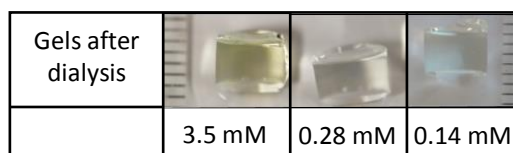


Figure 19: Macro gels observés après purification pour différentes concentrations en photoamorceur.

4.2.2.2 Etude de l'encapsulation d'insuline dans des gels préparés à partir de différents HA-MA-PBA

Différents précurseurs peuvent être étudiés afin de faire varier la quantité de fonctions PBA présentes dans les matrices de gel et déterminer l'influence du taux de greffage sur l'encapsulation en insuline. Les précurseurs HA-MA-PBA sont introduits à 15 g/L et les degrés de fonctionnalisation en PBA des précurseurs étudiés sont de 13 et 20 %. L'encapsulation de l'insuline est étudiée par le suivi des variations du gonflement des gels et le dosage de la protéine encapsulée (Tableau 5).

Tableau 5 : Etude de la variation de gonflement des macrogels de HA-MA-PBA_x, BIS₂₀ avec x=13 ou 20 %, due au chargement en insuline et de l'efficacité d'encapsulation en termes de quantité encapsulée et du coefficient de partition entre les gels et les solutions d'incubation en fonction du précurseur identifié.

	Encapsulated quantity (µg/mg _{HA-MA-PBA})	Partition coefficient	Weight variation (%)
DS 13 %	21±2	1.6	+5
DS 20 %	25±3	1.9	-23

Les macrogels sont stables indépendamment du taux de fonctionnalisation en PBA. L'efficacité d'encapsulation en insuline est bonne. Le coefficient de partition entre l'insuline présente dans les gels et présente dans les solutions d'incubation est comparable pour les deux précurseurs.

Les gels sont stables pour tous les degrés de fonctionnalisation en PBA étudiés. L'encapsulation est efficace dans tous les cas.

4.2.3 Etude de gels sensibles au glucose doublement réticulés

Les macrogels doublement réticulés chargés en insuline-FITC sont également étudiés en utilisant les techniques de fluorescence. Les macrogels de réticulation 50 et 100 % en PEG (SH)₂ sont étudiés. Les résultats concernant l'efficacité d'encapsulation sont résumés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Encapsulation de l'insuline-FITC en termes d'efficacité d'encapsulation, de partition de coefficient lors du chargement. Variation de gonflement pour des macrogels doublement réticulés préparés à partir de HA-PBA et de HA-Maltose en fonction du taux de réticulation

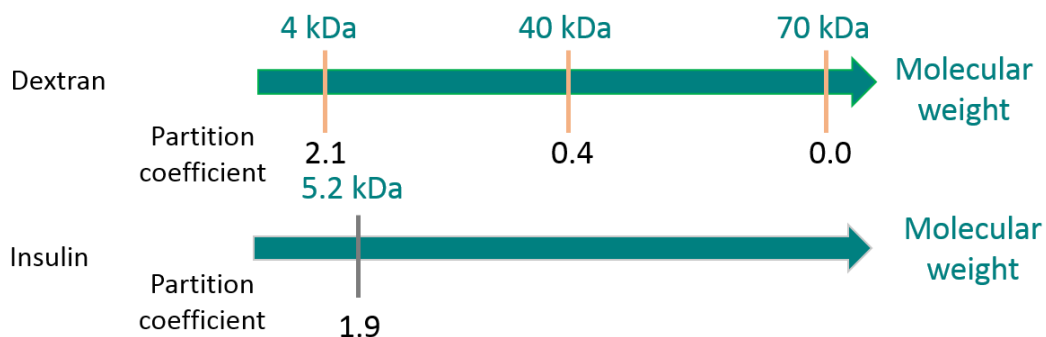
	Encapsulated quantity ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{HA-MA-PBA}}$)	Partition coefficient	Weight variation (%)
Crosslinking 50 %	29	2.3	-2
Crosslinking 100 %	24	1.8	-4

L'encapsulation de l'insuline dans des macrogels de HA-PBA/HA-Maltose est dans le même ordre de grandeur que pour les macrogels de HA-MA-PBA. L'encapsulation est efficace, les coefficients de partage entre les gels et les solutions d'incubation sont largement supérieurs à 1. La quantité encapsulée est légèrement plus importante pour le gel de plus faible réticulation, peut-être en raison d'une plus large porosité.

L'encapsulation d'insuline dans des gels doublement réticulés de HA-PBA/HA-Maltose est aussi efficace que dans des gels de HA-MA-PBA et dépend du taux de réticulation.

Pour résumé, l'encapsulation est efficace pour les protéines suffisamment petites pour rentrer dans la matrice de gel (Figure 20)

Figure 20 : Résumé des coefficients de partition obtenus pour l'encapsulation de protéines (dextran ou insuline) pour des gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀



Les coefficients de partage sont tous supérieurs à 1, et pour une même composition, ils sont toujours supérieurs quand le dextran est encapsulé par rapport à quand l'insuline est encapsulée, montrant une meilleure affinité du dextran pour le gel.

Tableau 7 : Gamme de coefficients de partition obtenus, en fonction des différents paramètres de compositions étudiés

	Dextran	Insulin
Crosslinking density	2.1-3.1	1.2-2.0
Photoinitiator concentration	-	1.2-2.0
Substitution degree PBA	-	1.6-1.9

5 Etude de la libération de protéines

Les macrogels chargés en protéines modèles sont ensuite placés dans des solutions d'incubation, et des prélèvements sont effectués à différents temps, afin d'étudier les cinétiques de relargage dans des milieux PBS avec et sans fructose.

5.1 Dosage de l'insuline par spectroscopie de fluorescence

5.1.1 Présentation des deux méthodes analytiques

Le relargage de l'insuline et du dextran sont étudiés en suivant deux méthodes analytiques différentes. Le choix de la méthode sera discuté dans le paragraphe 5.2.2.6.

5.1.1.1 Présentation de la méthode 1

Afin de quantifier le relargage du dextran et de l'insuline, les gels sont immergés dans 1,5 mL de solution de relargage de différentes compositions. Les compositions des solutions utilisées pour l'étude du relargage du dextran sont:

- PBS
- PBS + glucose 20 mM
- PBS + fructose 20 mM

Pour l'étude des cinétiques de relargage de l'insuline, les compositions des solutions de relargage sont limitées au PBS et au PBS + fructose 20 mM. Des échantillons de 200 μ L sont prélevés à différents temps après l'immersion des macrogels dans les solutions de relargage à 0, 15, 30, 60, 120, 240 et 540 minutes. Après chaque prélèvement, un volume équivalent de 200 μ L de tampon est introduite dans le vial, maintenant le volume constant pour toute la cinétique. L'insuline-FITC ou le dextran-FITC sont quantifiés par spectroscopie de fluorescence en mesurant l'absorbance de la fluorescéine à 519 nm.

5.1.1.2 Présentation de la méthode 2

Les gels sont immergés dans 1 mL de solution de relargage de différentes compositions : PBS ou PBS + fructose 20 mM. Les échantillons prélevés pour le dosage sont de 1 mL, ce qui correspond à la totalité de la solution. Le milieu est donc totalement remplacé à chaque prélèvement. Ils sont réalisés toutes les 2h pendant 10 heures. L'insuline-FITC ou le dextran-FITC sont quantifiés par spectroscopie de fluorescence en mesurant l'absorbance de la fluorescéine à 519 nm.

5.2 Gels de HA-MA-PBA

5.2.1 Relargage du dextran

Les gels étudiés sont préparés à partir des précurseurs HA-MA-PBA₂₀, BIS_x avec x=5, 10 ou 10 wt%, en présence de 3,5 mM d'Irgacure 2959. Une courbe typique est présentée pour les gels HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀

La différence d'efficacité de relargage est confirmée par observation directe des gels. En effet, après relargage dans le PBS, les gels restent jaunes en raison du dextran fluorescent lié présent dans le milieu, alors qu'après relargage dans un milieu contenant du fructose les gels sont quasi transparents (Figure 23). En présence de fructose, les gels gonflent de +19 % par rapport au volume initial suite au relargage du dextran alors que dans du tampon le volume du gel regonfle seulement de +6 %. Les mesures sont réalisées deux fois avec une bonne reproductibilité.

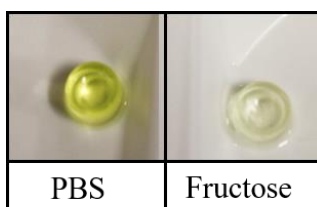


Figure 23: Observation visuelle des gels en fin de cinétique en fonction du milieu de la solution de relargage PBS ou PBS contenant du fructose.

L'analyse approfondie des profils de diffusion a montré que sur des temps courts, la libération du dextran suit un profil diffusionnel (courbe accompagnée d'une modélisation présentée en annexe 4.4).

Les gels contenant moins de 20 wt% de BIS ne sont pas stables mécaniquement et aucune différenciation n'est observée entre le relargage dans le PBS ou dans le PBS + fructose 20 mM. Ces formulations présentaient des taux d'encapsulation aberrants qui peuvent s'expliquer par ce manque de tenue mécanique.

Les gels présentant une bonne tenue mécanique présentent des profils de libération plus fiables. Le relargage du dextran est plus efficace de 37 % en présence de fructose. Dans ce cas la totalité du dextran encapsulé est libéré. Le gel gonfle en présence de fructose.

5.2.2 Relargage de l'insuline

En Figure 24, nous présentons un exemple de libération d'insuline, obtenu à partir du même gel que celui présenté pour le dextran (Figure 24), soit le HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀.

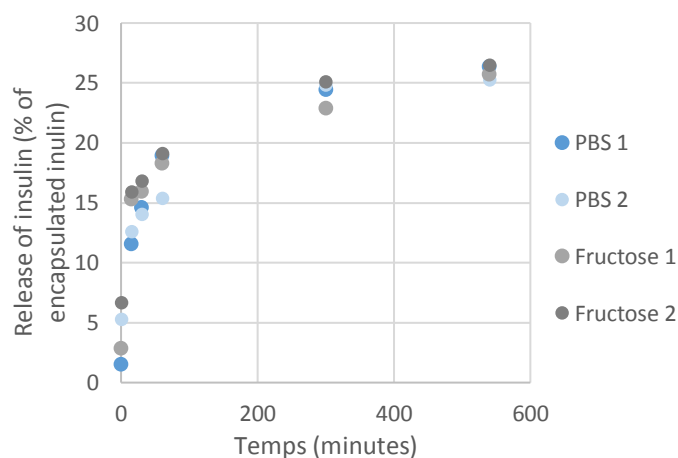


Figure 24 : Profil de relargage de l'insuline-FITC chargés dans des gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ avec et sans fructose à 25°C.

Les clichés montrent également le gel après chargement et à la fin de la cinétique de libération (Figure 25).

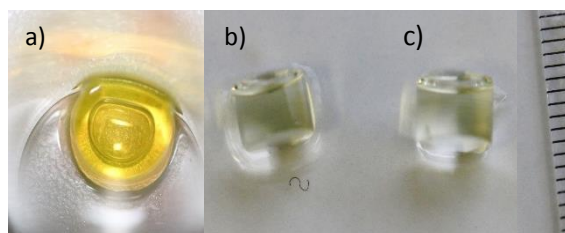


Figure 25 : Images des gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀, a) après incubation , b) après libération dans du PBS c) après libération dans du PBS + fructose. b) et c) sont à la même échelle.

Contrairement au dextran, la libération de l'insuline n'est pas influencée par la présence de fructose. Ce résultat est en désaccord avec le comportement observé sur les microgels de HA-MA-PBA. De plus, la valeur au plateau correspond à seulement un quart de l'insuline encapsulée. Ce résultat est surprenant et d'autant plus difficile à comprendre que le gel a perdu sa coloration, il semble vidé de son insuline en fin d'étude.

L'absence de corrélation entre le comportement observé pour les microgels et les macrogels nous laisse penser que la structure des microgels est différente de celle des macrogels. Cette différence peut avoir deux origines : la structure des gels, et notamment la taille ou la distribution de pores, ou encore leur composition. La préparation des microgels présente plusieurs différences : 1) la présence d'une émulsion peut induire un partage du photoamorceur entre les phases aqueuses et huileuse, rendant la polymérisation moins efficace dans les gouttes, 2) la photopolymérisation en ligne en microfluidique peut être incomplète, 3) la présence d'une interface peut induire une distribution particulière des précurseurs, notamment s'ils sont de nature amphiphile. Afin de retrouver qualitativement les mêmes résultats sur les macrogels, nous avons cherché à modifier systématiquement certains paramètres liés à la structure des macrogels et à leur méthode de polymérisation.

Pour plus de clarté, nous résumons ici les caractéristiques principales des cinétiques de libération sous forme d'un tableau (Tableau 8), les cinétiques présentées ultérieurement représentent le pourcentage d'insuline libéré par rapport à la quantité encapsulée mesurée expérimentalement. Nous nous intéresserons en particulier à :

- La quantité d'insuline libérée au plateau dans le tampon et en présence de fructose
- La fraction d'insuline libérée au maximum, par rapport à la quantité initialement encapsulée

Tableau 8 : Quantité d'insuline encapsulée et relarguée dans des milieux avec et sans fructose pour des gels préparés de HA-MA-PBA₂₀, BIS_y (y = 10, 20, ou 50 %wt) ou HA-MA-PBA₂₀, PEG-dite₃₂,

Irgacure concentration (mM)	BIS/HA (wt%)	Quantity encapsulated (µg/mg HA-MA-PBA)	Quantity released in PBS (µg/mg HA-MA-PBA)	Quantity released in fructose (µg/mg HA-MA-PBA)	Percentage of insulin recovered (%)
0,28	5	23	5.5 ± 2 %	6.6	29
0,14	20	25	4.2 ± 10 %	5.4 ± 2 %	21
0,28	20	17	4.6 ± 6 %	6.0 ± 10 %	35
0,28	PEG-diacrylate 32	26	5.1 ± 10 %	5.6 ± 10 %	22
3,5	20	26	6.6 ± 2 %	6.6 ± 2 %	26
0,28	50	26	3.5 ± 14 %	4.4 ± 2 %	17

5.2.2.1 Effet de la concentration en amorceur

Les gels étudiés ont des concentrations constantes de précurseurs de HA-MA-PBA de 15 g/L, et de BIS 20 wt% par rapport au précurseur HA. Les concentrations en Irgacure sont variées de 0,14 , 0,28 et 3,5 mM. Les profils de relargage obtenus sont présentés en Figure 26.

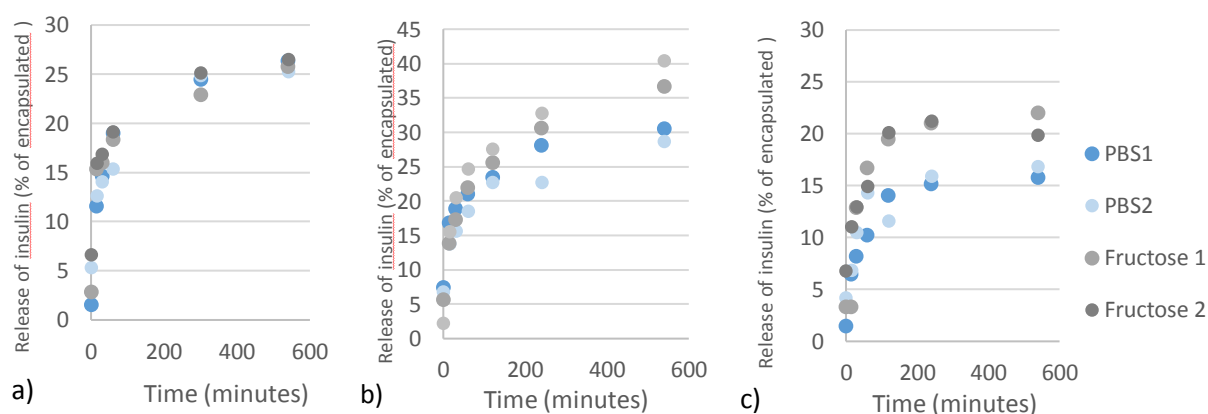


Figure 26 : Profil de relargage de l'insuline en fonction de la concentration en Irgacure a) 3,5 mM b) 0,28 mM c) 0,14 mM pour des macrogels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀.

En fin de cinétique de relargage, les gels contenant un faible taux d'amorceur sont plus jaunes en milieu PBS comparé au milieu PBS + fructose. Les observations visuelles des gels sont en accord avec les profils de relargage. Pour les gels contenant 3,5 mM d'Irgacure 2959, il n'y a pas de différence entre les quantités libérées dans un milieu contenant ou non du fructose (Tableau 8). Cependant, en diminuant la quantité d'Irgacure à 0,28 ou 0,14 mM, le maximum d'insuline relarguée est plus important en présence de fructose. Des différences de respectivement 22 et 23 % par rapport aux quantités libérées dans le PBS sont observés. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats observés par microscopie lors de l'étude des microgels. La

fraction libérée mesurée est plus importante pour le gel préparé à partir de 0,28 mM d'Irgacure, cependant, la quantité encapsulée mesurée était également plus faible.

Il est intéressant de noter que l'Irgacure peut être partiellement greffé sur la matrice de gel. Dans ce cas des groupements OH sont présents et disponibles sur les matrices de gel et peuvent être en compétition avec le fructose en diminuant son efficacité pour déclencher le relargage de l'insuline.

Les cinétiques sont différentes pour les profils de relargage des gels contenant 0,14 ou 0,28 mM d'Irgacure 2959. Dans les deux cas, le relargage dans le PBS commence après 2h dans le PBS avec ou sans fructose. Cependant, après 2h, la différenciation entre les profils obtenus avec ou sans fructose est plus importante pour les faibles concentrations en Irgacure et dans ce cas les profils atteignent des plateaux alors qu'à 0,28 mM la stabilisation est atteinte après 9h seulement. Le gonflement des gels en présence de fructose est indépendant de la concentration en Irgacure. La reproductibilité des résultats est bonne. De plus, on constate que la quantité d'insuline libérée ne correspond pas à la quantité encapsulée. Pour la suite de l'étude, la concentration en Irgacure est de 0,28 mM sauf si précisé autrement. A cette concentration, 23 % de l'insuline encapsulée est quantifiée dans les milieux de relargage contenant du fructose.

Une concentration minimum d'Irgacure doit être utilisée pour favoriser une libération d'insuline plus importante dans le fructose par rapport au PBS. Dans tous les cas seule une fraction de l'insuline encapsulée est quantifiée lors du maximum de libération.

5.2.2.2 Effet de la concentration en réticulant

Les gels étudiés ont des concentrations constantes en HA-MA-PBA de 15 g/L et d'Irgacure 2959 0,28 mM. Les quantités de BIS sont variées de 5, 20 et 50 wt%.

Les gels contenant moins de 20 wt% ne sont pas stables mécaniquement, cependant, ils semblent encapsuler et libérer l'insuline dans une plus grande proportion en raison d'une plus grande taille de pores. Les gels sont cependant cassés en fin de cinétique, il n'y a pas de différence entre le relargage en présence de fructose ou dans du tampon, mais l'état des gels implique une plus grande incertitude dans la mesure. Les profils obtenus pour les gels ayant une bonne tenue mécanique sont présentés Figure 27.

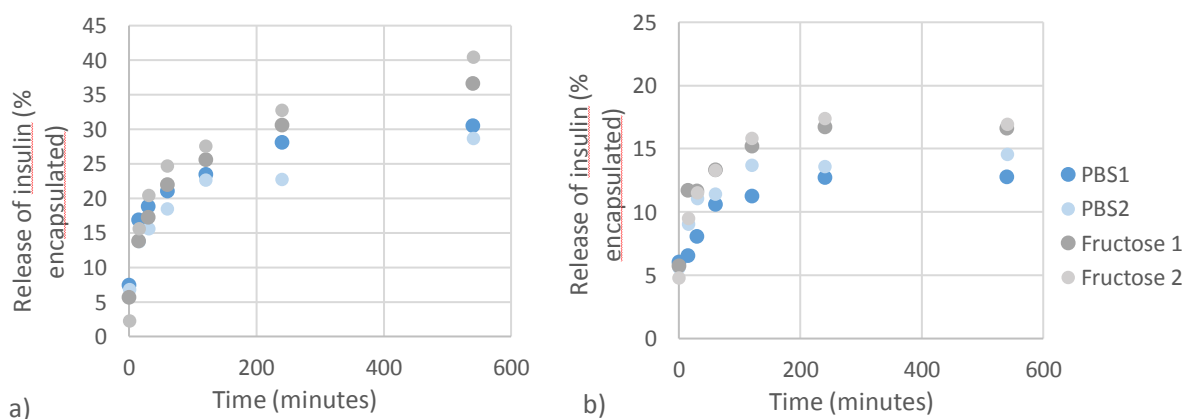


Figure 27 : Profil de relargage des macrogels de différentes densités de réticulation a) 20 wt% b) 50 mol%.

En augmentant la concentration de BIS à 50 wt%; les gels ont une porosité resserrée, et le relargage dans le fructose est supérieur de 20 % par rapport au relargage dans le PBS (Tableau 8). Cette différence est plus marquée pour les gels contenant 20 wt% de BIS. De plus, le maximum de relargage atteint un plateau plus faible pour une concentration de BIS de 50 wt%. Ces différences peuvent s'expliquer par les tailles de pores des gels qui sont liés au degré de réticulation qui limite l'encapsulation et le relargage pour les grandes concentrations en BIS.

Le relargage de l'insuline est plus important en présence de fructose pour les gels stables. La quantité de réticulant peut limiter la taille de pores et donc le maximum d'insuline libérée.

5.2.2.3 Influence de la nature du réticulant

Deux réticulants sont utilisés : le BIS et le PEG(SH)₂, pour des concentrations de 50 mol% par rapport au HA (20 et 32%wt respectivement) en présence de 15 g/L de précurseurs et de 0,28 mM d'Irgacure 2959. Les profils de relargage sont comparables. Il n'y a pas de d'amélioration de l'efficacité de relargage en présence de fructose. Les gels restent légèrement jaunes en fin de cinétique. Les quantités d'insuline relarguées sont largement inférieures aux quantités encapsulées (Tableau 8). Il n'y a pas d'effet de la nature du réticulant.

5.2.2.4 Effet du taux de PBA

L'impact du taux de PBA sur le relargage et la reproductibilité, sont étudiés, en préparant des gels avec différents précurseurs contenant 13 ou 20% de PBA. Les résultats sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Quantité d'insuline encapsulée et relarguée dans des milieux avec et sans fructose pour différents précurseurs de HA-MA-PBA_x, BIS₂₀ (x= 13 ou 20%).

DS	Encapsulated quantity ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{HA-MA-PBA}}$)	Released amount in PBS ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{HA-MA-PBA}}$)	Released amount in fructose ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{HA-MA-PBA}}$)	Recovered insulin (%)	Weight reswelling in fructose (%)
13 %	21	6.1 ± 2 %	6.8 ± 2 %	32	
20 %-1	26	4.2 ± 10 %	5.4 ± 2 %	21	+25
20 %-2	30	8.3 ± 7 %	8.0 ± 20 %	28	+10

Les profils de relargage obtenus pour les précurseurs contenant 13 % de PBA, ont un maximum 10% plus élevés dans les milieux contenant du fructose. Cette faible différence peut-être due à un faible taux de PBA qui limite la quantité d'insuline liée à la matrice de gel.

5.2.2.5 Remarque sur la reproductibilité

Pour les deux précurseurs utilisés ayant un taux de fonctionnalisation de 20 %, les variations de gonflement sont reproductibles, les gels en présence de fructose regonflent. Cependant, les profils de relargage ne sont pas reproductibles. La présence de fructose ne permet pas de relarguer plus d'insuline (Tableau 9). La quantité relarguée est légèrement supérieure pour la deuxième synthèse, même s'il reste partiel.

5.2.2.6 Remarque sur le choix de la méthode analytique

Pour toutes les formulations qui permettent d'obtenir des gels avec une tenue mécanique suffisante, le pourcentage d'insuline libérée quantifié par spectroscopie de fluorescence correspond au maximum à 35 % de la quantité encapsulée quantifiée. Tous les résultats présentés jusqu'à présents sont obtenus par la méthode

1 décrit le paragraphe 5.1.1.1. Les résultats obtenus pour des macrogels chargés par de l'insuline humaine quantifiée par HPLC, ont conduit à l'hypothèse que les gels libèrent également des résidus de HA dans le milieu qui rendent l'insuline indétectable au bout d'un certain temps. Pour contourner cette difficulté, une autre méthode d'échantillonnage est testée, où la totalité du volume de la solution de relargage est prélevée et remplacée par un volume équivalent de milieu d'incubation. Les prélèvements sont faits, à intervalles de temps régulier de 2h pendant 10h. Notre hypothèse de travail est que le remplacement total du milieu évite un temps de séjour trop long de l'insuline dans le milieu, en présence de possibles résidus de gel. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 28.

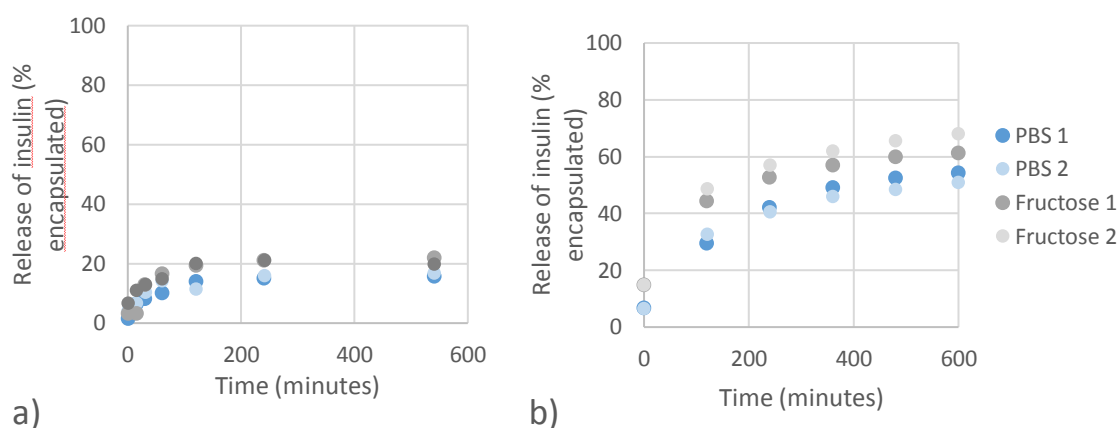


Figure 28 : Profils de relargage de l'insuline obtenus pour a) la méthode 1 b) la méthode 2. Les profils sont obtenus pour des gels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀, Irgacure 0,28 mM.

Le maximum d'insuline quantifiée dans le milieu en fin de cinétique suite à la méthode 2, permet de retrouver 68% de l'insuline encapsulée quantifiée (Tableau 10).

Tableau 10 : Quantité d'insuline encapsulée et relarguée dans des milieux avec et sans fructose pour des macrogels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ traité par les méthodes analytiques 1 et 2.

DS	Encapsulated quantity (µg/mg HA-MA-PBA)	Released quantity in PBS (µg/mg HA-MA-PBA)	Released quantity in fructose (µg/mg HA-MA-PBA)	Percentage of insulin recovered (%)
Method 1	26	4.2 ± 10 %	5.4 ± 2 %	21
Method 2	28	14.8 ± 6 %	18.2 ± 10 %	68

La différence d'efficacité de relargage entre les milieux contenant du PBS ou du PBS et du fructose est similaire à celle obtenue par la méthode 1. Le changement de méthode semble corroborer l'hypothèse du relargage de résidus HA-MA-PBA avec le temps. La méthode de prélèvement joue donc un rôle primordial dans l'analyse de la libération d'insuline.

La quantité d'insuline dosée dans le milieu externe est sensible à la méthode de prélèvement. Il est probable que les problèmes observés ne se produiraient pas en milieu ouvert. Cependant, la dépendance de la cinétique de libération au fructose reste peu importante, avec seulement 30 % d'insuline supplémentaire relarguée en présence de fructose. Les gels étudiés présentent le défaut majeur de perdre la moitié de leur chargement par diffusion en absence de fructose.

5.3 Etude des gels doublement réticulés HA-PBA/HA-Maltose

La quantité d'insuline relarguée à partir des macrogels doublement réticulés est déterminée en utilisant la méthode analytique 1. Les résultats sont présentés en Figure 29.

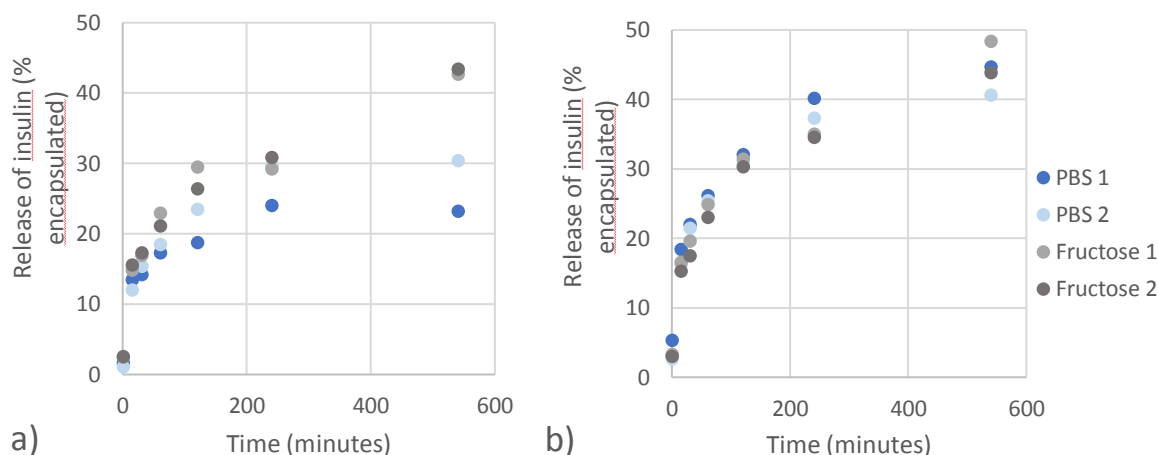


Figure 29 : Profil de relargage de l'insuline à partir de gels doublement réticulés de HA-PBA/HA-Maltose de taux de réticulation a) 50 % b) 100 %

Pour les taux de réticulation de 50 %, une différence de 33 % est observée entre le relargage dans le PBS comparé à un milieu contenant du fructose. Cependant, la taille des gels après dialyse n'est pas égale pour tous les gels, leur taille varie de 40 %. La quantité d'insuline est proportionnelle à la taille des gels. Pour les gels contenant 100 % de réticulant, moins de 10 % de variation est observé concernant la taille des gels. Dans ce cas, aucune différence n'est observée entre la quantité quantifiée dans les milieux de relargage contenant du fructose ou non. Dans les deux cas, seulement, 40 % de l'insuline encapsulée est quantifiée en fin de cinétique (Tableau 11). Cette valeur est supérieure aux valeurs obtenues pour les gels de HA-MA-PBA. Les phénomènes entraînant la perte de l'insuline quantifiable dans les milieux lors de la libération sont peut-être moins marqués pour les gels dynamiques. Nous avons émis l'hypothèse que l'insuline précipitait dans le milieu, suite à la libération progressive de résidus HA. Si la précipitation est liée à la présence de fonctions PBA sur les chaînes de polymères, les gels dynamiques utilisés sont moins fonctionnalisés ce qui permettrait de limiter la précipitation de l'insuline dans le milieu mais peut limiter les quantités encapsulées.

Tableau 11 : Quantité d'insuline encapsulée et relarguée en fonction du taux de réticulation des gels doublement réticulés.

Crosslinking density	Encapsulated quantity ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{HA-MA-PBA}}$)	Released quantity in PBS ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{HA-MA-PBA}}$)	Released quantity in fructose ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{HA-MA-PBA}}$)	Percentage of insulin recovered (%)
50 %	29	$7.5 \pm 20 \%$	$11.2 \pm 9 \%$	38
100 %	24	$9.7 \pm 4 \%$	$10.2 \pm 6 \%$	42

En conclusion, aucune différence significative n'est observée pour la libération de l'insuline dans du PBS ou du fructose, malgré des variations de gonflement sensibles au fructose.

En résumé, la libération du dextran et de l'insuline a été étudiée en présence de fructose et dans du tampon PBS seul. La libération de dextran en fonction du fructose est différenciée et totale. Cependant, les mêmes résultats ne sont pas obtenus avec l'insuline: en optimisant les paramètres de formulations, la concentration libérée en présence de fructose est différenciée et plus importante par rapport à la libération dans du tampon seul, mais le maximum libéré ne correspond qu'à une fraction de l'insuline encapsulée. Il semblerait que l'insuline ne soit plus quantifiable dans le milieu suite à des phénomènes de précipitation. Cette phénoménologie est commune aux deux générations de gels de HA modifiés par des PBA : le même comportement est observé pour les gels doublement réticulés et les gels de HA-MA-PBA. De plus dans tous les cas, la libération de dextran/insuline dans du tampon seul n'est pas nulle, ce qui est un défaut pour l'utilisation des gels dans le traitement du diabète.

6 Conclusion

Nous avons préparé avec succès des macrogels de différentes compositions en utilisant les précurseurs HA-MA-PBA et les précurseurs HA-PBA/HA-Maltose. La stabilité mécanique des gels est fortement dépendante du degré de réticulation et du taux de gonflement des gels. Ainsi, pour les gels de HA-MA-PBA, un second réticulant doit être utilisé en plus des 20 % de réticulation provenant des méthacrylates. De plus, dans des milieux de faible salinité, les gels sont très gonflés et donc fragiles et difficilement manipulables.

Les premiers essais ont été menés, en encapsulant de l'insuline humaine dans des macrogels présents en milieux aqueux ou plasmatique. L'insuline est dosée par HPLC couplée à un spectromètre UV ou de masse. La précipitation de l'insuline dans les milieux de relargage est mise en évidence. La quantification de l'insuline encapsulée ou relarguée est rendue impossible par la présence d'une seconde espèce libérée dans le milieu, qui pourrait être des résidus de gels.

Afin de contourner ces écueils, la suite des expériences de quantification est effectuée par spectroscopie de fluorescence, par suivi de l'encapsulation et de la libération de protéines modèles fluorescentes. Les gels préparés à partir de HA-MA-PBA ne sont pas des matériaux idéaux, en effet, la libération d'insuline se produit également en milieu PBS. Les résultats ne sont pas reproductibles pour deux batches de précurseurs contenant le même taux de PBA. Cependant, pour certaines compositions, la libération d'insuline est supérieure de 30% dans un milieu contenant du fructose par rapport à un milieu PBS.

Les gels doublement réticulés, ne semblent pas libérer l'insuline de manière contrôlée par la présence de fructose, même si leur gonflement est plus important dans ce cas-là en raison de la complexation compétitive entre les HA-PBA et le fructose.

Dans tous les cas, la quantité d'insuline libérée quantifiée, ne correspond pas à la quantité encapsulée quantifiée prouvant la perte du signal de l'insuline. Cette perte peut être expliquée par la libération dans le milieu de résidus de HA au fur et à mesure de la cinétique. Ces résultats semblent confirmés par l'utilisation d'une méthode analytique alternative où la totalité du milieu de relargage est changé à chaque prélèvement à intervalles de temps réguliers pour limiter la concentration en résidus HA dans le milieu. Avec cette méthode

68% de l'insuline encapsulée est quantifiée dans le milieu de relargage. La présence de ces résidus est concordante avec les résultats obtenus pour le dosage de l'insuline humaine par HPLC.

7 Comportement du HA-PBA en solution et aux interfaces

Les différents comportements observés lors des processus de fabrication des macrogels ont montré que les systèmes sont complexes. Nous nous sommes interrogés sur le rôle de l'hydrophobie de l'acide phénylboronique sur les propriétés des chaînes de polymères modifiées, que ce soit en solution ou aux interfaces. En effet, le greffage de fonctions boronates sur des chaînes de polymère très hydrophile comme le HA lui confère un caractère amphiphile [5]. Nous avons mentionné à plusieurs reprises la possibilité que les hydrogels contiennent des poches hydrophobes, du fait de l'assemblage de ces fonctions, par interaction Pi-Pi par exemple. Ainsi, cette partie du chapitre est dédiée à l'étude de ces propriétés. De plus, la formation d'un ester boronate lors de l'ajout d'un diol devrait renforcer le caractère hydrophile de ces entités. Il est donc en théorie possible d'exploiter cette propriété pour préparer des architectures stimulables.

7.1 Interaction avec l'insuline

Afin de mettre en avant des éventuelles interactions entre l'insuline et le HA-PBA nous avons procédé à une étude sur le polymère en solution.

Pour mettre en évidence, une éventuelle précipitation de l'insuline en présence de HA-PBA nous avons suivi la solubilité par des contrôles visuels. En effet, lors de l'étude des macrogels, l'insuline précipite dans les gels au cours de l'étude de la libération (Figure 9) et ce phénomène est amplifié en présence de fructose. Pour suivre la solubilité de l'insuline en présence de HA-PBA, une solution à 1,5 wt% de HA-PBA 60 kDa de degré de substitution 20 % est préparée dans du tampon PBS, et une solution concentrée d'insuline est ajoutée dans le milieu pour obtenir une concentration finale en insuline de 0,6 wt%. La concentration de HA-PBA introduite est similaire à la concentration en polymère lors de la préparation du gel et la quantité d'insuline introduite est environ 10 fois supérieure à la quantité quantifiée lors de la libération dans les milieux contenant du fructose. Aucune précipitation n'est observée dans le milieu.

En parallèle, la même expérience est réalisée en substituant l'insuline par de l'insuline-FITC. Dans ce cas, aucune précipitation n'est observée. De plus, la fluorescence de la solution est mesurée pour différentes dilutions. Les mêmes dilutions sont réalisées sur une solution contrôle contenant l'insuline dans du PBS. L'intensité de fluorescence est similaire dans les deux cas. La déstabilisation de l'insuline n'est pas mise en évidence.

Une autre technique est utilisée pour mettre en avant la formation de complexes moléculaires. Il s'agit de la RMN, les interactions entre les partenaires entraînent des déplacements des pics observés. Nous avons réalisé des spectres RMN de solutions de HA-PBA à 3 mg/mL avec et sans insuline et ce avec ou sans fructose et à

pH 7,4 et 8,5. Les spectres observés sont superposables. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence d'interactions entre l'insuline et le HA-PBA par cette méthode.

7.2 Propriétés amphiphiles du HA-PBA

Afin d'étudier les propriétés amphiphiles du PBA, nous nous sommes penchés sur les propriétés des HA-PBA à une interface, par le biais de mesures de tension interfaciale, et sur leur adsorption à la surface de gouttes d'huile en milieu aqueux, par le biais de l'étude de la stabilité d'émulsions. Pour cela, nous avons utilisé un polymère ayant un taux de fonctionnalisation en fonction PBA hydrophobes greffées sur le squelette hydrophile du HA, relativement important de 33 %.

7.2.1 Adsorption à une interface liquide

Afin de déterminer l'adsorption du polymère à l'interface liquide, la méthode de la goutte pendante est utilisée, elle est décrite en partie expérimentale.

Différents paramètres peuvent être étudiés, tels que l'influence de la concentration en polymère, du degré de substitution en PBA et de la présence de fructose dans le milieu. Les polymères étudiés étant des polyélectrolytes, porteurs de deux types de fonctions acides, d'autres paramètres peuvent également être étudiés comme le pH ou la force ionique. Afin de simplifier l'étude, nous avons choisi de rester à force ionique et pH constants, c'est-à-dire de travailler dans du PBS 150 mM à pH 7.4. Ces restrictions ne nous permettent pas d'avoir une connaissance complète du système mais permettent de nous focaliser sur son intérêt dans le domaine pharmaceutique, à savoir créer des systèmes formulés sensibles au glucose. De plus, ces conditions sont similaires à celles de l'étude menée sur les hydrogels chargés en insuline. Les mesures sont réalisées à 25°C. Les cinétiques d'adsorption du HA-PBA DS= 0,33 à 0,5 g/L sont réalisées à l'interface dodécane/eau pendant 30 min avec et sans fructose (Figure 30).

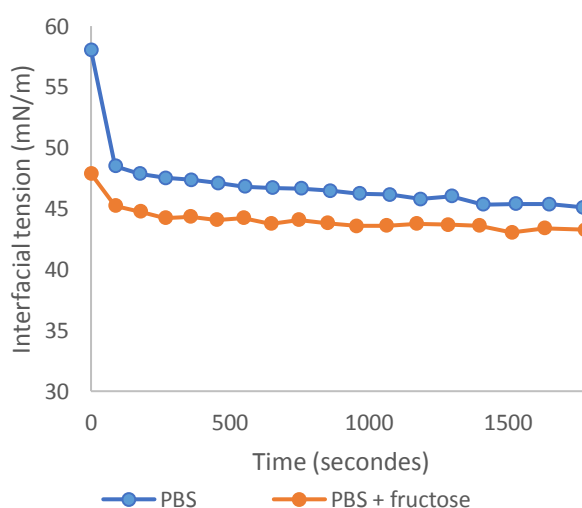


Figure 30 : Evolution cinétique de la tension de surface, mesurée par la méthode de la goutte pendante, d'une goutte de solution aqueuse de HA-PBA de DS 0,33 à 0,5 g/L dans du PBS à l'interface avec le dodécane avec et sans fructose.

Cette étude confirme le caractère amphiphile du polymère. En effet, celui-ci s'adsorbe progressivement à l'interface eau-huile, provoquant la chute de la tension interfaciale au cours du temps jusqu'à atteindre un plateau. En comparaison, la courbe d'évolution de la tension interfaciale d'une goutte contenant le HA non modifié reste constante, il n'a pas d'activité interfaciale [5]. Deux aspects sont à prendre en considération dans l'étude des données. L'état d'équilibre, correspondant à la valeur de tension interfaciale obtenue après stabilisation et la cinétique d'adsorption, qui correspond à la vitesse que le polymère met pour saturer la surface de la goutte ou être totalement adsorbé à sa surface pour une concentration donnée.

L'ajout de fructose dans la solution contenant le polymère HA-PBA est un paramètre intéressant à étudier. En effet, le fructose peut former des complexes avec les fonctions PBA qui lui sont accessibles. Une fois complexé, le boronate est sous sa forme chargée, ce qui implique une diminution de son hydrophobie. Le polymère est donc moins amphiphile et on peut s'attendre à une augmentation de la valeur de tension de surface à l'équilibre. Les résultats obtenus montrent une légère baisse de la tension de surface à l'équilibre cependant elle est peu marquée (différence de 2 mN/m). L'effet du fructose sur la tension de surface à l'équilibre semble négligeable. Si les fonctions boronates sont bien responsables de l'adsorption du HA à l'interface, elles ne semblent pas affectées par la présence de fructose. Une hypothèse est que l'équilibre entre boronates et esters de boronates soit différent en milieu homogène (dans l'eau) et en milieu biphasique. Les fonctions PBA ancrées dans le dodécane pourraient ne pas être accessibles pour le fructose présent.

L'effet de la concentration en polymère, et du degré de substitution ont été étudiés au sein de notre équipe pour un autre projet. En effet, des chaînes de poly (acide acrylique) ont été modifiées par des fonctions PBA, le PAA-PBA obtenus est étudié à différentes concentrations (0,05 ; 0,5 et 5 g/L). Les synthèses ont été réalisées dans l'équipe et deux taux de substitution sont obtenus DS= 0,25 et 0,4. Les PAA-PBA et HA-PBA sont tous deux des diacides et des polyélectrolytes, on s'attend à observer les mêmes comportements. Les résultats obtenus pour le PAA-PBA sont résumés ci-dessous. On peut s'attendre à retrouver ses comportements pour le HA-PBA.

Les valeurs de tension de surface aux plateaux diminuent quand la concentration en polymère augmente. La cinétique d'adsorption est accélérée quand la concentration en polymère augmente. L'effet du degré de substitution est étudié. Les cinétiques d'adsorption sont plus rapides pour les polymères de plus grand degré de substitution. De plus, la valeur l'équilibre est plus basse pour toutes les concentrations. Pour une chaîne de polymère fortement substituée, adsorbée à l'interface, une plus grande quantité de PBA peut s'adsorber à l'interface et ainsi la stabiliser plus fortement.

Un autre moyen de mettre en avant l'amphiphilie du HA-PBA est de l'utiliser pour stabiliser des émulsions.

7.2.2 Stabilisation d'émulsions

Les polymères amphiphiles sont connus pour leur capacité à stabiliser les émulsions [6],[7],[8]. En effet, les polymères se placent à l'interface, les parties hydrophobes du polymère privilégient la phase huile alors que les parties hydrophiles se placent préférentiellement dans la phase aqueuse. Le polymère ainsi adsorbé permet d'abaisser la surface tension entre les phases et de stabiliser les gouttes formées. L'utilisation du HA-PBA

pour stabiliser les émulsions est un autre moyen de mettre en avant l'activité interfaciale. De plus, l'utilisation de polymères biocompatibles, peut remplacer les tensioactifs conventionnels.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, les méthodes d'émulsification sont classées en plusieurs catégories : les procédés dits de basse énergie, qui correspondent aux faibles nombres de Reynolds, et les procédés dits de haute énergie, tels que les ultrasons ou encore les homogénéiseurs à haute pression. Ces derniers, à fort nombre de Reynolds, permettent de fragmenter des gouttes plus petites, souvent largement inférieures au micromètre.

L'ultrasonication est très courante dans ce domaine. Néanmoins, nous avons déjà démontré que le HA pouvait dépolymériser dans ces conditions. Pour cette raison, nous avons choisi de privilégier une émulsification par homogénéiseur à haute pression.

Une phase aqueuse, contenant le HA-PBA, est mise en contact d'une huile. La fraction volumique en huile du mélange est de 10 %. La phase organique est composée, soit de dodécane, soit d'une huile végétale, l'huile de soja. La phase aqueuse peut contenir ou non du fructose. Le milieu est un tampon PBS à pH 7.4. Pour comparaison, les mêmes conditions sont utilisées mais à pH 8.5. Les deux phases préparées sont mises en contact et pré-émulsionnées par Ultra-Turrax à 9600 tr/min pendant 30 secondes, puis elles sont introduites dans le microfluidiseur où elles passent dans des canaux microfluidiques afin d'obtenir une émulsion fine. La pression de l'homogénéiseur et le nombre de passages en continu de la pré-émulsion dans les canaux ont été fixés à 400 kPa et 50 cycles respectivement. Le protocole et les techniques de caractérisations sont décrits en partie expérimentale. Les émulsions obtenues sont présentées Figure 31.

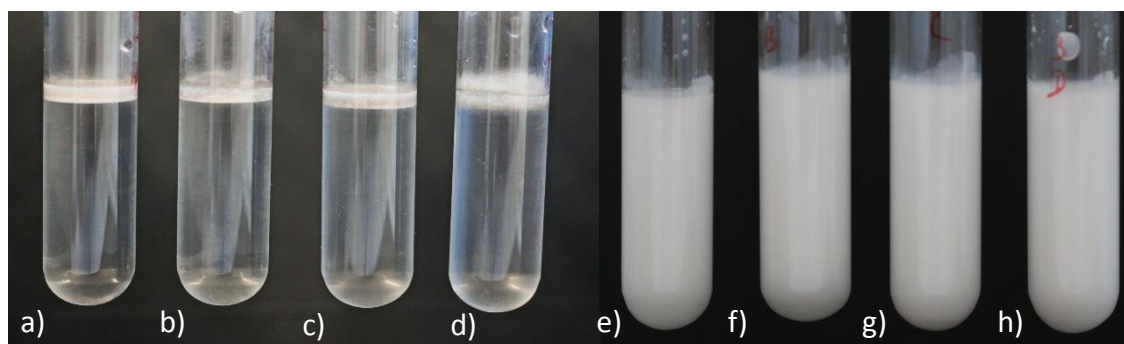


Figure 31: Photos des émulsions de HA-PBA DS 0,33 (concentration de HA-PBA dans la phase aqueuse 0,2 wt%) préparés dans des milieux a) PBS/dodécane, b) PBS + fructose 40 mM/dodécane c) tampon PBS pH 8,5/dodécane, d) tampon PBS à pH 8,5 + fructose 40 mM/dodécane e) PBS/huile de soja, f) PBS + fructose 40 mM/huile de soja g) tampon PBS 8,5/huile de soja et h) tampon PBS à 8,5 + fructose 40 mM/huile de soja. Photos a à d prises 9 mois après fabrication. Photos prises 1 mois après fabrication.

Dans le cas où la phase organique est du dodécane, les émulsions crèment au bout de quelques heures mais elles restent stables vis-à-vis de la coalescence. Aucun déphasage n'est observé, même après quelques mois de stockage. Les émulsions contenant de l'huile de soja sont également stables mais elles ne crèment pas. L'une des raisons peut être liée à la densité de l'huile de soja qui est plus proche de celle de l'eau (0,95 contre 0,75 pour le dodécane).

La taille des gouttes des émulsions est caractérisée par DLS, les résultats sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Récapitulatif des caractérisations des émulsions dodécane/PBS et Huile de soja/PBS stabilisées par du HA-PBA DS 0,33 à 0,2 wt% obtenues par DLS à différents pH et avec et sans fructose.

	Emulsion dodécane		Emulsion Soybean oil	
	z-average (nm)	pDI	z-average (nm)	pDI
PBS	1050	0,154	357	0,244
PBS + 40mM Fructose	977	0,108	318	0,122
PBS pH 8,5	1043	0,175	334	0,227
PBS pH 8,5 + 40 mM Fructose	937	0,077	348	0,168

Les profils des émulsions préparées dans le PBS/dodécane et le PBS/Huile de soja à pH 7,4 sont présentés à titre d'exemple Figure 32.

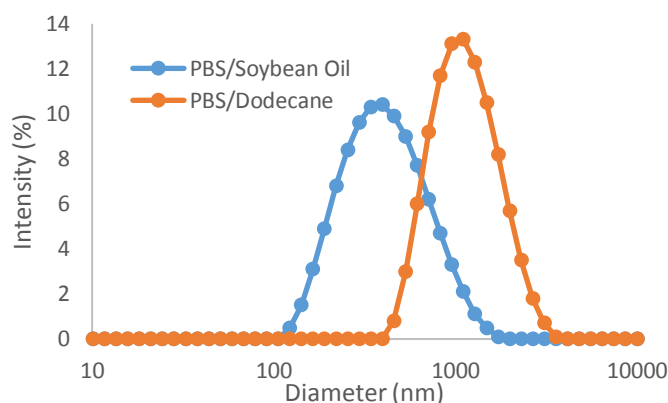


Figure 32 : Profil DLS des nanoémulsions stabilisées par le HA-PBA DS=0,33% à 0,2 wt%. Les huiles utilisées sont le dodécane (orange) et huile de soja (bleu).

Les émulsions préparées en utilisant le dodécane comme phase aqueuse ont des tailles de gouttes nettement plus grandes (autour de 1000 nm) que celles obtenues avec l'huile de soja (autour de 340 nm). Ceci permet d'expliquer l'absence de crémage des gouttes pour l'huile de soja. L'origine de la différence de taille peut s'expliquer par les différences de tensions interfaciales (non mesurées avec l'huile de soja) mais également des différences de viscosité [9], [10]. Ces deux facteurs sont importants dans l'étape de fragmentation.

7.2.2.1 Influence de la composition du milieu sur les émulsions obtenues

Les émulsions contenant du fructose ne présentent pas de différence flagrante avec leurs homologues, que ce soit dans leur stabilité au stockage ou en termes de granulométrie. Tout au plus, on constate une diminution de la polydispersité en présence de fructose. Une augmentation du pH déplace l'équilibre d'ionisation des boronates et modifie donc leur hydrophilie. Cependant, le pH ne semble pas jouer un rôle majeur sur l'état des émulsions.

7.2.2.2 *Influence de la composition du milieu sur la stabilité des émulsions*

La stabilité en présence de fructose est également étudiée en substituant la sous-phase aqueuse PBS obtenue après le crémage de l'émulsion préparée avec du dodécane par du PBS contenant du fructose. Les émulsions ne se déstabilisent pas. Ces données nous permettent de conclure que l'amphiphilie des HA-PBA ne dépend ni du pH, ni de la présence de fructose, ce qui semble confirmer que les fonctions PBA sont ancrées dans l'huile et ne sont pas accessibles pour le fructose.

Afin de déstabiliser les émulsions, on peut imaginer de cliver les chaînes de HA-PBA en segments de plus petite taille. Pour ce faire, de la hyaluronidase est ajoutée dans la phase continue de l'émulsion pour avoir une concentration de Hase de 300 U/mL. Cependant, pour une incubation à température de 37°C aucune déstabilisation n'est observée même après plusieurs jours. Nous n'avons pas été en mesure de dégrader les émulsions par voie enzymatique. Cependant, nous avons également montré que les microgels de HA-MA-PBA n'étaient pas dégradables par cette voie. Il est probable que l'enzyme ne dégrade pas les chaînes hautement modifiées.

Afin de mieux appréhender l'influence de la substitution de ces polymères hydrosolubles par le PBA, nous avons ensuite étudié leur comportement en solution. Il s'agit notamment d'évaluer si ces polymères amphiphiles peuvent former des auto-assemblages en solution.

7.3 Propriétés d'autoassemblages du HA-PBA

Afin de mieux connaître le comportement des HA-PBA en solution, leur capacité à former des autoassemblages en solution a été brièvement étudié par DLS et microscopie TEM. Les résultats préliminaires sont présentés dans ce paragraphe.

Des signes probants de la présence d'autoassemblages ont été observés lors des premiers essais menés avec du HA-PBA 60 kDa DS 0,33. Le HA-PBA est préparé en solution concentrée, à 0,6 %wt dans du PBS. La solution concentrée est diluée à différentes concentrations, et des mesures de DLS sont effectuées pour chaque dilution. La stabilité dans le temps du signal de diffusion est étudiée : après un maximum de 30 minutes les tailles des objets sont stables. Les distributions en taille obtenues montrent, après stabilisation, deux populations: la première correspondant à des tailles de l'ordre de 20 nm peut correspondre aux pelotes de HA-PBA en solution, alors que la deuxième observée aux environ de 200 à 400 nm suivant la concentration en HA-PBA. Cette population semble indiquer la présence d'assemblages colloïdaux (Figure 33 a).

Les images de TEM des mêmes solutions, montrent la présence de nombreux objets de taille comprise entre 100 et 200 nm, confirmant la présence des autoassemblages. (Figure 33 b)

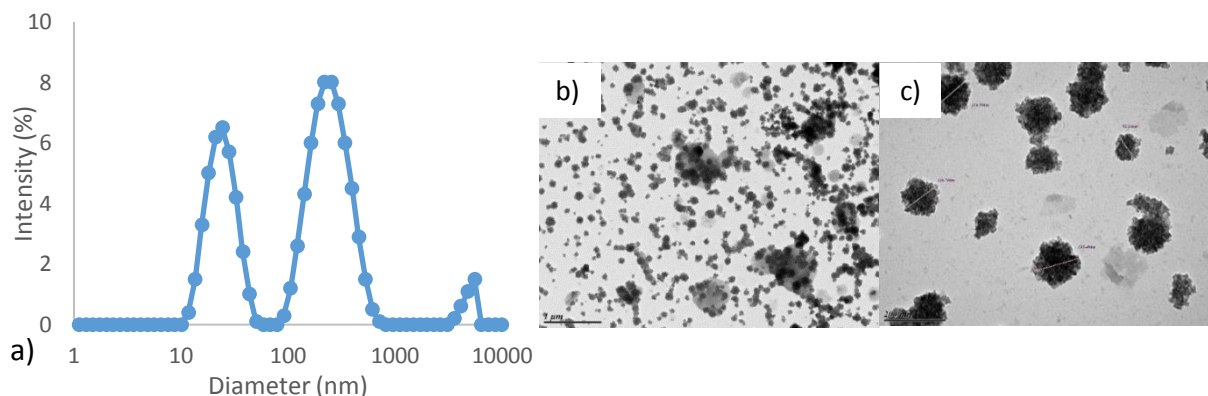


Figure 33: a) Profil de DLS obtenu pour une solution de HA-PBA Cp 0,1 wt% dans du tampon PBS b et c) Images de microscopie TEM des autoassemblages de HA-PBA observés pour une concentration de 0,1 wt% dans du PBS Echelle b) 1µm et c) 200 nm.

Cependant, l'étude par DLS du HA non modifié en solution montre la présence également de deux populations, avec des tailles comparables. Ces assemblages de HA observés peuvent être expliqués par l'enchevêtrement des chaînes et la présence de nombreuses liaisons hydrogène menant à une organisation des chaînes [11],[12],[13]. Cependant, en absence de modification de la chaîne de HA par le PBA, aucun objet n'a pu être détecté en TEM. Il semblerait donc que les objets soient issus de la fonctionnalisation.

En filtrant les solutions de HA avant le passage en DLS, le pic d'autoassemblage disparaît. En revanche, il est toujours présent si l'on applique le même traitement aux polymères modifiés avec les fonctions PBA, confirmant ainsi la présence d'autoassemblages. Ils sont formés par réorganisation du polymère de manière à minimiser le contact des fonctions PBA hydrophobes avec le milieu aqueux.

La formation des autoassemblages est aussi étudiée en présence de fructose et d'insuline. Dans le premier cas, la solution de HA-PBA concentrée à 0,6 wt% est diluée dans du tampon contenant 20 mM de fructose. Les résultats obtenus sont présentés Figure 34.

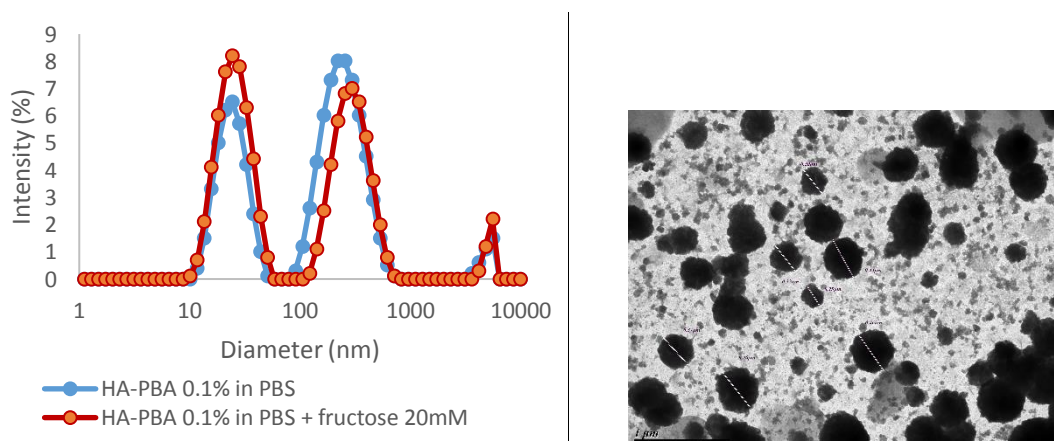


Figure 34: Autoassemblages de HA-PBA DS= 0,33 % à 0,1 wt% préparés en présence de fructose 20 mM du tampon PBS a) Profil de DLS b) Images de microscopie TEM Echelle 1µm.

Les autoassemblages sont stables en présence de fructose. L'intensité du pic représentant les pelotes de HA-PBA en solution est plus importante que celle des autoassemblages, ce qui n'est pas le cas dans le PBS

(Tableau 13). De plus il semblerait que les particules formées soient de plus grande taille (Tableau 13). Les particules observées en TEM ont des tailles comprises entre 250 et 500 nm ce qui semble confirmer l'augmentation de taille des objets en présence de fructose. Si le fructose parvient aux fonctions PBA, l'augmentation de l'hydrophobie du système ne semble pas suffisante pour déstabiliser les assemblages.

Dans le second cas, une solution d'insuline à 0,1 wt% est préparée dans du tampon PBS. Elle est diluée 5 fois ou 10 fois dans une solution de HA-PBA DS 0,33 (concentration finale 0,1 wt%). Les assemblages formés sont suivis par DLS et observés par TEM.

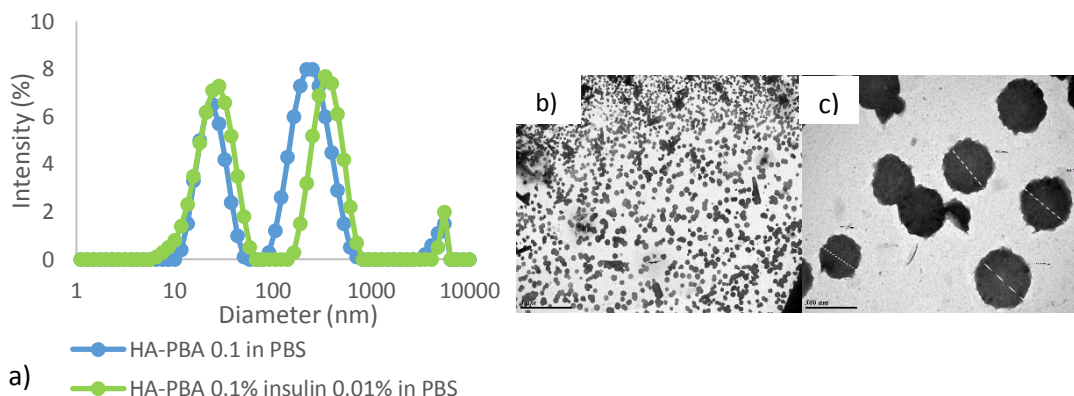


Figure 35 : a) Profil de DLS des autoassemblages de HA-PBA DS=0,33 % à 0,1 wt% en présence d'insuline 0,1wt% dans du PBS b et c) Images de microscopie TEM correspondant. Echelle b) 5 µm et c) 500 nm

Les assemblages sont également formés en présence d'insuline. Ils semblent de tailles plus importantes (Tableau 13). Les images de TEM semblent confirmer cette observation, les particules observées ont des tailles comprises entre 150 et 550 nm.

Tableau 13 : Récapitulatifs des tailles des autoassemblages obtenus et du signal des HA-PBA ainsi que l'intensité relative des pics en solution dans du PBS, du PBS + fructose 20 mM et du PBS + 0,01% d'insuline. La concentration en HA-PBA est de 0,1%.

	Peak HA-PBA in solution		Peak HA-PBA self-assembly structures	
	z-average (nm)	Intensity of the peak (%)	z-average (nm)	Intensity of the peak (%)
PBS	24	36	274	36
PBS + fructose 20 mM	27	43	334	54
PBS + insulin	27	27	565	73

A ce stade, l'étude des autoassemblages n'est pas poussée plus avant. Nous avons mis en évidence la présence d'autoassemblages du HA-PBA en solution. Ces autoassemblages se forment en présence d'insuline et de fructose. L'ajout de fructose ne permet pas de déstabiliser totalement les assemblages mais on constate une diminution de l'intensité diffusée associée.

7.4 Conclusion

Les systèmes étudiés issus de polymère amphiphiles modifiés avec des fonctions PBA sont complexes, les polymères ont sont potentiellement sensibles au pH et aux sucres comme le fructose. Le polymère étudié, le HA-PBA permet de former des autoassemblages et de stabiliser des émulsions huile-dans-eau. Cependant, les fonctions PBA ne sont pas toujours accessibles pour former des complexes avec les sucres susceptibles de modifier les propriétés de polymères et ainsi de déstabiliser les émulsions ou les autoassemblages.

Concernant ces derniers, une étude systématique pour différents pH et concentration en sucre pourrait être mise en œuvre après optimisation des protocoles.

Le comportement des gels préparés à partir des précurseurs contenant des fonctions PBA est complexe de par la nature des chaînes et la fonctionnalisation en PBA. Ce constat est valable pour la préparation des gels en milieu biphasique où les fonctions PBA peuvent s'adsorber aux interfaces, mais aussi en milieux aqueux où ils peuvent s'autoassembler en solution.

Références:

- [1] D. Tarus, E. Hachet, L. Messenger, B. Catargi, V. Ravaine, and R. Auzély-velty, "Readily Prepared Dynamic Hydrogels by Combining Phenyl Boronic Acid- and Maltose- Modified Anionic Polysaccharides at Neutral pH," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 35, pp. 2089–2095, 2014.
- [2] J. Mergy, A. Fournier, E. Hachet, and R. Auzély-Velty, "Modification of Polysaccharides Via Thiol-Ene Chemistry : A Versatile Route to Functional Biomaterials," *J. Polym. Sci. part A*, vol. 50, pp. 4019–4028, 2012.
- [3] R. Auzély-Velty, E. Hachet, B. Catargi, V. Ravaine, and L. Messenger, "WO2014072330A1(1).pdf," 2014.
- [4] S. Fleury-Souverain *et al.*, "The stability of insulin in plastic Syringes," *Eur. J. Hosp. Pharm.*, vol. 17, no. 1, pp. 3–6, 2011.
- [5] L. Messenger, "Nanogels de polysaccharides pour la délivrance d'insuline," Université de Bordeaux I.
- [6] J. E. Kim and Y. J. Park, "High paclitaxel-loaded and tumor cell-targeting hyaluronan-coated nanoemulsions," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 150, pp. 362–372, 2017.
- [7] M. Kong, X. Chen, and H. Park, "Design and investigation of nanoemulsified carrier based on amphiphile-modified hyaluronic acid," *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 2, pp. 462–469, 2011.
- [8] M. Kong and H. J. Park, "Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier," *Carbohydr. Polym.*, vol. 83, no. 3, pp. 1303–1310, 2011.
- [9] J. H. Dymond and H. A. O/ye, "Viscosity of Selected Liquid n-Alkanes," *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 23, no. 1, pp. 41–53, 1994.
- [10] H. Nouredini, B. C. Teoh, and L. Davis Clements, "Viscosities of vegetable oils and fatty acids," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 69, no. 12, pp. 1189–1191, 1992.
- [11] J. E. Scott, C. Cummings, and A. Brasst, "Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution , investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation," *Biochem. Journals*, vol. 274, pp. 699–705, 1991.
- [12] F. Heatley and J. E. Scott, "A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan.," *Biochem. J.*, vol. 254, pp. 489–493, 1988.
- [13] J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, and J. Kolar, "Hyaluronic acid (hyaluronan): A review," *Vet. Med. (Praha)*, vol. 53, no. 8, pp. 397–411, 2008.

Conclusion générale et perspectives.

Dans ce mémoire de thèse, nous avons pour objectif de sonder la potentialité des hydrogels de HA modifiés par des boronates pour encapsuler et délivrer l'insuline. Pour ce faire, nous avons préparé des hydrogels d'acide hyaluronique à plusieurs échelles. Les microgels ont été étudiés par microscopie confocale, afin de déterminer l'effet de la structure des gels sur leurs propriétés d'encapsulation. Cette méthode permet de sonder, les variations de volume des gels, la distribution des protéines chargées et la présence d'interactions entre les gels et les protéines encapsulées. Cette étude a permis également, de déterminer les propriétés de libération de protéines en présence de fructose afin d'identifier les gels qui pourraient être utilisés, en vue de libérer l'insuline de manière asservie à la glycémie. En fonction de ces résultats, l'étude quantitative de l'encapsulation et de la libération d'insuline par des macrogels est effectuée pour les formulations de gels prometteuses.

Dans les deux gammes de tailles, l'effet des modifications chimiques de la chaîne par les boronates, a été étudié en comparant le comportement des gels d'acide hyaluronique réticulés par des méthacrylates (HA-MA), avec les mêmes structures portant également des PBA ligand des sucres (HA-MA-PBA). L'effet de la structure des gels sur leurs propriétés a également été discuté, en faisant varier le taux de réticulation et la nature chimique de la réticulation. Des gels doublement réticulés ont été étudiés à l'échelle macroscopique. Leur porosité est modulable en présence de sucre, car ils présentent deux niveaux de réticulation, une permanente qui assure la stabilité du réseau, et une dynamique, qui met en jeu des fonctions PBA/maltose réversibles en présence de sucre.

L'étude de microgels par microscopie, a permis de sonder *in situ*, les effets de la nature chimique des gels, simultanément aux effets structuraux. La méthode s'est avérée pertinente pour identifier les microgels prometteurs. Pour cela, les gels de différentes compositions ont été chargés en protéines modèles, cette étude a permis de mieux comprendre leur structure et notamment d'estimer leur porosité et leur rigidité. L'impact du taux de méthacrylation ou de la présence d'un second réticulant sur ces caractéristiques a été décrit. De plus, des interactions spécifiques ont pu être mises en avant notamment pour les matrices de gels sensibles au sucre. Ces interactions mettent en jeu les fonctions PBA, et l'ajout de sucre comme le fructose dans le milieu a permis de déclencher la libération partielle de la protéine encapsulée. A ce stade, les gels préparés à partir de matrices de HA-MA-PBA sont identifiés comme de bons candidats pour l'application visée car ils libèrent l'insuline de façon différenciée en présence de sucre. Ainsi, ces structures ont été étudiées à l'échelle macroscopique. La libération d'insuline en présence de fructose a pu être observée. Cependant, une grande partie de la protéine encapsulée est libérée de façon non spécifique par diffusion vers le milieu extérieur de protéine non liée. Cette libération non contrôlée ne doit pas se produire, ces matériaux ne peuvent pas être utilisés pour le traitement du diabète, car l'insuline serait libérée même pour une faible glycémie. Les gels doublement réticulés à l'échelle macroscopique ont également été examinés pour déterminer leur capacité à encapsuler de l'insuline et la libérer de manière différenciée en présence de fructose. Cependant, la libération contrôlée d'insuline en présence de sucre n'a pas pu être observée, et la protéine semble majoritairement libérée par diffusion.

Pour les deux formulations, des variations de gonflement en présence de fructose sont établies, mais ces propriétés de gonflement sensibles aux sucres, ne semblent pas être corrélées aux propriétés de libération des

gels. Le levier principal, pour libérer l'insuline à bon escient, paraît être le contrôle des interactions entre la protéine et la chaîne de polymère. Ainsi, à l'avenir, pour les formulations présentant des réponses importantes au glucose en termes de gonflement, les interactions devront être étudiées.

Pour continuer ce travail, de nouveaux matériaux devront être développés en tenant compte de la meilleure compréhension des systèmes et des méthodes, acquis durant cette thèse.

De nouvelles structures de biopolymères sensibles au sucre, pourront être proposées par nos partenaires du CERMAV. Leur étude à l'échelle micrométrique par microscopie pourra être conduite. Les gels de tailles micrométriques et nanométriques ont été préparés par réticulation des chaînes de polymères en milieu confiné. Pour cela, une émulsion matricielle a été préparée par homogénéisation haute pression pour former des nanogouttes ou par microfluidique pour former des microgouttes. La taille des gouttes est contrôlée et induit la taille des gels obtenus. L'amélioration de la fabrication de microgels est possible. En effet, certains gels préparés par voie microfluidique ne sont pas de forme sphérique, ils sont allongés et cette morphologie vient de la forme de la goutte dans les capillaires lorsque les gouttes sont créées en régime de compression. Afin, de changer cette forme et la rendre sphérique, la préparation de microgels en milieu confiné peut être réalisée dans des puces microfluidique en PDMS. Cette technique permet de moduler plus facilement la géométrie des puces qui sont dessinées en fonction des besoins. Nous avons conçu et préparé des puces où la phase continue est introduite perpendiculairement à la phase dispersée (géométrie flow-focusing). Cette géométrie favorise la fragmentation et l'obtention de gouttes sphériques. Des structures de gels dynamiques pourront également être étudiées à l'échelle micrométrique par microscopie. Pour préparer des microgels dynamiques, les deux précurseurs menant à la création de la réticulation réversible comme par exemple un précurseur PBA et un précurseur diol, devront être mélangés juste avant la création des gouttes d'eau dans la phase continue. La formation des gouttes doit opérer avant que les fonctions PBA et diols aient eu le temps de se complexer. Pour cela nous avons conçu et préparé des puces microfluidique en PDMS qu'il est possible de tester. Une fois disponible, les interactions des matrices de gels avec les protéines et en particulier l'insuline pourront être étudiées.

Dans le cas où les protéines encapsulées n'interagissent pas avec les matrices de gel, nous avons présenté une stratégie d'encapsulation et de libération contrôlée. Le gel contenant la protéine non liée dans sa structure poreuse est mis au contact d'une macromolécule assez longue qui elle, interagit. Cette macromolécule va venir interagir sur la surface du gel, et en colmater les pores. La protéine peut être libérée par dégradation enzymatique de la macromolécule. Nous avons également essayé d'utiliser les interactions spécifiques PBA/diols pour lier de façon réversible la macromolécule à la matrice de gel. L'étape d'encapsulation a été un succès mais la libération contrôlée de la protéine n'a pas pu être observée. Cette stratégie d'encapsulation et de libération ne permet pas la libération de protéines comme l'insuline sur plusieurs cycles. Dans le cas où la macromolécule est dégradée, ce processus n'est pas réversible. Dans le cas où elle se détache grâce à la présence de sucre, en milieu ouvert, comme par exemple dans le corps humain, pour pouvoir colmater les pores pour un autre cycle, la macromolécule doit rester à proximité du gel. Pour ce faire, elle devra être liée au gel de manière covalente. Un des systèmes présentés dans ce manuscrit, met en jeu des microgels de Dex-Ma et des chaînes longues de HA-PBA modifiées à 33% comme macromolécule.

Afin d'améliorer l'encapsulation et la libération de protéines, l'étape de préparation des gels de Dex-Ma par voie microfluidique devra être améliorée pour moduler la rigidité et la porosité des gels obtenus. Les gels de Dex-Ma pourront être préparés par d'autres voies comme l'utilisation d'émulsion matricielle eau-dans-eau. De plus, les gels de Dex-Ma pourront être remplacés par des gels préparés à partir de biopolymère-diol obturés par un polymère-PBA. La proportion de fonctions diols présente sur la matrice de gel pourra être modulée, en faisant varier la quantité de greffons introduite sur la chaîne de biopolymère. Dans ce cas, il sera peut-être possible de modifier la capacité d'immobilisation de la macromolécule-PBA sur la surface du gel et ainsi, de libérer la protéine encapsulée en fonction du glucose. Un autre levier pour y arriver, serait d'adapter les propriétés de la macromolécule notamment en termes de longueur de chaînes et de taux de fonctionnalisation.

Parmi, les nouveaux systèmes potentiels, on peut envisager de modifier la structure de l'insuline par des sucres. Dans ce cas, une structure insuline/sucre reconnue par le boronate pourrait être libérée par compétition en cas de pic glycémique.

Pour finir, les formulations les plus prometteuses devront être étudiées *in vivo*. Il faudra comprendre l'interaction de ces nouveaux matériaux avec le vivant. Des tests *in vitro* pourront être menés, afin d'évaluer leur éventuelle cytotoxicité et leur hémocompatibilité. Par la suite, leur comportement *in vivo* sera examiné. Leur biodistribution pourra être suivie par imagerie. Pour cela, une fonctionnalisation préalable par des nanoparticules magnétiques ou des fluorophores sera nécessaire. L'étude de la libération d'insuline devra également être conduite *in vivo* pour optimiser la libération notamment en termes de pharmacocinétique.

Enfin, les précurseurs amphiphiles de HA-PBA ont montré leur complexité, et l'étude analytique de la libération d'insuline à partir de macrogels contenant des dérivés HA-PBA n'est pas triviale. Cependant, les propriétés d'autoassemblages et les propriétés interfaciales des précurseurs HA-PBA pourront être exploitées pour concevoir de nouveaux matériaux. En effet, il est possible de réticuler les assemblages, pour assurer leur stabilité et envisager la libération d'insuline en boucle fermée. De plus, nous avons montré qu'il est également possible de préparer des nanoémulsions. Dans les deux cas, la sensibilité au glucose devra être avérée. Si ce n'est pas le cas, ces nouveaux matériaux pourraient tout de même ouvrir des perspectives pour la thérapie de capture de neutrons par le bore pour le traitement du cancer. L'encapsulation de principe actifs hydrophobes tels des anticancéreux pourrait également être envisagée.

Partie expérimentale et Annexes.

1 Annexe 1 : Matériel

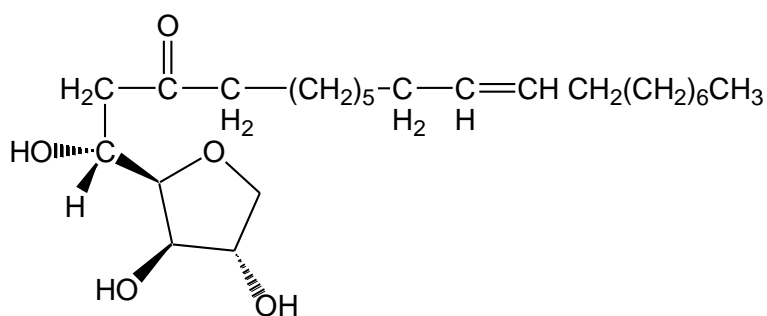
1.1 . Produits utilisés

L'acide hyaluronique (HA), 100 kDa ou 60 kDa a été utilisé comme fourni par Lifecore. L'anhydride méthacrylate, l'octane, le DMF, l'EtOH, le cyclohexane, le THF, le NaCl, l'EDC, l'APBA, l'HOBt, l'insuline-FITC, l'insuline humaine, le dextran-FITC (4, 10, 40 ou 70 kDa), la hyaluronidase type I-S, les tablettes de PBS, le Na_2HPO_4 , le NaH_2PO_4 , l'OTS, le chloroforme, le toluène, le BIS, le PEG-diacrylate, le dodécane, ont été utilisés, comme reçus de chez Sigma-Aldrich. Le D_2O provient d'Eurisotop. Le fluorophore Alexa 488 provient de Thermo-Fisher.

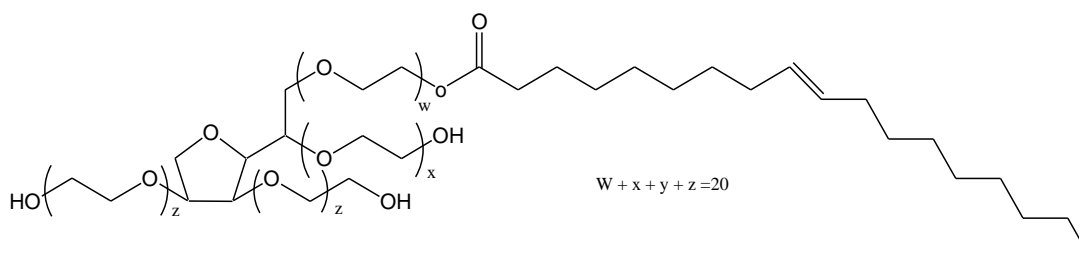
1.2 Formule développés des réactifs cités

1.2.1 Formules développées des tensioactifs utilisés

- a) Formule développée du monooleate de sorbitane (Span 80, Sigma)

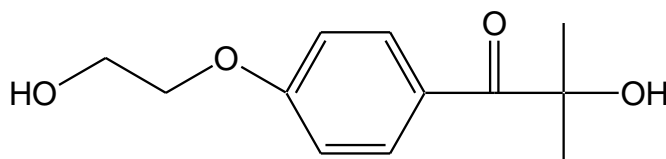


- b) Formule développée du polysorbate 80 (Tween 80, Sigma)



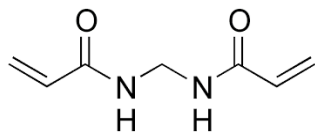
1.2.2 Formule développée de l'amorceur

Photopolymérisation : Irgacure 2959 (Ciba)

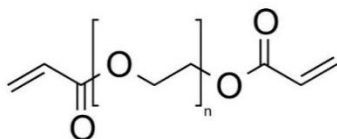


1.2.3 Formules développées de co-réticulants

a) N,N'-Méthylènebisacrylamide

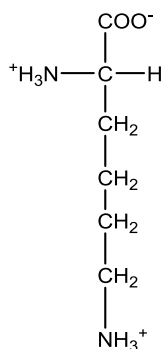


b) PEG-diacrylate n=3

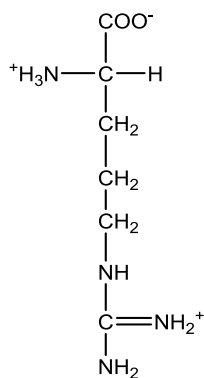


1.2.4 Formules développées des acides aminés cités

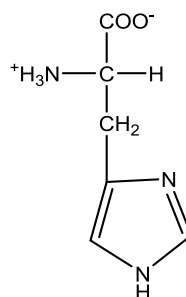
a) Acides aminés cationiques : lysine, arginine, histidine



Lysine

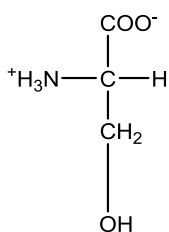


Arginine

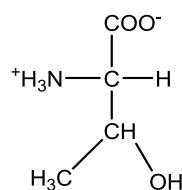


Histidine

b) Acides aminés polaires (porteurs de fonction -OH) : Sérine, Thréonine

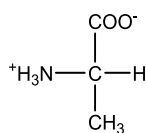


Sérine

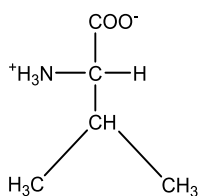


Thréonine

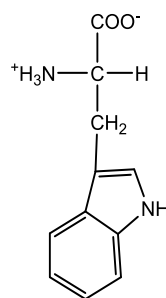
c) Acides aminés ayant une chaîne latérale hydrophobe :



Alanine



Valine



Tryptophane

2 Annexe 2 : Descriptifs des outils et appareils utilisés

2.1 ^1H -RMN

Les spectres ^1H -RMN des dérivés HA-MA, HA-MA-PBA, Dex-MA, PAA-PBA, et HA-PBA ont été enregistrés sur un appareil Bruker Avance II 400 MHz. Les spectres ont été acquis sur un nombre de points TD = 65 K et transformés sur 65 K points avec une EFP de 1.

Les spectres ^1H -RMN ont été réalisés dans le D_2O ($C=6\text{-}8$ mg/mL) à 80°C ou à 25°C avec un nombre de scans de 256 et un délai de 1s. La référence utilisée est alors le pic résiduel de l'eau, étalonné à 4.79 ppm pour une température de 298 K et à 4.21 ppm pour une température de 353 K. Ainsi le pic de l'eau recouvre pas celui des protons anomériques.

2.2 Caractéristiques de la lampe UV

Une lampe UV LC8 de chez Hamamatsu a été utilisée. Cette lampe Mercure-Xénon est équipée d'un miroir elliptique réfléchissant permettant une bonne efficacité d'irradiation (90 % de l'intensité réfléchi). La gamme spectrale de la lampe est reportée en Figure 1 a) (spectre gris). Cette gamme varie de 300 nm à 450 nm (centrée à 365 nm, type 01A). Le filtre utilisé en chapitre IV est le filtre A9616-05, bloquant les longueurs d'onde visibles et infra-rouges (spectre vert, Figure 1 a). Les longueurs d'onde transmises oscillent alors entre 300 nm-400 nm, et sont centrées à 365 nm. La puissance de lampe (Figure 1 b) balaye une gamme allant de 1% Puissance maximale ($45\text{ mW}/\text{cm}^2$) à la puissance maximale de $4500\text{ mW}/\text{cm}^2$.

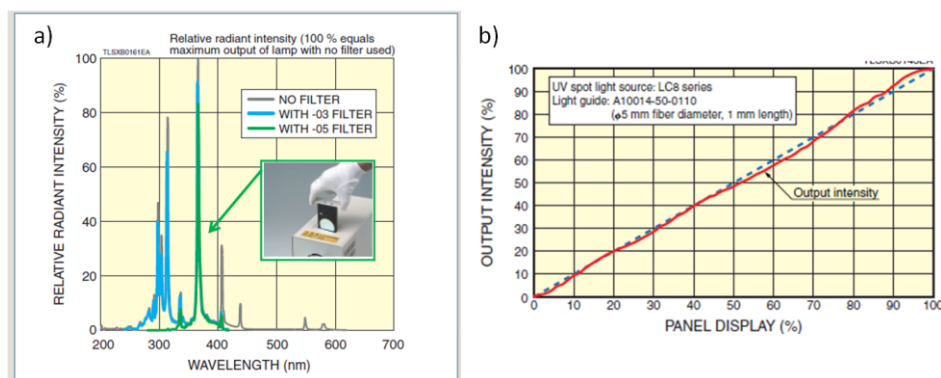


Figure 1 : a) Gamme spectrale de la lampe UV avec ou sans filtre (spectre vert et gris) ; b) gamme de puissance balayée.

2.3 Techniques de microscopie

2.3.1 Microscopie confocale

En bref, un faisceau laser est reflété par un miroir dichroïque vibrant (diviseur de réseau), puis dirigé à travers une lentille objective. Le faisceau traverse l'objet d'étude. Lorsque le laser frappe une zone de l'objet qui s'excite à la longueur d'onde du laser (comme un peptide fluorescent), la lumière émise obtenue est dirigée à travers les pinholes (petit trou) jusqu'à atteindre le détecteur. Le passage à travers les trous permet d'éliminer les informations hors focus. Une microscope confocale est représenté schématiquement Figure 2.

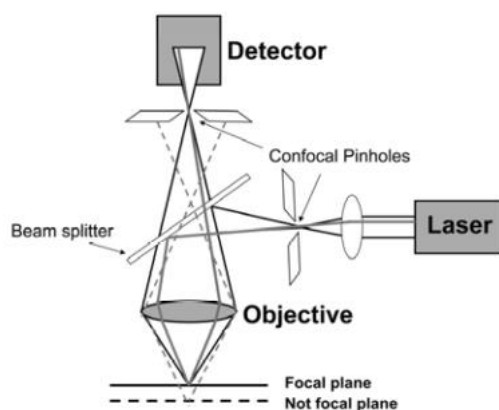


Figure 2 : Représentation schématique d'un microscope confocal. Illustration du chemin optique des photons collectés très précis, et des photons rejetés (traits pointillés).

2.3.2 Microscopie électronique à transmission (TEM)

Le principe général de la microscopie électronique consiste à utiliser des électrons à la place des photons. Le TEM nous a permis d'observer les nanogels ou les autoassemblages dans leur état sec, par détection des électrons du faisceau primaire qui passent à travers l'échantillon. La structure des nanogels, une fois redispersés en milieu aqueux ou des assemblages en solution ont été visualisés sur un TEM FEI Tecnai 12 biotwin 120 Kv. Pour ce faire, un aliquot 20 μL de suspension de nanogels ou d'autoassemblages en solution a été déposé sur une grille de cuivre recouverte d'un film carbone (maillage 400 Mesh). L'aliquot bien imprégné sur la grille est ensuite absorbé par le dessous avec du papier filtre. La visualisation TEM nécessite l'addition d'un agent de contraste électronique pour marquer les particules. L'acétate d'uranyle acidifié à 0,5% a été utilisé par dépôt d'un aliquot de 10 μL sur la grille.

2.4 Chambre d'observation :

Deux chambres d'observation sont utilisées, une chambre Ludin, et une chambre thermostatée Warner Chamber. Dans tous les cas, elles sont ouvertes, sur le dessus, et le fond est composé d'une lame circulaire, jointée à la structure de la chambre (Figure 3). Des tubes, d'entrée et de sortie sont connectés à la chambre d'observation, et permettent grâce à une pompe péristaltique (MiniPuls 3 Gilson).

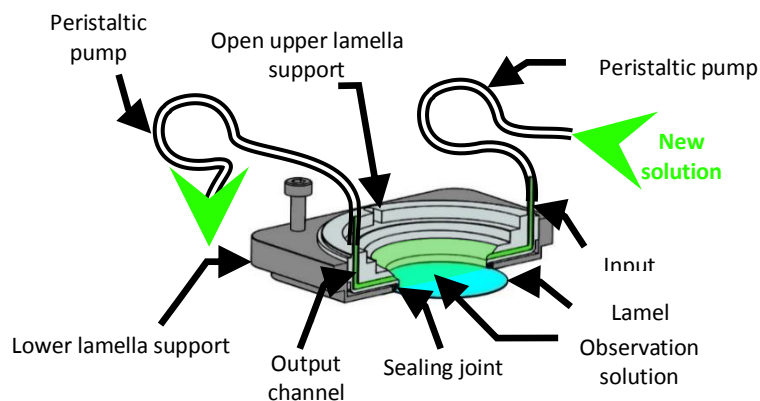


Figure 3 : Représentation schématique de la chambre d'observation Ludin, et des tubes d'entrée et de sortie de fluide.

2.5 Les homogénéiseurs haute pression ou microfluidizer

Les homogénéiseurs haute pression fonctionnent sous très haute pression allant jusqu'à 350 MPa, créant ainsi des taux de cisaillement très élevés. La pré-émulsion est amenée dans une chambre d'interaction munie de canaux de très faible diamètre ($\approx 100 \mu\text{m}$) et subit alors des cisaillements intenses dus aux vitesses d'écoulement très élevées ($\approx 1000 \text{ m/s}$) avant de passer dans une zone d'impact jet contre jet. Un microfluidiseur est représenté Figure 4.

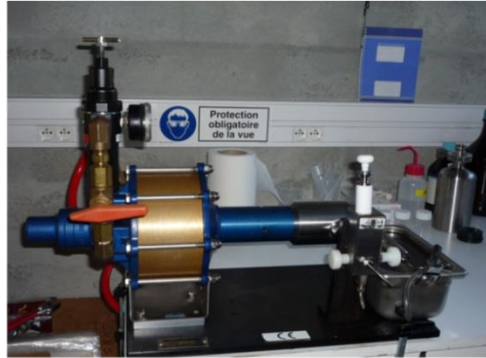


Figure 4 : Dispositif de fragmentation par homogénéisation haute pression

2.6 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La taille des émulsions et des nanogels et leur distribution respective (indice de polydispersité, PDI) a été mesurée par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS). La technique de DLS permet de mesurer le diamètre hydrodynamique des particules dans un solvant de viscosité connue. Le mouvement brownien des particules est à l'origine de fluctuations temporelles de l'intensité diffusée. Les corrélations entre l'intensité diffusée à un instant t pris pour origine, et celle diffusée à un instant $t+dt$ voisin peuvent être évaluées à l'aide de la fonction d'autocorrélation $C(t)$. Cette fonction est égale à l'unité lorsque t tend vers 0 et est égale à zéro lorsque t tend vers ∞ . Pour une dispersion monodisperse, la fonction d'autocorrélation décroît exponentiellement avec un temps caractéristique τ_c :

$$\tau_c = \frac{1}{D_{diff}q^2} \quad (\text{Équation 2.6.1})$$

où D_{diff} est le coefficient de diffusion translationnel des objets et q le vecteur de diffusion défini par l'expression suivante :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta_{diff}}{2} \quad (\text{Équation 2.6.2})$$

Dans l'expression de q , n est l'indice de réfraction du milieu, λ la longueur d'onde dans le vide du rayonnement incident et θ_{diff} l'angle de diffusion. La relation de Stokes-Einstein permet alors de déduire le rayon hydrodynamique R_h des objets dispersés :

$$D_{diff} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (\text{Équation 2.6.3})$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température et η la viscosité de la phase continue ou du solvant.

Le diamètre hydrodynamique moyen est alors généralement donné par la méthode des cumulants, qui consiste à donner le temps caractéristique à partir du logarithmique de la fonction de corrélation. Si les objets avaient une taille unique monodisperse nous aurions une droite parfaite. Comme il s'agit d'une distribution en tailles, l'écart à la linéarité traduit la largeur de la distribution. C'est cet écart qui sert à établir le PDI.

Les distributions en tailles et PDI des émulsions et des nanogels ont été déterminées à l'aide d'un Zetasizer Nano (Malvern Instruments) doté d'un laser HeNe et d'un système de détection à $\theta_{diff}=173^\circ$ (configuration A Figure 5). Les mesures ont été réalisées à 25°C sur les émulsions diluées

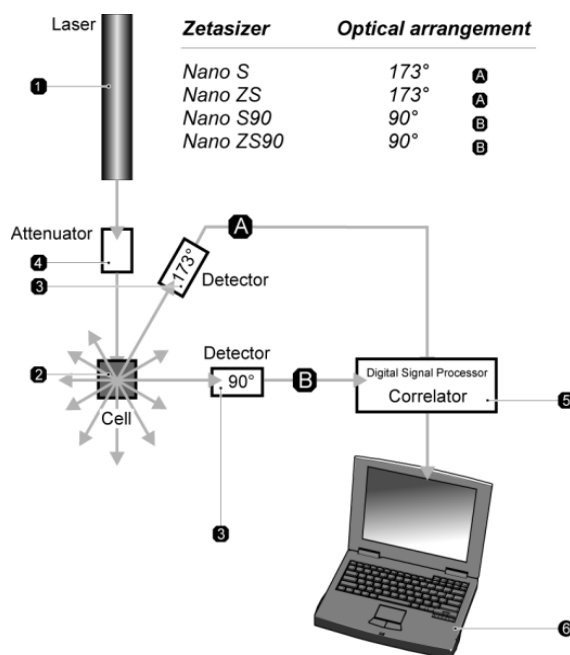


Figure 5 : Schématisation de la technique de DLS.

2.7 Zétamétrie

Le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entourent quand elle est en suspension ou en solution. En effet, lorsque celle-ci est en mouvement dans un liquide, elle s'entoure d'ions organisés en une « double couche électrique » (Figure 6) :

- une partie des ions s'accroche à la particule formant ainsi une couche d'ions adhérents dite couche dense
- l'autre partie des ions forme une couche non liée dite diffuse.

Le « plan de cisaillement » délimite ces deux couches. C'est la différence de potentiel entre le milieu de dispersion et le potentiel au plan de cisaillement qui définit le potentiel Zêta. Ce potentiel représente la mesure de l'intensité de répulsion ou d'attraction électrostatique entre particules

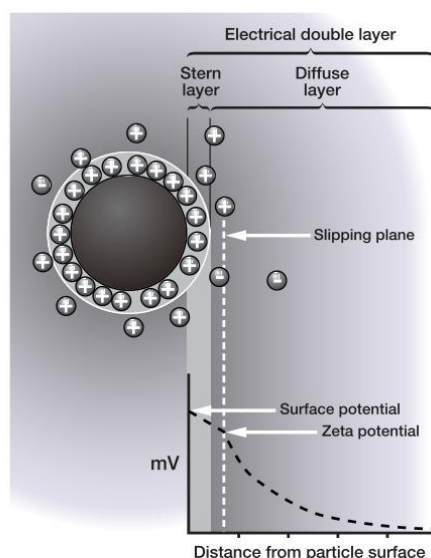


Figure 6 : représentation schématique d'une particule et de sa double couche électrique (source Malvern Instruments).

Sa mesure apporte donc une compréhension des causes de dispersion, d'agrégation ou de floculation et une solution d'amélioration de la formulation de dispersions, d'émulsions ou de suspensions.

Le potentiel zêta est calculé en déterminant la mobilité électrophorétique puis en appliquant l'équation d'Henry. La mobilité électrophorétique est obtenue par une mesure du mouvement d'une particule chargée par rapport au liquide dans lequel elle est en suspension et ce sous l'influence d'un champ électrique.

Lorsqu'un champ électrique est appliqué dans une solution électrolyte, les particules chargées en suspension sont attirées vers l'électrode de charge opposée. Les forces visqueuses s'opposent à ce mouvement. Quand l'équilibre est atteint, les particules se meuvent à vitesse constante. Cette vitesse dépend du champ électrique appliqué, de la constante diélectrique du milieu, de la viscosité du milieu et du potentiel zêta. La vitesse correspond à la mobilité électrophorétique.

L'équation d'Henry permet d'obtenir le potentiel zêta :

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad (\text{Équation 2.7.1})$$

Où z est le potentiel zêta. U_E , la mobilité électrophorétique, ε la constante diélectrique, η la viscosité et $f(ka)$ la fonction d'Henry (1,5 pour les milieux aqueux à faible concentration d'électrolyte dans l'approximation de Smoluchowski).

2.8 Mesures de tension interfaciale par la méthode de la goutte pendante

Il existe de nombreuses méthodes de mesure de tensions interfaciales entre deux liquides. L'une d'entre elles consiste à placer une goutte dans un champ de force : c'est le cas de la méthode de la goutte pendante. Une goutte de liquide est formée à l'extrémité d'une aiguille. La forme de cette goutte est déterminée par la

compétition entre les forces de pesanteur et les forces capillaires. Le contour de la goutte en tout point M d'ordonnée y (Figure 7) est décrit par l'équation de Laplace :

$$\gamma_{int} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta\rho g (y - h) + \frac{2\gamma_{int}}{b} \quad (\text{Équation 2.8.1})$$

où h et b sont respectivement l'ordonnée et le rayon de courbure au sommet de la goutte, R_1 et R_2 sont les deux rayons de courbure principaux au point considéré, et $\Delta\rho$ est la différence de densité entre les deux phases. Il est donc possible, en déterminant le profil de la goutte à l'équilibre (par numérisation d'image), de calculer la valeur de la tension interfaciale γ_{int} .

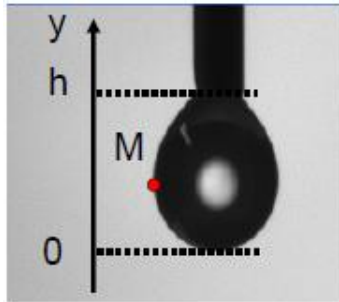


Figure 7 : Profil de goutte pendante

Pour ce faire, une goutte de 12 à 13 μL a été mise en suspension à l'extrémité de l'aiguille sur une gamme de temps variant entre 10 min et 60 min. La tension de surface a été enregistrée *via* le logiciel Scion capture.

3 Annexe 3 : Descriptif des différents protocoles

3.1 Protocoles de synthèses

3.1.1 Synthèse des HA-MA

A titre d'exemple, la synthèse de HA-MA ($M_w=100$ kDa), DS=0.2 est reportée.

L'acide hyaluronique (HA) (2.5 mmol) est solubilisé à 2% w/v dans 50 mL d'eau distillée à 4°C. La solution est gardée sous agitation pendant 4 heures. Un volume de 33 mL de DMF est ajouté au goutte à goutte afin d'obtenir un mélange DMF/eau de 3/2 (v/v) puis le pH du mélange est ajusté à pH=8. L'anhydride méthacrylique (AMA) (1eq molaire par rapport à l'acide hyaluronique) est ajouté à pH=8, T=4°C. Le pH du mélange est maintenu entre pH= 8 et pH=9 pendant 4 heures par ajout de NaOH à 0.5 N. La réaction est alors maintenue sous agitation toute la nuit à 4°C. Le lendemain, du NaCl à 0.5 N est ajouté dans le mélange. Le polymère est précipité par ajout de 150 mL d'éthanol (ratio water/etOH de 2/3). Le surnageant est prélevé et le précipité est lavé successivement avec des mélanges eau/EtOH de 3/7, 1/4 et 1/9. Après redispersion du précipité dans 80 mL d'eau ultrapure, la solution est purifiée par diafiltration (seuil de coupure : membrane 10 kDa, Millipore), pendant 24 h puis lyophilisée.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O , 80°C) : δ (ppm) : 2.5 (s, 3H CH_3 (MA)), 2.6 (s, 3H, CH_3CO), 3.9-4.5 (m, 9H), 5.1 (d, 1 H anomérique), 5.2 (d, 1 H anomérique), 6.4 (d, 1 H $\text{CH}_2=$), 6.8 (d, 1H $\text{CH}_2=$).

3.1.2 Synthèse des Dex-MA

Le protocole de synthèses de Dex-Ma est similaire à celui utilisé pour la synthèse des HA-MA. Le spectre RMN obtenu est présenté Figure 8. La mesure du taux de méthacrylate correspond au ratio de l'intensité relative des pics des méthacrylates à 5,8 et 6,3 ppm, et au pic du proton anomérique du dextran à 5 ppm.

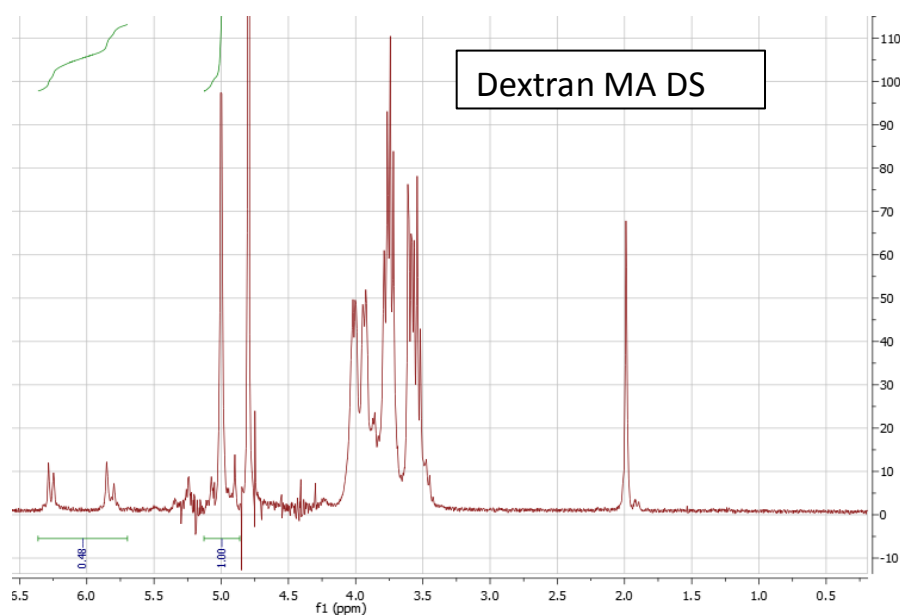


Figure 8 : Spectre RMN du Dextran-Méthacrylate DS 10

3.1.3 Synthèse de HA-PBA

A titre d'exemple la synthèse menant à la préparation de HA-PBA DS=0,33 est décrite. On solubilise le HA (350 mg) à 1,75wt% dans 80 mL d'eau salée ([NaCl]= 0.15 M) à température ambiante. Un volume de 50 mL d'éthanol est ajouté en filet afin d'obtenir un mélange EtOH/eau de 2/3 (v/v). Le dérivé d'acide phénylboronique l'ABPA (1 eq molaire par rapport à l'acide hyaluronique), est préalablement solubilisé dans 4 mL d'eau mQ, puis ajouté au mélange réactionnel. Ensuite, le HOBT (1eq/HA), solubilisé dans 3mL de DMSO, est ajouté au mélange réactionnel. Le pH de la réaction est alors diminué à pH=4,75 par ajout de HCl 1M pour une activation maximum des fonctions carboxyliques. L'EDC (1eq/HA), solubilisée dans 3,5 mL d'eau, est ajoutée. La réaction est alors maintenue à pH=4,75 pendant 18 heures à température ambiante sous agitation. Le lendemain, on ajoute du NaCl à une concentration de 0.5 N dans le mélange. On précipite le polymère par ajout de 125 mL d'éthanol (ratio eau/EtOH de 3/7). Le surnageant est prélevé et le précipité est redispersé dans un minimum d'eau (50 mL). La solution est ultra-filtrée pendant 45h puis lyophilisée.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O , 80°C): 1,9 ppm (s, 3H, CH_3 (MA)), 2,0 ppm (s, 3H, CH_3CO), 3,3-3,8 ppm (m, 9H, HA), 5,8 et 6,2 ppm (d, 2H $\text{CH}_2=$), 7,6 (dd, 4H, aromatiques).

Le détail du mécanisme de couplage du mécanisme de couplage d'un dérivé aminé sur un acide carboxylique en présence d'HOBT et d'EDC est détaillé Figure 9. Dans le cadre de ce travail, le dérivé aminé est l'APBA, et les fonctions acide carboxylique sont présentes sur la chaîne de HA.

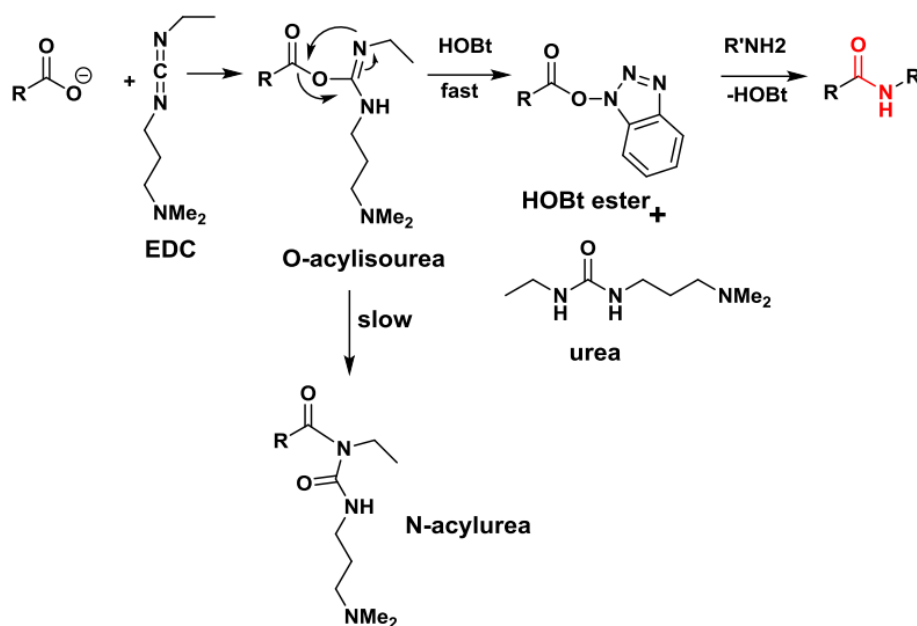


Figure 9 : Réaction de greffage de dérivé aminé sur un acide carboxylique via l'introduction d'EDC et d'HOBT

3.1.4 Greffage de FITC sur les chaînes de HA-PBA

On solubilise le HA-PBA (35 mg) à 4,38mg/L dans 8 mL d'eau salée ([NaCl]= 0.15 M) à température ambiante. Un volume de 8 mL d'éthanol est ajouté en filet. 152 μL de solution de fluorescéine à 0,1% dans l'éthanol est rajouté dans le milieu réactionnel. 10 μL de solution d'HOBT à 12mg/mL de DMSO sont ajoutés.

Le pH de la réaction est alors diminué à pH=4,75 par ajout de HCl 1M pour une activation maximum des fonctions carboxyliques. 10 μ L de solution d'EDC à 17mg/mL d'eau ultrapure sont finalement introduits. La réaction est alors maintenue à pH=4,75 pendant 18 heures à température ambiante sous agitation. Le lendemain, on ajoute du NaCl à une concentration de 0.5 N dans le mélange. On précipite le polymère par ajout de 125 mL d'éthanol (ratio eau/EtOH de 3/7). Le surnageant est prélevé et le précipité est redispersé dans un minimum d'eau. La solution est ultra-filtrée pendant 45H puis lyophilisée.

3.1.5 Greffage des fluorophores Alexa 488 sur les polylysines 15 et 150 kg/mol

La poly-L-lysine est modifiée par des fluorophore Alexa 488 en suivant la procédure standard recommandée par le fournisseur. En bref, 1 mg de fluorophore pour 10 mg de PLL sont mis à réagir pendant 1h dans du tampon bicarbonate à 0,1 M à PH 8,3. Le fluorophore est présolubilisé dans 100 μ L de DMSO. En fin de réaction, 100 μ L d'hydroxy ammonium 3M dans 900 μ L d'eau ultrapure sont introduits dans le volume réactionnel. L'excès d'Alexa 488 n'ayant pas réagi est enlevé par exclusion de taille en utilisant des colonnes PD-10 Sephadex (GE Healthcare 17085101).

3.2 Protocole de préparation de microgels

Les microgels de HA-MA, Dex-MA ou de HA-MA-PBA ont été préparés par photopolymérisation de gouttes eau contenant les précurseurs polymériques dans huile préparées par voie microfluidique. Une procédure typique est décrite ci-dessous.

3.2.1 Préparation des capillaires :

Le capillaire utilisé pour la phase continue a un diamètre interne de 250 μ m et un diamètre externe de 350 μ m, le capillaire utilisé pour la phase dispersée a un diamètre interne de 70 μ m et un diamètre externe de 150 μ m (Polymicro technologies). Le capillaire interne a une longueur de 7 cm environ. Le capillaire externe de 20 cm est protégé par une gaine, il est dénudé sur 2 cm afin de créer une fenêtre d'exposition aux UV.

Le capillaire externe contient la phase organique, il doit être traité de manière à rendre sa surface hydrophobe. Pour ce faire, 3mL d'une solution d'octadécyltrichlorosilane (OTS) 1,8 wt% dans du dodécane est passée à travers le capillaire à un débit de 6 mL/h. Le capillaire est par la suite rincé, avec un mélange contenant 5mL de toluène et 5mL de chloroforme passé à 6 mL/h.

3.2.2 Montage microfluidique

Le capillaire de plus petit diamètre, est inséré dans une jonction en T le long de l'axe horizontal (UpChurch Scientific, 1/16). A la sortie de la jonction en T, ce capillaire est introduit dans le capillaire de plus grand diamètre. Les deux capillaires sont ajustés avec des manchons tubulaires (UpChurch Scientific 1/16 diamètre interne). La jonction en T permet l'injection de la phase aqueuse dispersée dans la phase continue. Les deux phases sont alimentées grâce à des pousses seringues. Le montage est présenté Figure 10.



Figure 10 : Image du montage de microfluidique, et de l'approvisionnement des phases par les pousses-seringues.

3.2.3 Préparation des phases

La phase organique est composée d'octane ou d'huile de soja et de Span 80 (2 wt%) comme tensioactif.

La phase aqueuse contient le polymère d'intérêt acide hyaluronique (1.5 wt%) ou dextran (5 wt%), et l'initiateur Irgacure 2959 (0.1 wt%) et éventuellement un réticulant de concentration variable (BIS, PEG-diacrylate) dans une solution saline (NaCl 0.1M).

3.2.4 Polymérisation

Les deux phases sont injectées dans le montage microfluidique, le rapport phase aqueuse/phase organique est de $\frac{1}{2}$. Le débit des phases est minimum fixé à 2 et 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Si ces débits ne sont pas suffisants pour permettre l'écoulement des gouttes formées dans le capillaire, ils sont augmentés en maintenant un ratio $\frac{1}{2}$ entre les phases. Une fois la fragmentation de la phase aqueuse réalisée, dix minutes sont attendues afin de permettre la stabilisation des phases. La polymérisation est ensuite réalisée en plaçant la puce microfluidique sous une lampe UV (Hamamatsu LC8, L9588-06). L'irradiation UV ($\lambda=300$ à 450 nm centré à 365nm) est dirigée sur la fenêtre déprotégée du capillaire de plus grand diamètre. La lampe est utilisée à pleine puissance 100 % en utilisant le spectre complet sans filtre elle est située à 3,5 cm du capillaire. Les caractéristiques de la lampe sont décrites précédemment.

3.2.5 Collecte des microgels

Les microgels obtenus sont collectés à la sortie du capillaire de plus grand diamètre. Dans certains cas, cette irradiation dans le capillaire n'est pas suffisante pour assurer la polymérisation des microgels sur tout le volume. Dans ce cas-là, les gels sont collectés dans des pots en verre à fond plat, de manière à ne pas avoir une superposition de couches de microgels et ils sont irradiés une deuxième fois dans les mêmes conditions pour une durée de 5 min, c'est le cas des gels de Dex-MA.

3.2.6 Lavage

Les microgels sont lavés dans du THF, et centrifugés à 7000 tr/min pendant 5 min afin d'enlever la phase organique. 5 lavages sont réalisés. Les gels sont ensuite laissés à sec pour évaporation du THF pendant une nuit, puis redispersés dans de l'eau mQ et lyophilisés. Enfin les gels sont redispersés en milieux aqueux dans un volume minimum pendant minimum trois jours.

3.3 Protocole de préparation de nanogels

Les nanogels de HA-MA, HA-MA,BIS ou de HA-MA-PBA ont été préparés par photopolymérisation en miniémulsion inverse. Une procédure typique est décrite ci-dessous.

3.3.1 Formulation de l'émulsion

Du HA-MA (1.5 wt%) est solubilisé en présence de 0.05 wt% de photoamorceur (Irgacure 2959) en milieu aqueux, $[NaCl]=0.15M$ (ratio $[photoamorceur] / [MA]$ of 0.30). La dispersion transparente est ensuite ajoutée à une solution d'octane, contenant 8 wt% de Span 80. La fraction volumique Φ est de 10%. Le mélange hétérogène est ensuite placé sous agitation magnétique pendant 15 min conduisant à la formation d'une pré-émulsion, qui est ensuite fragmentée par homogénéiseur haute pression. Les émulsions ont été fragmentées en utilisant un dispositif Microfluidizer® M-110S opérant à 400 kPa. Les émulsions ont été homogénéisées après 50 cycles, avec un passage dans un bain d'eau froide (6-9°C) entre chaque cycle.

3.3.2 Photopolymérisation (en ligne dans capillaires)

Les émulsions stables sont passées dans un capillaire de verre de 400 μm de diamètre pour un débit de 60 $\mu L/min$. Le capillaire et donc l'émulsion est irradié sur 2 cm de longueur par la lampe placée à 3,5 cm. La lampe centrée à 365 μm et fonctionne à 100 % soit à 4500 mW/cm^2 .

3.3.3 Purification

Les nanogels réticulés sont ensuite purifiés par précipitation au THF. Le mélange hétérogène est ensuite centrifugé pendant 45 min à 1h à 13 000 tr/min. Le surnageant est ensuite séchés sous vide pendant 24 h, puis redispersés dans de l'eau ultrapure dans $\frac{1}{2}$ du volume l'émulsion avant lavage. La suspension finale est stockée à 4°C jusqu'à utilisation.

3.4 Préparation des capillaires utilisés pour immobiliser les microgels

Afin de préparer des capillaires pour maintenir les gels, des capillaires en verre borosilicate avec filament (O.D= 1mm ; I.D= 0,75mm) TW 100F-4 sont utilisés. Ils sont étirés en utilisant une étireuse Flaming (P-97, Sutter). Le programme d'étirage choisi est le suivant : heat 515, pull 90, velocity 70 delay 70. Heat correspond à la puissance du laser et donc à la quantité d'énergie fournit au verre. Velocity correspond à la vitesse à laquelle les mâchoires maintenant le capillaire doivent bouger au cours de la phase de pré-étirage. Cette vitesse est dépendante de la viscosité du verre utilisé et donc de la température. Delay contrôle la durée de l'étirage de manière relative à la désactivation du laser. Pull contrôle la force de l'étirage.

Les pipettes ont après étirage une forme conique en pointe. Afin, d'obtenir une section de taille contrôlée, une microforge est utilisée, pour chauffer et découper la pointe jusqu'à ce qu'elle est le diamètre requis (10 à 20 μm).

3.5 Etude des microgels en microscopie

3.5.1 Mesure du taux de gonflement

Un microgel est immobilisé au bout d'une micropipette par aspiration. Le microgel est ensuite immergé dans une solution d'eau ultrapure présente dans la chambre d'observation Ludin. Le microgel est ensuite rincé à un débit de par 10 mL de tampon PBS à un débit de 2 mL/min. Puis après 10 minutes d'incubation il est rincé par 10 mL de PBS auquel a été ajouté 1 M de NaCl à un débit de 2 mL/min. Enfin, après 10 minutes d'incubation il est rincé par 10 mL d'eau ultrapure. A chaque étape les dimensions du gel sont mesurées en direct grâce à la microscopie en transmission.

3.5.2 Etude du chargement de microgels

Un microgel est immobilisé au bout d'une micropipette par aspiration. Le microgel est ensuite immergé dans une solution de PBS présente dans la chambre d'observation Ludin. Le microgel est rincé à 2 mL/min par une solution de peptide (PLL 15 kDa, PLL 150 kDa, insuline-FITC, dextran-FITC) à 0,01 wt% pour remplacer le milieu. Après 1h30 d'incubation, le milieu est rincé à 2 mL/min par du tampon PBS. Le microgel est observé en direct par microscopie. Pour les peptides marqués par des fluorophores, l'observation est réalisée en simultanée par microscopie confocale. Dans ce cas, les PLL sont marquées par des Alexa 488 ou 633 et le dextran et l'insuline sont marqués par la fluorescéine.

3.5.3 Etude de la dégradation des microgels

Un microgel chargé ou non, est immobilisé au bout d'une micropipette par aspiration. Le microgel est ensuite immergé dans une solution de PBS. Le milieu est chauffé à 37°C. Une solution concentrée de Hase est ajoutée dans le milieu pour obtenir une concentration finale de 500 UI/mL. L'évolution des dimensions des microgels sont suivis en direct par microscopie en transmission.

3.5.4 Détermination de la taille des pores des microgels

Un microgel est immobilisé au bout d'une micropipette par aspiration. Le microgel est ensuite immergé dans du tampon PBS. Le milieu est substitué par une solution de dextran-FITC à 0,1 mg/mL. L'incubation a lieu pendant 1h. Les microgels sont observés par microscopie confocale. Les solutions de dextran étudiées contiennent du dextran 4, 10, 40 et 70 kg/mol à 0,1 wt%.

Pour les gels qui n'interagissent pas avec les dextrans, l'incubation est menée dans un vial pendant une nuit. Les gels sont observés par microscopie confocale.

3.5.5 Etude de l'encapsulation et de la libération des peptides

Pour les espèces qui n'interagissent pas avec les matrices de gel :

Un gel préalablement mis à incubé dans une solution de peptide de 0,1 wt% pendant une nuit, est immobilisé grâce à une micropipette. Une macromolécule qui interagit, comme la PLL 150 kg/mol sont utilisés pour confiné le peptide qui n'interagit pas avec le gel. La PLL est ajoutée pour avoir une concentration finale de 0,01 wt%, l'incubation a lieu pendant une heure puis le milieu est rincé par du PBS à un débit de 2 mL/min pour enlever l'excès de PLL et de peptide. Pour déclencher la libération le milieu est chauffé à 37°C pour

cliver la PLL. La perte de fluorescence est mesurée par fluorescence. Toutes les étapes sont suivies par microscopie confocale et en transmission.

Pour les espèces qui interagissent avec les matrices de gel :

Les microgels sont mis à incuber dans des solutions d'insuline ou de dextran de 0,01 wt% pendant une heure minimum. Puis, le milieu est rincé par du PBS à un débit de 2 mL/min pour enlever l'excès d'espèce non encapsulée dans le gel. Enfin, le milieu est rincé par du PBS contenant 20 mM de fructose à un débit de 2 mL/min. Les différentes étapes sont suivies par microscopie confocale et en transmission.

3.6 Dosage de l'insuline par HPLC

3.6.1 Détection UV

Le filtrat est analysé par HPLC en double par HPLC (Merck-Hitachi LaChrom D7000) équipé d'un passeur d'échantillon L-7250, d'une pompe haute pression L7100 et d'un détecteur à réseau de diodes L-7455. Les séparations sont réalisées à l'aide d'une colonne Ultrasep C8 avec un diamètre de particules de 6 μm (Bischoff Chromatography). La phase mobile est constituée de 28,4 g L⁻¹ de sulfate de sodium ajustée à un pH de 2,3, de l'acétonitrile et du 2-méthoxyethanol (ratio 770 : 274 : 6). Le débit est de 1 mL par minute, la détection est suivie à 212 nm et le volume d'injection est de 10 μL .

La phase stationnaire est composée de silice dont les groupements hydroxyles ont été modifiés pour y ajouter des chaînes alkyles C8 qui lui confèrent son caractère apolaire. Le temps de rétention de l'insuline dans ces conditions est aux alentours de 3min.

3.6.2 Détection par spectroscopie de masse

L'analyse HPLC est menée sur une colonne JUPITER C18 de longueur 150 mm, de diamètre de particule 5 μm et de diamètre de pore 300 Angstrom. La phase stationnaire est à base de silice sur laquelle au niveau des groupements hydroxyles ont été greffés des chaînes alkyles, lui conférant un caractère apolaire. La phase mobile utilisée est polaire, il s'agit dans ce cas d'un mélange eau/0,1 % d'acide formique. Le volume prélevé par le système d'injection programmable est fixé à 20 μL . Le débit de la phase mobile est de 0,2 mL/min; Le temps d'analyse pour chaque prélèvement est de 22 min. Le gradient d'élution choisi correspond au passage du mélange acétonitrile /0,1 % d'acide formique de 0 à 100 % en 14 min. Le temps de rétention de l'insuline dans ces conditions est compris entre 11,4 et 11,6 min.

La détection se fait grâce à un spectromètre API 3200 (AB SCIex) triple quadripôle.

Colonne extraction strata X

Strata X est un sorbant polymérique à base de polystyrène-divinylbenzène modifié par du N-vinylpyrrolidone. Les cartouches permettent la rétention de l'insuline par des interactions hydrophobes, aromatiques et polaires (sorbant base silice greffée C18 permet une rétention seulement par interactions hydrophobes).

4 Annexe 4 Compléments d'informations relatifs aux résultats

4.1 Théorie du gonflement

Le gonflement des gels neutres peut être analysé par la théorie de Flory [1]. Le gonflement d'un hydrogel est conditionné par un ensemble de contributions indépendantes et coordonnées de ses deux parties constitutives à savoir son réseau et le solvant. L'équilibre de gonflement des hydrogels dépend alors de la densité de réticulation et du caractère hydrophile des chaînes polymères. Le gonflement d'un gel est décrit par la pression de gonflement, elle-même composée d'une partie osmotique (π_{osm}) et d'une partie élastique (π_{elas}) de telle sorte que :

$$\pi = \pi_{osm} + \pi_{elas} \quad (\text{Équation 4.1.1})$$

Selon la théorie de Flory, un hydrogel tend à maximiser les interactions entre sa chaîne polymère et le milieu extérieur en respectant l'équilibre des potentiels chimiques entre l'intérieur et l'extérieur du réseau. Cette première force est modulée selon l'affinité des chaînes polymères avec le solvant : ainsi, π_{osm} peut aussi être notée π_{mel} . Bien que le réseau immergé dans un bon solvant ait tendance à se disperser le plus loin possible (action de π_{mel}), cette action est limitée par la réticulation permanente. Cette réaction élastique est exprimée par π_{el} , et elle agit contre le gonflement. Il va s'ensuivre une compétition entre l'énergie qui tend à disperser les chaînes et l'énergie qui tend à ramener la conformation moyenne des chaînes dans leur état d'équilibre, c'est-à-dire sans étirage. Ainsi, le degré de réticulation de l'hydrogel limite le gonflement de l'hydrogel jusqu'à l'équilibre des forces élastiques du système et des forces osmotiques, c'est-à-dire lorsque la pression est nulle.

D'un point de vue thermodynamique, le gonflement d'un gel peut être vu comme le mélange d'un réseau dans un solvant. En adaptant la théorie des polymères en solution, Flory postule que l'enthalpie libre de mélange d'un réseau de polymère réticulé en immersion dans un fluide (ΔG_{tot}) combine deux grandeurs opposées : une enthalpie libre de mélange des polymères en solution (ΔG_{mel}) et un terme supplémentaire d'énergie libre élastique (ΔG_{elas}) pour tenir compte des effets de la réticulation, soit [2] :

$$\Delta G = \Delta G_{osm} + \Delta G_{elas} \quad (\text{Équation 4.1.2})$$

Le gonflement du réseau à l'équilibre correspond à la situation où la pression π est nulle. Sachant que π dérive de l'enthalpie libre, on admet que la fraction volumique en polymère ϕ_2 à l'équilibre est donnée par [3]:

$$\phi_2 = \left\{ \frac{X v_1}{v_c (\frac{1}{2} - X_{12})} \right\}^{3/5} \quad (\text{Équation 4.1.3})$$

Où X représente le nombre de point de réticulation présent dans le réseau à l'état contracté et v_1 rappelle le volume molaire du solvant. La grandeur $\frac{X}{v_c}$ décrit la densité moyenne de réticulant au sein de l'hydrogel à l'état contracté. La grandeur X_{12} est le paramètre d'interaction de Flory entre le solvant et le polymère, et peut être discriminée de la manière suivante :

- Pour $\chi_{12} > \frac{1}{2}$, le polymère, plus difficile à dissoudre, est en régime mauvais solvant;
- Pour $\chi_{12} < \frac{1}{2}$, le polymère est en régime bon solvant;
- La valeur limite $\chi_{12} = \frac{1}{2}$ correspond à un état de solvation nommé solvant θ .

Ainsi, le gonflement d'un réseau neutre est associé à sa fraction volumique qui dépend de la composition de ce dernier (nœud de réticulation χ) mais aussi de sa solvation (contribution de χ_{12}).

Dans le cas où le réseau est chargé, le gonflement ne peut directement être associé aux considérations décrites ci-dessus. La théorie des gels neutres peut être complétée par des termes supplémentaires π_{ion} (contribution des ions) et π_{coul} (contribution électrostatique), chacune de ces contributions agissant en faveur d'un gonflement du réseau.

$$\pi = \pi_{osm} + \pi_{elas} + \pi_{ion} + \pi_{coul} \quad (\text{Équation 4.1.4})$$

La contribution électrostatique est souvent négligée, en revanche la contribution due à la présence d'ions peut s'écrire :

$$\pi_{ion} = \frac{k_B T}{v_1} \{m \varphi_2 \ln(m \varphi_2)\} \quad (\text{Équation 4.1.5})$$

Où m est le degré d'ionisation du réseau. En régime bon solvant ($\chi_{12} < 0.5$), la contribution des charges apporte une pression positive, soit un gonflement supplémentaire en comparaison à celui d'un gel non chargé. En mauvais solvant ($\chi_{12} > 0.5$), les gels ioniques se caractérisent par une importante « résistance entropique » au dégonflement. Le confinement des contre-ions est très défavorable, se traduisant par le maintien à l'état gonflé pour des valeurs de χ_{12} très supérieures à 0,5. Toutefois, à partir d'une valeur critique de χ_{12} , cette « résistance entropique » ne contrebalance plus l'effet de non-solvation et le gel transite vers l'état dégonflé.

4.2 Calcul de la concentration critique de recouvrement C^*

Comme illustré en Figure 11, la concentration critique de recouvrement C^* est une grandeur caractéristique des polymères en solution. Elle correspond au passage du régime dilué (pas de recouvrement des pelotes, à gauche), au régime enchevêtré (recouvrement de pelotes, à droite). A $C = C^*$ le régime est semi-dilué. La concentration C^* peut être calculée par la relation suivante :

$$C^* = \frac{M_w}{\frac{4}{3} \pi R_g^3 N_A} \quad (\text{Équation 4.3.1})$$

Où, M_w est la masse molaire en poids du HA, R_g le rayon de giration des pelotes et N_A le nombre d'Avogadro.

Le rayon de giration peut être estimé, en supposant le polymère en bon solvant et en négligeant la contribution des charges, par la relation :

$$R_g = a N^{\frac{3}{5}} \quad (\text{Équation 4.3.2})$$

Où, a est la longueur d'une unité monomère (10 Å pour le HA) et N le nombre d'unités monomères.

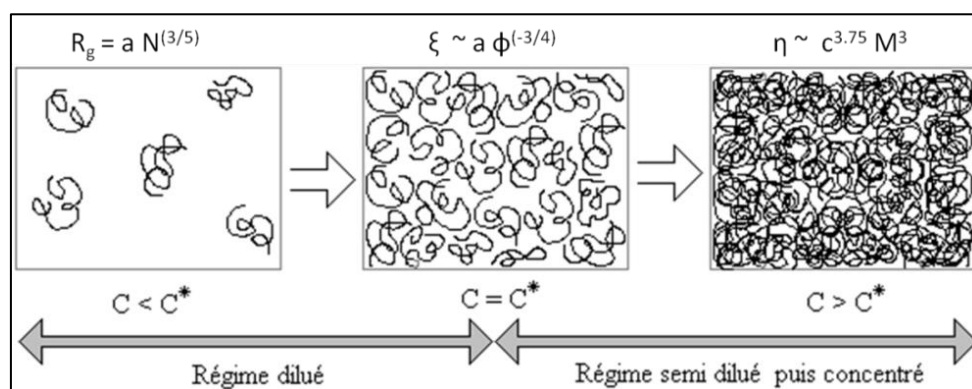


Figure 11 : Illustration des régimes de concentration et lois d'échelles

En utilisant ces deux équations, nous avons calculé le rayon de giration et la concentration critique de recouvrement pour le HA de masse molaire M_w variable, respectivement 20, 100 et 200 kDa, et comparées celles-ci avec celles trouvées par l'équipe de Rinaudo sur le HA 350 kDa [4]. Les données sont reportées en Tableau 1.

Tableau 1 : Grandeurs caractéristiques R_g et C^* des HA en solutions.

M_w HA (kDa)	R_g (nm)	C^* (g/L)
20	10	8.9
100	28	1.8
200	42	1.1
350	/	0.66

4.3 Calcul du paramètre de maille des gels de HA-MA DS 20 %

Dans le chapitre 3 paragraphe 3.2.3, nous avons entrepris d'estimer la porosité des gels préparés à partir des différentes huiles de manière théorique. Nous détaillerons ici les calculs pour l'exemple du microgel de HA-MA₂₀ préparé dans l'huile de soja. Ce microgel est de forme allongée décrite Figure 13.

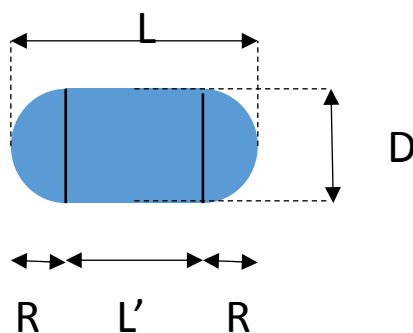


Figure 12 : représentation schématique d'un microgel de forme allongée

Le volume du gel à l'état gonflé dans un tampon donné comme le PBS, peut être déterminé grâce à la mesure des dimensions L et D du gel qui correspondent respectivement au diamètre du gel et à sa longueur. Son volume peut donc s'exprimer en fonction des dimensions L' et R avec $L' = L - 2R$ et $R = D/2$:

$$V_{PBS} = \frac{4}{3} \pi R^3 + \pi R^2 L' \quad (\text{Équation 4.4.1})$$

Pour le microgel de HA-MA₂₀ préparé dans l'huile de soja, les dimensions mesurées sont $D = 353 \mu\text{m}$ et $L = 413 \mu\text{m}$. On en déduit $L' = 60 \mu\text{m}$ et $R = 176,5 \mu\text{m}$. Le volume du gel gonflé d'eau peut nous permettre de déterminer la masse d'eau dans le gel. Le volume du gel est de $2,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3$. Sa masse est de $2,9 \cdot 10^{-5} \text{ g}$. en considérant que la masse de polymère est négligeable devant la masse d'eau.

Afin de déterminer le gonflement, il faut calculer la masse de polymère sec contenu dans le gel. Pour cela, il faut estimer le volume du gel en sortie de capillaire microfluidique après la réticulation i.e. le volume de la goutte d'eau dans le dispositif microfluidique. Le rayon R_0 nous est donné par la dimension du capillaire $125 \mu\text{m}$. En considérant un gonflement homothétique dans toutes les directions, on peut déterminer un coefficient $k = R/R_0 = 1,412$. On peut en déduire $L_0 = L/k$ et L_0' . Pour l'exemple choisi $L_0' = 42,5 \mu\text{m}$. Le volume de la goutte d'eau est de $V_0 = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3$. La concentration en précurseurs HA-MA₂₀ étant de 1,5 wt. La masse de polymère présente dans la goutte peut être déterminée elle correspond à $m_0 = 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ g}$.

Le gonflement du gel est défini comme :

$$q_M = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad (\text{Équation 4.4.2})$$

Où W_s est la masse du polymère solvaté soit la masse du polymère + la masse d'eau et W_d et la masse du polymère sec.

q_M peut être déterminé, dans notre exemple $q_M = 186$

Il est possible de calculer le paramètre de maille du réseau en fonction du gonflement des microgels. Le taux de gonflement volumique q_e peut-être déterminé grâce à q_M :

$$q_e = 1 + \frac{\rho_p}{\rho_s} (q_M - 1) \quad (\text{Équation 4.4.3})$$

Où ρ_p est la masse volumique de polymère sec ($1,229 \text{ g/cm}^3$ pour l'acide hyaluronique), et ρ_s correspond à la masse volumique de l'eau.

Pour notre exemple $q_e = 228$

Le taux de gonflement volumique permet d'accéder à la masse molaire moyenne entre deux nœuds de réticulation, M_c . En effet, d'après la théorie de Flory-Rhener, on peut dans le cas de réseaux peu réticulés gonflés dans un bon solvant écrire l'équation suivante :

$$q_e^{5/3} \cong \frac{M_c}{\rho_p V_1} \left(\frac{1}{2} - \chi \right) \quad (\text{Équation 4.4.4})$$

Où M_c est la masse molaire moyenne entre deux nœuds de réticulation, V_1 est le volume molaire du solvant ($18 \text{ cm}^3/\text{mol}^{-1}$ pour l'eau), χ est le paramètre de Flory décrivant les interaction polymère solvant (il est de 0,473 pour l'acide hyaluronique dans l'eau)[5].

La masse molaire moyenne pour notre exemple est ainsi de $M_c = 6,9 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$

On peut ainsi accéder au paramètre de maille, pour cela il faut déterminer la densité volumique de réticulation z qui correspond au ratio de la densité du polymère par la masse molaire moyenne entre deux nœuds de réticulation. Ainsi, dans un volume d'1L le nombre de nœuds de réticulation peut s'écrire $z * N_{av}$ où N_{av} correspond au nombre d'Avogadro.

Nous déterminons une densité volumique de réticulation de $z=1,8.10^{-4}\text{mol/cm}^3$.

Chaque nœud de réticulation occupe un volume : $V = \frac{1}{z*N_{av}}$. En apparentant ce volume et donc les pores de la matrice à une sphère de diamètre D , on peut déterminer la taille des pores comme étant :

$$D = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi z N_{av}}} \quad (\text{Équation 4.4.5})$$

La taille de pore obtenu pour les gels de cet exemple est de 26 nm.

4.4 Cinétique de libération du dextran encapsulés dans des macro/microgels de HA-MA-PBA

La libération de protéine des matrices de gels, peut être décrite par la loi de Fick qui peut être écrite sous la forme suivante [6],[7]:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_e \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (\text{Equation 4.5.1})$$

Les conditions aux frontières associées sont :

$$\left\{ \begin{array}{l} c_{(-\delta < x < \delta, t=0)} = c_0 \\ c_{(x=\pm\delta, t \geq 0)} = 0 \\ \frac{\partial c}{\partial x}_{(x=0, t \geq 0)} = 0 \end{array} \right.$$

Où c est la concentration en protéine dans le gel, x et t sont la position dans le gel et le temps respectivement, 2δ est l'épaisseur du gel et c_0 est la concentration en protéine initiale dans le gel.

Pour les temps courts après le début de la libération, on peut résoudre l'équation 4.5.1, et après simplification on obtient :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 2 \left[\frac{D_e}{\pi \delta^2} \right]^{1/2} t^{1/2} \quad (\text{Equation 4.5.2})$$

Où M_t est la masse de protéine libérée à l'instant t , M_∞ est la masse libérée à t_{infini} , et $\frac{M_t}{M_\infty}$ est la fraction massique de protéine libérée à l'instant t , et D_e le coefficient de diffusion de la protéine encapsulée.

Ainsi, la fraction massique de protéine libérée est proportionnelle à la racine carrée du temps, dans le cas où la libération de la protéine est contrôlée par des phénomènes diffusionnels.

4.4.1 Etude de la libération de protéine modèle encapsulé dans des macrogels

Nous avons donc tracé $\frac{M_t}{M_\infty}$ en fonction de $t^{1/2}$, en assimilant M_∞ à la masse de protéine à la fin de la libération, c'est-à-dire quand le plateau est atteint pour représenter le profil de libération de protéine modèle à partir de macrogel de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀ (Figure 14). Les résultats obtenus ont été présentés Chapitre 5 paragraphe 5.2.1.

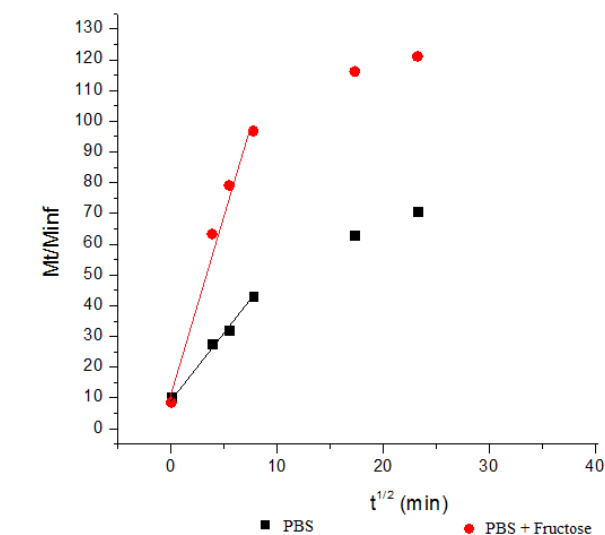


Figure 13 : Profil de libération de protéines modèles de macrogels de HA-MA-PBA₂₀, DM₂₀, représenté en termes de fraction massique libérée en fonction de la racine carré du temps.

Les pentes obtenues pour les temps courts peuvent être déterminés, et en considérant les dimensions du gel on peut déterminer des valeurs expérimentales de coefficient de diffusion.

Dans le PBS, on trouve $D_e = 0,27 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Dans le PBS + fructose on trouve $D_e = 1,36 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, en négligeant les variations de volume des gels.

Le coefficient de diffusion de l'insuline (ou dextran 4 kDa) est de $1,41 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ dans l'eau. On l'appelle D_0 . La diffusion de la protéine dans le gel est donc plus lente que dans l'eau.

4.4.2 Etude de la libération de protéine modèle encapsulé dans des macrogels

La figure 15 représente la libération de dextran-rhodamine à partir des microgels de HA-MA-PBA₂₀, BIS₂₀, les profils ont été déterminés par suivi de la perte de fluorescence dans le gel. On constate que sur les temps courts, la courbe représentant la fraction massique de protéine modèle libérée en fonction de la racine carré du temps est linéaire (Figure 15 partie grise). La libération suit un profil de diffusion. Les résultats ont été présenté Chapitre 4 paragraphe 2.2.1.

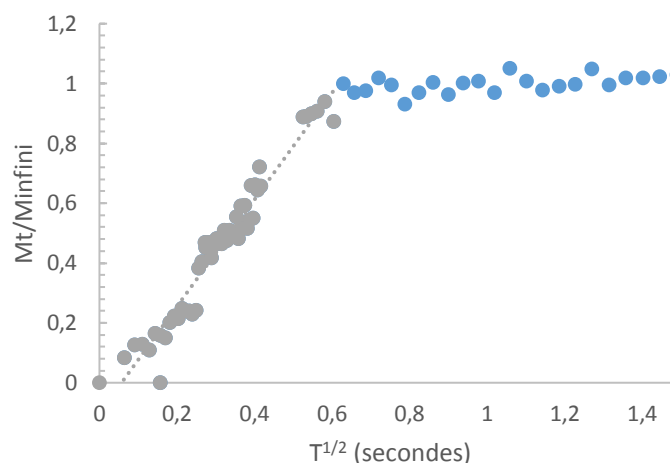


Figure 14 : Profil de libération de protéines modèles de microgels de HA-MA-PBA₂₀, DM₂₀, représenté en termes de fraction massique libérée en fonction de la racine carré du temps.

4.5 Etude en milieu plasmatique de l'insuline libérée de macrogels HA-PBA/HA-Maltose par dosage HPLC

Lors de l'étude quantitative de l'insuline encapsulée puis libérée de macrogels de HA-PBA/HA-Maltose, nous avons essayé de nous approcher des conditions physiologiques en travaillant en milieu plasmatique en utilisant la technique HPLC couplé à un spectromètre de masse. Cette étude a pour but d'estimer l'impact des autres protéines présentes dans le plasma sur la stabilité de l'insuline et de tester les conditions analytiques sur ces milieux complexes. Les macrogels sont étudiés à température ambiante dans un milieu plasmatique dilué contenant une teneur en glucose correspondant au taux physiologique de 1 g/L ou contenant un excès de glucose de 10 g/L. En parallèle un témoin est étudié, il correspond à une solution d'insuline à 1 mg/mL contenant 1g/L de glucose. Des prélèvements sont faits à différents intervalles de temps et dilués dans une solution d'eau/HCl 0,01 M/BSA 0,02 %/urée 8 M. L'urée est utilisée pour rompre les liaisons hydrogènes qui stabilisent les formes dimères et hexamères de l'insuline qui ne sont pas détectables au spectromètre de masse. La présence d'acide chlorhydrique permet de mieux solubiliser l'insuline et de favoriser sa forme monomérique en limitant les interactions hydrophobes. La forme monomérique dosable, est ainsi favorisée. La purification est réalisée par extraction sur cartouches. Cette purification permet d'extraire l'insuline de l'échantillon plasmatique afin d'améliorer la sensibilité du dosage de l'insuline et également d'éviter d'endommager la colonne chromatographique par accumulation de protéines. L'extraction choisie est une méthode solide/liquide ou Solide Phase Extraction (SPE). Elle consiste à transférer la molécule d'intérêt de la phase liquide, ici le plasma, à une phase solide, l'adsorbant, montrant une forte affinité vis-à-vis de la protéine à extraire. Les cartouches sélectionnées sont des cartouches Strata-X® 30 mg en phase inverse, composées d'un sorbant polymérique à base de polystyrène divinylbenzène modifié par du N-vinylpyrrolidone. Les différentes étapes de l'extraction sont décrites en partie expérimentale. Les échantillons sont ensuite évaporés à 40°C sous atmosphère inerte. La température reste basse afin de ne pas dénaturer la protéine. Enfin, les échantillons sont solubilisés dans une solution de reprise de d'eau/HCl 0,01 M/BSA 0,02 %/urée 8 M avant injection dans le système HPLC. Trois mesures sont

effectuées pour chaque condition afin de minimiser la variabilité due à l'analyse. Huit macrogels sont étudiés ainsi que deux témoins:

- Deux témoins non chargés en insuline ayant deux taux de réticulation différents de 15 g/L et 30 g/L.
- Deux gels sont étudiés dans un milieu plasmatique contenant un excès de glucose de 10 g/L ayant deux taux de réticulations différents de 15 et 30 g/L.
- Quatre gels sont étudiés dans un milieu plasmatique contenant 1 g/L de glucose, deux ayant une réticulation de 15 g/L et deux ayant une réticulation de 30 g/L.

Les concentrations en insuline dosées dans les témoins restent relativement stables sur 50 h. Les allures des profils de libération observés pour des gels de différents degrés de réticulation et différentes concentrations en glucose dans les milieux sont les mêmes. En effet, les quantités d'insuline libérées augmentent pendant les 20 premières heures puis diminuent jusqu'à ce que l'insuline devienne indétectable aux alentours de 120h (Figure 11).

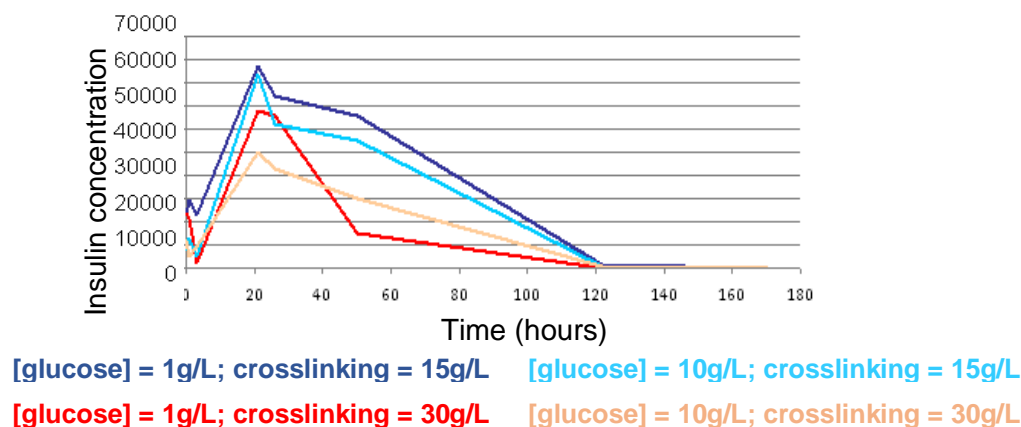


Figure 15: Profil de libération de l'insuline humaine à partir de macrogels doublement réticulés pour différents degrés de réticulation permanente et différentes concentrations en glucose dans le milieu de libération.

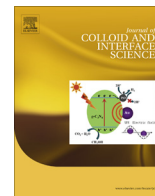
De plus on constate que sur les 20 premières heures, le relargage est plus important pour les gels de plus faible réticulation. La porosité plus large peut favoriser une diffusion plus rapide vers le milieu extérieur. L'augmentation de la concentration en glucose dans le milieu ne permet pas de libérer plus d'insuline ou de la libérer plus vite. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus depuis le début de cette étude, l'insuline n'est quantifiable que sur un temps court. Les problèmes analytiques rencontrés en milieu plasmatique sont similaires à ceux observés en milieux aqueux.

5 Annexe 5: Publication Oil-in-microgel strategy for enzymatic-triggered release of hydrophobic drugs



Contents lists available at ScienceDirect

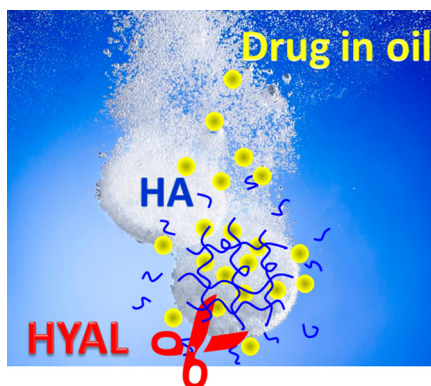
Journal of Colloid and Interface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcis

Oil-in-microgel strategy for enzymatic-triggered release of hydrophobic drugs

C.A. Busatto^b, H. Labie^a, V. Lapeyre^a, R. Auzely-Velty^c, A. Perro^a, N. Casis^b, J. Luna^b, D.A. Estenoz^b, V. Ravaine^{a,*}^a Université de Bordeaux, Bordeaux INP, ISM, UMR 5255, Site ENSCBP, 16 avenue Pey Berland, 33607 Pessac, France^b Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química, INTEC (Universidad Nacional del Litoral and CONICET), Güemes 3450, 3000 Santa Fe, Argentina^c Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS), affiliated with Université Joseph Fourier, 601 rue de la Chimie, 38041 Grenoble, France

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2016

Revised 6 January 2017

Accepted 9 January 2017

Available online 10 January 2017

Keywords:

Drug delivery

Microgels

Biodegradable polymers

Hyaluronic acid

Hydrophobic drug

Oil-in-water-in-oil emulsion

Progesterone

ABSTRACT

Polymer microgels have received considerable attention due to their great potential in the biomedical field as drug delivery systems. Hyaluronic acid (HA) is a naturally occurring glycosaminoglycan composed of *N*-acetyl- D -glucosamine and D -glucuronic acid. This polymer is biodegradable, nontoxic, and can be chemically modified. In this work, a co-flow microfluidic strategy for the preparation of biodegradable HA microgels encapsulating hydrophobic drugs is presented. The approach relies on: (i) generation of a primary oil-in-water (O/W) nanoemulsion by the ultrasonication method, (ii) formation of a double oil-in-water-in-oil emulsion (O/W/O) using microfluidics, and (iii) cross-linking of microgels by photopolymerization of HA precursors modified with methacrylate groups (HA-MA) present in the aqueous phase of the droplets. The procedure is used for the encapsulation and controlled release of progesterone. Degradability and encapsulation/release studies in PBS buffer at 37 °C in presence of different concentrations of hyaluronidase are performed. It is demonstrated that enzymatic degradation can be used to trigger the release of progesterone from microgels. This method provides precise control of the release system and can be applied for the encapsulation and controlled release of different types of hydrophobic drugs.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: vravaine@enscbp.fr (V. Ravaine).

1. Introduction

Among different types of drug delivery systems, polymeric hydrogels hold great promise thanks to their hydrophilic three-dimensional network which offers large water-retaining property and excellent biocompatibility. Moreover, particles made of hydrogels, namely microgels or nanogels, exhibit good colloidal stability and are injectable. All these lightly cross-linked polymers are porous and can be loaded with drugs. Stimuli-responsive hydrogels are fascinating materials because they swell or shrink in response to an external stimulus such as temperature, pH, irradiation or even the presence of a biomolecule in solution [1–4]. In this case, drug release can be additionally controlled by stimuli [5]. Microgels also offer opportunities as surface coatings when adhered to biomaterials or surgical implants to reduce infection and inflammation and to improve biocompatibility, particularly when containing antimicrobial and anti-inflammatory drugs [6–8]. Therefore, responsive hydrogels allow a fine tuning of drug release rate with tailored properties.

For most therapeutic applications, the drug delivery system needs to be readily biodegradable in order to avoid accumulation-related adverse effects. Biodegradability of the matrix can also be used as the trigger to control the release of the drug. HA is a naturally occurring glycosaminoglycan composed of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid, which exhibits biocompatible and biodegradable properties. This linear polysaccharide is ubiquitous in all tissues, as a major component of the extracellular matrix (ECM) in animal tissues [9]. Advantageously, chemical modification of HA is relatively easy [10,11]. Being non-toxic and non-immunogenic, it has been widely used as a building block to design cross-linked architectures with a potential application in tissue regeneration [12,13] and drug delivery [14] or cell growth [15]. Enzymatic degradation of HA occurs *in vivo* via hyaluronidases (Hase), which are present in both intra- and extracellular space [16]. Therefore, HA-based microgels are expected to deliver their payload after injection in the body by progressive enzymatic erosion of the matrix. In general, members of HA signaling pathway (receptors such as CD44 and CD168 [17,18], Hase [19,20]) are also overexpressed in a variety of carcinomas. HA has been used in drug delivery formulations for the targeted delivery of chemotherapy drugs and other anticancer compounds to tumor cells through interaction with cell-surface HA receptors [21]. Furthermore, Hase-responsive containers appear as emerging technologies to deliver anticancer drugs since the high concentration of Hase in the tumor cells can increase the release efficiency [22–26].

In spite of the great interest for HA-based hydrogel materials, these systems are generally limited to water-soluble drugs, most often peptides and proteins [27–30], whereas many drugs are hydrophobic, such as anticancer drugs. The encapsulation of a hydrophobic drug has been reported using different strategies of functionalization of the micro- or nanogels: (1) via the incorporation of a hydrophobic core in a hydrogel shell [31] or hydrophobic domains in the hydrogel matrix [32,33,36] and (2) via the introduction of cyclodextrin (CD) moieties, that can bind hydrophobic molecules through inclusion complexes [34]. However, the loading efficiency is often poor. Alternately, hydrophobic drugs can be solubilized in non-polar solvent that can further be dispersed in a hydrogel matrix. This latter solution offers the advantage of incorporating high payloads of drugs in a dissolved form. The concept has been explored recently using alginate matrices [35,36] and thermoresponsive poly(*N*-isopropylacrylamide) (pNIPAM) ones [37,38], where burst release could be achieved by collapsing the hydrogel upon heating.

In this paper, we focus on the preparation of a biocompatible system that could be used *in vivo* to deliver a hydrophobic drug

upon Hase degradation (Fig. 1). We demonstrate the concept using progesterone (PGR), a lipophilic steroid hormone with a low molecular weight. This drug requires long-time controlled delivery system to induce estrus and ovulation in production animals [39,40]. Several progesterone delivery systems for estrus synchronization have been reported but they are based on non-biodegradable polymers [41]. HA microgels would provide a controlled release of the hormone after subcutaneous administration. Once the microgel is degraded and the oil droplets are dissolved, progesterone could be absorbed to systemic circulation and could reach sites of action thanks to its extensively binding to plasma proteins, primarily albumin.

Thus, we report the preparation of oil-in-microgel containers, made of fully biocompatible ingredients, encapsulating PGR. The materials are prepared by a two-step method which allows a fine and robust control of the structural parameters: the drug is incorporated in an oil-in-water nanoemulsion, that is further incorporated within monodispersed HA microgels prepared by microfluidic approach. The enzymatic degradability of the microgels and their ability to release the PGR-loaded oil nanodroplets upon enzymatic degradation is finally presented.

2. Experimental

2.1. Materials

All the reagents were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise noted. Methacrylic anhydride (AMA), *N,N*-dimethylformamide (DMF), ethanol, *n*-hexadecane, octadecyltrichlorosilane (OTS), chloroform, toluene, soybean oil, sunflower oil, sorbitan monooleate (Span 80), polysorbate 80 (Tween 80), hyaluronidase from bovine testes (type I-S), *N,N'*-methylenebisacrylamide (BIS), sodium caseinate (SC), 1-[4-(2-hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propan-1-one (Irgacure 2959), 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride, Nile Red (NR), progesterone (PGR) and phosphate buffered saline (PBS) were used without any further purification. NIPAM was recrystallized from *n*-hexane. Hyaluronic acid ($M_w = 60,000 \text{ g mol}^{-1}$) was purchased from Lifecore (USA).

2.2. Synthesis of methacrylated hyaluronic acid macromer (HA-MA)

The synthesis of hyaluronic acid modified with methacrylates is fully reported by Hachet et al. [42]. In brief, 1 g of hyaluronic acid (2 wt%) was solubilized for 4 h at room temperature in ultrapure water. Then, DMF was added dropwise to the solution (volume ratio 3:2 water-DMF) and the mixture was cooled down to 4 °C. The reaction medium was cooled after addition of DMF to avoid a temperature increase upon addition of the anhydride in the hydro-alcoholic medium that could promote side reactions (hydrolysis of esters formed and hydrolysis of the anhydride). Then, AMA (1 M equivalent with respect to the moles of the repeating unit of HA) was added dropwise and the pH was maintained between 8 and 9 for 4 h by the addition of 0.5 M NaOH. The reaction was run overnight and then, 0.5 M NaCl was added to the mixture. The polymer was precipitated by the addition of ethanol (with a water-EtOH volume ratio of 2:3). After the removal of the supernatant, the precipitate was successively washed with mixtures of water-EtOH using volume ratios of 3:7, 1:4 and 1:9. The final precipitate was dissolved in ultrapure water and further dialyzed against ultrapure water by diafiltration (ultramembrane Amicon YM10). The purified macromer was recovered by freeze-drying and characterized by ^1H NMR analysis.

^1H NMR spectra of HA-MA in D_2O ($C = 8 \text{ mg mL}^{-1}$) were recorded at 80 °C with 128 scans using a Bruker 400 MHz

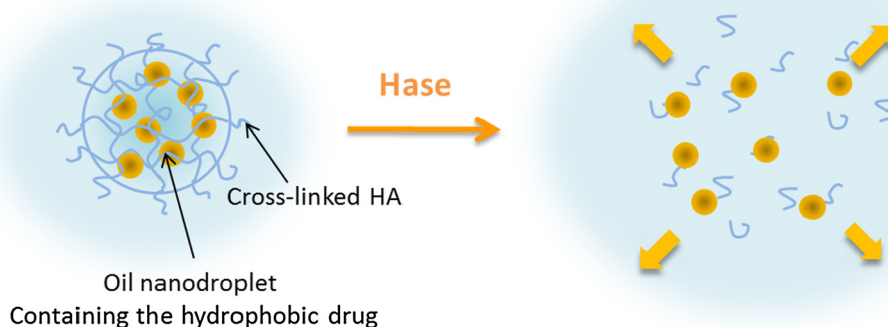


Fig. 1. Concept of the oil-in-microgel system, encapsulating a hydrophobic drug. The HA matrix degrades upon addition of Hase and releases the oil nanodroplets.

spectrometer. The temperature was set to 80 °C in order to shift the water peak towards lower chemical shifts thus avoiding its overlapping with those of anomeric protons. The degree of methacrylation was determined by digital integration of the methacrylate proton signal at 5.8 ppm or 6.2 ppm relative to the anomeric proton signal of HA at 4.5 ppm and 4.7 ppm.

2.3. Preparation and characterization of primary emulsion

The aqueous phase of the emulsions consisted of 2 mL of aqueous phase containing the surfactant and the oil phase consisted of hexadecane or sunflower oil (20 wt%). The surfactant was Tween 80 or SC with different compositions. The oil phase was often replaced by a solution of Nile Red in hexadecane (3.1×10^{-4} M) to provide visual inspection of an encapsulated hydrophobic specie. The emulsions were prepared by ultrasonication for 20 min (with 1 min ON and 1 min OFF), with the output level set at 6, using a probe sonicator (Branson sonifier 250, frequency = 20 kHz, operating with an output of 90% of 200 W and a Duty Cycle of 90%). The solution was cooled on an ice water bath throughout the sonication process. The diameter of oil droplets and the emulsion stability was studied using the dynamic light scattering technique with a Zetasizer NanoZS Malvern Instruments apparatus operating with a HeNe laser at 173°.

2.4. Preparation of HA-MA microgels

A co-flowing microfluidic device was used. The system consisted of two coaxial capillaries connected with a T-junction (Fig. S1). The inner fused silica tube [inside diameter (ID) 75 μ m; outside diameter (OD) 148 μ m; Polymicro technologies] associated with adjusted tubing sleeves (UpChurch Scientific, 1/16 ID 180 μ m) was inserted inside the T-junction (UpChurch Scientific, 1/16) along its main axis. At the exit of the T-junction, the inner capillary is introduced in the outer silica tube (ID, 250 μ m; OD 356 μ m; Polymicro technologies). The T-junction allowed the injection of the liquid dispersed phase into the continuous phase. The surface of the outer capillary was modified in order to increase its hydrophobicity. To this effect, 3 mL of a dilute OTS solution in dodecane (1 wt%) was passed through the silica capillary at the flow rate of 6 mL/h. Then, the capillary was rinsed with a mixture of 5 mL of toluene and 5 mL of chloroform.

Soybean oil containing 2 wt% Span 80 was used as continuous phase. Separately, 3 wt% HA-MA macromer was dissolved in saline water (0.2 M NaCl) in the presence of 0.2 wt% photoinitiator

(Irgacure 2959) and eventually BIS (2 wt%) and mixed with an equal volume of emulsion. Alternately, a solution containing 10 wt% of NIPAM and 0.2 wt% of BIS in saline water (0.1 M NaCl) was used to prepare the emulsion (as the aqueous phase) and thus it was not diluted, and the photoinitiator (0.08 wt%) was added to the emulsion after sonication. The resulted solution was used as dispersed phase in the microfluidic device. The dispersed and continuous phases were injected into the device using a syringe pump and the flow rates were 3 μ L min⁻¹ and 6 μ L min⁻¹, respectively. Polymerization was carried out by placing the device under a UV lamp (Hamamatsu LC8, L9588-06). The UV irradiation ($\lambda = 300$ –450 nm, centered at 365 μ m) was directed to an unprotected window on the outer silica tube (20 mm). The lamp was used at 100% of its power, and equipped with a filter allowing the transmittance of wavelengths between 300 and 400 nm. The microgels were separated from the continuous phase by centrifugation at 800 rpm for 10 min at room temperature and washed two times in hexane and then two times in ultrapure water to remove the oil.

2.5. Enzymatic degradation with hyaluronidase

The biodegradability of the microgels by hyaluronidase was investigated using a Leica optical microscope (Leica DMI600 B) with a coupled camera. The microgels were observed in an imaging chamber and micropipette technique was used to hold the microgels by suction. The microgels were incubated at 37 °C in PBS buffer (pH = 7.4) containing 300 U hyaluronidase, type I-S (Hase) and 1 wt% Tween 80.

2.6. Encapsulation and release of progesterone from microgel particles

A solution of progesterone in sunflower oil (0.06 M) was used to prepare the primary emulsion. The hormone release from the microgels was investigated by enzymatic degradation with hyaluronidase. Microgels collected from 10 min-microfluidic experiments were incubated at 37 °C, together with different concentrations of Hase in 150 μ L PBS buffer (pH = 7.4) containing 1 wt% Tween 80. Aliquots of 20 μ L of the solution were taken at different intervals of time and mixed with 480 μ L of ethanol. Progesterone concentration was analyzed by HPLC (Merck-Hitachi LaChrom D7000 HPLC system) equipped with a L-7250 autosampler, a L7100 high pressure pump and a L-7455 diode array detector. A mixture of methanol/water (95:5) was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Oven temperature and detection wavelength of the assay were 25 °C and 254 nm, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Microgel preparation

The preparation of microgels encapsulating oil nanodroplets requires several steps, which are summarized in Fig. 2. Firstly, an oil-in-water nanoemulsion is produced. This step is performed separately to allow a fine control of the volume fraction of oil and of the drop size distribution. Then HA water-soluble hydrogel precursors are added in the continuous phase of the nanoemulsion. This primary oil-in-water emulsion, noted O_1/W , is further emulsified using a microfluidic device to yield a double oil-in-water-in-oil emulsion, noted $O_1/W/O_2$. This method allows a good reproducibility of the drop size and of the number of O_1 nanodroplets per drop [43]. The resulting monodisperse aqueous drops are then irradiated by UV to photopolymerize the precursor and form the gel phase entrapping the O_1 nanodroplets. The preparation is collected in a vial. Water is finally added to provoke phase separation between the outer oil phase and water. The microgels remain dispersed in the aqueous phase. For the sake of comparison, poly(*N*-isopropylacrylamide) (pNIPAM), a synthetic polymer, will be used instead of the HA. It will be obtained by radical polymerization of a water-soluble monomer, NIPAM, and *N,N*-methylenebisacrylamide, BIS.

The inner oil drops (from primary emulsion) should be smaller than the double emulsion drops. In the present study, we chose to use a primary nanoemulsion, in order to promote the rapid diffusion of the droplets after matrix degradation and, eventually, to take advantage of their ability to locally deliver their payload. Therefore, attention was paid to generate the smallest drops as possible. A high energy emulsification method was used to produce the primary organic/water (O/W) nanoemulsion [44]. For simplicity, ultrasonication was chosen. However, it could be replaced by high pressure homogenization if fragile molecules should be used [30]. A first set of nanoemulsions was produced using hexadecane as a dispersed phase (10% vol) and Tween 80 as a water-soluble surfactant (5 wt% in water). Immediately after preparation, the average diameter of the hexadecane droplets in aqueous solution was 140 nm, with a polydispersity index close to 0.22 (Fig. 3). The droplet size increased and reached a plateau of 180 nm after 1 day. At the same time, the polydispersity index decreased from 0.22 to 0.1. This trend suggested that the emulsion was subjected to Oswald ripening, *i.e.* the diffusion of O_1 from small drops to larger ones due to the Laplace pressure difference. Over time, the size distribution becomes narrower and the diffusion slows down. After one day, the size remains constant.

It should be noted that the HA precursor was added in the continuous phase after emulsification of the O_1/W nanoemulsion, and not prior to the nanoemulsion preparation. There were two reasons for that: firstly, the presence of HA-MA increases the viscosity, which has an impact on the size of drops; secondly, HA molecules are fragile and can depolymerize under ultrasonication [45,30].

The conditions to prepare HA microgels were tested separately, in the absence of O_1/W nanoemulsion. HA chains modified with methacrylates were chosen as HA precursors. These moieties have been widely studied to yield photopolymerizable hydrogels, which can self-crosslink by radical polymerization of the methacrylate groups [14,42]. The grafting density of methacrylates can be easily tuned during the synthesis step. It allows a fine control of the cross-linking density and thus of the elastic modulus of the gels. In our case, a HA-MA precursor having 10% mol. of methacrylates was synthesized. Its concentration was 15 g/L in the continuous aqueous phase of the nanoemulsion. A photoinitiator was also introduced in the solution. Irgacure 2959 was selected for its known biocompatibility with cells [46]. The aqueous phase containing HA-MA was introduced in the microfluidic device using a syringe pump and emulsified in the continuous oil phase, soybean oil containing Span 80. The flow rates were adjusted to $3 \mu\text{L min}^{-1}$ and $6 \mu\text{L min}^{-1}$, respectively. After irradiation, the drops were collected in a vial. In the absence of photopolymerizable precursor or of photoinitiator, the drops were unstable and phase separation occurred. In the presence of photoinitiator together with HA-MA, the drops were stable, indicating the change in their mechanical properties due to the success of the cross-linking step. The resulting particles did not exhibit any aggregation and sunk in the vial. They were monodispersed and had a slug shape (Fig. 4a). The shape indicated that the drops were produced in a squeezing regime, *i.e.* a regime where the drops are compressed by the capillary [47]. As cross-linking took place during the progression of the drops in the capillary, the shape of the compressed liquid drops was translated to the resulting elastic hydrogel particles. The size of the drops was controlled by the flow rate, the viscosity of the continuous phase and the interfacial tension, which could be altered by the composition of the system. A similar shape was also obtained with a pNIPAM matrix, where HA-MA was replaced by a mixture of NIPAM (10 wt%) and BIS (0.2 wt%) (results not shown). It means that changing the viscosity ratio between the dispersed and the continuous phase did not alter significantly the shape of the drops. Note that the NIPAM solution has a viscosity close to that of water, whereas a solution of HA-MA at 15 g/L has a viscosity of 15 times higher. Furthermore, as

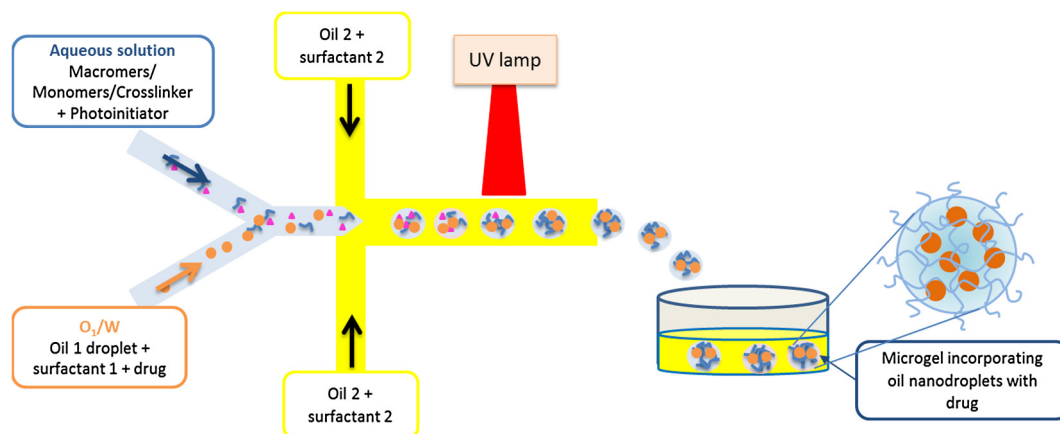


Fig. 2. Conceptual representation of the multistep process to prepare oil-in-microgels using the microfluidic approach.

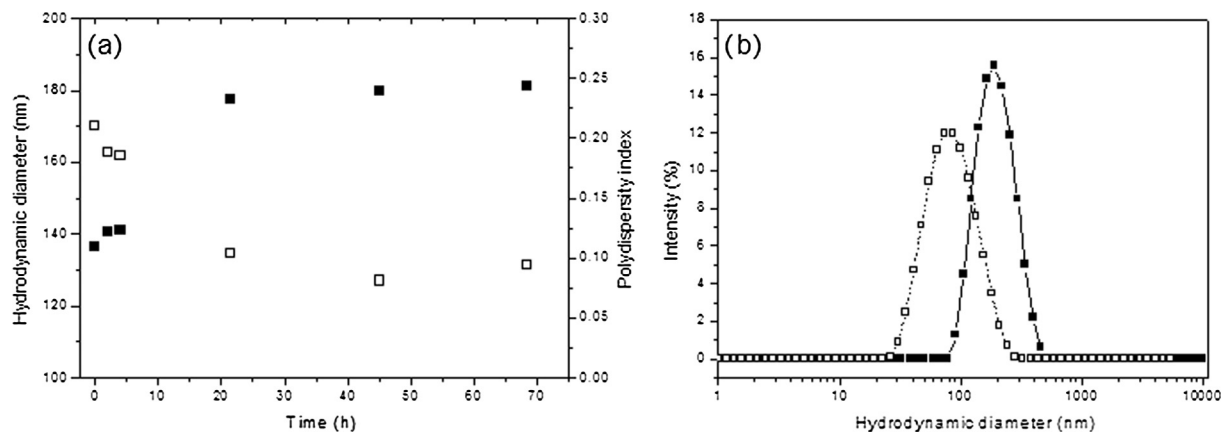


Fig. 3. Characteristics of the O_1/W emulsion with O_1 = hexadecane, W = aqueous solution of Tween 80 (5 wt%): (a) kinetic evolution of the drop average diameter and of the polydispersity index and (b) size distribution just after emulsion preparation and after 24 h of ageing.

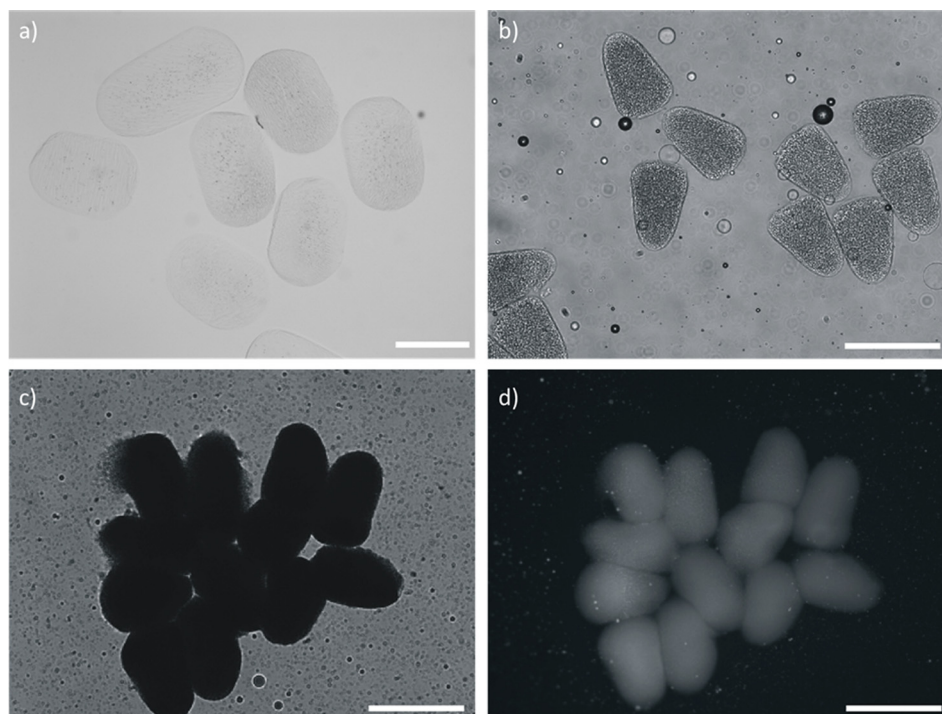


Fig. 4. (a) Bright-field micrograph of HA-MA microgels (without the O_1/W nanoemulsion); (b) bright-field micrograph of pNIPAM microgels containing the O_1/W nanoemulsion stabilized with 5 wt%. Tween 80; (c) bright-field and (d) fluorescence micrograph of pNIPAM microgels containing the Nile Red loaded O_1/W nanoemulsion stabilized with 1 wt% sodium caseinate. Scale bar is 400 μm .

shown below, the addition of a second surfactant present in the nanoemulsion did not alter the shape, although it changed drastically the interfacial tension [48].

The aqueous phase was then replaced by the O_1/W nanoemulsion, containing the polymerizable precursors. The nanoemulsion was aged for 1 day before use. The encapsulation of oil nanodrops was set up with the pNIPAM system. Composite microgels were successfully obtained, as proved by their heterogeneous internal structure (Fig. 4b). The microgels adopt a bullet-like shape induced by a modification the droplets wettability on the outer capillary wall [49]. It should be noted that the inner nanodrops could not be resolved by microscopy due to their size below 200 nm. In order to visualize the encapsulation process, Nile red was incorporated into the oil phase prior to emulsification. However, the fluorescence could not be observed for these first trials. Photobleaching due to UV irradiation was suspected but it was ruled out by a con-

trol experiment, where the oil solution containing Nile Red was irradiated in similar conditions. It was hypothesized that the dye could be transported from the inner oil phase O_1 to the outer oil O_2 phase, during the preparation process. This could be achieved by diffusion mediated by the micelles and/or by permeation through the surfactant film of the inner droplets located at the surface of the large water drop [50]. To address this issue, we limited the amount of excess surfactant and decreased the surfactant concentration in the primary emulsion down to 2 and 1 wt%. Slight improvement could be achieved, which confirmed our hypothesis. However, the fluorescence remained very low. Therefore, the low molecular weight surfactant was replaced by a high molecular weight one, while respecting the criteria of biocompatibility. It is indeed expected that the presence of large molecules at the interfaces reduces the dye diffusion, either by changing the interface permeability or by decreasing the number of micelles, which could

transport the dye. Sodium caseinate was chosen to replace Tween 80. This time, the inner nanodroplets were slightly bigger (350 nm) and remained stable over time. After polymerization of the pNIPAM in the aqueous drops, fluorescent microgels were successfully obtained (Fig. 4c and d).

This optimized composition was finally applied to HA-MA based microgels. When the nanoemulsion was mixed with HA-MA macromers and further photopolymerized, oil-in-microgels were obtained but the size of the inner droplets was larger than their initial size, meaning that the stability of the inner emulsion was not

guaranteed (Fig. S2). The shape of the microgels was also different from the pNIPAM ones. The anisotropic bullet shape was partially lost. The microgels looked more swollen, probably due to a lower cross-linking ratio. Increasing the substitution degree of methacrylates up to 20% mol. did not give significant changes. Therefore, a second cross-linker, BIS, was added to the HA-MA macromer. This strategy allowed obtaining monodisperse bullet structures, with relatively homogeneously distributed fluorescence (Fig. 5). The inner drops were not resolved optically, indicating that they remained close to their initial size.

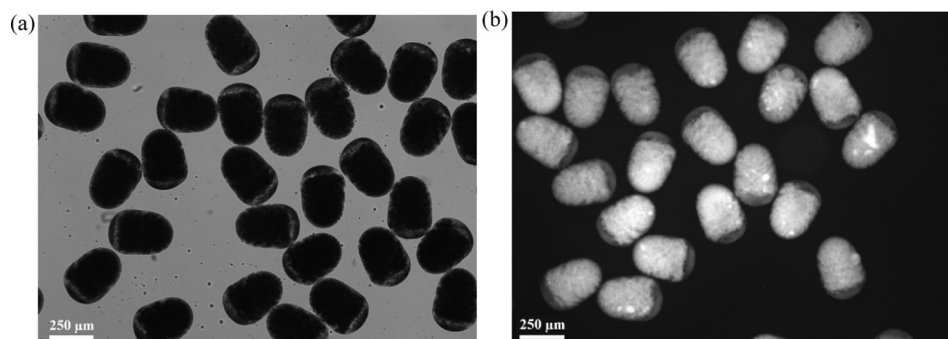


Fig. 5. HA-MA microgels prepared with BIS as crosslinking agent (1 wt%) containing the Nile Red loaded O_1/W nanoemulsion stabilized with 1 wt% sodium caseinate (a) bright-field images and (b) fluorescence images. Scale bar is 250 μm .

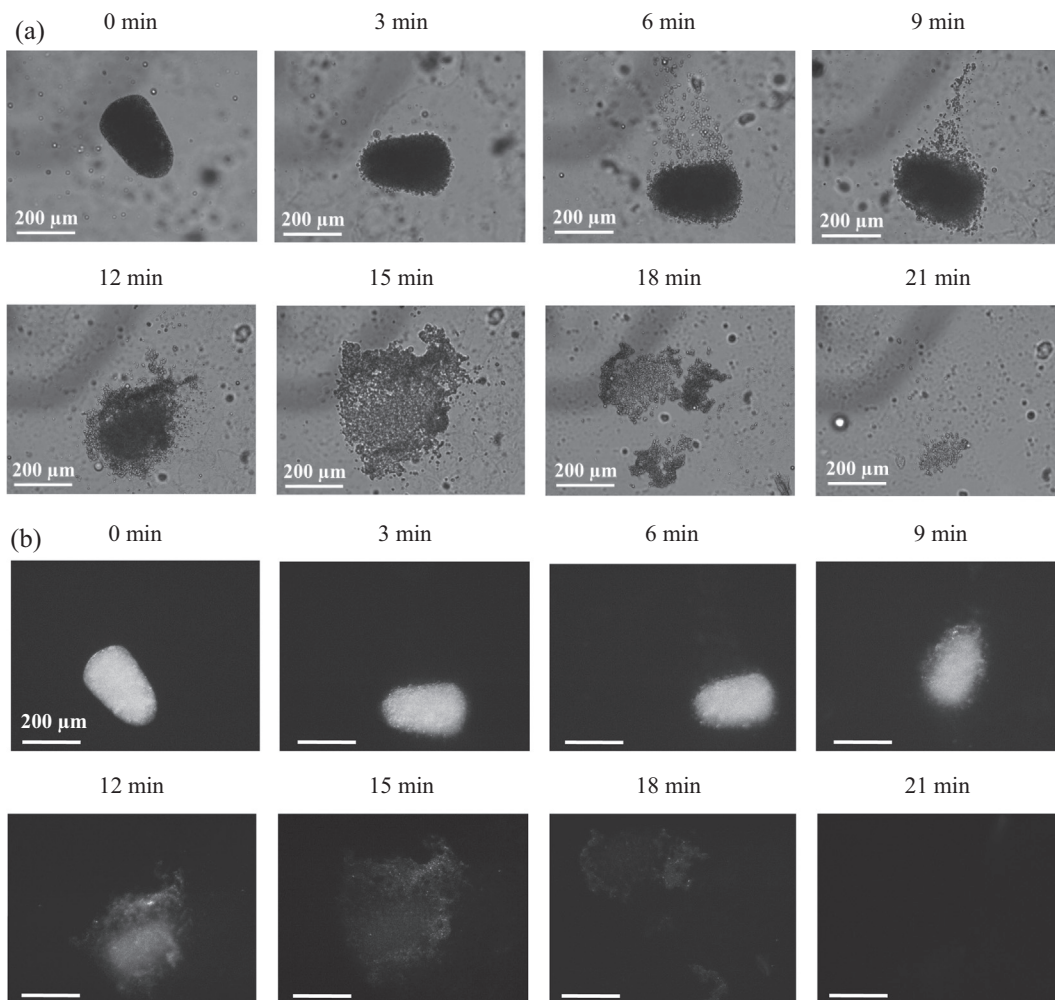


Fig. 6. Enzymatic degradation of a single HA-MA microgel with time: (a) bright-field and (b) fluorescence micrographs. Scale bar is 200 μm .

3.2. Degradation and release studies

The biodegradability of HA-MA microgels prepared with BIS as crosslinker and Nile Red as encapsulated compound was investigated by enzymatic degradation with hyaluronidase (Fig. 6). The microgels were incubated at 37 °C in PBS buffer (pH = 7.4) containing 1 wt% Tween 80 in presence of 300 UI/mL hyaluronidase.

As shown in Fig. 6, slow enzymatic degradation of the matrix occurs in a period of 21 min approximately. The bullet-like shape of the microgel was progressively lost (Fig. 6a). Simultaneously, small drops appear at the surface of the microgel, which rapidly diffuse away. More droplets are visible when the bullet-like shape vanishes. This scenario is very similar to the dissolution of aspirin effervescent tablets, except that the gas bubbles are replaced by the tiny oil droplets.

3.3. Application to progesterone encapsulation and release

In order to use biocompatible compounds for the hormone encapsulation, hexadecane was replaced with sunflower oil containing 0.06 M of progesterone during the preparation of the primary emulsion. The average hydrodynamic diameter of the sunflower oil droplets in aqueous solution was about 60 nm, with a PDI of 0.3. Therefore, the distribution was broader than the one with hexadecane. Droplets as large as 200 nm were also present in the distribution. Optical images of the HA-MA microgels containing this emulsion are shown in Fig. S3. The image suggests that the individual oil droplets were successfully encapsulated, retained, and uniformly distributed within the hydrogel network of the particles.

The potential of these microgels to be used as drug delivery systems was assessed. Fig. 7 shows pictures taken at different times during the release assay in presence of different concentrations of hyaluronidase. The release experiments were this time performed on a collection of microgels. Since the microgels were filled with oil droplets, their density was lower than that of the aqueous phase and they floated at the top of the suspension. The supernatant was initially clear. Upon HA degradation, the supernatant became cloudy, indicating that the oil droplets invaded

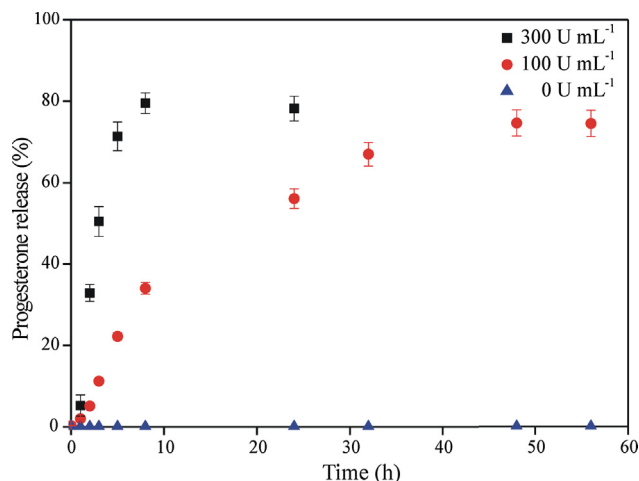


Fig. 8. Effect of enzymatic degradation on progesterone release from HA-MA microgels (T = 37 °C).

this part of the solution. Thanks to their small size, they could diffuse in the whole volume. For microgels exposed to a concentration of 300 UI/mL, the degradation process begins to be macroscopically visible after 3 h of testing, whereas for microgels exposed to a concentration of 100 UI/mL, this situation is visible after 8 h. As expected, the release of oil nanodroplets was not observed in the control test carried out in absence of enzyme in the period studied.

The degradation-responsive release of PGR was analyzed quantitatively by HPLC (Fig. 8). The microgels exposed to a concentration of 300 UI/mL released their load within 1 day whereas those exposed to a concentration of 100 UI/mL released their load within more than 2 days. In both cases, a PGR release of about 80% was observed. Additional quantitative analyses were performed in order to evaluate the influence of the compound transport into the continuous oil phase during the preparation of microgels. It was estimated that the compound loss by transfer was about 6%, whereas additional losses may occur during washing and redispersion steps. These small losses could explain why the plateau did

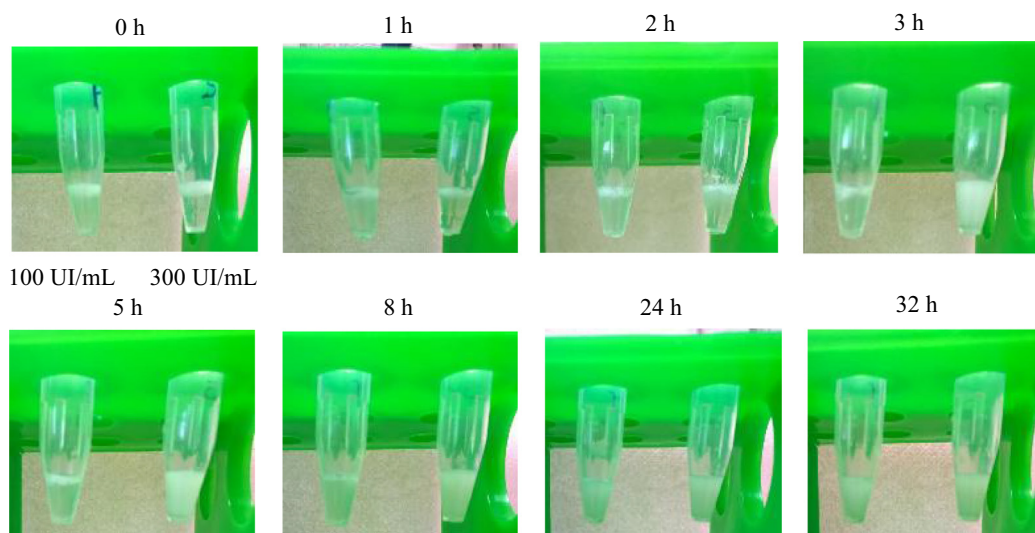


Fig. 7. Photographs of release experiments of PGR-encapsulating oil nanodroplets from HA-MA microgels in presence of hyaluronidase. Each snapshot presents a solution with microgels containing 100 UI/mL of Hase (left vial) and 300 UI/mL of Hase (right vial). At initial time, the microgels are located near the air-water interface, where a turbid area is visible. Over time, the vial on the right becomes progressively turbid in the whole volume of the solution, indicating a progressive diffusion of the nanodroplets of oil.

not reach 100%. This meant that the progesterone was quasi-quantitatively released in the outer medium. Interestingly, this result also indicated that the drug was not degraded by the UV irradiation during particle synthesis. Therefore, it could be concluded that the enzymatic degradation could lead to a full release of the entrapped species.

4. Conclusions

In this work, we provided an effective route to the preparation of monodisperse degradable microgels based on hyaluronic acid, which encapsulate and release hydrophobic drugs upon enzymatic degradation. Whereas hydrogel particles are highly sought-after as highly hydrated biocompatible drug delivery systems, their limitation often lies in their poor capability to encapsulate hydrophobic drugs. The incorporation of submicrometer-sized non-polar droplets in the interior of hydrophilic microgel particles provides an efficient route of encapsulation, which is achieved using a double oil-in-water-in-oil emulsion template, where the aqueous phase is further converted into the gel phase. The overall process is precisely controlled by microfluidics, which offers a tailoring process to create controlled double emulsion template, and allows online photopolymerization. Up to now, very few examples have reported the entrapment of oil droplets into hydrogel particles [35–38], and the concept has never been applied to a biodegradable matrix for controlled release application. Here, the enzymatic degradation of the microgels is used to trigger the release of progesterone-loaded oil nanodroplets. In particular, it is demonstrated that hyaluronidase, which is present *in vivo*, can promote the release with a concentration-dependent kinetics. The droplets can then diffuse freely in the body to transport the drug.

This concept of oil-in-microgel material is general and can be applied to a broad range of hydrophobic drugs. Depending on the application, the required kinetics of release and the delivered amount will be different. Those parameters will be easily tuned upon an appropriate choice of the injection site – because the amount of Hase varies in the body– but also upon appropriate structure of the microgel. Further work will be required to demonstrate the impact of the structure on the release kinetics. The microfluidic process can be easily adapted to tune the shape of the microgels and yield spherical microgels instead of bullet-like ones by changing the position and width of the channels, using a flow-focusing technology for example. In general, the synthesis procedure can be optimized in order to produce particles with pre-specified physico-chemical and structural characteristics (size of microgels and drops, drop concentration, crosslinking degree of HA-MA, chemical composition) to achieve a desired drug release profile. Besides, the drug is released in the solubilized form, in oil nanodroplets. Conjugation of the droplets may also be required to further promote site-specific targeting. In future works, the preparation of microgels with tunable properties will be studied and other hydrophobic drugs will be assayed.

Acknowledgements

Carlos Busatto thanks to Saint-Exupéry program for the fellowship.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2017.01.029>.

References

- [1] H.L. Lim, Y. Hwang, M. Kar, S. Varghese, Smart hydrogels as functional biomimetic systems, *Biomater. Sci.* 2 (5) (2014) 603–618.
- [2] Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (Suppl.) (2012) 49–60.
- [3] A. Richter, G. Paschew, S. Klatt, J. Lienig, K.F. Arndt, H.J.P. Adler, Review on hydrogel-based pH sensors and microsensors, *Sensors* 8 (1) (2008) 561–581.
- [4] J. Kopeček, J. Yang, Hydrogels as smart biomaterials, *Polym. Int.* 56 (9) (2007) 1078–1098.
- [5] M. Malmsten, H. Bysell, P. Hansson, Biomacromolecules in microgels – opportunities and challenges for drug delivery, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15 (6) (2010) 435–444.
- [6] H. Bysell, R. Månsson, P. Hansson, M. Malmsten, Microgels and microcapsules in peptide and protein drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (13) (2011) 1172–1185.
- [7] J. Zhang, D. Chen, Y. Li, J. Sun, Layer-by-layer assembled highly adhesive microgel films, *Polymer* 54 (16) (2013) 4220–4226.
- [8] A.W. Bridges, R.E. Whitmire, N. Singh, K.L. Templeman, J.E. Babensee, L.A. Lyon, A.J. Garcia, Chronic inflammatory responses to microgel-based implant coatings, *J. Biomed. Mater. Res. A* 94A (1) (2010) 252–258.
- [9] T.C. Laurent, Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and Its Derivatives, in: T.C. Laurent (Ed.), *Wenner-Gren International*, 1998.
- [10] G.D. Prestwich, Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine, *J. Control. Release* 155 (2) (2011) 193–199.
- [11] C.E. Schanté, G. Zuber, C. Herlin, T.F. Vandamme, Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 85 (3) (2011) 469–489.
- [12] J.B. Leach, K.A. Bivens, C.W. Patrick Jr, C.E. Schmidt, Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds, *Biotechnol. Bioeng.* 82 (5) (2003) 578–589.
- [13] X. Jia, Y. Yeo, R.J. Clifton, T. Jiao, D.S. Kohane, J.B. Kobler, S.M. Zeitels, R. Langer, Hyaluronic acid-based microgels and microgel networks for vocal fold regeneration, *Biomacromolecules* 7 (12) (2006) 3336–3344.
- [14] J.A. Burdick, C. Chung, X. Jia, M.A. Randolph, R. Langer, Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks, *Biomacromolecules* 6 (1) (2005) 386–391.
- [15] F. Khan, R.S. Tare, R.O.C. Oreffo, M. Bradley, Versatile biocompatible polymer hydrogels: scaffolds for cell growth, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (5) (2009) 978–982.
- [16] E.J. Menzel, C. Farr, Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses, *Cancer Lett.* 131 (1) (1998) 3–11.
- [17] K.Y. Choi, H. Chung, K.H. Min, H.Y. Yoon, K. Kim, J.H. Park, I.C. Kwon, S.Y. Jeong, Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting, *Biomaterials* 31 (1) (2010) 106–114.
- [18] L.K. Liu, B.C. Finzel, Fragment-based identification of an inducible binding site on cell surface receptor CD44 for the design of protein-carbohydrate interaction inhibitors, *J. Med. Chem.* 57 (6) (2014) 2714–2725.
- [19] H. Lee, K. Lee, I.K. Kim, T.G. Park, Synthesis, characterization, and *in vivo* diagnostic applications of hyaluronic acid immobilized gold nanoprobe, *Biomaterials* 29 (35) (2008) 4709–4718.
- [20] K.S. Girish, K. Kemparaju, The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview, *Life Sci.* 80 (21) (2007) 1921–1943.
- [21] T. Jiang, Z. Zhang, Y. Zhang, H. Lv, J. Zhou, C. Li, L. Hou, Q. Zhang, Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery, *Biomaterials* 33 (36) (2012) 9246–9258.
- [22] C.O. McAttee, J.J. Barycki, M.A. Simpson, Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy, in: A.S. Melanie, H. Paraskevi (Eds.), *Adv. Cancer Res.*, Academic Press, 2014, pp. 1–34 (Chapter 1).
- [23] K. Tairong, L. Yarong, G. Tiantian, P. Xiangfang, H. Xianglong, Y. Zhiqiang, Enzyme-responsive nanoparticles for anticancer drug delivery, *Curr. Nanosci.* 12 (1) (2016) 38–46.
- [24] Q. Zhao, J. Liu, W. Zhu, C. Sun, D. Di, Y. Zhang, P. Wang, Z. Wang, S. Wang, Dual-stimuli responsive hyaluronic acid-conjugated mesoporous silica for targeted delivery to CD44-overexpressing cancer cells, *Acta Biomater.* 23 (2015) 147–156.
- [25] V.B. Lokeshwar, S. Mirza, A. Jordan, Targeting hyaluronic acid family for cancer chemoprevention and therapy, in: A.S. Melanie, H. Paraskevi (Eds.), *Adv. Cancer Res.*, Academic Press, 2014, pp. 35–65 (Chapter 2).
- [26] K. Radhakrishnan, J. Tripathy, D.P. Gnanadhas, D. Chakravorty, A.M. Raichur, Dual enzyme responsive and targeted nanocapsules for intracellular delivery of anticancer agents, *RSC Adv.* 4 (86) (2014) 45961–45968.
- [27] Y.Y. Chen, H.C. Wu, J.S. Sun, G.C. Dong, T.W. Wang, Injectable and thermoresponsive self-assembled nanocomposite hydrogel for long-term anticancer drug delivery, *Langmuir* 29 (11) (2013) 3721–3729.
- [28] A. Takahashi, Y. Suzuki, T. Suhara, K. Omichi, A. Shimizu, K. Hasegawa, N. Kokudo, S. Ohta, T. Ito, In situ cross-linkable hydrogel of hyaluronan produced via copper-free click chemistry, *Biomacromolecules* 14 (10) (2013) 3581–3588.
- [29] M.A. Casadei, G. Pitarresi, R. Calabrese, P. Paolicelli, G. Giammona, Biodegradable and pH-sensitive hydr

- delivery: characterization and in vitro release studies, *Biomacromolecules* 9 (1) (2008) 43–49.
- [30] L. Messenger, N. Portecop, E. Hachet, V. Lapeyre, I. Pignot-Paintrand, B. Catargi, R. Auzély-Velty, V. Ravaine, Photochemical crosslinking of hyaluronic acid confined in nanoemulsions: towards nanogels with a controlled structure, *J. Mater. Chem. B* 1 (27) (2013) 3369–3379.
- [31] N. Devi, D.K. Kakati, Thermoresponsive submicron-sized core-shell hydrogel particles with encapsulated olive oil, *Colloid Polym. Sci.* 292 (10) (2014) 2581–2596.
- [32] S.S. Pedrosa, C. Gonçalves, L. David, M. Gama, A novel crosslinked hyaluronic acid nanogel for drug delivery, *Macromol. Biosci.* 14 (11) (2014) 1556–1568.
- [33] A.V. Kabanov, S.V. Vinogradov, Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (30) (2009) 5418–5429.
- [34] A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, Chemically cross-linked and grafted cyclodextrin hydrogels: from nanostructures to drug-eluting medical devices, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (9) (2013) 1188–1203.
- [35] E. Josef, M. Zilberman, H. Bianco-Peled, Composite alginate hydrogels: an innovative approach for the controlled release of hydrophobic drugs, *Acta Biomater.* 6 (12) (2010) 4642–4649.
- [36] H.B. Eral, V. López-Mejías, M. O'Mahony, B.L. Trout, A.S. Myerson, P.S. Doyle, Biocompatible alginate microgel particles as heteronucleants and encapsulating vehicles for hydrophilic and hydrophobic drugs, *Cryst. Growth Des.* 14 (4) (2014) 2073–2082.
- [37] D. Jagadeesan, I. Nasimova, I. Gourevich, S. Starodubtsev, E. Kumacheva, Microgels for the encapsulation and stimulus-responsive release of molecules with distinct polarities, *Macromol. Biosci.* 11 (7) (2011) 889–896.
- [38] Y.-M. Liu, W. Wu, X.-J. Ju, W. Wang, R. Xie, C.-L. Mou, W.-C. Zheng, Z. Liu, L.-Y. Chu, Smart microcapsules for direction-specific burst release of hydrophobic drugs, *RSC Adv.* 4 (87) (2014) 46568–46575.
- [39] M.J. Rathbone, K.L. Macmillan, C.R. Bunt, S. Burggraaf, Conceptual and commercially available intravaginal veterinary drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28 (3) (1997) 363–392.
- [40] C.S. Whisnant, P.J. Burns, Evaluation of steroid microspheres for control of estrus in cows and induction of puberty in heifers, *Theriogenology* 58 (6) (2002) 1229–1235.
- [41] M.I. Weibel, J.M. Badano, I. Rintoul, Technological evolution of hormone delivery systems for estrous synchronization in cattle, *Int. J. Livest. Res.* 4 (1) (2014) 20–40.
- [42] E. Hachet, H. Van Den Berghe, E. Bayma, M.R. Block, R. Auzély-Velty, Design of biomimetic cell-interactive substrates using hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties, *Biomacromolecules* 13 (6) (2012) 1818–1827.
- [43] A. Perro, C. Nicolet, J. Angly, S. Lecommandoux, J.F. Le Meins, A. Colin, Mastering a double emulsion in a simple co-flow microfluidic to generate complex polymersomes, *Langmuir* 27 (14) (2011) 9034–9042.
- [44] T.G. Mason, J.N. Wilking, K. Meleson, C.B. Chang, S.M. Graves, Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties, *J. Phys. Cond. Matter* 18 (41) (2006).
- [45] K. Kubo, T. Nakamura, K. Takagaki, Y. Yoshida, M. Endo, Depolymerization of hyaluronan by sonication, *Glycoconj. J.* 10 (6) (1993) 435–439.
- [46] S.J. Bryant, C.R. Nuttelman, K.S. Anseth, Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* 11 (5) (2000) 439–457.
- [47] T. Fu, Y. Ma, D. Funfschilling, C. Zhu, H.Z. Li, Squeezing-to-dripping transition for bubble formation in a microfluidic T-junction, *Chem. Eng. Sci.* 65 (12) (2010) 3739–3748.
- [48] P. Posocco, A. Perazzo, V. Preziosi, E. Laurini, S. Pricl, S. Guido, Interfacial tension of oil/water emulsions with mixed non-ionic surfactants: comparison between experiments and molecular simulations, *RSC Adv.* 6 (6) (2016) 4723–4729.
- [49] B.M. Jose, T. Cubaud, Formation and dynamics of partially wetting droplets in square microchannels, *RSC Adv.* 4 (29) (2014) 14962–14970.
- [50] K. Pays, J. Giermanska-Kahn, B. Pouligny, J. Bibette, F. Leal-Calderon, Double emulsions: how does release occur?, *J. Control. Release* 79 (1–3) (2002) 193–205.

Références:

- [1] P. J. Flory and J. Rehner, “statistical theory on chain configuration and physical properties of high polymers,” *J. Chem. physics*, vol. 11, p. 512, 1943.
- [2] J. A. Burdick and G. D. Prestwich, “Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications,” pp. 41–56, 2011.
- [3] P. J. Flory and B. Erman, “Critical Phenomena and Transitions in Swollen Polymer Networks and in Linear Macromolecules,” *Am. Chem. Soc. Polym. Prepr. Div. Polym. Chem.*, vol. 26, no. 2, p. 34, 1985.
- [4] E. Fouissac, M. Milas, and M. Rinaudo, “Shear-Rate, Concentration, Molecular Weight, and Temperature Viscosity Dependences of Hyaluronate, a Wormlike Polyelectrolyte,” *Macromolecules*, vol. 26, no. 25, pp. 6945–6951, 1993.
- [5] J. B. Leach, K. A. Bivens, C. W. Patrick, and C. E. Schmidt, “Photocrosslinked Hyaluronic acid hydrogels : Natural , Biodegradable Tissue Engineering Scaffolds,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 82, p. 578, 2003.
- [6] J. B. Leach and C. E. Schmidt, “Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 2, pp. 125–135, 2005.
- [7] J. Crank, “The Mathematics of Diffusion, second ed.,” 1979.

