



**HAL**  
open science

## Nouveaux hydrogels à base de polysaccharide obtenus par voie biomimétique ou par photoréticulation.

Ahdi Hadrich

► **To cite this version:**

Ahdi Hadrich. Nouveaux hydrogels à base de polysaccharide obtenus par voie biomimétique ou par photoréticulation.. Polymères. Normandie Université, 2019. Français. NNT: 2019NORMR017 . tel-02272694

**HAL Id: tel-02272694**

**<https://theses.hal.science/tel-02272694>**

Submitted on 28 Aug 2019

**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.



Normandie Université

## THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

### Nouveaux hydrogels à base de polysaccharide obtenus par voie biomimétique ou par photoréticulation

Présentée et soutenue par  
**Ahdi HADRICH**

Thèse prévue publiquement le 28 Juin 2019  
devant le jury composé de

Mme Catherine LE VISAGE	Directrice de Recherche INSERM Université de Nantes	Rapporteur
M. Vincent LAPINTE	Maitre de Conférences Université de Montpellier	Rapporteur
M. Jacques DESBRIERES	Professeur Université de Pau et des Pays de l'Adour	Examineur
M. Didier LE CERF	Professeur Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. Luc PICTON	Professeur Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Didier LE CERF et Luc PICTON, laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces UMR 6270 CNRS / Université de Rouen Normandie / INSA de Rouen Normandie





## **Remerciements**

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du laboratoire « Polymères, Biopolymères, Surfaces » (UMR 6270, CNRS) à l'université de Rouen Normandie.

Je remercie tout d'abord le directeur du laboratoire, Monsieur Thierry Jouenne, de m'avoir accueilli au sein de son unité.

Mes sincères remerciements sont adressés à mes directeurs de thèse : Messieurs Didier Le Cerf et Luc Picton pour m'avoir fait confiance et m'avoir guidé tout au long de ces travaux. Merci pour votre disponibilité, vos précieux conseils scientifiques et vos encouragements qui m'ont indiscutablement permis d'évoluer. Merci également pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir sans oublier le grand optimisme de Luc et le soutien humain de Didier. Je tiens également à remercier ma co-encadrante, Madame Virginie Dulong, qui a fait preuve d'une très grande disponibilité tant par rapport aux résultats expérimentaux que pour les discussions scientifiques. Je tiens à lui exprimer mes plus vifs remerciements pour m'avoir fait partager sa passion pour les polysaccharides et pour son soutien constant tout au long de ces années de thèse

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Merci à Madame Catherine Le Visage et Monsieur Vincent Lapinte de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. J'associe également à ces remerciements Monsieur Jacques Desbrières pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à tous les membres du laboratoire et à toutes les personnes qui ont contribué à la

réussite de ces travaux et avec qui j'ai également pu échanger et discuter. Un merci particulier à Monsieur Christophe Rihouey pour les analyses chromatographiques et pour sa grande gentillesse ainsi que pour sa gaieté et son soutien. Un grand merci à Madame Béatrice Labat pour les tests de cytotoxicité ainsi que pour sa disponibilité et sa gentillesse. Je remercie également mon référent Laurent Lebrun pour son extrême gentillesse.

Mes pensées vont ensuite à mes collègues de l'équipe qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel et avec qui j'ai passé des moments inoubliables. Merci à Marie-Carole (Big Mama !!) pour avoir supporté mes taquines et pour sa sympathie. Mes remerciements ne pourront jamais égaler ton grand cœur qui m'a apporté du soutien au moment où j'avais besoin d'aide. Merci également à Hung pour ton énorme serviabilité et pour ta bonté. Merci à Mathieu, je te souhaite un bon courage pour ta thèse. Merci à toi Ali, pour m'avoir aidé de s'intégrer au sein de l'équipe et pour tes précieux conseils. Un grand merci à Chahrazed et Julia pour leur gentillesse. Je remercie également Farouk pour sa générosité et son aide précieuse.

Je tiens à remercier tout le reste des membres du laboratoire, permanents et doctorants qui ont fait en sorte que chaque jour soit unique : Brahim, Amine, Basco, Naila, Quentin, Edyta, Nagihan, Charolotte au carré, Clément, Corinne, Béatrice, Gisèle, Carole, Eric, Tony, Stéphane, Katia, Pascal, Marion, Takfarinas, Imen, Tiphaine, Aracelys, Arlette...Merci de m'avoir fait partager votre joie de vivre.

Si ces années se sont si bien passées c'est grâce à vous tous !!

Enfin, je ne pourrais pas finir ces remerciements sans penser à mes proches : je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma famille qui m'a gratifié de son amour et fourni les motivations sans cesse. Un grand merci à tous mes amis pour leurs encouragements constants.

Merci à tous et à bientôt !!

## Abréviations et Symboles

CDI :	Carbonyldiimidazole
CMP :	Carboxyméthylpullulane
D <sub>2</sub> O :	Eau deutérée
DIAD :	Azodicarboxylate de diisopropyle
DMF :	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DP <sub>n</sub> :	Degré de polymérisation moyen en nombre
DPPH :	1,1-diphényl-1-picrylhydrazyl
DS :	Degré de substitution
EDC :	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EtOH :	Éthanol
FA :	Acide férulique
HA :	Acide Hyaluronique
HCl :	Acide chlorhydrique
IR :	Spectroscopie Infrarouge
M <sub>n</sub> :	Masse molaire moyenne en nombre
M <sub>w</sub> :	Masse molaire moyenne en poids
NaOD :	Soude deutérée
NHS :	N-hydroxysuccinimide
PPh <sub>3</sub> :	Triphényle phosphine
ppm :	Partie par million
PUL :	Pullulane
R <sub>h</sub> :	Rayon hydrodynamique
RMN- <sup>1</sup> H :	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
SEC/MALS/DRI/Visco/UV :	Chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de la lumière, un détecteur réfractométrique, un détecteur viscosimétrique et un spectrophotomètre ultraviolet
TBA :	Tétrabutylammonium
[η] :	Viscosité intrinsèque



# **Table des matières**

---



---

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre A- Etude bibliographique .....</b>	<b>9</b>
Introduction.....	13
I. Les polysaccharides : biopolymères d'un grand intérêt.....	13
I.1. Généralités .....	13
I.2. Les polysaccharides neutres.....	16
I.2.1. Quelques exemples et leurs principales modifications chimiques ...	16
I.2.2. Le pullulane.....	20
I.3. Les polysaccharides chargés.....	30
I.3.1. Quelques exemples et leurs principales modifications chimiques ...	30
I.3.2. L'Acide Hyaluronique.....	32
II. Les hydrogels : matériaux aux propriétés exceptionnelles .....	44
II.1. Historique .....	44
II.2. Définition et classification.....	45
II.2.1. Les hydrogels physiques .....	47
II.2.2 Les hydrogels chimiques.....	48
II.3. Les hydrogels de pullulane et de ses dérivés.....	51
II.4. Les hydrogels d'acide hyaluronique et de ses dérivés .....	53
II.5. Propriétés des hydrogels.....	56
II.5.1. Propriétés structurales.....	56
II.5.2. Propriétés mécaniques .....	57
II.5.3. Propriétés de gonflement .....	58
II.6. Principales applications des hydrogels.....	59
II.6.1. Culture cellulaire .....	60
II.6.2. Séquestration et libération de principes actifs.....	62
II.6.3. Industrie cosmétique.....	63
III. La nature : une source d'inspiration.....	65
III.1. Biomimétisme.....	65
III.1.1. Définition .....	65
III.1.2. Exemples de systèmes biomimétiques .....	67
III.2. Exemples de dérivés naturels greffés sur des polysaccharides .....	68
III.2.1. Les composés phénoliques .....	69
III.2.2. Les acides gras.....	76
Conclusion.....	78

Références bibliographiques .....	80
<b>Chapitre B- Matériels et Méthodes.....</b>	<b>99</b>
Introduction.....	103
I. Méthodes de caractérisation du greffage chimique .....	103
I.1. Spectroscopie Infra-Rouge (IR) .....	103
I.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	104
I.3. Dosage de Folin-Ciocalteu.....	107
II. Méthodes de caractérisation physico-chimiques .....	110
II.1. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco/UV .....	110
II.2. Rhéologie .....	114
II.2.1. Régime permanent .....	114
II.2.2. Régime dynamique.....	116
II.2.3. Appareillage et conditions d'analyse.....	119
III. Étude de la gélification .....	120
III.1. Mesure de l'activité enzymatique de la laccase.....	120
III.2. Etude rhéologique.....	121
III.2.1. Hydrogels biomimétiques par voie enzymatique.....	122
III.2.2. Hydrogels obtenus par photoréticulation .....	123
III.3. Propriétés de gonflement .....	123
IV. Activités biologiques.....	125
IV.1. Propriétés antioxydantes.....	125
IV.2. Tests de cytotoxicité.....	128
IV.2.1. Culture cellulaire des fibroblastes .....	129
IV.2.2. Préparation des échantillons à tester .....	129
IV.2.3. Test Live/Dead .....	130
IV.2.4. Test à l'Alamar Blue® .....	130
V. Réactifs et solvants utilisés.....	131
Références bibliographiques .....	136
<b>Chapitre C- Hydrogels biomimétiques à base de polysaccharide neutre.....</b>	<b>139</b>
Introduction.....	143
I. Greffage de l'acide férulique sur le pullulane (PUL-FA) .....	143
I.1. Différentes stratégies testées .....	143
I.1.1. Greffage basé sur la chimie des carbodiimides.....	144

I.1.2 Greffage par réaction de Mitsunobu.....	148
I.1.3. Greffage par voie enzymatique .....	150
I.1.4. Greffage par la chimie des imidazoles .....	152
I.2. Stratégie retenue .....	154
I.2.1. Protocole de synthèse et conditions opératoires.....	154
I.2.2. Caractérisation structurale.....	156
I.3. Conclusion sur le greffage de l'acide férulique sur le pullulane.....	162
II. Caractérisations physico-chimiques.....	162
II.1. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco/UV .....	162
II.2. Mesures rhéologiques.....	167
II.2.1. Mesures en écoulement.....	167
II.2.2. Mesures dynamiques.....	171
II.2.3. Conclusion sur les propriétés physico-chimiques .....	173
III. Gélification.....	174
III.1. Mode d'obtention des hydrogels PUL-FA .....	174
III.2. Étude rhéologique.....	175
III.2.1. Influence de la quantité d'enzyme .....	177
III.2.2. Influence du degré de substitution.....	179
III.2.3. Influence de la concentration .....	180
III.3. Propriétés de gonflement .....	181
III.4. Conclusion sur la gélification.....	182
Conclusion.....	183
Références bibliographiques .....	186
<b>Chapitre D- Hydrogels biomimétiques à base de polysaccharides anioniques .....</b>	<b>189</b>
Introduction.....	193
<b>Chapitre D-I. Hydrogels biomimétiques à base du carboxyméthylpullulane .....</b>	<b>193</b>
I. Article .....	193
II. Résultats et discussion .....	204
II.1. Réaction de greffage .....	204
II.2. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco.....	204
II.3. Etude rhéologique de la gélification.....	205
II.4. Propriétés de gonflement.....	206

---

Conclusion .....	207
<b>Chapitre D-II. Transfert sur un polysaccharide d'intérêt, l'acide hyaluronique .....</b>	<b>208</b>
I. Greffage de l'acide férulique sur l'acide hyaluronique .....	208
I.1. Méthode de synthèse .....	208
I.2. Synthèse de référence .....	209
I.2.1. Protocole de synthèse .....	209
I.2.2. Caractérisation du greffage .....	210
I.2.3. Détermination des masses molaires .....	215
I.3. Amélioration du protocole de synthèse et de purification .....	216
I.3.1. Purification .....	216
I.3.2. Teneur en acide férulique .....	218
I.3.3. Contrôle du pH .....	219
I.3.4. Effet de la longueur du bras espaceur .....	220
I.4. Conclusion sur le greffage de l'acide férulique sur l'acide hyaluronique .....	223
II. Mesures rhéologiques .....	224
II.1. Mesures en écoulement .....	224
II.2. Mesures dynamiques .....	226
III. Gélification .....	228
III.1. Mode d'obtention des hydrogels HA-FA .....	228
III.2. Etude rhéologique .....	228
III.2.1. Influence de la quantité d'enzyme .....	228
III.2.2. Influence du degré de substitution .....	230
III.2.3. Influence de la concentration .....	231
III.2.4. Influence du bras espaceur .....	232
III.2.5. Influence de la masse molaire .....	234
III.3. Propriétés de gonflement .....	235
III.3.1. Influence des paramètres intrinsèques .....	235
III.3.2. Influence des paramètres externes .....	237
III.4. Conclusion sur la gélification .....	239
Conclusion .....	240
Références bibliographiques .....	242

## **Chapitre E- Activités biologiques.....243**

Introduction.....	247
I. Activités antioxydantes .....	247
I.1. Acide férulique et ses dimères .....	247
I.1.1. Synthèse des dimères d'acide férulique .....	247
I.1.2. Analyse des propriétés antioxydantes .....	249
I.2. Pullulane précurseur et dérivés PUL-FA.....	250
I.2.1. Pullulane précurseur .....	250
I.2.2. Dérivés PUL-FA.....	251
I.3. CMP précurseur, dérivés CMP-FA et hydrogels CMP-FA .....	256
I.4. HA précurseur et dérivés HA-FA.....	258
II. Cytocompatibilité .....	260
II.1. FA et ses dimères .....	260
II.1.1. Test Live /Dead.....	260
II.1.2. Test Alamar Blue® .....	261
II.2. PUL et dérivés PUL-FA.....	262
II.2.1. Test Live/Dead.....	262
II.2.2. Test Alamar Blue® .....	262
II.3. CMP et dérivés CMP-FA.....	264
II.4. HA et dérivés HA-FA .....	265
II.4.1. HA et dérivés HA-FA à haute masse molaire.....	265
II.4.2. HA et dérivés HA-FA à faible masse molaire .....	267
II.5. Conclusion .....	268
Références bibliographiques .....	270

## **Chapitre F- Hydrogels à base de polysaccharides obtenus par photoréticulation .....271**

Introduction.....	275
I. Réactions de greffage de l'amine/acide gras insaturé.....	275
I.1. Couplage direct entre le pullulane et l'acide linoléique .....	275
I.1.1. Synthèse mise en jeu .....	275
I.1.2. Caractérisation structurale du greffage.....	276
I.2. Couplage direct entre le CMP ou le HA et l'amine grasse insaturée.....	280
I.2.1. Protocole expérimental du greffage direct de l'amine grasse insaturée sur le HA ou le CMP.....	281

I.2.2. Caractérisation structurale du greffage .....	282
I.3. Couplage indirect entre le CMP et l'acide gras insaturé.....	286
I.3.1. Protocole expérimental du greffage indirect de l'acide gras insaturé sur le CMP.....	287
I.3.2. Caractérisation structurale du greffage .....	288
I.4. Conclusion sur les réactions de greffage.....	291
II. Caractérisations physico-chimiques .....	292
II.1. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco.....	292
II.2. Mesures rhéologiques.....	294
II.2.1. Mesures en écoulement.....	294
II.2.2. Mesures dynamiques.....	295
III. Gélification.....	298
III.1. Optimisation des conditions de photoréticulation .....	299
III.1.1. Effet de la concentration en photoamorceur .....	299
III.1.2. Effet de l'intensité du rayonnement UV.....	300
III.1.3. Effet du temps de l'application du rayonnement UV.....	301
III.1.4 Conditions choisies pour la photoréticulation.....	301
III.2. Influence des paramètres intrinsèques.....	301
III.2.1. Effet du DS .....	302
III.2.2. Effet du mode de greffage .....	302
III.2.3. Effet du nombre d'insaturation.....	303
IV. Conclusion.....	304
Références bibliographiques .....	306
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>307</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>315</b>
Annexe 1 : Synthèse et caractérisation du carboxyméthylpullulan.....	317
Annexe 2 : Effet NaOD dans les analyses RMN- <sup>1</sup> H.....	320
Annexe 3 : Communications scientifiques .....	324

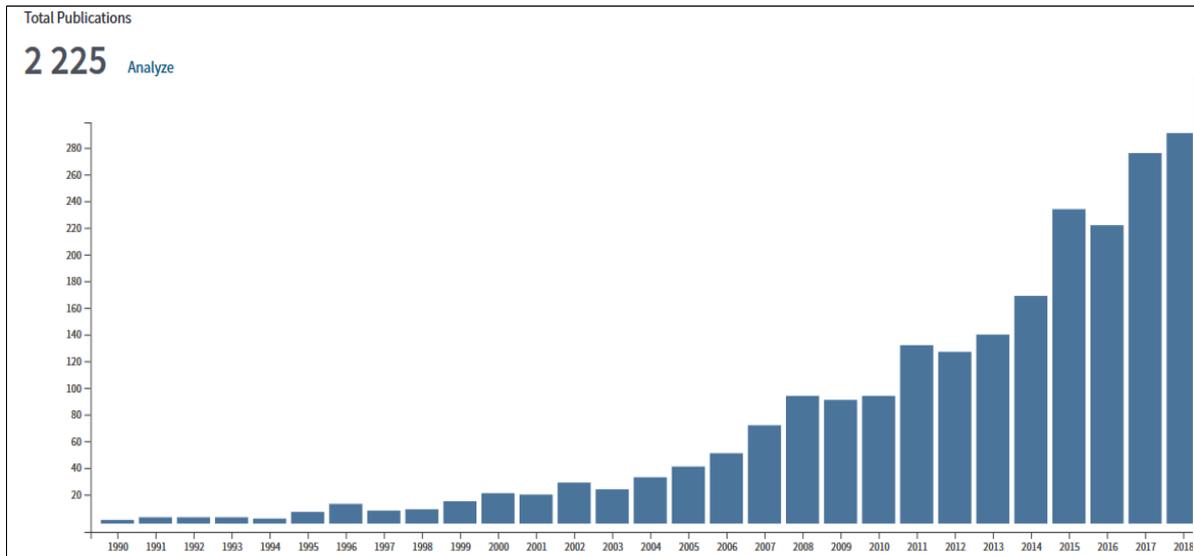
# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

---



**L**es hydrogels sont des réseaux tridimensionnels capables de retenir une quantité plus ou moins grande d'eau. La matrice constituant ce réseau est le plus souvent constituée de polymère réticulé, généralement de façon covalente ou chimique (hydrogels irréversibles) mais parfois aussi de façon physique (hydrogels réversibles) par le biais d'interactions de type liaisons hydrogène ou 'hydrophobe' ou de complexes par exemple. Ces nouveaux matériaux sont ainsi capables d'absorber des fluides aqueux, de constituer des 'réservoirs' permettant une séquestration/libération contrôlée, de restituer une hydratation locale, d'obtenir des propriétés mécaniques intéressantes ou encore de permettre la culture cellulaire ou d'amorcer un processus de réparation tissulaire<sup>1</sup>. Plus de 15000 articles ont ainsi été publiés sur ce thème depuis ces 20 dernières années et les applications sont multiples notamment dans les domaines biomédical<sup>2</sup>, pharmaceutique<sup>3</sup> et cosmétique<sup>4</sup>.

Une grande partie des hydrogels encore actuellement utilisés est élaborée à partir de polymère de synthèse (les polyacrylates et dérivés par exemple), issus de ressources fossiles (pétrole). Par ailleurs, les agents de réticulation chimiques ou les monomères sont de nature variée mais souvent aussi assez toxiques (épichlorhydrine par exemple). Afin de développer de nouvelles approches plus respectueuses de l'environnement, les stratégies d'élaboration des hydrogels s'orientent aujourd'hui vers les polymères d'origine naturelle tels que les polysaccharides ou les protéines qui sont issus de ressources renouvelables, souvent biocompatibles et souvent aussi plus biodégradables que leurs homologues de synthèse. Cette tendance est illustrée par la Figure I-1 qui représente le nombre d'articles publiés depuis 30 ans avec les termes 'hydrogels et polysaccharides' au nombre de 2225 avec une croissance certaine ces 10 dernières années.



**Figure I-1 :** Publications avec les termes ('hydrogels et polysaccharides') entre 1990 et 2019.

Sources Web of Sciences (consultation avril 2019)

C'est dans cette démarche que ce situe ce travail de thèse qui se propose de développer des hydrogels originaux, réticulés chimiquement, à base de polymères d'origine naturelle et en particulier de polysaccharides et avec des chimies les plus vertueuses possibles en termes de respect de l'environnement. Notre projet s'articule autour de deux orientations distinctes :

La première orientation se base sur une approche de type biomimétique. Nous nous sommes inspirés de l'élaboration d'hydrogels entièrement naturels observés dans la nature et plus précisément au sein des semences de certaines céréales comme les graines de blé mais aussi des parois cellulaires de certains végétaux. En effet, il a déjà été largement décrit dans la littérature que les arabinoxylanes, polysaccharides majeurs de ces structures<sup>5</sup>, étaient naturellement mais faiblement fonctionnalisés (via des liaisons de type ester) par de l'acide férulique (FA), composé phénolique abondant<sup>6</sup>. La littérature montre également la capacité de ces acides féruliques greffés à dimériser par oxydation en présence de laccase<sup>7</sup>, une enzyme d'origine fongique appartenant à la famille des polyphénol-oxydases ou oxydases multi-cuivre, conduisant à la formation de lien de réticulation chimique et donc de structures de type hydrogels<sup>8</sup>. On retrouve donc ces structures 3D dans certains mucilages de graines qui permettent par exemple une bonne rétention des eaux en terre ou encore un renforcement de la protection contre les pathogènes<sup>9</sup>. La première partie de notre travail consistera donc à transférer cette approche biomimétique en mettant en œuvre et en adaptant une chimie de fonctionnalisation de polysaccharides neutre (pullulane), anionique modèle

(carboxyméthylpullulane CMP) et anionique d'intérêt (acide hyaluronique ou HA) par l'acide férulique. Les dérivés obtenus seront caractérisés d'un point de vue structural et physicochimique puis les potentielles propriétés de gélification en présence de laccase seront évaluées. Au regard des applications potentielles et notamment biomédicales des systèmes étudiés, nous étudierons également les activités biologiques et cytotocompatibles des différents dérivés obtenus.

La seconde orientation s'intègre également dans le cadre d'une stratégie de développement durable et ouvre aussi une voie originale de conception d'hydrogels biosourcés. Elle repose sur l'utilisation de ressources quasi exclusivement issues de la biomasse. L'objectif est ici de greffer des chaînes grasses mono ou polyinsaturées d'origine naturelle sur des polysaccharides anioniques. On obtient alors des copolymères polyélectrolytes amphiphiles, dont le comportement en solutions aqueuses est déjà bien connu au laboratoire, et qui permettent d'obtenir, selon les conditions, des systèmes aux propriétés de pseudogel ou de gel physique réversible. L'originalité de l'approche réside alors à utiliser le potentiel réactif des doubles liaisons soumises à une irradiation lumineuse pour conduire à une photoréticulation. Nous présenterons dans un premier temps, la chimie adéquate pour l'obtention des dérivés greffés en faisant varier le polysaccharide (CMP et HA) et la nature du greffon insaturé. Nous proposerons une caractérisation structurale et physicochimique de ces dérivés. Enfin nous évaluerons la possibilité d'obtenir des hydrogels chimiques à partir des dérivés synthétisés selon les conditions de concentration en polymère, de degré de greffage, de nature des chaînes grasses (longueur, mono ou polyinsaturées), de puissance et de longueur d'onde de la stimulation photolumineuse. Cette seconde partie permettra d'apporter une preuve de concept et constitue une étude préliminaire de cette approche en photoréticulation.

L'ensemble de ces deux orientations visant à obtenir des hydrogels par des approches respectueuses des considérations environnementales constitue donc les enjeux principaux de ce travail de thèse résumé et schématisé dans la figure I-2.

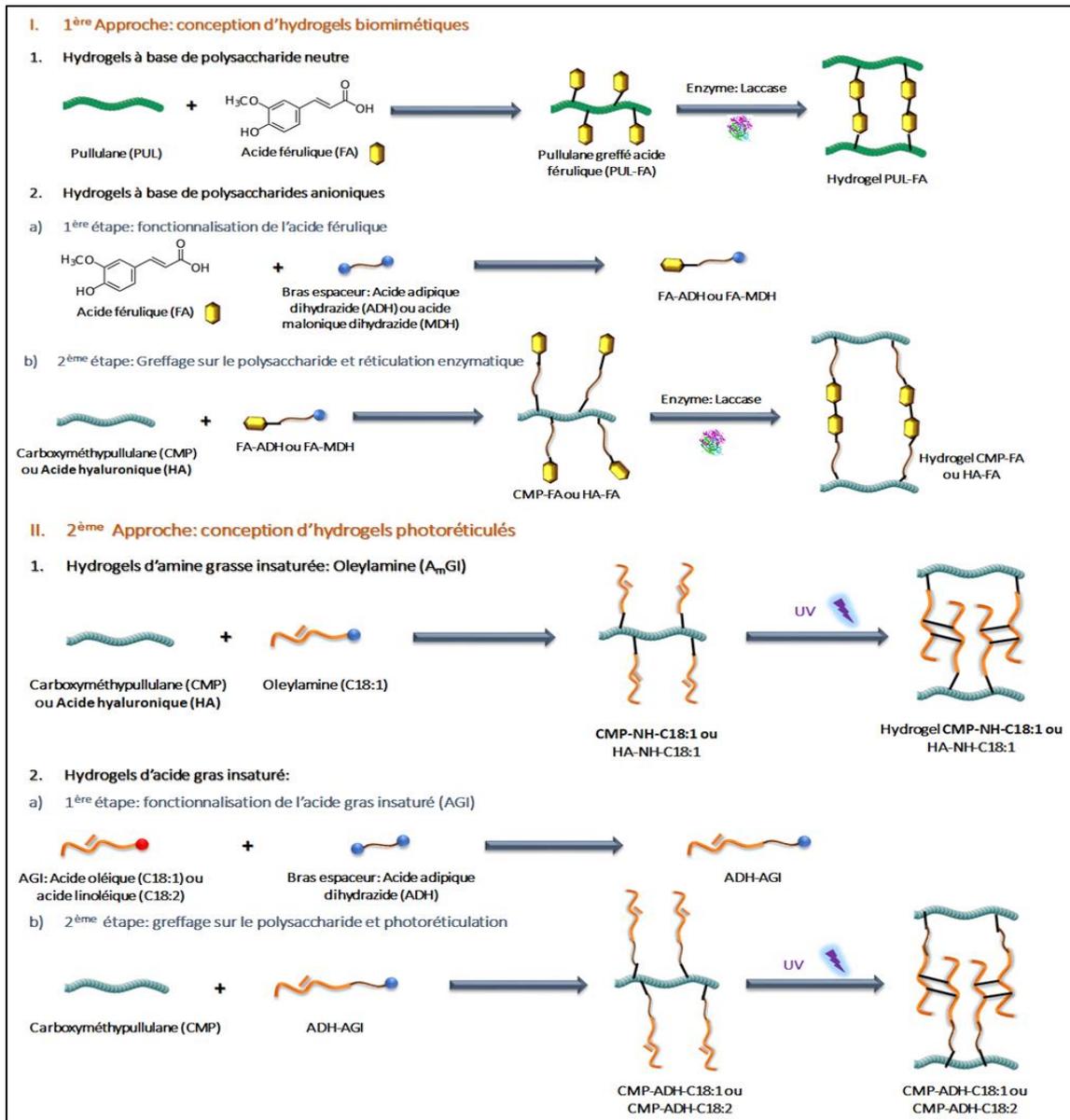


Figure I-2 : Principales approches envisagées

Le manuscrit présenté ici et intitulé « Nouveaux hydrogels à base de polysaccharide obtenus par voie biomimétique ou par photoréticulation » est constitué de six chapitres.

Le premier chapitre situe le travail dans son contexte bibliographique et s'organise en trois volets : un aperçu général sur les polysaccharides avec un accent particulier porté sur le pullulane et l'acide hyaluronique, une présentation des hydrogels avec leurs propriétés et leurs principales applications et enfin les approches biomimétiques et les composés naturels utilisés.

Le deuxième chapitre est consacré aux matériels et méthodes utilisés pour les caractérisations structurales et physicochimiques ainsi que pour l'évaluation des activités biologiques des systèmes obtenus.

La troisième partie du manuscrit présente les résultats de l'approche biomimétique sur les polysaccharides neutres et notamment le pullulane. Nous nous intéresserons aux différentes stratégies de chimie envisagées pour obtenir les dérivés de pullulane greffés par l'acide férulique et à la caractérisation ainsi que la quantification de la réaction de greffage. Puis, les caractérisations physico-chimiques en régimes dilué et semi-dilué seront exposées. À la fin de cette partie, la gélification en présence de la laccase et la caractérisation des propriétés mécaniques et de gonflement des hydrogels obtenus seront explorées.

Le quatrième chapitre présente également les résultats de l'approche biomimétique mais cette fois sur les polysaccharides anioniques. Dans un premier temps, nous montrerons les résultats de l'étude réalisée sur le CMP modèle présentés sous forme d'un article publié suivi d'une discussion rapide. Puis nous présenterons le transfert de cette méthodologie à l'acide hyaluronique.

Le cinquième chapitre du manuscrit porte sur les activités biologiques notamment antioxydantes et cytocompatibles des différents dérivés obtenus au cours de notre étude.

Dans le sixième et dernier chapitre, nous présenterons les premiers travaux réalisés dans le but d'élaborer des hydrogels à base de polysaccharides anioniques (acide hyaluronique et carboxyméthylpullulane) par photoréticulation. Nous exposerons les différentes stratégies utilisées pour le greffage de l'amine ou de l'acide gras insaturé sur le polysaccharide. Nous nous intéresserons ensuite aux caractérisations physico-chimiques des dérivés obtenus. Nous finirons par donner quelques résultats, notamment par rhéologie sous UV, sur la faisabilité de cette approche en photoréticulation.

Le financement des travaux de recherche présentés dans ce manuscrit a été assuré par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche ainsi que la région Normandie. Ces travaux ont été réalisés au sein du Laboratoire Polymères, Biopolymères et Surfaces (PBS, UMR-6270 CNRS Université de Rouen Normandie), dirigé par le Dr. Thierry Jouenne, au sein de l'équipe Systèmes Colloïdaux Complexes (SCC) dirigée par le Pr. Didier Le Cerf et s'inscrivent dans l'une des thématiques du groupe visant à développer des systèmes adaptatifs à base de polysaccharides. Cette thèse a été dirigée par les Pr. Didier Le Cerf et Luc Picton et co-encadrée par Dr. Virginie Dulong.

## Références bibliographiques

1. Garg, Sweta, A. G. Hydrogel : Classification , Properties , Preparation and Technical Features. *Asian J. Biomater. Res.* 2016 **2**, 163–170 (2016).
2. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 3–12 (2002).
3. Kashyap, N., Kumar, N. & Kumar, M. N. V. R. Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **22**, 107–150 (2005).
4. Patravale, V. B. & Mandawgade, S. D. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *Int. J. Cosmet. Sci.* **30**, 19–33 (2008).
5. Mendis, M., Leclerc, E. & Simsek, S. Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. *Carbohydr. Polym.* **139**, 159–166 (2016).
6. Naczki, M. & Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1523–1542 (2006).
7. Carunchio, F., Crescenzi, C., Girelli, A. M., Messina, A. & Tarola, A. M. Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. *Talanta* **55**, 189–200 (2001).
8. Carvajal-Millan, E., Landillon, V., Morel, M.-H., Rouau, X., Doublier, J.-L. & Micard, V. Arabinoxylan Gels: Impact of the Feruloylation Degree on Their Structure and Properties. *Biomacromolecules* **6**, 309–317 (2005).
9. Bento-Silva, A., Vaz Pato, M. C. & do Rosário Bronze, M. Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. *Food Chem.* **246**, 360–378 (2018).

# **Chapitre A- Etude bibliographique**

---



## Sommaire

Introduction.....	12
I. Les polysaccharides : biopolymères d'un grand intérêt.....	13
I.1. Généralités .....	13
I.2. Les polysaccharides neutres.....	16
I.2.1. Quelques exemples et leurs principales modifications chimiques ...	16
I.2.2. Le pullulane .....	20
I.3. Les polysaccharides chargés.....	30
I.3.1. Quelques exemples et leurs principales modifications chimiques ...	30
I.3.2. L'Acide Hyaluronique .....	32
II. Les hydrogels : matériaux aux propriétés exceptionnelles .....	44
II.1. Historique.....	44
II.2. Définition et classification.....	45
II.2.1. Les hydrogels physiques .....	47
II.2.2 Les hydrogels chimiques.....	48
II.3. Les hydrogels de pullulane et de ses dérivés.....	51
II.4. Les hydrogels d'acide hyaluronique et de ses dérivés .....	53
II.5. Propriétés des hydrogels.....	56
II.5.1. Propriétés structurales.....	56
II.5.2. Propriétés mécaniques .....	57
II.5.3. Propriétés de gonflement .....	58
II.6. Principales applications des hydrogels.....	59
II.6.1. Culture cellulaire.....	60
II.6.2. Séquestration et libération de principes actifs.....	62
II.6.3. Industrie cosmétique.....	63
III. La nature : une source d'inspiration .....	65
III.1. Biomimétisme .....	65
III.1.1. Définition .....	65
III.1.2. Exemples de systèmes biomimétiques .....	67
III.2. Exemples de dérivés naturels greffés sur des polysaccharides .....	68
III.2.1. Les composés phénoliques .....	69
III.2.2. Les acides gras .....	76
Conclusion.....	78
Références bibliographiques .....	80



## Introduction

Quel que soit le domaine, les travaux de recherche sont basés en grande partie sur la bibliographie. Pour cette raison, tout ce chapitre sera consacré à un état de l'art sur lequel nous nous sommes appuyés afin de mettre en place les stratégies utilisées pour réaliser les travaux décrits dans ce manuscrit.

Dans un premier volet, nous donnerons succinctement une description générale des polysaccharides et des principales modifications chimiques réalisées sur ces biopolymères. Notre étude se concentrera sur un polysaccharide neutre ; le pullulane et son dérivé anionique le carboxyméthylpullulane (CMP) et un autre polysaccharide anionique qui est l'acide hyaluronique. Ces trois polysaccharides ont retenu notre attention pour la conception de nos biomatériaux.

Ensuite, dans un deuxième volet, nous présenterons les hydrogels tout en commençant par un petit rappel historique. Ensuite, nous définirons et nous présenterons les deux grandes familles d'hydrogels physique ou chimique. Nous détaillerons ensuite leurs propriétés spécifiques qui sont à la base de leur utilisation importante et d'un grand nombre d'applications dont certaines seront présentées.

Enfin, dans le troisième et dernier volet, nous évoquerons, à l'aide d'exemples choisis, le biomimétisme qui a largement inspiré ce travail sur les hydrogels. La nature est en effet une source de molécules aux fonctions et propriétés variées, parmi lesquelles on citera plus particulièrement les composés phénoliques et les acides gras utilisés au cours de nos travaux.

## I. Les polysaccharides : biopolymères d'un grand intérêt

### I.1. Généralités

Le déchiffrement de la structure cyclique des oses dans les années 1930 a permis aux scientifiques la découverte rapide des polysaccharides connus encore sous le nom de glycanes ou polyosides. Ce sont des macromolécules carbohydrates constituées par l'enchaînement linéaire ou ramifié d'un grand nombre de motifs monosaccharidiques connectés par des liaisons de nature glycosidique. Le nombre important d'oses disponibles avec différentes structures et fonctions chimiques confère à ces biopolymères une grande diversité dans leur structure et propriété (nature d'enchaînement, longueur des chaînes, taux de ramification dans le cas d'un polysaccharide ramifié, ...)<sup>1</sup>. Les polysaccharides sont produits à partir d'une grande variété de ressources renouvelables provenant de la biomasse, c'est-à-dire les végétaux, les animaux, les

bactéries, les champignons et levures. *Walter* a essayé de répartir les polysaccharides selon leur origine<sup>2</sup> comme le montre le tableau suivant (Tableau A-1).

**Tableau A-1 : Répartition de quelques polysaccharides en fonction de leur origine<sup>2</sup>**

Origine	Exemples de polysaccharide
Végétale terrestre	Amidon, cellulose, pectine, gomme de guar, gomme karaya
Végétale marine	Alginate, carraghénanes, agar-agar, ulvane
Animale	Acide hyaluronique, chitine, glycogène
Bactérienne	Dextrane, xanthane, gellane, curdlane, acide hyaluronique
Fongique	Pullulane

Les polysaccharides présentent de nombreuses fonctions hydroxyle et parfois un caractère anionique (carboxylate, sulfate notamment). Ainsi, la majorité de ces macromolécules présentent une grande affinité pour l'eau. Néanmoins, cette hydrosolubilité reste dépendante de leur origine et leur structure chimique. Pour cette raison, on trouve certains polysaccharides insolubles dans l'eau (cellulose et chitine)<sup>3</sup>. Afin d'améliorer leurs solubilités et leurs propriétés physico-chimiques ou de leurs apporter de nouvelles propriétés biologiques, les polysaccharides sont susceptibles d'être chimiquement modifiés grâce à la présence de nombreux groupements fonctionnels réactifs (alcool, acide carboxylique). Cette fonctionnalisation conduira ainsi généralement à un greffage statistique le long de la chaîne des polysaccharides via des liens qui seront le plus souvent de type ester, éther ou amide. Ce greffage permet par exemple l'incorporation de groupements chargés, hydrophobes, thermosensibles ou de molécules actives<sup>4-8</sup>. La modification des polysaccharides conduisant à des structures bloc est aussi possible en utilisant le sucre réducteur en extrémité de chaînes via une amination réductrice<sup>9</sup>.

La modification des polysaccharides nécessite au préalable de bien connaître les critères de solubilité dans différents solvants pour déterminer le milieu réactionnel convenable de la réaction de greffage (Tableau A-2).

**Tableau A-2 : Solubilité de quelques polysaccharides<sup>3</sup>**

Polysaccharide	Solubilité dans		
	H <sub>2</sub> O	DMSO	DMF
Pullulane	✓	✓	✓ (80°C)
Acide hyaluronique	✓	✓ (TBA <sup>+</sup> OH <sup>-</sup> )	✓ (TBA <sup>+</sup> OH <sup>-</sup> )
Alginate	✓	-	-
Amidon	✓ (70°C)	✓ (80°C)	-
Cellulose	-	✓ (TBA <sup>+</sup> F <sup>-</sup> )	-
Chitine	-	-	-
Chitosane	✓ (solution acide)	-	-
Dextrane	✓ (sauf forme cristalline)	✓ (40°C)	✓ (Li <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> )
Xanthane	✓	-	-

✓ Soluble

- Pas soluble

Dans la littérature, les chercheurs ont essayé aussi de classifier les polysaccharides. Une première classification est basée sur leur structure et plus précisément sur leur composition en unités monosaccharidiques. Lorsqu'ils sont constitués d'un enchaînement d'un seul type d'unités osidiques, les polysaccharides sont dits homopolysaccharides. Ils peuvent être linéaires (amylose, cellulose, chitine) ou encore ramifiés (amylopectine, glycogène). Tandis que lorsque le squelette est formé de plusieurs types d'unités osidiques, les polysaccharides sont dits hétéropolysaccharides. Les arabinoxylanes à titre d'exemple sont composés d'un mélange mixte d'arabinose et de xylose. Les ramifications sont aussi présentes chez les hétéropolysaccharides mais elles suivent des enchaînements simples<sup>10</sup>.

Cette diversité de composition structurale et saccharidique confère à ces biopolymères des rôles différents et primordiaux dans la survie et la protection des organismes à partir des quels ils proviennent. En conséquence, il est aussi possible de classer les polysaccharides d'après leurs fonctions biologiques et de les diviser en trois catégories :

- Les polysaccharides de structure ayant un rôle mécanique apportant rigidité et élasticité aux cellules vivantes contribuant ainsi à leur protection (cellulose, chitine, pectine). Ils sont par définition peu ou pas solubles dans l'eau.
- Les polysaccharides de réserve constituent les sources de l'énergie pour les cellules végétales et animales par le stockage des sucres riches en énergie (amidon, glycogène, caroube).
- Les polysaccharides généralement produits par des micro-organismes sont connus sous le nom d'exopolysaccharides. Leur rôle est d'aider le développement des microorganismes et de les protéger contre le dessèchement en assurant la présence d'eau à proximité (acide hyaluronique, dextrane, xanthane).

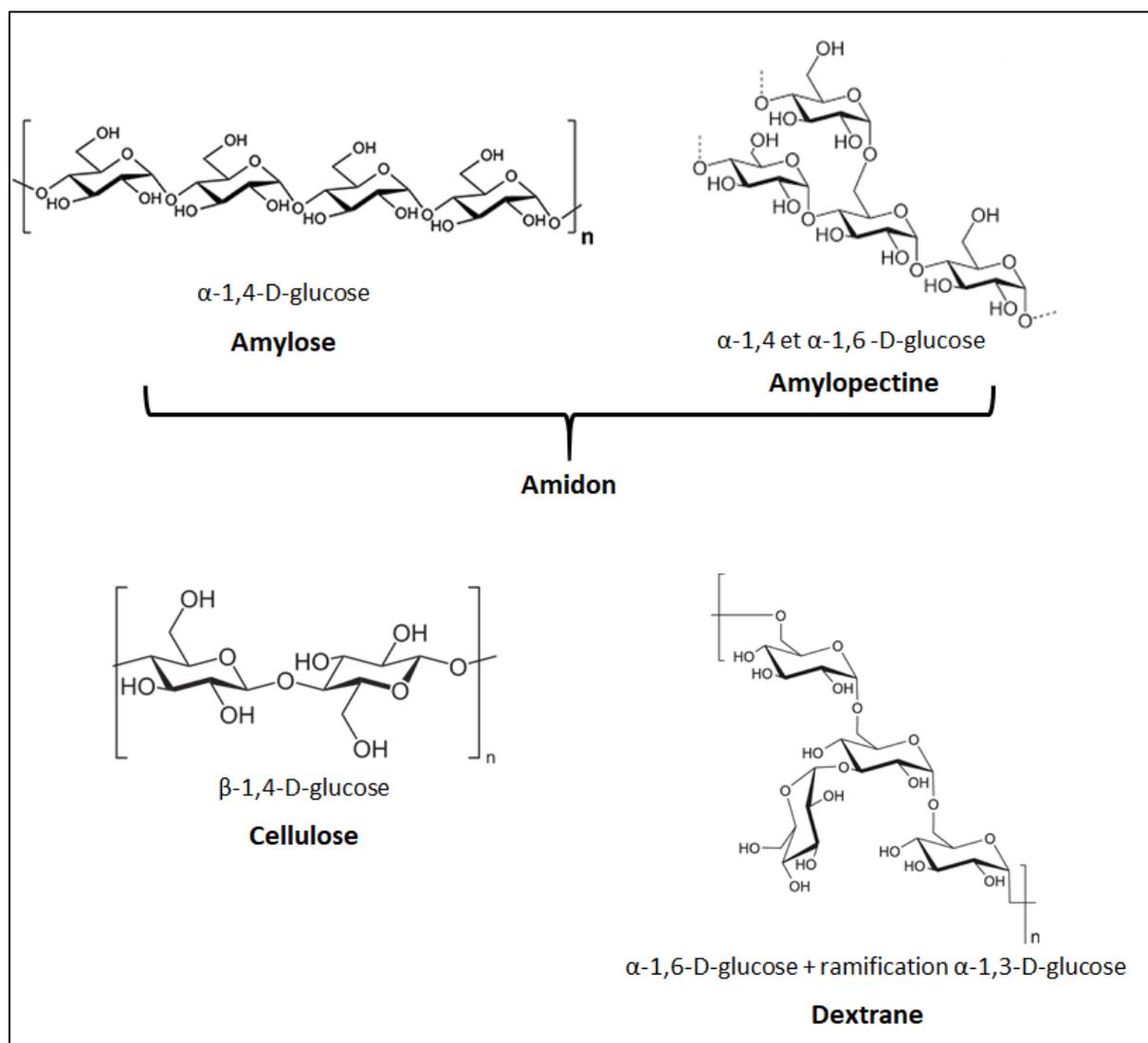
Enfin, il est également possible de classer les polysaccharides selon leur caractère neutre ou ionique (anioniques et plus rarement cationiques). C'est ce critère que nous adopterons dans la suite de ce premier volet de l'étude bibliographique. Nous nous limiterons à présenter succinctement les polysaccharides les plus courants et nous détaillerons seulement ceux utilisés au cours de nos travaux.

## **I.2. Les polysaccharides neutres**

### **I.2.1. Quelques exemples et leurs principales modifications chimiques**

Les polysaccharides neutres peuvent provenir de différentes sources que ce soit animales, végétales (notamment algales), bactériennes et présentent des structures et caractéristiques variées. Nous traiterons ici les exemples les plus cités dans la littérature ainsi que leurs modifications chimiques et leur utilisation comme supports pour la conception de divers matériaux.

La cellulose, l'amidon, la chitine ou encore les arabinoxylanes constituent les polysaccharides neutres les plus abondants dans la nature et probablement les plus couramment étudiés durant ces 20 dernières années. Ils proviennent respectivement de la paroi cellulaire du bois et des plantes, des organes de réserve des végétaux, de la structure externe des crustacés et des insectes. Citons aussi le dextrane et le pullulane, deux polysaccharides neutres produits par des microorganismes ou des levures, également très étudiés dans la littérature. La figure suivante regroupe la structure de certains de ces polysaccharides (Fig. A-1). Le pullulane, quant à lui, sera présenté et détaillé à la suite de cette partie (A-II.2.2).



**Figure A-1 :** Structures chimiques de quelques polysaccharides neutres

Pour améliorer ou modifier les propriétés physicochimiques et/ou biologiques des polysaccharides neutres, il convient de fonctionnaliser le polymère en utilisant les seules fonctions alcool présentes. Ces fonctions alcool ne sont pas toujours suffisamment réactives et/ou le polysaccharide neutre n'est pas toujours soluble dans l'eau, il faut alors envisager une pré-modification afin d'apporter une nouvelle fonctionnalisation (acide carboxylique, amine par exemple), support pour poursuivre la modification chimique.

- Cellulose

Dans le cas de la cellulose, une estérification est possible conduisant par exemple à l'acétate de cellulose<sup>11</sup> ou le nitrate de cellulose<sup>12</sup>. Pour obtenir des dérivés hydrosolubles de la cellulose, il faut passer par une étape de mercerisation en présence d'une base forte pour former les alcoolates nécessaires à l'accessibilité des fonctions en milieu aqueux puis par une

éthérisation le plus souvent. On obtient ainsi des dérivés industriels hydrosolubles tels que la méthylcellulose (MC)<sup>13</sup>, la carboxyméthylcellulose (CMC)<sup>14</sup>, l'hydroxyéthylcellulose (HEC), l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) et l'hydroxypropylcellulose (HPC)<sup>15</sup>.

Les polysaccharides naturels ou artificiels (après fonctionnalisation) contiennent ainsi divers groupements réactifs le long des chaînes macromoléculaires. Ils peuvent alors être modifiés chimiquement et/ou biochimiquement pour obtenir de nouveaux dérivés possédant de nouvelles propriétés physico-chimiques et biologiques plus intéressantes<sup>16</sup>. Par exemple, le greffage de longs groupes alkyle au sein de dérivés cellulosiques (MC, HEC, HPC...) a été mis en évidence et exploité par *Landoll* en 1982. Pour cela, il utilisait des chaînes époxydes alkylées (C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> et un mélange de C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub> et C<sub>24</sub>)<sup>17</sup>. Cette stratégie conduit à l'obtention de systèmes de type peigne<sup>18</sup>.

D'autres approches ont aussi été utilisées sur ces dérivés cellulosiques en s'appuyant sur des groupes fonctionnels portés par les chaînons alkyle tels que les époxydes, les anhydrides, les isocyanates, les halogénures d'alkyle et les halogénures d'acyle<sup>19,20</sup>, des amines alkylées<sup>21</sup>, le tosylate de fluorocarbone et l'époxyde de tosylate<sup>22</sup>, des halohydrines quaternaires<sup>23</sup> et les composés phénoliques<sup>24</sup>.

- Amidon

L'amidon et ses dérivés ont été aussi utilisés pour former des polysaccharides hydrophobiquement modifiés de type peigne suite à l'incorporation de molécules hydrophobes. Parmi ces molécules, on trouve les anhydrides alkylés<sup>25</sup>, les halogénures d'acyles alkylés<sup>26</sup>, les époxydes alkylés<sup>27</sup>, les composés phénoliques<sup>28</sup>, les isocyanates alkylés ou contenant des groupements cycliques<sup>29</sup> et la quercétine ou appelée aussi quercétol appartenant à la famille des flavonoïdes<sup>30</sup>.

- Dextrane

Un troisième polysaccharide neutre, le dextrane et notamment ses dérivés ont fait également l'objet de diverses modifications chimiques hydrophobes à travers le greffage de groupements tels que les phénoxy<sup>31</sup>, les flavonoïdes<sup>32</sup>, les carbonates cycliques<sup>33</sup>, longues chaînes alkyles<sup>34,35</sup> et sans oublier aussi les composés phénoliques<sup>36</sup>.

Les mécanismes réactionnels les plus employés pour modifier ces polysaccharides neutres sont l'éthérisation<sup>17,22,23,26,33,34,37,38</sup>, la carbamoylation<sup>28</sup>, l'amidification<sup>21</sup>, le greffage radicalaire<sup>30,32</sup> et finalement l'estérification<sup>19,20,24-26,28,36,39</sup>.

L'estérification avec un anhydride d'acide en présence d'une base faible a été appliquée sur l'amidon afin de greffer des anhydrides d'acide carboxylique alkylés<sup>25</sup>. Wang *et al.* ont obtenu des esters de cellulose d'acide gras à longues chaînes aliphatiques à partir de l'huile de soja en utilisant le mélange DMF/Pyridine comme milieu réactionnel<sup>19</sup>. Cependant, il est à noter que l'ajout excessif de base limite l'efficacité de la réaction et on obtient ainsi des degrés de substitution (DS) plus faibles<sup>20</sup>. Les travaux de Höfle *et al.* ont montré que l'ajout d'un catalyseur nucléophile tel que le 4-diméthylaminopyridine (DMAP) augmente la réactivité du milieu permettant l'obtention des DS plus élevés<sup>40</sup>. Néanmoins, la réactivité des anhydrides reste insuffisante dans le cas où on souhaite modifier le polysaccharide neutre par des molécules hydrophobes de structure plus complexe (acides gras, composés aromatiques...) d'où le recours à l'utilisation de chlorure d'acide dans une solution alcaline<sup>39</sup>. L'estérification du polysaccharide par ces composés peut conduire à des réactions secondaires qui sont minimisées quand les solvants comme le DMF, le N,N-diméthylacétamide (DMAc) ou encore le N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) sont employés à la place du DMSO. Morgenstern *et Kammer* ont réussi à greffer quatre acides carboxyliques de structure  $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{COOH}$  avec  $n=9,11,15,17$ ) sur la cellulose dans un milieu homogène en ajoutant LiCl au milieu réactionnel contenant le DMAc comme solvant, en utilisant la pyridine comme base et en chauffant entre 50 et 65°C pendant 24h. Les DS obtenus étaient compris entre 280 et 290%<sup>39</sup> montrant la grande efficacité et le bon contrôle de la réaction d'estérification en milieu homogène. Bien que le mélange DMF/LiCl figure parmi les solvants les mieux étudiés vue sa capacité à dissoudre une grande variété de polysaccharides y compris la cellulose sans provoquer la dégradation, le mécanisme de dissolution du polysaccharide dans ce type de mélange reste inconnu jusqu'à ce jour.

Bien que l'eau soit généralement un milieu peu approprié pour les réactions d'estérification, un certain nombre d'esters de polysaccharides peuvent être obtenus dans ce solvant vert selon des méthodes douces et respectueuses de l'environnement. L'acylation en milieu aqueux des chlorures d'hexanoyle, heptanoyle, octanoyle, nonanoyle et de décanoyle avec ou sans l'ajout de catalyseurs (pyridine, DMAP, triéthylamine (TEA), N,N-diisopropyléthylamine (DIEA)) a été successivement réalisée sur l'amidon aboutissant à des DS compris entre 10 et 29%<sup>26</sup>.

Ces réactions sont des stratégies éprouvées et reproductibles pour l'estérification bien contrôlée des polysaccharides neutres par des molécules hydrophobes. Toutefois, ces réactions de synthèse restent limitées pour le greffage de certains acides carboxyliques aliphatiques et aromatiques. Pour résoudre ce problème, Grote *et Heinze* ont fait appel à l'activation *in situ* de

l'acide carboxylique par un chlorure d'acide sulfonique (chlorure de 4-toluènesulfonyl (TsCl)) pour incorporer des acides gras saturés et insaturés de longueurs de chaîne aliphatique allant de C<sub>14</sub> à C<sub>18</sub> dans des conditions homogènes avec l'emploi du mélange DMAc/LiCl comme solvant<sup>37</sup>. L'activation de la fonction acide peut être aussi effectuée par des agents activateurs comme les carbodiimides. *Nichifor et Carпов* se sont basés sur cette chimie en activant l'acide biliaire avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour le coupler ensuite avec le dextrane via un lien ester<sup>38</sup>. Pour éviter les réactions secondaires pouvant avoir lieu suite à l'utilisation du TsCl ou le DCC comme agent d'activation, le carbonyldiimidazole (CDI) pourra remplacer ces deux agents sans induire aucune réaction secondaire même lorsque le DMSO est utilisé comme solvant<sup>37</sup>.

Une autre possibilité non présentée dans ce mémoire est d'utiliser l'extrémité réductrice du polysaccharide pour y greffer un groupe alkyle ou un oligomère, ou bien entraîner une polymérisation. On obtient alors une structure de type bloc<sup>41</sup>.

Les différentes réactions de modification hydrophobe du polysaccharide étudiées précédemment conduisent à des polysaccharides à caractère amphiphile. Un polysaccharide est dit amphiphile quand il est constitué de parties hydrophobes incorporées sur son squelette hydrophile. Ces polymères associatifs ont la capacité de s'organiser en milieu aqueux suite aux interactions hydrophobes inter et/ou intramoléculaires entre les greffons pouvant former ainsi des microdomaines (agrégats, micelles, clusters...) tout en gardant son hydrosolubilité. Cette auto-organisation confère à ces systèmes des propriétés rhéologiques (viscosifiantes voire gélifiantes), de séquestration d'actifs amphiphiles ou hydrophobes, de contrôle des interfaces exceptionnelles et beaucoup plus importantes que leurs homologues non amphiphiles. Grâce à ces propriétés qui s'ajoutent aux propriétés de biocompatibilité et de biodégradation, l'utilisation des polysaccharides amphiphiles dans des applications cosmétiques<sup>42,43</sup> biomédicales<sup>44</sup> devient très intéressante. Ils sont aussi utilisés en tant qu'agent rhéologique pour l'industrie de papeterie<sup>45</sup> ou la récupération assistée du pétrole<sup>46</sup>.

### **I.2.2. Le pullulane**

Au cours de nos travaux, nous avons choisi le pullulane comme modèle de polysaccharide neutre pour maintes raisons que nous évoquerons à travers la présentation détaillée de ce biopolymère.

### I.2.2.1. Contexte historique

Jusqu'à nos jours, seul un nombre restreint de glucanes fongiques exocellulaires sont signalés dans la littérature. Le pullulane représente un exopolysaccharide très étudié. Il est produit par le champignon polymorphe *Aureobasidium pullulans* (initialement décrit sous le nom de *Dematium pullulans* De Bary<sup>47</sup>). La production du pullulane par *A. pullulans* a été observée pour la première fois par *Bauer* en 1938<sup>48</sup>. Puis en 1958, *Bernier*<sup>49</sup> fut le premier à isoler le pullulane du milieu de culture d'*A. pullulans*. Une étude plus approfondie de ce nouveau polysaccharide a été ensuite menée par *Bender et al.* en 1959 qui lui ont attribué le nom « pullulane »<sup>50</sup>.

Considéré comme produit *GRAS* (Generally Recognized As Safe) aux États-Unis pour une grande variété d'applications, le pullulane a été utilisé au Japon comme ingrédient alimentaire et comme excipient pharmaceutique<sup>51</sup>. On le trouve également comme agent de revêtement de surface ayant des propriétés barrière au dioxygène<sup>52</sup>.

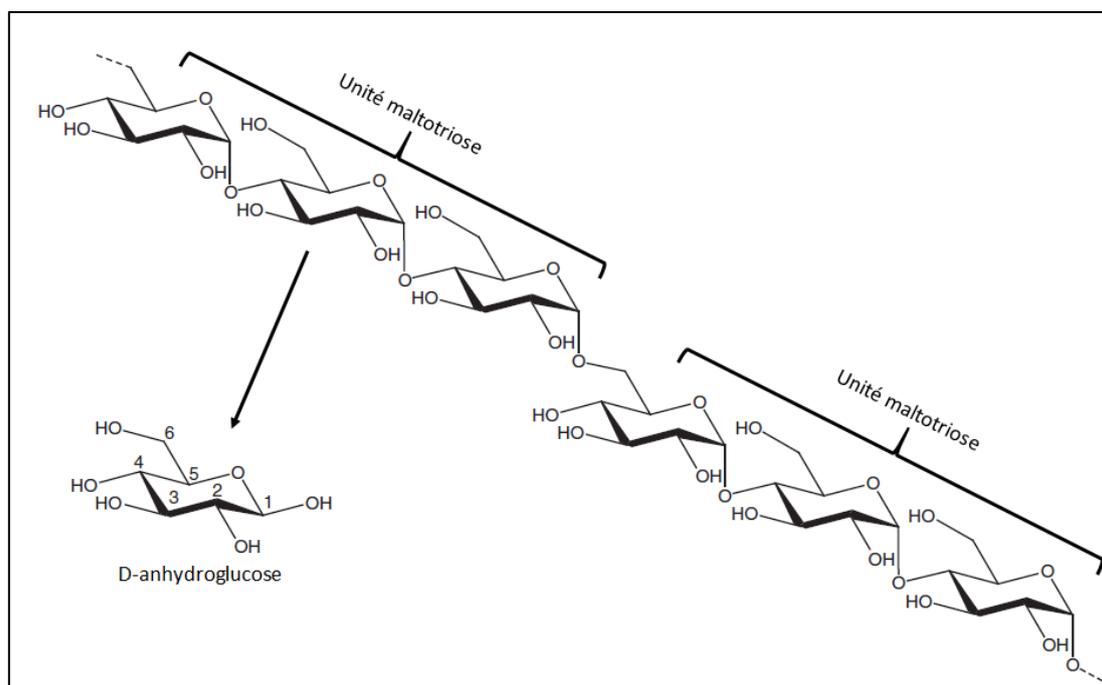
Localisée à Okyama au Japon, Hyashibara Company Limited est le premier producteur mondial du pullulane depuis 1976<sup>53</sup>. Cette société a réussi à contrôler les conditions de croissance de la source fongique permettant ainsi de produire du pullulane avec des masses molaires moyennes en nombre ( $M_n$ ) particulières ( $10 \times 10^4$  ou  $20 \times 10^4$  g/mol) selon 2 grades : PF-10 et PF-20 alimentaire (F pour food) ou PI-10 et PI-20 pharmaceutique (I pour désionisé). Des films de pullulane ont été aussi commercialisés par Hyashibara en 1982. Récemment, Hyashibara Biochemical Labs a signé une convention commerciale avec Pfizer dans le secteur pharmaceutique pour des applications dans le domaine des soins dentaires (bains de bouche) commercialisé au Canada sous le nom de Listerine®.

### I.2.2.2. Structure et propriétés

*Bernier*, le premier à isoler le pullulane des milieux de cultures d'*A. pullulans* en 1958, a montré que le D-glucose est le produit majoritaire obtenu suite à l'hydrolyse acide<sup>49</sup>. En 1959, basés sur sa rotation optique et son spectre infrarouge, *Bender et al.* ont défini ce nouveau polysaccharide comme étant un enchaînement d'unités  $\alpha$ -D-glucose reliées principalement en  $\alpha$ -1,4. L'analyse élémentaire leur a permis d'attribuer la formule brute  $(C_6H_{10}O_5)_n$  pour ce polymère<sup>50</sup>. Au début des années 1960, la structure de base du pullulane a été déterminée par *Wallenfels et al.*<sup>54,55</sup> à l'aide d'autres chercheurs<sup>56</sup>. Ils ont conclu, à l'aide de la spectroscopie infrarouge, de la méthylation et de l'oxydation périodique, que le pullulane est un  $\alpha$ -D-glucose linéaire avec des liens  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 avec des proportions 2 : 1.

Toutefois, il a été également montré que la chaîne linéaire de pullulane peut contenir des sous-unités de maltotétraoses<sup>55</sup> distribuées de manière aléatoire le long du squelette polysaccharidique<sup>52</sup>. *Catley et al.* ont réussi à quantifier ces sous-unités et ont trouvé une valeur maximale de 7 %<sup>57</sup>. Par ailleurs, les travaux de *Fujii et al.* ont prouvé l'existence de liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,3,  $\beta$ -1,3 et même  $\beta$ -1,6 en plus des liens  $\alpha$ -1,4 entre les unités de D-glucopyranose d'un pullulane produit par certaines souches<sup>58</sup>.

La découverte de l'enzyme extracellulaire *Aerobacter aerogenes*, appelée aussi pullulanase, était un outil essentiel pour résoudre la structure du pullulane<sup>59</sup>. La pullulanase, capable d'hydrolyser spécifiquement les liens glycosidiques  $\alpha$ -1,6, conduit à des unités maltotriose, décrivant ainsi le pullulane comme étant un polysaccharide composé d'unités maltotrioses liées en  $\alpha$ -1,6 (Figure A-2). Une unité maltotriose est composée de trois unités D-anhydroglucose (AGU) liées en  $\alpha$ -1,4. Cette structure a été confirmée par l'analyse RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C<sup>60,61</sup>. Ces résultats ont été appuyés par la spectroscopie Raman montrant l'apparition des bandes à 543 et 480 cm<sup>-1</sup> qui correspondent respectivement à la présence des liens glycosidiques  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 dans le biopolymère<sup>62</sup>.



**Figure A-2** : Structure chimique du pullulane

Pour plus de détails, plusieurs revues intéressantes sur l'étude structurale du pullulane ont été effectuées jusqu'à présent parmi lesquelles on peut citer celle de *Shingel*<sup>63</sup>, *Leathers*<sup>64</sup> et *Singh et al.*<sup>65</sup>.

Vue la coexistence des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6 dans sa structure, le pullulane peut être considéré comme un polysaccharide intermédiaire entre l'amylose et le dextrane<sup>66</sup>. C'est un polysaccharide neutre et très flexible. Cette flexibilité est le résultat des liens glycosidiques  $\alpha$ -1,6 : la liaison C<sub>1</sub>-O-CH<sub>2</sub> (C<sub>6</sub>) (liaison  $\alpha$ -1,6) est beaucoup plus flexible que celle de C<sub>1</sub>-O-C<sub>4</sub> des unités glucopyranoses. Par conséquent, le squelette du pullulane est plus flexible que celui de l'amylose, il adopte une conformation de pelote aléatoire en solution aqueuse<sup>67</sup>. Sa masse molaire varie considérablement selon la source de production et les paramètres de culture<sup>68</sup>. Il possède un pouvoir rotatoire de 192° dans une solution de 0,1 g/L<sup>63</sup>. Le pullulane anhydre a la forme d'une poudre blanche sans goût et sans odeur. Il est très soluble dans l'eau (à chaud ou à froid) et stable sous forme aqueuse sur une large plage de pH. Les solutions aqueuses de pullulane présentent des viscosités plutôt faibles comparées aux autres polysaccharides en raison notamment de sa grande flexibilité<sup>69</sup>. À l'état de poudre, le pullulane se dégrade à partir d'une température comprise entre 250 et 280 °C<sup>70</sup>. Il est par contre insoluble dans les solvants organiques à l'exception du DMSO, DMF et DMAc<sup>71</sup>. Le pullulane possède des caractéristiques uniques ; il est non-toxique, non-cancérogène, non-mutagène et non immunogène<sup>72</sup>. En raison de ces propriétés et de son caractère biocompatible<sup>51</sup> et biodégradable<sup>73</sup>, ce polysaccharide est utilisé dans diverses applications en particulier dans le domaine biomédical<sup>74</sup>. La présence de nombreuses fonctions alcool le long de la chaîne du pullulane permet la réalisation de diverses réactions et modifications chimiques.

### I.2.2.3. Les dérivés du pullulane

Le pullulane peut être facilement modifié chimiquement afin d'améliorer ses propriétés. Ces modifications peuvent être des fonctionnalisations structurales en lui apportant des fonctions chimiques plus réactives que celles déjà présentes sur son squelette ou par greffage direct des groupements spécifiques (généralement hydrophobes). Le pullulane contient 9 fonctions hydroxyles par unité de répétition (maltotriose) qui se distinguent par leurs localisations sur l'unité AGU : OH-2, OH-3, OH-4 et OH-6 avec des proportions respectives de 3, 3, 1 et 2. Leurs réactivités sont différentes et dépendent de la polarité du solvant et des réactifs. Diverses réactions chimiques peuvent être réalisées sur le pullulane pour remplacer les groupes hydroxyle par d'autres groupes chimiques désirés<sup>63</sup>. Parmi ces réactions (Tableau A-3), on trouve l'éthérification, l'oxydation, l'estérification, la copolymérisation, la sulfatation, l'amidification notamment.

Tableau A-3 : Structures chimiques des principaux dérivés du pullulane

Type de réaction	Structure chimique du dérivé obtenu	Réf.
Oxydation	P-COOH (oxydation d'OH-6)	75
	Ouverture du cycle glycosidique (oxydation périodique)	76
Estérification	P-O-CO-CH <sub>3</sub> (acétylation)	77
	P-O-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -14-CH <sub>3</sub> (alkylation) <sup>c</sup>	78
	P-O-CO-CH <sub>2</sub> -Cl (chloroacétylation)	79
	P-O-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH (succinylation)	80
	PA-O-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-sulfadiméthoxine <sup>a</sup>	81
	P-O-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-cholestérol <sup>b</sup>	82
	P-abiétate	83
	P-stéarate	84
	PA-folate <sup>a</sup>	85
	P-cinnamate	86
	P-biotine	87
	P-O-SO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	88
Éthérisation	P-O-CH <sub>3</sub> (perméthylation)	89
	P-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ou 3-CH <sub>3</sub> (alkylation)	90
	P-O-CH <sub>2</sub> -COOH (carboxyméthylation)	91
	P-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ou 3-CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (cationisation)	92
	P-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CN (cyanoéthylation)	93
	P-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>1→4</sub> -Cl (chloroalkylation)	79
	P-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -(S=O)-CH <sub>3</sub> (sulfinyléthylation)	94
	P-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub> Na	95
	P-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	96
	P-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	96
Dérivés uréthane	P-O-CO-NH-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>3</sub> P-O-CO-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	97
	P-O-CO-NH-R (R = phényle ou hékyle)	98
	P-O-CO-NH-phenyl	99
Dérivé uréthane /amidification	P-O-CO-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -NH-CO-cholesterol	100
Chlorination	P-CH <sub>2</sub> -Cl (substitution nucléophile d'OH-6)	101
Sulfatation	P-O-SO <sub>3</sub> Na	102

Azido-pullulane	P-CH <sub>2</sub> -N <sub>2</sub>	101
CMP / hydrazone <sup>c</sup>	P-O-CH <sub>2</sub> -CO-NH-doxorubicin	103
	P-O-CH <sub>2</sub> -CO-NH-anticorps	104
CMP / amidification <sup>c</sup>	P-O-CH <sub>2</sub> -CO-NH-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -CH <sub>3</sub>	105
	P-O-CH <sub>2</sub> -CO-aminogaiacol	4

<sup>a</sup> Les modifications ont été réalisées sur OH libres de l'acétate de pullulane (PA)

<sup>b</sup> Les modifications ont été réalisées sur les OH libres du succinate de pullulane

<sup>c</sup> Les modifications ont été réalisées sur les COOH du carboxyméthylpullulane (CMP)

Pour les réactions de carbonylation, d'oxydation ou de succinylation, *Bruneel et Schacht* ont prouvé que la fonction OH-6 (alcool primaire) est la plus réactive et ces modifications se déroulent majoritairement sur la position 6<sup>76,80,97</sup>. Tandis que pour les réactions de carboxyméthylation, la fonction OH-2 est la plus réactive vue qu'elle est la plus proche de l'oxygène de l'unité AGU ce qui rend le proton de la fonction OH-2 plus labile suite à l'effet inductif donneur (+I) de l'oxygène. Toutes ces modifications sont réalisées dans le but d'améliorer les propriétés du pullulane et chaque dérivé obtenu possède des propriétés physico-chimiques spécifiques.

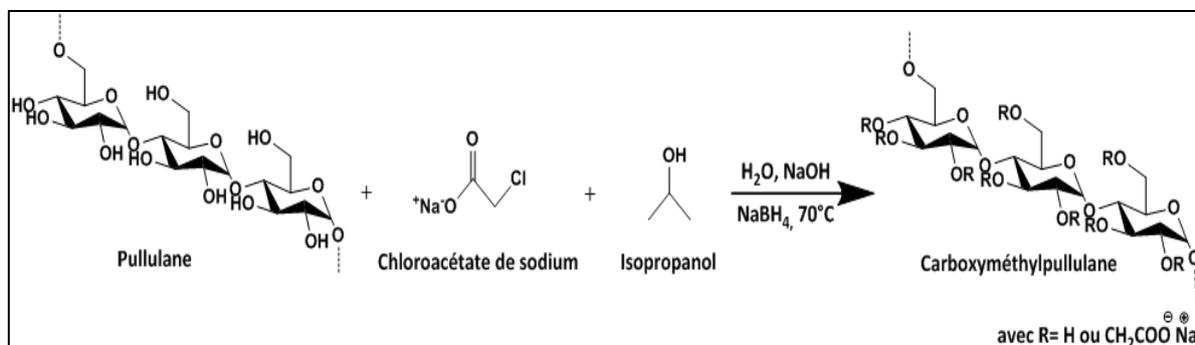
Un nombre très vaste de dérivés du pullulane existe dans la littérature. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement au dérivé carboxyméthylpullulane (CMP) qui nous permettra de décliner notre approche sur un polysaccharide anionique modèle. Nous présenterons également les principales modifications conduisant aux dérivés amphiphiles du CMP.

### 1.2.2.3.1. Le carboxyméthylpullulane (CMP)

Durant nos travaux, nous avons choisi de prendre le CMP comme polysaccharide anionique modèle puisqu'il est obtenu à partir du pullulane, notre polysaccharide neutre modèle. Ainsi, nous allons pouvoir comparer l'influence de la présence de charges sur les comportements de nos produits greffés. D'autre part, notre laboratoire possède une grande expertise dans la synthèse du CMP ainsi que dans les différentes modifications chimiques possibles de ce dernier<sup>5,105,106</sup>.

La carboxyméthylation est de loin la réaction de fonctionnalisation structurale la plus effectuée sur les polysaccharides neutres pour apporter plus de réactivité au squelette du polysaccharide et/ou pour favoriser leur hydrosolubilité. La réaction s'opère généralement en milieu eau/isopropanol alcalin. Les fonctions hydroxyle sont activées et transformées en

alcoolate par l'action d'une base permettant leurs substitutions nucléophiles par l'acide monochloroacétique avec un départ de HCl (-OH est remplacé par -OCH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) (Figure A-3).



**Figure A-3 :** Réaction de synthèse du Carboxyméthylpullulane

En général, lorsque cette réaction est réalisée en une seule étape, on peut obtenir un DS maximal de 100%. Pour obtenir des DS plus élevés, la procédure doit être effectuée en plusieurs fois. *Glinel et al.*<sup>107</sup> ont réussi à obtenir des CMP avec des DS entre 60 et 120%. Une hydrolyse acide des CMP obtenus a été ensuite réalisée pour déterminer le DS et la distribution des groupements carboxyméthyle aux positions OH-2, OH-3, OH-4 et OH-6 de l'anhydroglucose par RMN <sup>1</sup>H. Les résultats obtenus ont révélé que la substitution d'OH-2 est prédominante et diminue selon l'ordre OH-2 > OH-3 > OH-6 > OH-4. En tenant compte des proportions des fonctions hydroxyle dans l'unité maltotriose du pullulane, l'ordre de réactivité des fonctions OH vis-à-vis la réaction de carboxyméthylation devient OH-2 > OH-4 > OH-6 > OH-3.

#### **1.2.2.3.2. Principales modifications chimiques hydrophobes du CMP**

Au sein de notre laboratoire, plusieurs études ont été menées afin de comprendre le comportement amphiphile des solutions aqueuses des CMP modifiés avec des groupements hydrophobes<sup>4,6,7,78,96,105</sup>. Les propriétés épaississantes du pullulane peuvent être améliorées par le greffage des chaînes alkyle sur le CMP. Pour ceci, des faibles quantités d'hexadécylamine (C<sub>16</sub>-NH<sub>2</sub>) ont été greffées sur le CMP via une réaction d'amidification en utilisant le DCC (activateur classique de type carbodiimide) dans un mélange de solvant DMSO/Chloroforme (CHCl<sub>3</sub>). Différents DS ont été obtenus allant de 1,3 jusqu'à 6,8%. En régime dilué, une compaction de la pelote statistique et une apparition d'agrégats suite aux interactions hydrophobes intra et intermoléculaires entre les motifs d'hexadécylamine des dérivés obtenus ont été observées. En raison du caractère polyelectrolyte des dérivés, l'addition de NaCl induit un écrantage des répulsions électrostatiques favorisant l'associations des groupes hydrophobes et conduisant à une diminution de la viscosité suite à la formation d'agrégats collapsés<sup>105</sup>. Les

propriétés de séquestration de principes actifs (plutôt hydrophobes) de tels dérivés ont également été examinées pour une application dans le domaine pharmaceutique. Pour ceci, le CMP a été greffé avec différentes quantités de chaînes alkyle de longueur différente allant de C8 jusqu'à C16. Les systèmes obtenus ont démontré une grande capacité à séquestrer des molécules hydrophobes au sein des micro-domaines hydrophobes associés même avec un faible DS de chaînes alkyle. À titre d'exemple, le CMP amphiphile modifié avec un C8 a été testé in vitro avec le docétaxel montrant une bonne solubilisation de ce dernier<sup>78</sup>. Les résultats ont montré que l'efficacité du docétaxel sur les cellules tumorales est équivalente pour le système CMP-C8-docétaxel que pour le système commercial contenant l'actif en solution eau/alcool/Tween80<sup>®</sup>. Autre résultat important, la cytotoxicité du système CMP-C8-docétaxel sur des cellules saines s'est révélée moins importante qu'avec le système commercial<sup>108</sup>.

D'autres études ont été aussi réalisées par *Glinel et al.*<sup>6</sup> à partir d'une réaction de couplage entre le CMP et deux perfluoroalkylamines ( $C_7F_{15}CH_2NH_2$  et  $C_8F_{17}CH_2CH_2NH_2$ ) via une réaction d'amidification dans le DMSO en utilisant le DCC comme agent de couplage avec le catalyseur DMAP. Ils ont obtenu des DS de 4,5 et 4,8% de perfluoroalkylamine /AGU avec une efficacité de réaction de 56 et 60% respectivement. Concernant le comportement des dérivés obtenus en solution aqueuse en régime dilué, ils ont montré que les associations hydrophobes augmentent avec la longueur du greffon hydrophobe formant des agrégats intermoléculaires avec une conformation plus compacte que celle du précurseur. Quant aux propriétés de ces dérivés, comme mentionné par *Shingel*<sup>63</sup>, ce type de polysaccharides modifiés a la capacité de transporter le dioxygène comme les polymères perfluorés et peuvent ainsi substituer le plasma sanguin vue leur biocompatibilité.

Récemment, *Kouassi et al.* ont réussi à incorporer une molécule hydrophobe de type phénolique l'aminogaiacol ( $NH_2Ga$ ) sur le squelette du CMP avec des taux compris entre 16 et 58% en changeant les rapports de départ entre l'aminogaiacol et le motif AGU du CMP précurseur<sup>4</sup>. Ils se sont basés sur une réaction d'amidification en solution aqueuse à pH=4.5 en employant le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) comme agent activateur à température ambiante pendant 24h. Les propriétés physico-chimiques des dérivés obtenus (CMP-Ga) ont été étudiées en régime dilué et semi-dilué par chromatographie d'exclusion stérique couplée diffusion de la lumière et viscosimétrie (SEC/MALLS/Visco), spectroscopie de fluorescence et rhéologie montrant des propriétés associatives attribuées aux interactions hydrophobes intra et intermoléculaires entre les motifs greffés de  $NH_2Ga$ . Un comportement de type polysavon a été obtenu pour le dérivé le plus greffé. Leurs propriétés antibactériennes face

à la bactérie *Staphylococcus aureus* et leurs propriétés antioxydantes face au radical DPPH ont été mis en évidence. Ils se sont avérés être également biocompatibles vis-à-vis des cellules fibroblastes L929.

Dans le cas du CMP, de tels comportements associatifs ont été aussi observés dans d'autres études parmi lesquelles on peut citer celles de Dulong et al.<sup>5,8</sup>, Legros et al.<sup>7,109</sup> et Guyomard et al.<sup>110</sup>.

### **I.2.2.3.3 Principales modifications chimiques hydrophobes du pullulane**

Le pullulane est connu comme étant un excellent vecteur des molécules thérapeutiques permettant de les transporter directement vers différents organes du corps humain comme le cerveau, le foie, les poumons,...<sup>72</sup> et de cibler la diffusion des molécules cytotoxiques spécifiquement dans le site infecté<sup>111</sup>. Bien que le pullulane ait de nombreuses applications potentielles, ses modifications chimiques hydrophobes peuvent accroître ses applications en lui accordant de nouvelles propriétés physico-chimiques et de nouvelles activités biologiques.

Contrairement au CMP, le pullulane natif est beaucoup moins modifié par des groupements hydrophobes que son dérivé le CMP. Ceci est due à la réactivité réduite de ses fonctions hydroxyle qui rend les réactions de modification beaucoup plus compliquées et d'autre part à son caractère neutre qui rend les dérivés obtenus insolubles dans l'eau même à des taux d'incorporation très faibles. De ce fait, peu de travaux ont été conduits sur ce thème. Les travaux les plus intéressants restent ceux de *Akiyoshi et al.* qui ont réussi à synthétiser des dérivés amphiphiles du pullulane (CHP) issus de la création de liaisons uréthanes entre les fonctions hydroxyle du polysaccharide et les dérivés isocyanate du cholestérol (le Cholestéryl de N-(6-isocyanatohéxyl)carbamate)<sup>100</sup>. Le cholestérol a été tout d'abord modifié par le 1,6-hexyl diisocyanate jouant le rôle d'un bras espaceur permettant ensuite le déroulement de la réaction de greffage sur le pullulane. Cette modification a été réalisée dans le DMSO anhydre en présence de la pyridine à 80°C pendant 8h. Il est à noter que toute trace d'humidité peut favoriser des réactions secondaires conduisant à la formation d'urée. Des DS de 1,6% et 5,4% de cholestérol/AGU ont été déterminés par l'analyse élémentaire et la RMN-<sup>1</sup>H. Les CHP hydrosolubles obtenus possèdent un caractère amphiphile. Un comportement d'auto-association des CHP dans l'eau a été également observé formant des nano-agrégats stables et monodisperses. Ces CHP sont capables de s'associer avec diverses molécules hydrophobes comme la porphyrine, la bilirubine et l'adriamycine<sup>112</sup>.

Dans notre laboratoire, des essais de greffage d'un acide perfluoré ( $C_8F_{17}CH_2CH_2COOH$ ) sur le pullulane ont été menés par *Glinel et al.*<sup>6</sup> avec des DS de 1 à 5% et avec une efficacité de réaction de 20 à 34%. Il est à noter que le dérivé modifié à 5% était insoluble dans l'eau. La stratégie de synthèse était de coupler directement les fonctions acide de la molécule hydrophobe avec les fonctions hydroxyles du polysaccharide via une réaction d'estérification dans des conditions super-anhydres en chauffant à 40°C pendant 24h en utilisant le DMSO comme solvant, le DCC comme agent activateur des fonctions acide et le DMAP comme catalyseur<sup>6</sup>. Le comportement et les propriétés des dérivés obtenus étaient similaires de ceux des CMP modifiés avec l'amine perfluorée ( $C_8F_{17}CH_2CH_2NH_2$ ) cités précédemment (voir A-I.2.2.3.1). Par contre, on note une efficacité plus élevée de la réaction d'amidification par rapport à celle d'estérification (facteur de 3). Afin d'expliquer cette différence, il faut tenir compte de deux paramètres. Le premier au niveau de la réactivité des fonctions chimiques où la fonction amine est plus réactive que la fonction acide qui est à son tour plus réactive que la fonction alcool ce qui donne cet ordre croissant de réactivité amine > acide > alcool. Le deuxième au niveau de la différence des caractéristiques entre le pullulane et le CMP où l'apport de charges sur le squelette polysaccharidique du CMP par les fonctions carboxylate minimise la flexibilité de ce dernier par rapport au pullulane ce qui facilite l'accessibilité aux fonctions réactives du polysaccharide.

On finira par traiter l'exemple de l'hydrophobisation du pullulane par l'acide poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) réalisée par *Jeong et al.*<sup>113</sup>. Les deux polymères ont été solubilisés dans le DMSO et la réaction d'estérification s'effectue en présence du couple activateur DCC/DMAP sous  $N_2$  pendant 24h. Les dérivés obtenus, avec des DS de 2 à 6,5%, étaient amphiphiles avec un comportement d'auto-association formant des nano-agrégats dont la taille varie entre 75 et 150 nm. Les chercheurs ont évalué l'influence du DS sur la concentration critique d'agrégation (CAC) par fluorescence et ont prouvé que la CAC diminue avec le DS. Ces systèmes ont par la suite été testés dans la libération contrôlée de principe actif (Adriamycine) incorporé dans les nano-domaines hydrophobes formés par les greffons de PLGA. Contrôlée par la biodégradation du PLGA, la libération du principe actif a été retardée par l'augmentation de la masse molaire et le DS du PLGA.

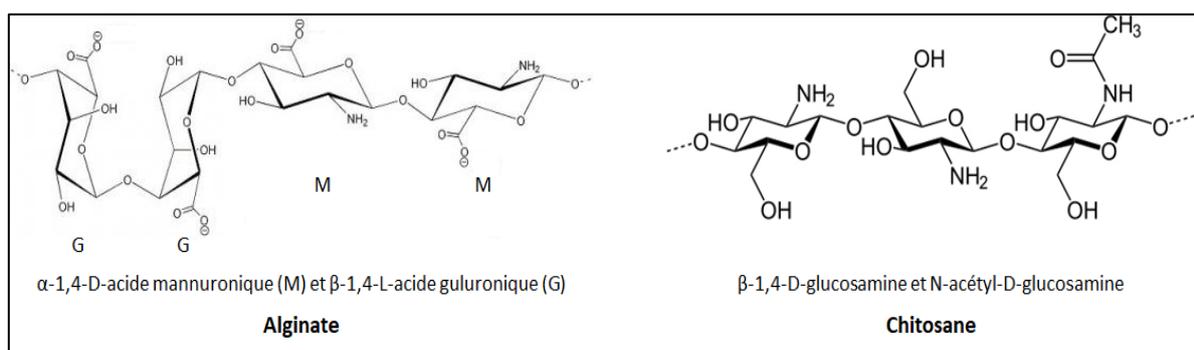
### I.2.2.4. Perspectives futures

Le pullulane natif et ses dérivés amphiphiles possèdent de nombreuses applications biomédicales et pharmaceutiques en raison de leurs propriétés structurales intéressantes. Néanmoins, la majorité de ces systèmes ont été explorés uniquement par des études *in vitro*. Les futures recherches scientifiques devraient ainsi se focaliser principalement sur l'étude de l'efficacité *in vivo* du pullulane et de ses dérivés.

## I.3. Les polysaccharides chargés

### I.3.1. Quelques exemples et leurs principales modifications chimiques

Les polysaccharides chargés peuvent être anioniques et plus rarement cationiques sachant que ces derniers n'existent pas dans la nature mais ils sont obtenus suite à des modifications structurales de polysaccharides neutres voire anioniques. Provenant respectivement des algues brunes et de tissus animaux (ou de la production bactérienne), l'alginate et l'acide hyaluronique sont des polysaccharides particulièrement étudiés. Quant au polysaccharide cationique, le plus utilisé est probablement le chitosane obtenu par désacétylation de la chitine extraite des crustacés ou des céphalopodes. La Figure A-4 montre la structure chimique de l'alginate et du chitosane. L'acide hyaluronique, choisi dans notre étude comme un polysaccharide d'intérêt, sera détaillé dans la partie suivante (A-II.2.3.2).



**Figure A-4 :** Structures chimiques de l'alginate et du chitosane

Contrairement à certains polysaccharides neutres, les polysaccharides polyélectrolytes sont généralement bien solubles dans les milieux aqueux grâce à la présence des charges le long du squelette. En plus des fonctions alcool, ils contiennent aussi des groupements chimiques avec une réactivité notable telle que les amines (chitosane), les acides carboxyliques (alginate, acide hyaluronique), les amides (acide hyaluronique). De ce fait, leur fonctionnalisation structurale, dans le but d'améliorer leur solubilité ou d'apporter des fonctions plus réactives,

semble être peu nécessaire mais toutefois quelques-unes existent dans la littérature dont les plus citées sont l'oxydation<sup>114</sup>, la sulfatation<sup>115</sup> et l'acétylation<sup>116</sup>.

Les chercheurs se sont rapidement orientés vers la modification hydrophobe de ces biopolymères chargés afin de leur conférer un caractère amphiphile voire hydrophobe<sup>117</sup>. Les principales stratégies de synthèse développées dans la littérature permettant l'accessibilité à ce type de greffage sur l'alginate et le chitosane sont l'estérification<sup>118,119</sup> et l'amidification<sup>120-125</sup>.

Etant donné que la réaction d'estérification a déjà été détaillée dans le cas des polysaccharides neutres (A-II.2.1), nous nous focaliserons sur la modification hydrophobe par amidification. Reprenant globalement les stratégies développées pour le CMP précédemment, l'alginate a été hydrophobiquement fonctionnalisé par l'octylamine dans un milieu aqueux homogène en utilisant l'EDC comme agent de couplage<sup>122</sup>. La réaction s'est déroulée à 35°C pendant 24h en acidifiant le milieu jusqu'à obtenir un pH= 3,4. Les dérivés amphiphiles obtenus (DS de 23%) étaient auto-agrégatifs en solution aqueuse à partir d'une concentration de 0,34 g/L. En milieu organique, et plus précisément dans le DMF, l'alginate a été modifié par la dodécylamine avec un DS de 20%<sup>120</sup>. Un échange du contre ion de l'alginate (Na<sup>+</sup> par TBA<sup>+</sup>) était nécessaire pour le solubiliser dans le DMF. La réaction d'amidification a été assurée par l'ajout de l'agent activateur iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium (CMPI) avec la triéthylamine au milieu réactionnel à 0°C pendant 45 min. La réaction a été maintenue sous agitation à température ambiante pendant 20h.

Dans le cas où la molécule hydrophobe est insoluble dans l'eau, un mélange de solvant eau/alcool est utilisé permettant la réalisation de la réaction d'amidification. C'est l'exemple de la modification du chitosane par l'acide férulique réalisée par *Woranuch et al*<sup>123</sup>. Le chitosane a été solubilisé dans une solution aqueuse d'acide acétique (1% v/v) auquel a été ajouté l'acide férulique solubilisé dans l'EtOH activé préalablement par l'EDC. L'étude de l'influence de la température et du temps de la réaction sur le degré de substitution a montré que le DS le plus élevé (37%) est obtenu quand la réaction s'effectue à une température de 60°C pendant 3h. Les dérivés obtenus étaient plus solubles dans l'eau que le chitosane natif et les chercheurs ont attribué cette amélioration d'hydrosolubilité à la diminution de la cristallinité du polysaccharide induite par les greffons du composé aromatique. Le même agent activateur a été aussi utilisé dans un milieu mixte eau/méthanol pour greffer des acides gras (acide linoléique, oléique et stérique) sur le chitosane<sup>121,124,125</sup>.

D'autres agents activateurs couplés ou non à des catalyseurs peuvent être également utilisés dans la modification hydrophobe des polysaccharides chargés par la réaction d'amidification. Parmi ces agents, on peut citer le DCC, le CDI couplé à l'acide méthanesulfonique, le N-méthylmorpholine (NMM) couplé à l'isobutylchloroformate (EtOCOCl), la triéthylamine (TEA) couplée à l'acide p-toluènesulfonique (PTSA), etc.

Les polysaccharides chargés greffés de molécules hydrophobes par amidification peuvent atteindre un taux de modification hydrophobe assez élevé comparés à leurs homologues neutres, et les produits obtenus possèdent des comportements amphiphiles et rhéologiques remarquables et sensibles à la force ionique et au pH. Le lien amide présente une meilleure résistance à l'hydrolyse que le lien ester. Toutefois, ces réactions nécessitent de multiples étapes et des mesures de purification supplémentaires qui peuvent être dégradantes.

### **I.3.2. L'Acide Hyaluronique**

Depuis sa découverte, l'acide hyaluronique (HA) a suscité un grand intérêt et les études scientifiques concernant ce biopolymère sont en continuelle progression. À ce jour, une recherche dans les bases de données publiques les plus courantes (PubMed, ScienceDirect, ResearchGate, Google Scholar, Scopus, Questel, Bibliothèque en ligne de Wiley, etc) du mot « Hyaluronan » donne un total de 150 000 publications et 20 000 brevets.

Métabolisé par le corps humain notamment et donc parfaitement biocompatible, l'acide hyaluronique est probablement le polysaccharide le plus adapté à des applications dans le domaine médical, biomédical ou cosmétique. De ce fait, nous avons choisi le HA comme polysaccharide d'intérêt pour notre étude et donc une revue détaillée de ce polysaccharide et de ses fonctionnalisations possibles est nécessaire.

#### **I.3.2.1. Etat de l'art**

La découverte de l'acide hyaluronique remonte à plus de 80 ans. C'est en 1934 que *Meyer & Palmer*, travaillant dans le département d'Ophthalmologie de l'Université de Columbia, ont publié pour la première fois un article dans la revue « Journal of Biological Chemistry » au sujet d'un nouveau polysaccharide avec une masse molaire extrêmement élevée isolé de l'humeur vitré des yeux de bovin<sup>126</sup>. Ils lui ont attribué le nom « acide hyaluronique » (du grec hyalos = vitreux et uronique pour l'acide uronique). Bien que *Meyer & Palmer* soient généralement considérés comme les premiers découvreurs du HA, il est à préciser qu'en 1880, *Portes* a observé que la mucine du corps vitré était différente des cellules mucoïdes de la cornée et du cartilage et l'a appelée « hyalomucine »<sup>127</sup>. En 1918, *Levene & Lopez-Suarez* ont isolé un

nouveau polysaccharide du corps vitré et du sang du cordon constitué de glucosamine, d'acide glucuronique et d'une petite quantité d'ions sulfatés<sup>128</sup>. Ils l'ont nommé « acide mucoïtine-sulfurique » mais au regard de cette composition, il s'agissait probablement d'acide hyaluronique extrait avec un mélange de glycosaminoglycanes sulfatés.

Les propriétés particulières de ce biopolymère ont été décrites par *Meyer & Palmer*<sup>126</sup> montrant que ce dernier est différent d'autres glycosaminoglycanes similaires. Les auteurs indiquent alors la présence d'acide uronique, de pentose et de sucres aminés, la masse molaire de l'unité de répétition était de l'ordre de 450 g/mol<sup>126</sup>. Ces données ont été ensuite corrigées prouvant que le HA ne contient pas d'unités de pentose ou de groupes sulfatés, la masse molaire de l'unité répétitive devient alors 397 g/mol.

Ensuite, au cours des années 1930 à 1950, le HA a été isolé notamment du cordon ombilical, de la crête de coq et des streptocoques<sup>129,130</sup>. L'extraction de l'acide hyaluronique des capsules des streptocoques A et C par *Kendall et al.*<sup>129</sup> en 1937 avait une grande importance scientifique et pratique, car aujourd'hui les streptocoques sont la source la plus économique et fiable pour la production industrielle du HA.

L'acide hyaluronique a été commercialisé pour la première fois en 1942 quand *Balazs* a déposé un brevet permettant l'utilisation de ce biopolymère à la place du blanc d'œuf dans les produits de boulangerie. Les premiers modes d'obtention par extraction sont abandonnés et de nos jours, la fermentation bactérienne constitue la principale source de HA.

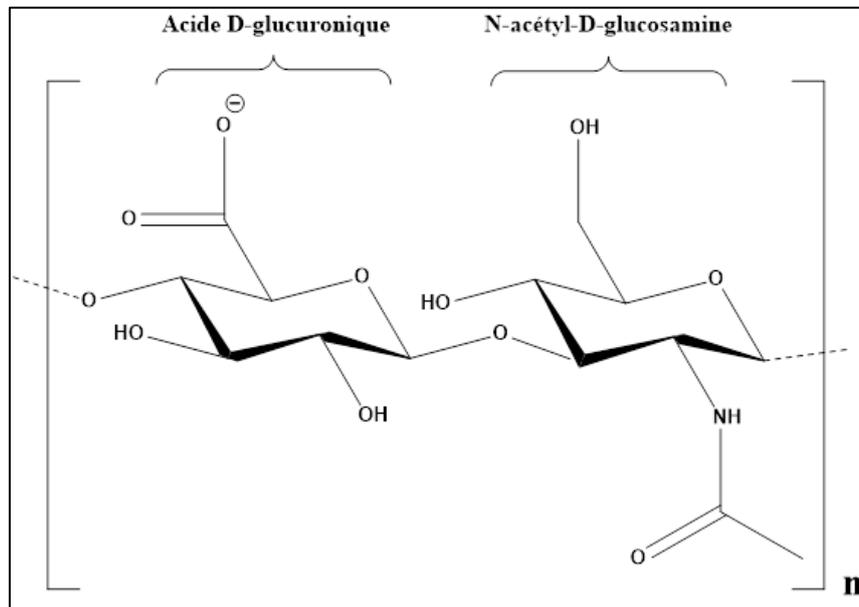
La première application de ce biopolymère dans le domaine biomédical intervient à la fin des années 1950 où il a été incorporé dans le corps humain comme un substitut vitré lors d'une chirurgie oculaire. A partir de 1988, il appartient au groupe des dispositifs médicaux et doit obéir à certaines normes définies dans le code de santé publique (Livre V bis, Art. L 665-3 à L665-9) et répondre à des directives européennes.

### **I.2.3.2. Structure et propriétés**

La découverte de la hyaluronidase, enzyme capable d'hydrolyser spécifiquement l'acide hyaluronique, a ouvert les portes à la détermination de la structure chimique de ce polysaccharide. Dans la courte période entre 1948 et 1951, de nombreux chimistes ont initié des recherches pour définir la structure du HA. En 1948, *Dorfmann* a publié les premiers résultats de la cinétique de l'hydrolyse combinée à la fermentation de ce polysaccharide<sup>131</sup>. Trois ans plus tard, *Ogston & Stanier* ont publié les premières données significatives trouvées sur la structure de cette macromolécule en solution aqueuse<sup>132</sup>. En revanche, ces études n'étaient pas

suffisantes pour définir la structure chimique du HA. Ce problème a été ensuite résolu par les travaux de *Weissmann & Meyer*<sup>133</sup>.

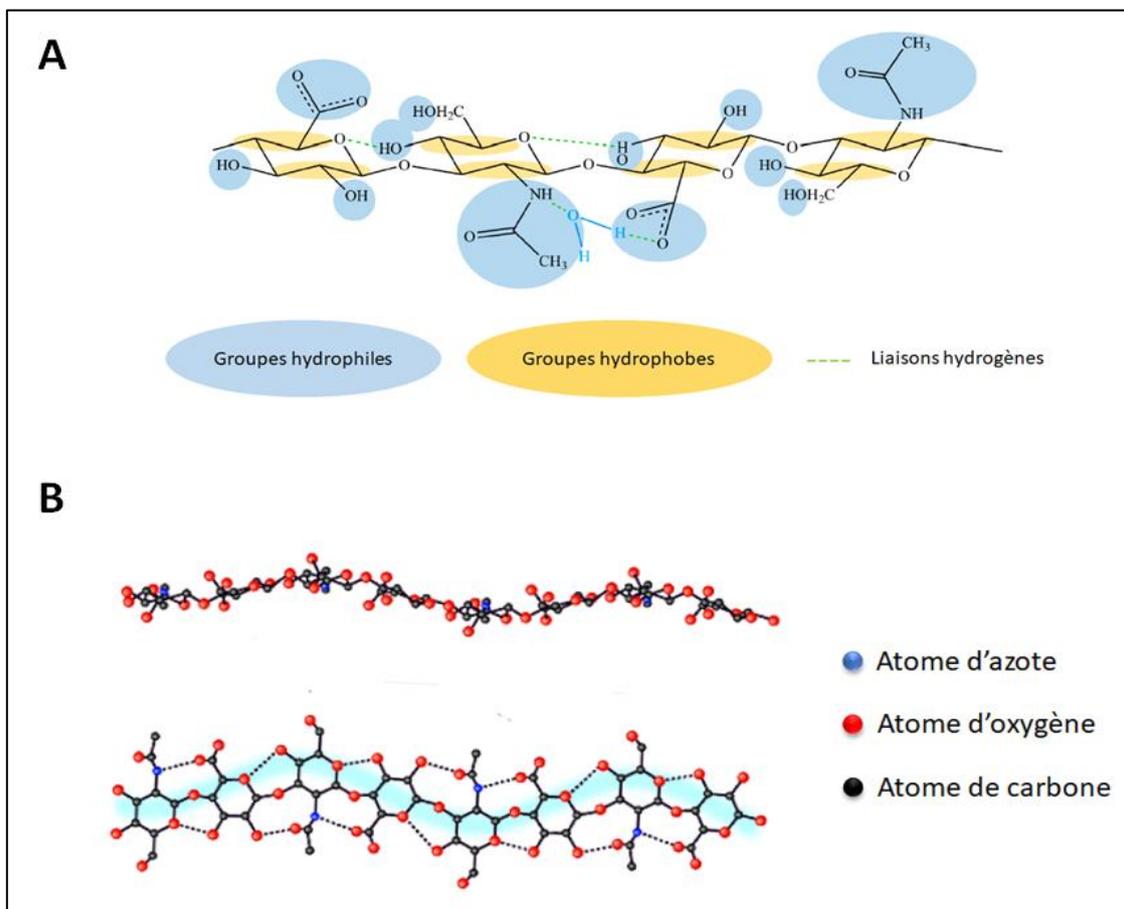
L'acide hyaluronique est un polysaccharide linéaire composé d'unités disaccharidiques reliées par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -1,4. Chaque disaccharide est constitué d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine lié en  $\beta$ -1,3 (Figure A-5)<sup>133</sup>. La configuration  $\beta$  confère aux groupements chimiques volumineux (hydroxyle, carboxyle, acétamide, carbone anomère) la position équatoriale énergétiquement plus favorable tandis que les atomes d'hydrogène qui ont une petite taille occupent la position axiale qui est énergétiquement moins favorable. Cette disposition spatiale accorde à cette configuration, par conséquent au polysaccharide, une structure énergétiquement très stable<sup>134</sup>. Ainsi, la rotation libre des chaînes polysaccharidiques autour des liaisons glycosidiques est limitée, entraînant une conformation rigide où des fractions hydrophobes (groupes CH) sont alternées avec des groupes polaires<sup>135</sup> connectés par des liaisons hydrogènes intermoléculaires<sup>136</sup> (Figure A-6-A). Le degré de polymérisation ( $DP_n$ ) peut atteindre une valeur de  $10^4$  et la masse molaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) de HA peut atteindre  $4 \times 10^6$  g/mol. La longueur moyenne de l'unité de répétition du HA est de l'ordre de 1nm, la longueur de persistance ( $q$ ) est de l'ordre de 4nm, enfin la longueur quadratique moyenne serait de 10  $\mu$ m pour un HA de  $DP_n$  égal à  $10^4$ <sup>137</sup>.



**Figure A-5** : Structure chimique de l'acide hyaluronique

Au pH physiologique, chaque fonction carboxylique du HA ( $pK_a \approx 3 - 4$ ) est sous forme carboxylate induisant la génération de charges anioniques le long des chaînes du polysaccharide accompagnées de contre-ions cationiques mobiles monovalents ou divalents comme  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ . Par conséquent, en solution aqueuse, le HA est chargé

négativement et forme des sels de HA très hydrosolubles généralement appelés hyaluronane ou hyaluronate<sup>138,139</sup>. Plus précisément, les molécules d'eau relient les fonctions carboxylate et acétamide par des liaisons hydrogène qui stabilisent la structure secondaire du biopolymère, décrite comme une hélice gauche à un seul brin<sup>140</sup> (Figure A-6-B). Dans l'eau, les hélices à deux plis du HA forment des hélices doubles c'est-à-dire une structure tertiaire en feuillet bêta due aux interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène intermoléculaires provoquant l'agrégation des chaînes de polysaccharides en formant un réseau de mailles plus étendu<sup>135</sup>. La mise en place de ce réseau dépend de la masse molaire et de la concentration du biopolymère. Par exemple, le HA à forte masse molaire ( $>10^6$  g/mol) forme un réseau étendu même à une très faible concentration de 0,1 g/L<sup>141</sup>. L'augmentation de la masse molaire et de la concentration implique le renforcement du réseau d'où l'augmentation progressive de la viscosité et de la viscoélasticité des solutions aqueuses de HA<sup>142</sup>.

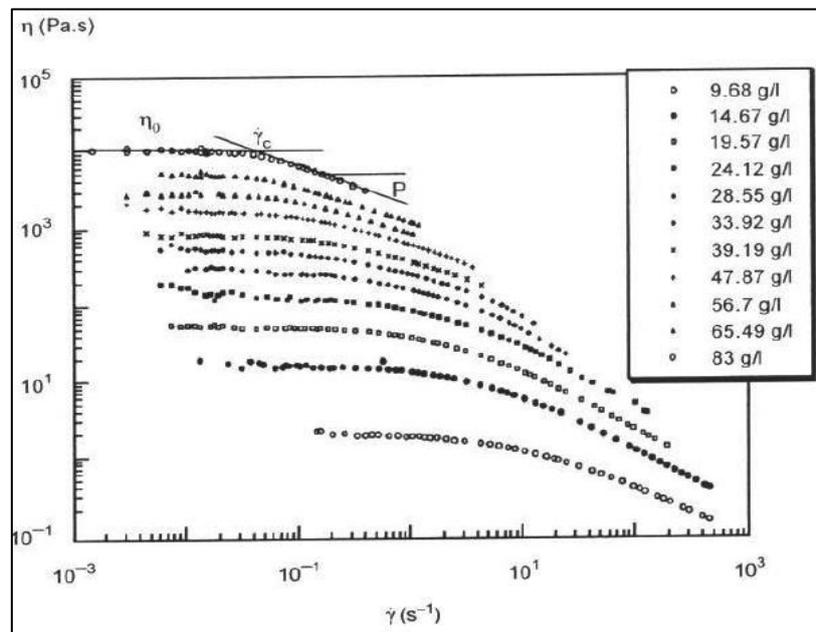


**Figure A-6 :** A) Structure chimique d'un tétra-saccharide de HA<sup>143</sup>. B) Structure secondaire de HA<sup>140</sup>

Le hyaluronane est un polyélectrolyte, ses propriétés rhéologiques en milieu aqueux sont donc influencées par la force ionique (effet écran) mais aussi par le pH (disparition du caractère polyélectrolyte pour des  $\text{pH} < \text{pKa}$ )<sup>144</sup>. Dans les solutions basiques, les liaisons

hydrogène participant à l'organisation structurale des chaînes polysaccharidiques sont rompues et la dégradation est alors plus remarquable en pH basique qu'en pH acide<sup>145</sup>.

Les propriétés physico-chimiques du HA ont fait l'objet de nombreuses études à partir des années 1940<sup>146,147</sup>. La diminution de la viscosité des solutions aqueuses semi-diluées de HA avec l'augmentation du gradient de cisaillement prouve le comportement non-newtonien rhéofluidifiant de ces solutions (Figure A-7). En effet, l'augmentation du gradient de cisaillement affecte l'enchevêtrement et les interactions intermoléculaires (liaisons hydrogène et interactions hydrophobes) ce qui provoque l'alignement des chaînes dans la direction du cisaillement et la chute de viscosité<sup>148</sup>. Ce comportement rhéofluidifiant n'est pas thixotrope, HA retrouve sa viscosité initiale instantanément indiquant la restructuration rapide de l'enchevêtrement et des interactions détruites par le cisaillement<sup>144</sup>.



**Figure A-7 :** Étude en écoulement de solutions de HA ( $M_w = 1.3 \times 10^6$  g/mol) à différentes concentrations dans NaCl 0,1 M à 25°C<sup>149</sup>

Les propriétés rhéologiques du HA et sa naturelle biocompatibilité lui confèrent une place de choix dans des applications médicales, biomédicales et pharmaceutiques. Il est notamment utile dans l'ingénierie tissulaire, la libération de médicaments, l'imagerie moléculaire et aussi pour améliorer et raffermir la peau en raison de ses propriétés biocompatibles, biodégradables, non-toxiques, non-inflammatoires, non-immunogènes et sa grande capacité à retenir l'eau<sup>150</sup>.

Les chercheurs ne se sont pas limités à l'utilisation du HA sous son état natif mais ils ont également poussé les recherches vers sa modification chimique pour obtenir de nouvelles propriétés physico-chimiques et biologiques.

### I.3.2.2. Principales modifications chimiques

Plusieurs voies de fonctionnalisation chimique de l'acide hyaluronique ont été rapportées dans la littérature. Certaines modifications sont effectuées dans l'eau tandis que d'autres sont effectuées dans des solvants organiques comme le DMSO ou le DMF lorsqu'elles utilisent des réactifs sensibles à l'hydrolyse ou très hydrophobes. Dans ce cas, le HA commercial (souvent HA-Na<sup>+</sup>) insoluble dans le milieu organique, doit être tout d'abord converti en HA-TBA<sup>+</sup> pour assurer sa solubilité dans le milieu réactionnel. Ceci nécessite une étape supplémentaire et passage sur une colonne échangeuse d'ions ce qui augmente les risques de dégradation des chaînes de polysaccharide<sup>119</sup>. La modification dans l'eau ou dans un mélange eau/alcool reste toutefois la méthode de choix même si cela nécessite parfois des conditions acides ou basiques pouvant provoquer une dégradation importante des chaînes. Ces aspects ont encouragé les chimistes à explorer de nouvelles voies de synthèse pour le développement de dérivés d'acide hyaluronique avec des caractéristiques adaptées à leurs besoins spécifiques. Dans certains cas, l'efficacité de la réaction n'est pas un critère, car des faibles degrés de substitution sont suffisants pour apporter les propriétés souhaitées, alors que pour d'autres applications, des DS élevés sont requis.

L'acide hyaluronique présente dans sa structure plusieurs groupements chimiques réactifs : acide carboxylique, alcool et acétamide (Figure A-5). De ce fait, des réactions de modification hydrophobe peuvent être réalisées de manière sélective sur une fonction bien précise sans avoir besoin de protéger les autres. Par contre, l'utilisation de l'acétamide comme site de greffage nécessite une hydrazinolyse dans le but de créer des fonctions amines plus réactives capables de réagir par amidification ou amination réductrice<sup>151</sup>. Cette étape peut engendrer une dégradation notable des chaînes de HA et donc les réactions de modification sont préférablement effectuées sur les autres fonctions réactives. Le Tableau A-4 regroupe les principales fonctionnalisations hydrophobes de HA utilisant les fonctions acide et alcool comme sites de greffage. Quelques exemples seront détaillés par la suite.

**Tableau A-4 : Principales modifications chimiques de HA par des molécules hydrophobes**

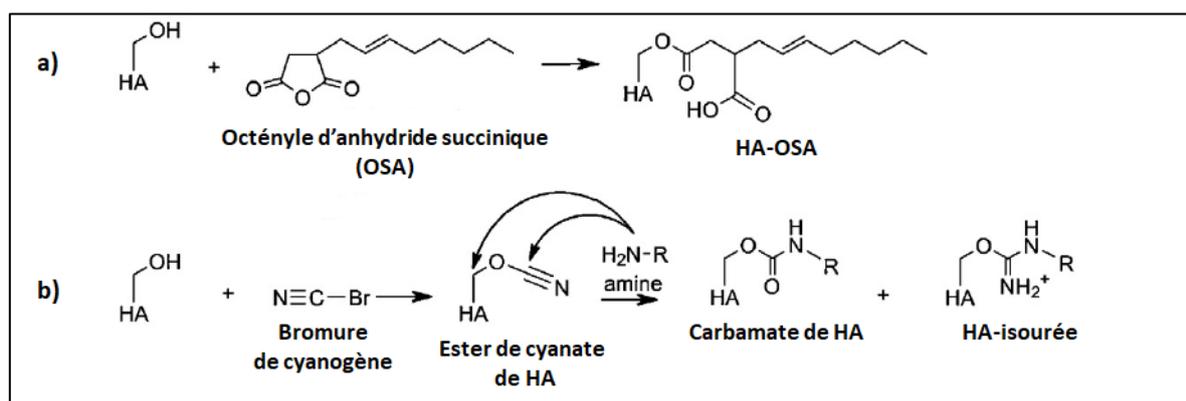
Fonction réactive de HA	Molécule greffée	Réaction mise en jeu	Conditions de la réaction	DS (%)	Réf.
-OH	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}-\text{O}$ <div style="text-align: center;"> <math>\diagdown</math>  <math>\text{CH}_2</math> </div> avec n = 4, 6, 8, 10, ou 14	Éthérisation	Eau, ou eau/DMSO, pH=9~10, 30°C, 4h~48h	4.8~78	<sup>152</sup>
	Octényle d'anhydride succinique	Estérisation	Eau, NaHCO <sub>3</sub> (0.2~1M), pH=8.5, TA, 6~24h	2~43	<sup>153</sup>
	R-NH <sub>2</sub> avec R= butyle, hexyle, octyle, décyle ou dodécyle	Formation de carbamate	Bromure de cyanogène, eau, pH=9~10, TA, 16h	1.9~80.7	<sup>154</sup>
	NH <sub>2</sub> -COOR avec R= C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ou C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	Formation de carbamate	Bromure de cyanogène, eau, pH=9~10, TA, 16h	3.3~100	<sup>155</sup>
-COO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	R-NH-NH-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -CO-NH-NH <sub>2</sub> avec n = de 1 à 17 R= H, OH ou alkyl ramifié ou linéaire	Amidification	EDC, eau, pH= 4.75, TA, 4h	2~30	<sup>156</sup>

	1) ADH	Amidification	1) EDC, eau, pH= 4.75, TA, 4h	8	156,157
	2) R-CHO avec R= C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> , C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> ou C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>		2) EDC, NaCNBH <sub>3</sub> , eau/EtOH, pH= 5.1, 24h	4~7	
-COO <sup>-</sup> TBA <sup>+</sup>	R-Br avec R= C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> ou C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>	Estérification	DMSO, TA, 24h	1~5	119
	Isocyanate d'alkyle	Formation de carbamate	DBTL, DMSO, 65°C, 8h	10~100	158
	Hexadécylamine	Amidification	CDI, acide méthylsulfo -nique DMSO, 42°C, 16h	2.4	159

L'éthérification des fonctions hydroxyles du HA avec des groupements hydrophobes peut être réalisée en utilisant des époxydes à longue chaîne alkyle dans l'eau ou dans un mélange eau/solvant organique en présence d'une base telle que KOH ou NaOH. Le choix du milieu réactionnel dépend des critères de solubilité de la molécule hydrophobe qu'on souhaite greffer. Dans les conditions de solvants mixtes, la proportion de solvant organique varie entre 20% et 90% (v/v) de manière à assurer la solubilité du HA et des molécules hydrophobes et de la base. L'utilisation des alcools comme solvant organique dans le milieu réactionnel présente beaucoup de bénéfices. Ils sont relativement peu coûteux, peu toxiques et à la fin de la réaction, le HA modifié peut être facilement isolé par filtration. *Mlčochová et al.* ont évalué l'effet de la proportion du solvant organique DMSO sur le degré de substitution des OH de HA par des dérivés d'époxydes alkylés à 4, 6, 8, 10, ou 14 carbones suite à une réaction d'étherification<sup>152</sup>. Ils ont démontré qu'en augmentant la concentration de DMSO de 20 à 90%, le DS augmente

respectivement de 17 à 78% avec une diminution légère de masse molaire. Par contre, plus le DS augmente plus les dérivés obtenus perdent logiquement leur caractère hydrosoluble. L'influence du temps de réaction de greffage du dérivé hexyle a été également étudié révélant que le DS augmente avec le temps mais au bout de 36h une dégradation du HA modifié a été notée. La température et le pH du milieu réactionnel ont aussi un effet très important. Ils ont constaté que le DS augmente en élevant la température et la basicité du milieu mais une dégradation a été signalée quand la température dépasse 30°C.

Des esters amphiphiles de HA peuvent être également préparés en utilisant les OH comme site de modification. Ces esters (Figure A-8-a), brevetés par *Eenschooten et al.*, ont été obtenus par le greffage de l'octényle de l'anhydride succinique (OSA) dans une solution aqueuse alcaline (pH=8,5)<sup>153</sup>. L'optimisation des conditions de la réaction conduit à un DS maximum de 43% en utilisant 50 équivalents d'OSA par rapport au HA. Un DS de 18% peut être obtenu très rapidement avec un temps de réaction de 6h seulement.

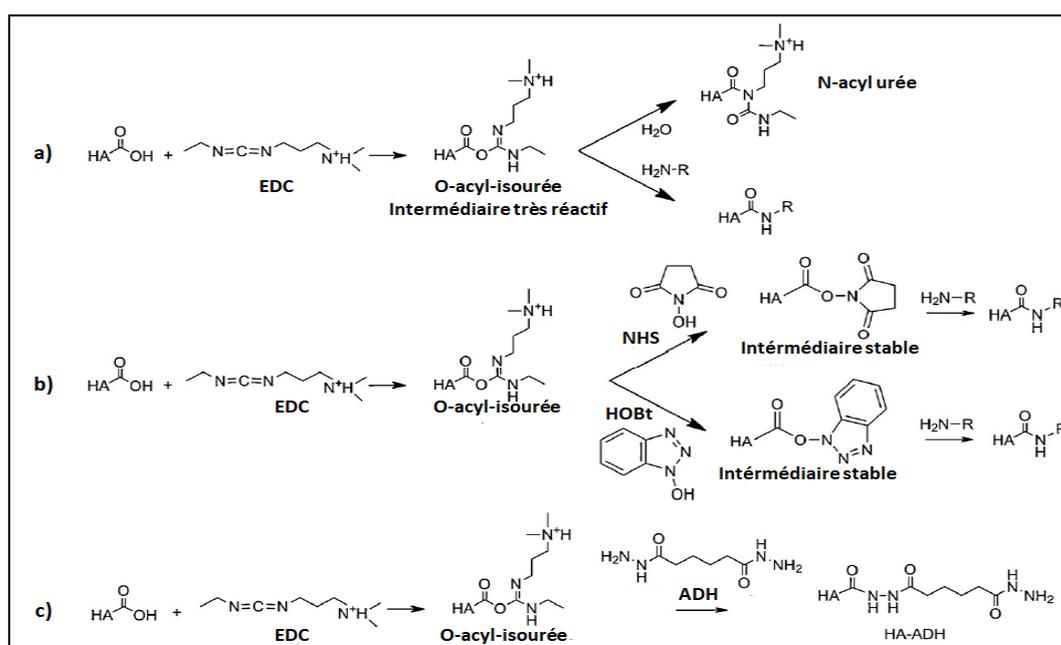


**Figure A-8 :** a) Estérification de HA par octényle d'anhydride succinique<sup>153</sup>. b) Activation des OH de HA par le bromure de cyanogène et formation de carbamate<sup>154</sup>

*Mlčochová et al.* ont poursuivi leurs recherches en créant des liens carbamate entre les fonctions alcool du HA et une amine alkylée (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub>)<sup>154</sup>. Les fonctions hydroxyle ont été tout d'abord activées par le bromure de cyanogène (CNBr) formant un ester de cyanate de HA qui réagit avec l'amine pour former principalement des liaisons de carbamate N-substituées et un produit secondaire HA-isourée (Figure A-8-b). Des DS élevés allant jusqu'à 80,7% ont été obtenus en utilisant seulement un léger excès d'amine hydrophobe dans un temps de réaction de seulement une heure. En revanche, un pH basique élevé (jusqu'à 10) est nécessaire pour que le couplage se produise ce qui entraîne une hydrolyse des chaînes de HA. *Chytil & Pekar*<sup>155</sup> ont également utilisé cette méthode pour synthétiser une large gamme de dérivés amphiphiles du HA.

Le greffage des molécules hydrophobes sur les fonctions hydroxyle de HA semblent donc être une voie très efficace afin d'obtenir des DS assez élevés. Par contre, ces réactions nécessitent l'utilisation d'un milieu réactionnel alcalin (pH= 8,5-10) ce qui provoque une dégradation notable des chaînes de HA. Pour éviter ce problème, les chimistes ont cherché des sites de greffage alternatifs en particulier la fonction carboxylique du HA.

L'amidification de la fonction acide carboxylique de HA dans l'eau avec des carbodiimides est finalement l'une des méthodes les plus utilisées pour la modification hydrophobe de ce polysaccharide<sup>156,157</sup>. Le carbodiimide utilisé est principalement le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) au regard de sa solubilité dans l'eau. La première étape consiste à activer l'acide carboxylique du HA par l'EDC formant un intermédiaire d'isourée O-acyle. La deuxième étape de la réaction est l'attaque nucléophile de l'amine sur le HA activé, qui conduit à la formation de la liaison amide entre le polysaccharide et la molécule hydrophobe (Figure A-9-a). Néanmoins, l'isourée O-acyle est un intermédiaire très réactif et peut réagir aussi avec l'eau donnant le produit secondaire stable urée N-acyle stable, empêchant ainsi le couplage avec l'amine. Pour éviter la formation de ce produit secondaire, le N-hydroxysuccinimide (NHS) ou le Hydroxybenzotriazole (HOBt) peuvent être utilisés renforçant la résistance à l'hydrolyse de l'intermédiaire isourée O-acyle. Le NHS ou le HOBt réagit avec l'isourée O-acyle et l'intermédiaire HA activé qui en résulte subit une attaque nucléophile de l'amine (Figure A-9-b).

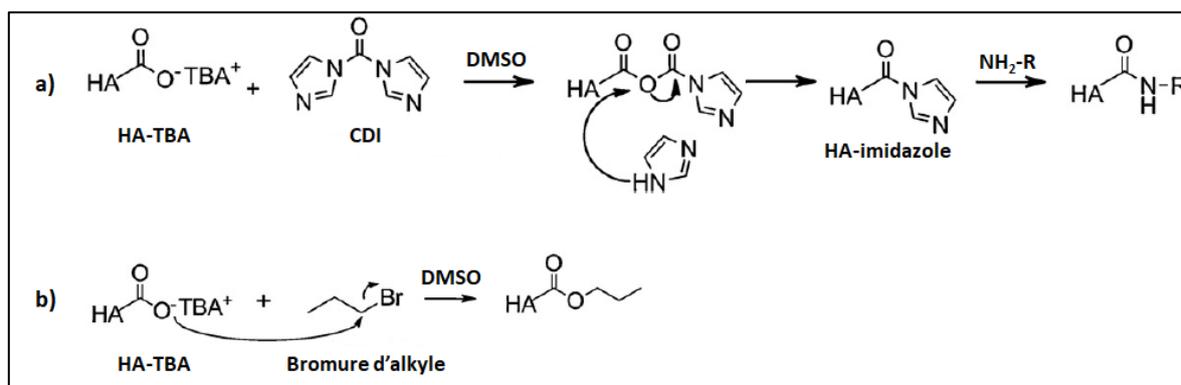


**Figure A-9 :** a) Mécanisme d'activation de HA par EDC<sup>160</sup>. b) Amidification entre HA et amine alkylée par EDC couplée à NHS ou HOBt. c) Amidification entre HA et ADH par EDC<sup>156</sup>

Cette voie de modification par EDC est néanmoins très délicate, car elle est très dépendante du pH et le pH optimal des deux étapes est différent. En effet, l'activation de l'acide carboxylique par EDC est mieux assurée dans un milieu acide (pH de 3,5 à 4,5)<sup>160</sup>, alors que la formation du lien amide est plus efficace à un pH élevé suite à la déprotonation de l'amine. Toutefois, à un pH élevé, l'EDC s'hydrolyse très rapidement et se convertit en urée de N-acyl empêchant la création des liens amide. Ce compromis est difficile à atteindre surtout lors de l'utilisation des amines hydrophobes avec des valeurs de pKa élevées. C'est pour cette raison qu'un pH de 4,75 est souvent utilisé dans ce type de couplage et on trouve aussi le recours à l'utilisation de l'acide adipique dihydrazide (ADH) dont les valeurs de pKa (2-3) sont bien inférieures à celles des amines (Figure A-9-c). En utilisant cette molécule, on peut accéder à des DS élevés allant jusqu'à 30% en procédant à température ambiante et en seulement 4h<sup>156</sup>. L'ADH est également utilisé comme un bras espaceur puisqu'il contient une fonction amine à chaque extrémité. Cette particularité permet de modifier les fonctions acide carboxylique du HA par des groupements hydrophobes aromatiques ou de longues chaînes alkyle contenant une fonction acide ou aldéhyde mais à condition d'utiliser des proportions d'ADH bien appropriés afin d'éviter la réticulation du HA par ce bras espaceur. Les DS obtenus ne sont pas souvent très élevés mais les produits du HA obtenus expriment une amphiphilie remarquable. C'est le cas pour *Creuzet et al.* qui ont utilisé cette méthode pour greffer des aldéhydes hydrophobes avec des chaînes alkyle de C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub><sup>157</sup>. Bien qu'ils n'aient obtenu qu'un DS maximal de 7%, les dérivés synthétisés reflétaient un comportement auto-associatif notable suite aux interactions hydrophobes des motifs greffés.

L'amidification par EDC a l'avantage de pouvoir être effectuée dans l'eau (solvant vert) avec l'utilisation directe du HA commercial. Cependant, un excès d'amine hydrophobe et d'agent de couplage doit être ajouté car d'une part une certaine hydrolyse d'EDC ne peut pas être évitée et d'autre part l'amine est protonée au pH requis pour la réactivité optimale de l'agent activateur diminuant ainsi l'efficacité de la réaction de couplage. Une autre contrainte de cette réaction est l'hydrophobicité de certaines molécules qui limitent leur solubilité dans l'eau et nécessite l'utilisation d'un solvant organique. Dans ce cas et comme déjà évoqué, une étape supplémentaire de conversion du contre ion Na<sup>+</sup> en TBA<sup>+</sup> devient nécessaire pour assurer la solubilité de HA dans le milieu réactionnel. Un changement d'agent de couplage est aussi requis pour garantir l'activation maximale des fonctions carboxylates. Le 1'-Carbonyldiimidazole (CDI) semble être l'activateur le plus approprié. Le carbonyldiimidazole réagit avec l'acide hyaluronique pour former un intermédiaire très réactif qui se réarrange rapidement pour donner

le HA-imidazole, l'intermédiaire le plus stable. Ce dernier réagit avec l'amine hydrophobe créant ainsi la liaison amide (Figure A-10-a). Comparée à la méthode décrite précédemment (amidification par EDC), cette procédure est plus longue et nécessite un temps de réaction pouvant aller jusqu'à 48h. Cependant, la réaction ne libère dans le milieu réactionnel que du CO<sub>2</sub> et de l'imidazole qui sont des composés non toxiques. Cette réaction a déjà fait ses preuves et a permis à *Finelli et al.* de modifier l'acide hyaluronique par l'hexadécylamine dans le DMSO en utilisant l'acide méthylsulfonique pour protoner les fonctions carboxylates de HA qui ont été activées à la suite par le CDI. La réaction s'est déroulée à 42°C pendant 16h donnant un DS de 2,4 % qui était suffisant pour obtenir des systèmes amphiphiles et auto-associatifs<sup>159</sup>.



**Figure A-10 :** a) Mécanisme d'amidification de HA par CDI<sup>159</sup>. b) Estérification de HA par bromure d'alkyle<sup>119</sup>

*Pelletier et al.* ont utilisé à leur tour la fonction carboxylique du HA mais cette fois-ci en créant des liens ester avec des bromures d'alkyle à C<sub>12</sub> et C<sub>18</sub> (Figure A-10-b). L'estérification a été assurée dans le DMSO à température ambiante pendant 24h sans le recours d'aucun agent de couplage ni de catalyseur. Un DS compris entre 1 et 5% a été obtenu et le comportement amphiphile a été observé sur les HA modifiés même avec les DS les plus faibles<sup>119</sup>.

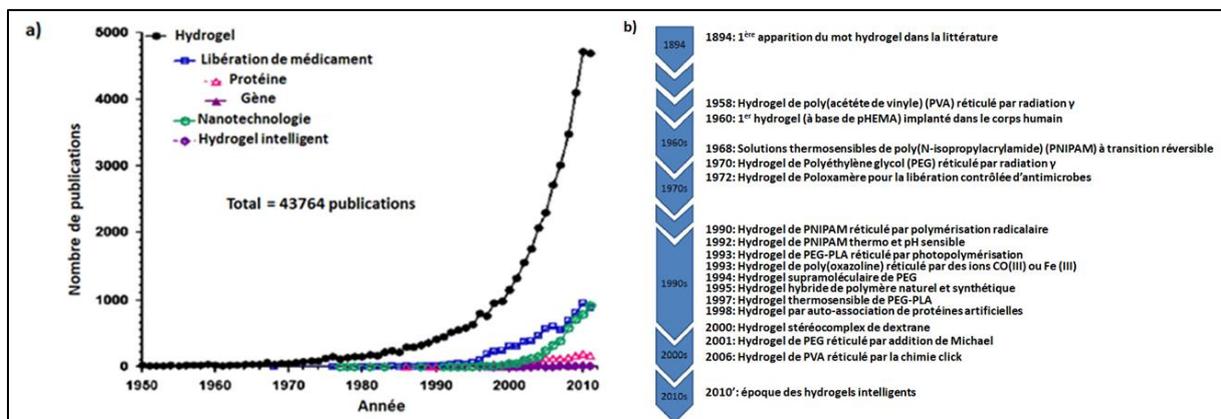
D'autres liens entre les fonctions carboxylate du HA et la molécule hydrophobe peuvent se produire telle que le lien carbamate ou autrement dit uréthane. Ceci peut se former en faisant réagir le polysaccharide avec les dérivés d'isocyanate alkylés dans le DMSO à 65°C pendant 8h en employant le di-n-Butyltin dilaurate (DBTL) comme agent de couplage avec des DS importants prouvant la grande efficacité de cette réaction<sup>158</sup>.

Les différents dérivés amphiphiles à base de polysaccharide peuvent conduire à la formation de matériaux particuliers que sont les hydrogels. Le volet suivant sera consacré à ces systèmes exceptionnels.

## II. Les hydrogels : matériaux aux propriétés exceptionnelles

### II.1. Historique

D'après *Lee al.* et selon SciFinder<sup>®</sup>, le mot « hydrogel » est apparu pour la première fois dans un article publié en 1894<sup>161</sup>. Cependant, le matériau décrit n'était pas un hydrogel comme nous le décrivons aujourd'hui mais un gel colloïdal fait avec des sels inorganiques. La définition actuelle d'un hydrogel avec ses propriétés spécifiques, principalement sa grande affinité avec l'eau, a été mise en place en 1960 par *Wichterle & Lim* après leur travaux sur un hydrogel à base de polyhydroxyéthylméthacrylate (pHEMA) en vue de l'utiliser dans des applications qui exigent un contact permanent avec les tissus humains<sup>162</sup>. Les premières applications des hydrogels concernaient effectivement des implantations dans le corps humain<sup>163</sup>. Depuis lors, le développement de ces systèmes n'a pas cessé d'augmenter surtout dans les domaines pharmaceutique et biomédical. Ceci est prouvé par le nombre d'articles scientifiques publiés pendant les 20 dernières années qui dépasse les 6000 publications sous les thèmes « libération de médicaments », « hydrogels intelligents » et « nanotechnologie » (Figure A-11-a)<sup>161</sup>. L'orientation de la recherche et les domaines d'intérêt de ces matériaux ont évolué et se sont accrus constamment au fil des années (Figure A-11-b).



**Figure A-11 : a)** Evolution de la recherche scientifique sur l'hydrogel entre 1950 et 2011<sup>161</sup>

**b)** Frise chronologique de l'hydrogel<sup>164</sup>

Comme le suggèrent *Buwalda et al.*<sup>164</sup>, l'historique des hydrogels peut être divisé en trois grandes générations. La 1<sup>ère</sup> génération est constituée d'hydrogels simples et comprend une large variété de procédés de réticulation incluant les modifications chimiques d'un polymère par des groupements réactifs (monomère par exemple) et l'utilisation d'un amorceur de réticulation. L'objectif principal était simplement de préparer des matériaux avec de bonnes propriétés mécaniques capables de renfermer une grande quantité d'eau.

Ensuite, à partir des années 1970, un nouveau concept d'hydrogel apparaît, ce sont les hydrogels stimulables qui ont la capacité de répondre à un stimulus externe comme la température, le pH ou la force ionique, etc<sup>165</sup>. Ces stimuli peuvent être exploités pour déclencher une action de l'hydrogel comme la libération d'un principe actif ou pour modifier la structure du matériau comme la création de pores in-situ.

Une troisième et dernière génération inclut les hydrogels stéréocomplexes obtenus à la faveur d'interactions physiques qui peuvent se produire suite à la fonctionnalisation chimique d'un polymère (exemple des systèmes amphiphiles)<sup>166</sup> ou suite à la complexation avec une molécule externe (comme la cyclodextrine)<sup>167</sup>.

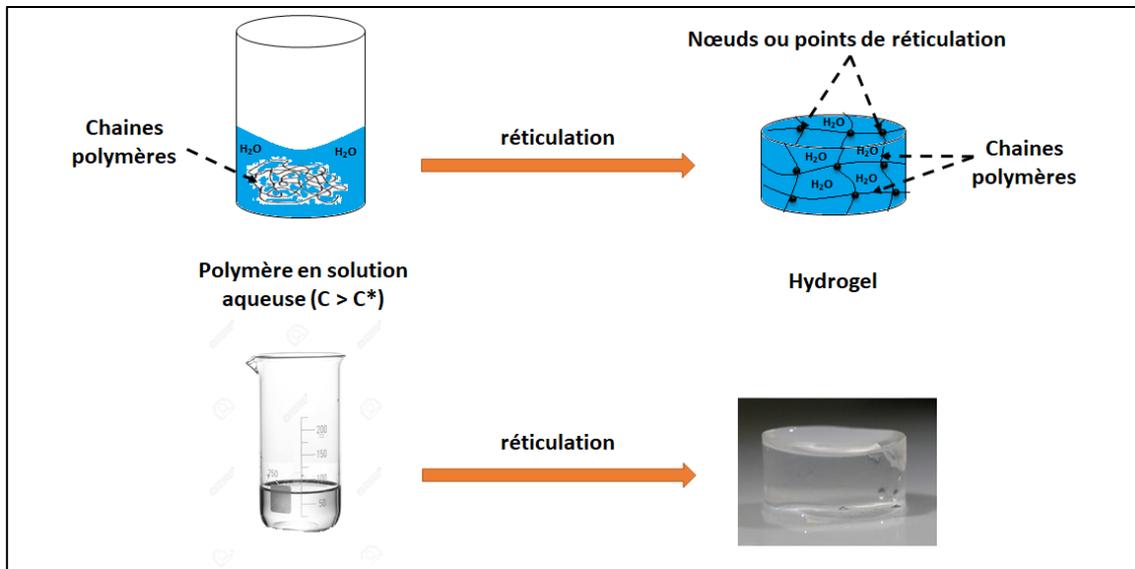
Ces progrès intéressants dans le domaine de la recherche et développement des hydrogels ont donné naissance à une nouvelle catégorie de matériaux multi-stimulables et multi-fonctionnels avec des propriétés plus avancées appelés « hydrogels intelligents » dont les applications possibles sont fascinantes.

Depuis les travaux pionniers de *Witcherle et Lim* en 1960, les hydrogels sont devenus des matériaux d'un grand intérêt pour les chercheurs en raison de leur caractère hydrophile et bicompatible notamment ceux obtenus à partir de polymères naturels<sup>168</sup>. L'efficacité notable d'hydrogel formées à partir de l'alginate de calcium dans la séquestration de cellules<sup>169</sup> a ouvert les portes à l'utilisation des polysaccharides. Ces matériaux à base de polymères naturels ou artificiels sont devenus très attractifs en particulier dans le domaine de l'ingénierie tissulaire comme matrice pour réparer et régénérer une grande variété de tissus et d'organes.

## II.2. Définition et classification

Un hydrogel est donc une matrice au sein de laquelle les chaînes polymères sont connectées (réticulation chimique ou physique) entre elles formant un réseau tridimensionnel (3D) capable de contenir une grande quantité d'eau (jusqu'à 90% de sa structure) (Figure A-12). Le terme de réseau implique donc la présence de réticulation qui empêchent la dissolution du matériau en solution aqueuse et assure les propriétés mécaniques. Les propriétés remarquables de gonflement sont dues à la grande affinité thermodynamique de ce type de matériau envers l'eau. La structure et les propriétés des hydrogels sont dépendants de différents paramètres parmi lesquels la concentration et la structure du polymère ou du monomère, les conditions et la nature de la réticulation, éventuellement les paramètres extrinsèques (salinité, pH, température,...). La grande variété des matrices (origine, structure, fonctionnalité, etc) à partir desquels les hydrogels peuvent se former et les diverses modes d'obtention possibles ont

donné naissance à plusieurs types d'hydrogels avec des propriétés chimiques et physiques différentes. De ce fait, de nombreuses classifications de ces matériaux sont apparues au cours des dernières années.



**Figure A-11** : Schéma représentatif d'un hydrogel

Les hydrogels peuvent être classés selon plusieurs critères. On peut par exemple établir deux groupes en fonction de leur origine naturelle ou synthétique. Les hydrogels naturels sont formés généralement à partir de polysaccharides (acide hyaluronique, alginate, pullulane, chitosane...) ou à partir de protéines (collagène, gélatine...). Ils constituent les hydrogels les plus physiologiques car ce sont pour certains des constituants de la matrice extracellulaire (ECM) *in vivo*. L'inconvénient principal des hydrogels naturels est la possible variabilité des propriétés d'un lot à l'autre en raison de leur origine naturelle qui peut induire une variation de leur composition. La structure des hydrogels synthétiques tels que le PVA, le PEG ou le poly(acrylamide) est plus contrôlée et reproductible. L'hydrolyse ou la biodégradation de ces matériaux peuvent être également programmées sur des périodes variables et bien déterminées.

D'autres classifications des hydrogels existent et peuvent être basées sur:

- La composition en polymère où on trouve trois types : les hydrogels à base d'un homopolymère, à base d'un copolymère ou à base de deux ou plusieurs polymères interpénétrés (IPN).
- L'apparence physique ou la forme de l'hydrogel obtenu qui peut être un film, une matrice ou une microsphère.

- Le caractère polyélectrolyte ou neutre des chaînes polymères qui constituent le réseau : hydrogels neutres, ioniques (anionique ou cationique), ampholytes et zwitterioniques.

Cependant, la classification selon la nature ou le type de réticulation reste la plus utilisée avec deux groupes : les hydrogels physiques et les hydrogels chimiques.

### II.2.1. Les hydrogels physiques

Les hydrogels physiques appelés aussi réversibles occupent une place très importante en raison de la grande facilité de mise en œuvre sans avoir besoin d'utiliser un agent réticulant. Dans ce cas, les chaînes macromoléculaires sont connectées entre elles de manière transitoire non permanente. Ces connexions sont de faible énergie (liaison hydrogène, liaison polaire, liaison de Van der Waals...) ou d'énergie plus importante (complexation ionotropique par exemple). Le caractère réversible de ce type de matériau résulte de la dépendance des nœuds de réticulation à l'état mécanique et thermodynamique de l'hydrogel et aux conditions physico-chimiques souscrites lors de la gélification (température, pH, concentration en polymère ou monomère, force ionique...). Dans ces conditions, la dissolution de ces hydrogels est empêchée par les interactions physiques qui existent entre les différentes chaînes polymères<sup>170</sup>. La réticulation physique peut s'établir via différentes voies (Figure A-12):

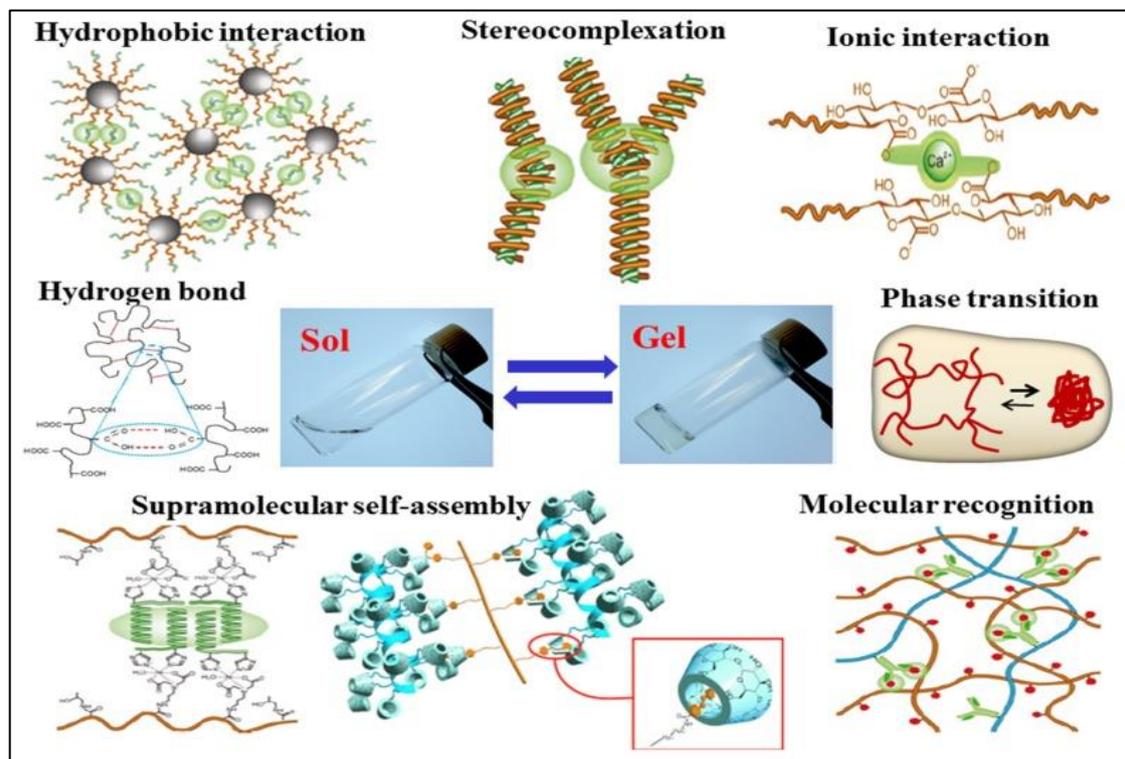


Figure A-12 : Schéma illustrant les principales modes d'obtention des hydrogels physiques<sup>171</sup>

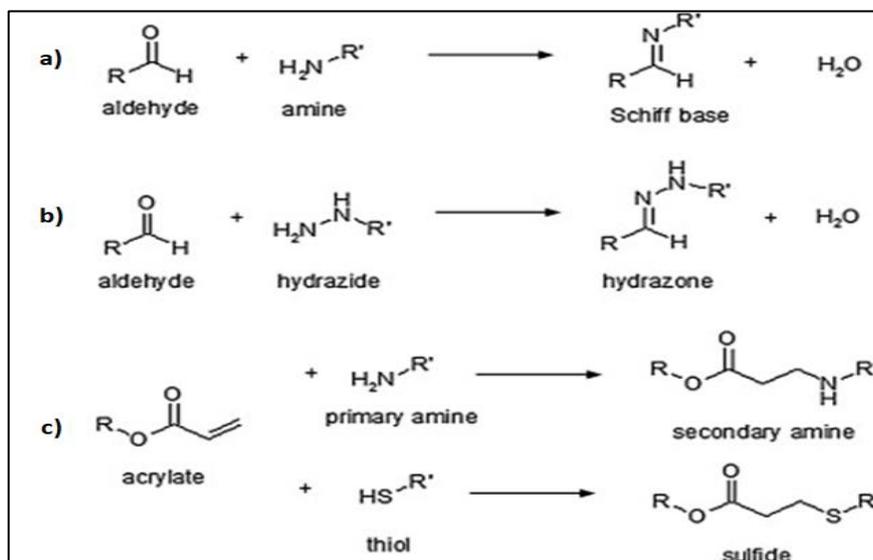
- Interactions hydrophobes : essentiellement à partir de polymères amphiphiles, ces interactions sont créées en solution aqueuse entre les motifs (ou blocs) hydrophobes accrochés au squelette hydrophile. La gélification dépend notamment de la quantité et de la nature des motifs hydrophobes et de la concentration en polymère mais aussi souvent des conditions extérieures (salinité, pH, température,...).
- Stéréo-complexation : elle est basée sur des interactions synergiques entre des chaînes polymères ou des petites molécules de même composition chimique mais de stéréochimie différente. Le principal avantage de cette méthode d'obtention est que l'hydrogel peut se former facilement en dissolvant séparément chaque produit dans l'eau et la gélification se produit en mélangeant les deux solutions ensemble. Le meilleur exemple de polymère exprimant des propriétés stéréo-complexes est le poly(acide lactique)<sup>172</sup>. La limite de cette méthode est la gamme restreinte de polymères ayant des propriétés stéréo complexes.
- Interactions ioniques ou condensation de charges : cette voie repose sur les interactions de charges entre deux polymères de charges opposées (polyélectrolytes) ou entre un polymère chargé et une molécule de charge opposée ou un ion di- ou trivalent de charge opposée. Le modèle le plus connu est l'alginate de calcium<sup>173</sup>. D'autres exemples existent dans la littérature comme le Chitosane-glycérol de phosphate<sup>174</sup>.
- Liaison hydrogène : elle est facilitée par structures régulières de polymères voir la formation de systèmes de conformation hélicoïdale qui vont pouvoir s'associer. On peut citer les gels d'agar-agar ou d'arabinoxylane ou encore la gélification de la carboxyméthylcellulose (CMC) en milieu acide HCl 0,1M<sup>175</sup>.
- Chimie supramoléculaire : cette méthode est basée sur la reconnaissance moléculaire et/ou supramoléculaire entre des motifs spécifiques. Le système hôte-invité est le plus simple, il se repose sur la formation de complexes d'inclusion entre des polymères ou des molécules. Les modèles les plus connus sont à la base de la cyclodextrine<sup>176</sup>.

## II.2.2 Les hydrogels chimiques

Un hydrogel est dit chimique ou permanent quand les chaînes polymères sont connectées entre elles par des liaisons covalentes (de forte énergie). Le caractère permanent des nœuds de réticulation confère une grande stabilité au réseau qui dépend globalement moins des facteurs extérieurs (pH, température, déformation mécanique,...). Cette stabilité rend les matériaux formés insolubles dans n'importe quel solvant et leurs propriétés de gonflement dépendent de leur affinité envers l'eau. Une fois détruits, les points de réticulation sont non

régénérables d'où le caractère irréversible de ce type d'hydrogel. La résistance mécanique des hydrogels chimiques est généralement plus élevée que leurs homologues physiques. Par contre, des défauts de réseau peuvent notamment apparaître en raison des extrémités des chaînes libres non réticulées, des enchevêtrements et des boucles de chaînes macromoléculaires qui ne contribuent pas à l'élasticité du réseau. Les différentes méthodes de préparation des hydrogels chimiques rapportées dans la littérature sont :

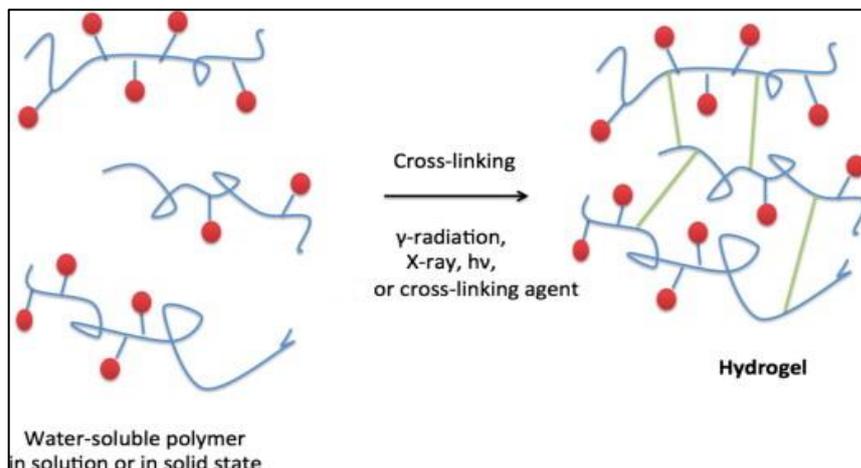
- Réticulation chimique : les agents de réticulation comme l'épichlorohydrine, le glutaraldéhyde, l'ADH, les polyaldéhydes, ..., sont largement utilisés pour réticuler des polymères naturels ou synthétiques afin d'obtenir des hydrogels chimiques. Parfois, des liens covalents entre les chaînes polymères peuvent être établis directement par des réactions entre groupes fonctionnels (Figure A-13).



**Figure A-13** : Réticulations chimiques typiques<sup>177</sup> : **a)** réaction entre un aldéhyde et une amine pour former la base de Schiff<sup>178</sup>. **b)** réaction entre un aldéhyde et une hydrazide pour former une hydrazone. **c)** réaction de Michael d'un acrylate avec une amine primaire ou avec un thiol pour former respectivement une amine secondaire ou un sulfide.

- Polymérisation radicalaire : les hydrogels chimiques peuvent être obtenus à partir de monomères par polymérisation radicalaire en utilisant un monomère plurifonctionnel comme réticulant. C'est un système très efficace qui entraîne une formation rapide de l'hydrogel même dans des conditions hétérogènes. Les générateurs de radicaux libres tel que le persulfate d'ammonium (APS) ou le persulfate de potassium (KPS) peuvent être employés pour préparer ce type de matériaux<sup>179</sup>.
- Greffage : les hydrogels sont préparés par la polymérisation d'un monomère préalablement greffé sur le squelette du polymère (Figure A-14). Selon le type de monomère greffé, on distingue deux types de greffage : le greffage chimique où la

réticulation est assurée par un réactif chimique comme l'ion cérium et le greffage par radiation qui repose sur l'utilisation de rayonnements à haute énergie, comme les radiations gamma ( $\gamma$ ), rayonnements d'un faisceau d'électrons, etc<sup>180</sup>.



**Figure A-14:** Synthèse des hydrogels par greffage<sup>181</sup>

- Réaction de condensation : cette méthode est appliquée généralement sur les polymères contenant des groupes hydroxyle ou amine avec des acides carboxyliques ou leurs dérivés. L'exemple idéal de ces réactions de condensation a été décrit par *De Nooy et al.* via les réactions de condensation de Passerini et d'Ugi<sup>182</sup>. La condensation de Passerini est basée sur la formation de liens d'ester et amide  $\alpha$ - (acryloxy) entre les chaînes macromoléculaires suite à la condensation d'un acide carboxylique avec un composé carbonyle (aldéhyde ou cétone) et un isocyanure. Lorsqu'on ajoute une amine à ce mélange, on parle de la condensation d'Ugi et la liaison amide  $\alpha$ - (acrylamino) prend la place de la liaison ester.
- Radiation à haute énergie : les monomères à plusieurs doubles liaisons peuvent être polymérisés au moyen de rayonnements à haute énergie comme les rayonnements gamma ( $\gamma$ ) ou les rayonnements du faisceau d'électrons. Cette voie a l'avantage de pouvoir se produire dans des conditions douces (température ambiante et pH physiologique) sans utiliser d'agents de réticulation toxiques. Cependant, ce type d'irradiation entraîne la formation de liaisons covalentes conduisant à des hydrogels non-biodégradables<sup>178</sup>.
- Réticulation enzymatique : Ce concept est basé sur l'utilisation d'une enzyme capable de créer des points de réticulation chimique entre les chaînes macromoléculaires. *Sperinde et al.*<sup>183</sup>, ont réussi à synthétiser des hydrogels à base de PEG par l'utilisation d'une enzyme. Tout d'abord, des groupes de glutamine ont été greffés sur le PEG. Ensuite, la réticulation est déclenchée par l'ajout de l'enzyme

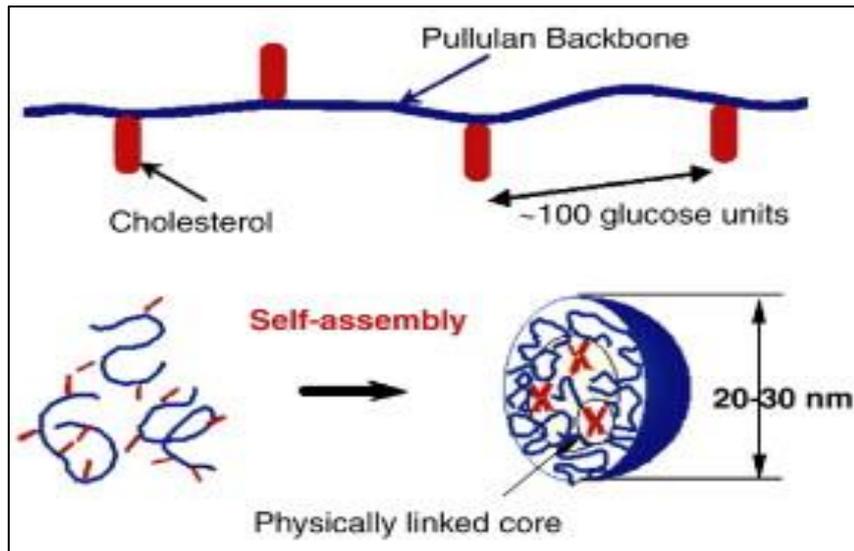
transglutaminase à des solutions aqueuses de PEG modifié et de poly(lysine-co-phénylalanine). Cette enzyme est capable de créer des liens amide entre le groupement  $\gamma$ -carboxamide du PEG modifié par la glutamine et le groupement  $\epsilon$ -amine de la lysine formant ainsi des nœuds de réticulation entre les deux polymères.

### II.3. Les hydrogels de pullulane et de ses dérivés

Le pullulane, détaillé précédemment (Voir A-I.2.2), est un polysaccharide naturel qui n'est pas gélifiant intrinsèquement mais pour lequel une modification chimique appropriée peut conduire à la formation d'hydrogels physiques et/ou chimiques.

De nombreuses publications rapportant des méthodes de préparation d'hydrogels à base de pullulane et leurs propriétés existent dans la littérature. L'étude de ces hydrogels s'est amplifiée au cours de la dernière décennie du fait de ses applications potentielles dans l'ingénierie tissulaire, la libération de médicament et dans le développement et l'implantation de nouveaux matériaux intelligents stimulables et biomimétiques.

Pour aboutir à l'élaboration d'hydrogels à base de pullulane, la voie d'obtention principale est la modification hydrophobe de ce polysaccharide conduisant à des dérivés à propriétés amphiphiles capables de créer des associations hydrophobes en solution aqueuse. Les premiers travaux ont commencé avec le pullulane greffé cholestérol (CHP) dont la stratégie de synthèse a été traitée antérieurement (Voir A-I-2.2.3.2). Les CHP sont capables de former des micro- ou nanohydrogels stables suite au comportement auto-agrégatif de ces dérivés dû aux interactions hydrophobes entre les motifs de cholestérol (Figure A-15)<sup>184</sup>. La taille et la densité des hydrogels obtenus dépendaient fortement du DS en groupe cholestéryl. Bien que ces nanohydrogels soient de type physique, ils conservent leur taille à température ambiante pendant toute une semaine en raison de leur très faible hydrosolubilité. Ils ont aussi la capacité de s'interagir avec diverses molécules hydrophobes et protéines<sup>185</sup>. *Akiyoshi et al.* ont également étudié les interactions de type hôte/invité entre ces dérivés et la  $\beta$ -cyclodextrine ouvrant la voie notamment à la libération contrôlée de médicaments dans des environnements hydrophobes<sup>186</sup>.



**Figure A-15:** Nanohydrogel formé par auto-agrégation de CHP en solution aqueuse<sup>184</sup>

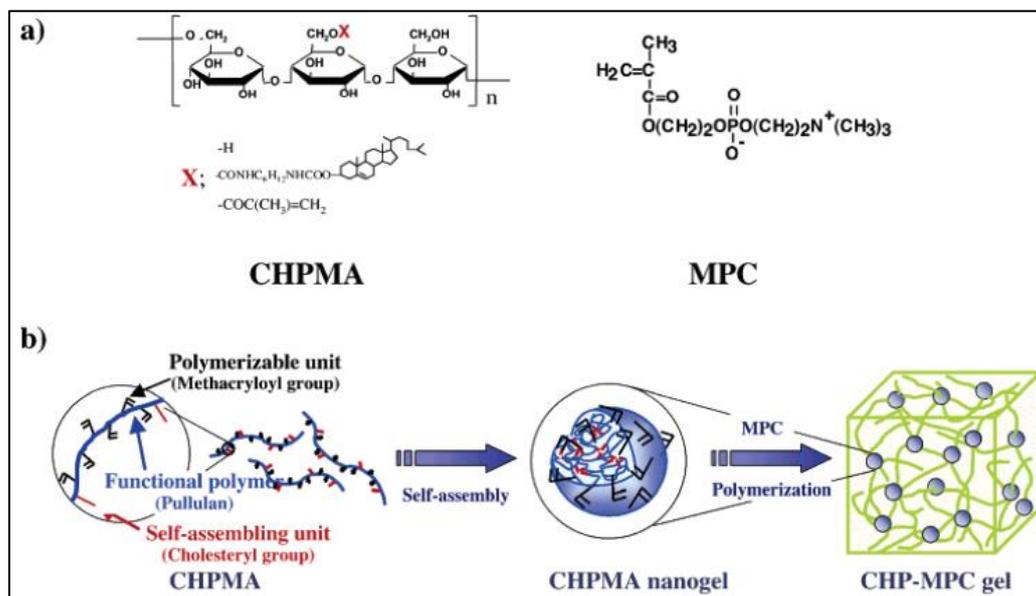
Un autre exemple de nanohydrogels est obtenu à partir de l'acétate de pullulane (PA) modifié par le sulfadiméthoxine<sup>81</sup>. Ces nanomatériaux ont démontré une bonne efficacité pour le transport et la libération de l'adriamycine (médicament anticancéreux) pour le traitement des cancers du sein (MCF-7)<sup>81,111</sup>. Cette efficacité peut être améliorée par l'incorporation de la vitamine H au sein du squelette des dérivés de PA-sulfadiméthoxine<sup>187</sup>. Des études de la libération du clonazépam par le PA ont été menées par *Jung et al.* montrant que la libération peut être prolongée en augmentant le degré d'acétylation du pullulane<sup>188</sup>.

Dans le secteur pharmaceutique et biomédical, une certaine biocompatibilité et stabilité des matériaux utilisés sont exigées. Pour répondre à ces exigences, d'autres types d'hydrogels chimiques de pullulane ont été préparés afin de développer un système polyvalent pour le transfert de gènes dans des cellules de mammifères<sup>189</sup>. Des nanohydrogels à cœur hydrophile, capables d'encapsuler des molécules hydrosolubles telle que l'ADN, ont été obtenus en utilisant le glutaraldéhyde comme un agent de réticulation des chaînes de polysaccharide.

Au sein de notre laboratoire, différents types d'hydrogel à base du pullulane et de CMP ont été obtenus avec l'épichlorohydrine et le triméthaphosphate de sodium comme agents de réticulation<sup>190,191</sup>. Ceux-ci sont capables de séquestrer et protéger un actif modèle comme le lysozyme (enzyme) dans un milieu acide ouvrant la voie aux applications de séquestration/libération de médicaments sensibles dans le milieu gastrique. Des composés cationiques comme le bleu de méthylène et un polyéthylèneimine ( $M_w=10^4$  g/mol), ont été également encapsulés par le biais des interactions électrostatiques avec les charges anioniques apportées par l'utilisation du triméthaphosphate de sodium. Cet agent de réticulation a été

également utilisé par *Autissier et al.*<sup>192</sup> pour la formation d'hydrogel à base de pullulane destiné à la culture cellulaire.

Des hydrogels hybrides de pullulane (physiques et chimiques) peuvent être élaborés à partir des dérivés (CHPMA) obtenus par le greffage du méthacrylate de glycidyle (GMA) sur le CHP. L'auto-association des motifs de cholestérol du CHP dans l'eau vont assurer la réticulation physique de l'hydrogel tandis que la réticulation chimique est obtenue par la polymérisation radicalaire des motifs de GMA greffés sur le CHP et déclenchée par l'ajout de l'agent réticulant le 2-méthacryloyloxyéthylphosphorylcholine (MPC)<sup>193</sup>. Les hydrogels hybrides de CHPMA montraient deux réseaux bien définis : un macrohydrogel (réticulé chimiquement) qui constitue la structure inter-réseau, dans laquelle sont dispersés les nanohydrogels (réticulés physiquement) constituant la structure intra-réseau (Figure A-16). Ces nanohydrogels de CHP immobilisés peuvent développer leur capacité d'encapsuler et de libérer des protéines (anhydrase carbonique B et insuline) par l'incorporation de cyclodextrine.



**Figure A-16 :** a) Structure de CHPMA et MPC. b) Formation et structure d'un hydrogel hybride à partir de CHPMA<sup>193</sup>

## II.4. Les hydrogels d'acide hyaluronique et de ses dérivés

Les hydrogels d'acide hyaluronique ont gagné en intérêt en tant que nouveaux matériaux biocompatibles et biodégradables avec des applications dans l'ingénierie tissulaire et l'encapsulation et la libération de médicament. Comme l'acide hyaluronique par nature ne peut pas former d'hydrogels, des modifications chimiques furent nécessaires pour obtenir des

réseaux 3D et différents agents de réticulation peuvent être utilisés comme le gultaraldéhyde, le divinylsulfone, l'éther glycidique, l'anhydride méthacrylique, ...<sup>194</sup>. Les agents activateurs de type carbodiimide peuvent également réticuler les chaînes de HA en formant des liens ester entre ses fonctions hydroxyle et ses fonctions acide carboxylique ou encore en formant des liens amide en présence de l'ester méthyl-L-lysine améliorant ainsi la résistance à la dégradation des hydrogels établis<sup>195</sup>. Des hydrogels similaires ont été préparés par *Barbucci et al.* utilisés pour la libération ciblée de l'ibuprofène-lysine dans le genou pour le traitement de l'arthrose<sup>196</sup>. L'hémocompatibilité des hydrogels peut être augmentée en utilisant les dérivés sulfatés du HA.

L'acide adipique dihydrazide (ADH) couplé aux fonctions acide de l'unité acide-D-glucuronique de HA par une réaction d'amidification par le biais d'un agent de couplage de type carbodiimide comme l'EDC, peut conduire à la création d'hydrogels pouvant contenir des molécules aux activités biologiques<sup>197</sup>. Les HA-ADH peuvent également former des hydrogels chimiques *in situ* en se couplant de manière covalente au HA oxydé par le périodate de sodium. La synthèse de cet hydrogel peut se réaliser par un simple mélange des deux dérivés de HA même dans une seringue. Un tel matériau est capable de piéger des principes actifs comme la bupivacaïne et de prolonger son effet anesthésique local<sup>198</sup>. Autrement, les polyhydrazides peuvent induire la réticulation des chaînes de HA, les hydrogels qui en résultent possèdent une bonne stabilité dans une large gamme de pH et une meilleure résistance à la dégradation par la hyaluronidase que leurs homologues obtenus à partir d'autres dérivés du HA<sup>199</sup>. Un exemple d'application de ces matériaux est la séquestration/libération de l'hydrocortisone déclenchée par la réaction de l'enzyme estérase de foie de porc quand l'enzyme hyaluronidase n'avait aucun effet.

Les hydrogels (chimiques et/ou physiques) à base de HA ont été largement étudiés pour le traitement de l'arthrose. Dans ce but, *Amargier et al.* ont préparé des hydrogels hybrides physiques/chimiques à partir des dérivés amphiphiles du HA greffé avec des chaînes alkyle (C<sub>12</sub>) renforcés par la création de liens covalents<sup>200</sup>. Pour ceci, les dérivés amphiphiles de HA-C<sub>12</sub> ont été réticulés chimiquement par le tétraéthylèneglycolditosylate avec une faible densité pour renforcer les propriétés rhéologiques tout en préservant les propriétés viscoélastiques.

Les méthodes de préparation des hydrogels de HA présentent souvent de nombreux inconvénients dont le plus important est l'utilisation de produits chimiques toxiques qui nécessite des procédés de purification longs et coûteux et qui limitent l'emploi de ces matériaux dans les applications biomédicales. Par conséquent, de nouvelles stratégies de synthèse ont été explorées pour élaborer des hydrogels de HA en s'appuyant sur des réactifs plus écologiques et

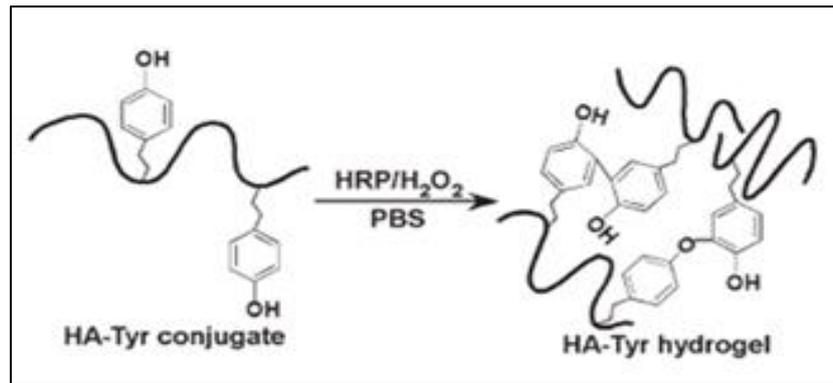
biocompatibles. Ainsi un hydrogel de HA peut être obtenu par le greffage de l'ADH sur le squelette du polysaccharide suivi du couplage covalent avec le poly(éthylène glycol)-propionaldéhyde<sup>201</sup>.

D'autres hydrogels pour des applications ophtalmiques peuvent être préparés à partir de l'hyaluronane thiolé avec le glutathion<sup>202</sup>.

Des hydrogels injectables et thermo-gélifiants de HA pour l'encapsulation de cellules ou de principes actifs peuvent être formés par double réticulation. Ces hydrogels sont synthétisés à partir de l'acide hyaluronique thiolé (HA-SH) et du copolymère tribloc p(HPMAM-lac<sub>1-2</sub>)-PEG-p(HPMAM-lac<sub>1-2</sub>) couplé au sulfonate de vinyle. La gélification thermique est ainsi déclenchée via la réaction d'addition de Michael liant les groupes de thiol de HA et le sulfonate de vinyle du copolymère tribloc<sup>203</sup>.

La photopolymérisation a été aussi utilisée pour élaborer des hydrogels de HA. Le processus décrit par *Park et al.* consiste à modifier tout d'abord le HA par le *N*-3-aminopropyl méthacrylamide pour former le dérivé HA-Ac. Ce dernier a été solubilisé en présence de triéthanolamine et de *N*-vinyl pyrrolidone (NVP). La photopolymérisation est déclenchée par l'application d'une lampe Xénon à 480–520 nm avec une puissance de 75 W/cm<sup>2</sup>. Le diacrylate de poly(éthylène glycol) (PEG-DA) a également été utilisé comme co-macromonomère pour améliorer le module élastique et les propriétés de gonflement des hydrogels<sup>204</sup>.

Le dernier exemple de formation d'hydrogel à base de HA traité dans cette partie repose sur la réticulation enzymatique qui est généralement basée sur une réaction d'oxydation catalysée par une enzyme. Les hydrogels obtenus par voie enzymatique attirent de plus en plus l'attention des chercheurs car cette méthode est plus écologique, très rapide et peut se réaliser dans des conditions physiologiques<sup>205</sup>. Par contre, les faibles propriétés mécaniques et la dégradation rapide de ces hydrogels ont limité leur application. La peroxydase de raifort (HRP), qui catalyse le couplage des phénols par oxydation en présence du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a été utilisée pour former des hydrogels réticulés chimiquement à partir de l'acide hyaluronique<sup>206</sup>. En premier lieu, la tyramine, un composé phénolique, a été greffée sur les chaînes de HA par l'utilisation de l'agent activateur EDC en présence du catalyseur HOBt. Les hydrogels ont été préparés *in vivo* par l'injection séparée de deux solutions par seringue : la 1<sup>ère</sup> contenait une solution de HA modifié par la tyramine et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la 2<sup>ème</sup> contenait l'enzyme, la HRP. L'hydrogel est donc formé suite à la dimérisation par oxydation des motifs de tyramine greffés sur le HA (Figure A-17).



**Figure A-17** : Mécanisme de formation *in situ* d'un hydrogel à partir de HA-Tyr par voie enzymatique<sup>206</sup>

## II.5. Propriétés des hydrogels

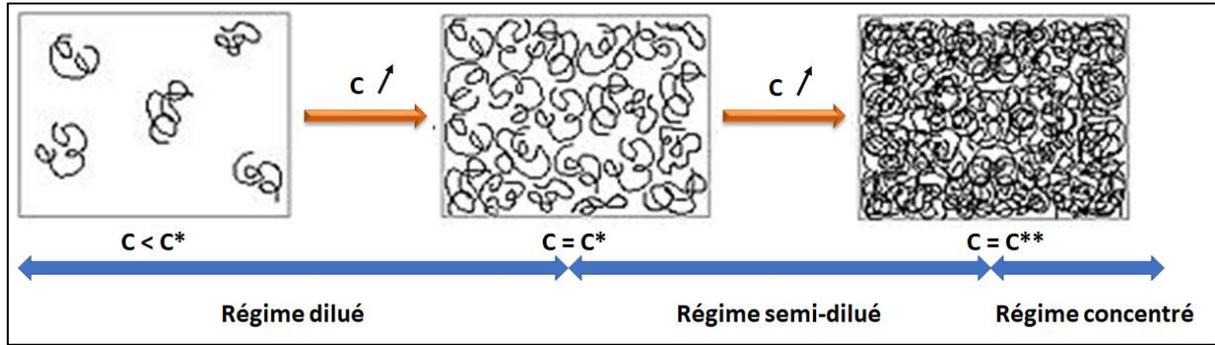
De nombreux résultats sur les propriétés des hydrogels ont été rapportés dans plusieurs travaux montrant des propriétés viscoélastiques, mécaniques et de gonflement uniques et très intéressantes. Il est donc important de comprendre comment ces caractéristiques sont décrites et évaluées.

### II.5.1. Propriétés structurales

Pour comprendre les propriétés structurales des hydrogels, différents paramètres doivent être tout d'abord définis ainsi que le comportement d'un polymère en solution.

- $v_{2,s}$  : la part ou la quantité du polymère dans la structure de l'hydrogel à l'état gonflé (fraction volumique)
- $\xi$  : la taille de la maille du réseau (distance entre deux points de réticulation)
- $M_c$  : masse molaire moyenne entre les nœuds de réticulation
- $C^*$  : concentration critique de recouvrement
- $C^{**}$  : concentration critique d'enchevêtrement

Le comportement d'un polymère en solution (Figure A-18) a été décrit notamment par *De Gennes*<sup>207</sup>. À faible concentration  $C < C^*$  (régime dilué), les chaînes polymères (pelotes) sont distribuées de façon isolées dans tout le volume du solvant. En augmentant la concentration, une première transition de viscosité est observée à  $C = C^*$  (concentration de recouvrement, régime semi-dilué non enchevêtré). Les chaînes polymères commencent alors à entrer en contact et à se recouvrir. Une seconde transition est ensuite atteinte lorsque les pelotes sont entièrement interpénétrées à  $C = C^{**}$  (concentration d'enchevêtrement), les chaînes sont totalement enchevêtrées.



**Figure A-18 :** Représentation schématique du comportement d'un polymère en solution

Le comportement des chaînes polymères en solution aqueuse à partir de laquelle les hydrogels sont formés, a une grande influence sur la structure du réseau. Dans le cas d'un régime dilué ( $C < C^*$ ), une dispersion colloïdale se forme et donc,  $\xi$  et  $M_c$  sont élevées tandis que  $v_{2,s}$  est très faible. C'est complètement l'inverse au-delà de  $C^*$  où des hydrogels macroscopiques se forment et  $\xi$  et  $M_c$  diminuent alors que la quantité du polymère dans le gel augmente. Par conséquent, il est nécessaire de se déplacer au-delà du régime semi-dilué afin de procéder à la gélification pour assurer la formation de l'hydrogel.

## II.5.2. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques d'un hydrogel peuvent varier et être modulées selon l'application souhaitée du matériau. Pour certaines applications (agroalimentaire ou cosmétique), les industriels cherchent plutôt des hydrogels très flexibles (mous) afin de les utiliser comme des épaississants tandis que pour des lentilles de contact, le matériau doit posséder de préférence une bonne rigidité. Sur des systèmes percolés, chimiques ou physiques à très long temps de relaxation, la mesure du module d'élasticité peut permettre de remonter aux dimensions structurelles du gel.

*Flory et al.*<sup>208</sup> ont essayé de décrire la structure des hydrogels à partir de leurs propriétés élastiques, mais l'approche de *Peppas et al.*<sup>209</sup> est généralement utilisée pour analyser la structure d'un hydrogel. Elle est définie par :

$$G = \frac{\rho RT}{M_c} \times \left(1 - \frac{2M_c}{M_n}\right) \times \left(\frac{\vartheta_{2,s}}{\vartheta_{2,r}}\right)^{\frac{1}{3}} \quad (\text{Eq. A1})$$

avec :

- $G$  : module d'élasticité
- $\rho$  : densité du polymère
- $R$  : Constante universelle des gaz parfaits
- $T$  : Température

- $M_c$  : masse molaire moyenne entre les nœuds de réticulation
- $M_n$  : masse molaire moyenne en nombre du polymère
- $\vartheta_{2,s}$  : la part ou la quantité du polymère dans la structure de l'hydrogel à l'état gonflé (fraction volumique)
- $\vartheta_{2,r}$  : la part ou la quantité du polymère dans la structure de l'hydrogel avant d'être gonflé (fraction volumique)
- $\alpha = \vartheta_{2,s}^{-\frac{1}{3}}$

Le module d'élasticité d'un hydrogel est proportionnel à la densité de réticulation et dépend aussi de la nature et de l'énergie des liaisons de réticulation du réseau 3D. Un réseau réticulé chimiquement possède un module élastique plus élevé que celui réticulé physiquement (l'énergie d'une liaison covalente est supérieure à celle d'une liaison physique). Ce module est lié aussi à la composition du matériau en polymère et à la structure de ce dernier. Par exemple, dans le cas des IPN, la rigidité d'un hydrogel peut être améliorée par l'augmentation de la quantité du polymère le plus rigide. La modification chimique du squelette du polymère constituant le réseau, par des groupements rigides comme des noyaux aromatiques ou des composés fluorés, amplifie le module élastique et ainsi la rigidité du matériau 3D. L'agent réticulant joue également un rôle dans le comportement mécanique de l'hydrogel qui devient plus rigide quand on utilise des quantités plus importantes suite à l'augmentation de la densité de réticulation<sup>210</sup>. Les conditions de gélification peuvent également affecter les propriétés mécaniques des hydrogels. L'eau présente le constituant majoritaire de la structure 3D d'un hydrogel (jusqu'à 90%) ce qui limite leur résistance mécanique.

### II.5.3. Propriétés de gonflement

L'autre propriété très importante d'un hydrogel est le gonflement, déterminé comme la quantité d'eau retenue dans le réseau 3D. Les propriétés de gonflement de l'hydrogel sont influencées par de nombreux facteurs tels que la densité de réticulation, la nature de l'agent réticulant, le caractère neutre ou chargé du polymère, la méthode de réticulation, les techniques de séchage et d'autres facteurs environnementaux comme le pH, la température et la force ionique. Le gonflement est inversement proportionnel à la densité de réticulation et par conséquent au module élastique. De ce fait les hydrogels à haute élasticité présentent généralement des faibles taux de gonflement et inversement<sup>211</sup>. Par conséquent, les propriétés de gonflement peuvent nous donner une idée sur les propriétés mécaniques et ainsi sur la

structure de l'hydrogel et également une idée sur l'évolution de ces dernières en fonction du temps.

A l'équilibre, le taux de gonflement d'un hydrogel ( $Q_{eq}$ ) peut être calculé selon l'équation suivante :

$$Q_{eq} = \frac{m - m_0}{m_0} \quad (Eq. A2)$$

avec  $m$  est la masse de l'hydrogel après le gonflement et  $m_0$  la masse de l'hydrogel sec avant le gonflement.

De nombreux travaux ont été menés afin de prédire le comportement de gonflement d'un hydrogel (propriétés mécaniques, mobilité des chaînes, diffusion de soluté). Mais, à ce jour, aucune théorie n'a encore été établie pour cette prédiction. En effet, dans un solvant, un réseau de polymère possède un comportement thermodynamique non-idéal. Dans le cas des hydrogels neutres, la théorie de *Flory-Rehner* semble être la plus raisonnable<sup>212</sup>. Elle est basée sur la combinaison des approches d'élasticité et de thermodynamique. A l'équilibre, induisant un état physique stable, l'énergie libre de Gibbs est ainsi donnée par l'équation suivante :

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{mélange} + \Delta G_{élastique} \quad (Eq. A3)$$

La présence de charge sur les chaînes polymères ou dans le soluté complique l'analyse théorique du gonflement et l'équation précédente devient :

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{mélange} + \Delta G_{élastique} + \Delta G_{ionique} \quad (Eq. A4)$$

$\Delta G_{mélange}$  dépend généralement de l'interaction polymère-solvant. Elle joue un rôle primordial dans les propriétés de gonflement de ce matériau.

Pour résumer, les excellentes propriétés structurales, mécaniques et de gonflement des hydrogels en plus du caractère biocompatible et biodégradable pour ceux obtenus à base de polymère naturel, ont permis d'élargir les applications des hydrogels dans plusieurs secteurs.

## II.6. Principales applications des hydrogels

Les hydrogels connaissent une forte expansion en raison de leurs propriétés spécifiques et de leur valeur biomédicale. On les retrouve dans de nombreuses applications comme la cicatrisation des plaies<sup>213</sup>, la séquestration cellulaire<sup>214</sup>, la réparation du cartilage<sup>215</sup>, support 3D pour la culture cellulaire<sup>216,217</sup>, rétablissement après blessure au niveau de la colonne vertébrale<sup>218</sup> et du cœur<sup>219</sup> et la réparation dermique après intervention chirurgicale<sup>220</sup>. Ils sont aussi utilisés dans d'autres applications comme bio-impression 3D<sup>221</sup>, matrices pour

séquestration et libération de principes actifs comme les médicaments<sup>222</sup>, les acides nucléiques<sup>223</sup>, les protéines<sup>224</sup>, les enzymes<sup>225</sup>, les anticorps<sup>226</sup> et les facteurs de croissance<sup>227</sup>. Récemment, le développement des hydrogels a envahi même les échelles micro<sup>228</sup> et nano<sup>229</sup> métriques. Ces nouveaux développements attirent l'attention des industriels dans différents domaines en particulier biomédical<sup>230</sup>, pharmaceutique<sup>231</sup> et cosmétique<sup>232</sup>. La figure A-20 englobe les principales applications des hydrogels.

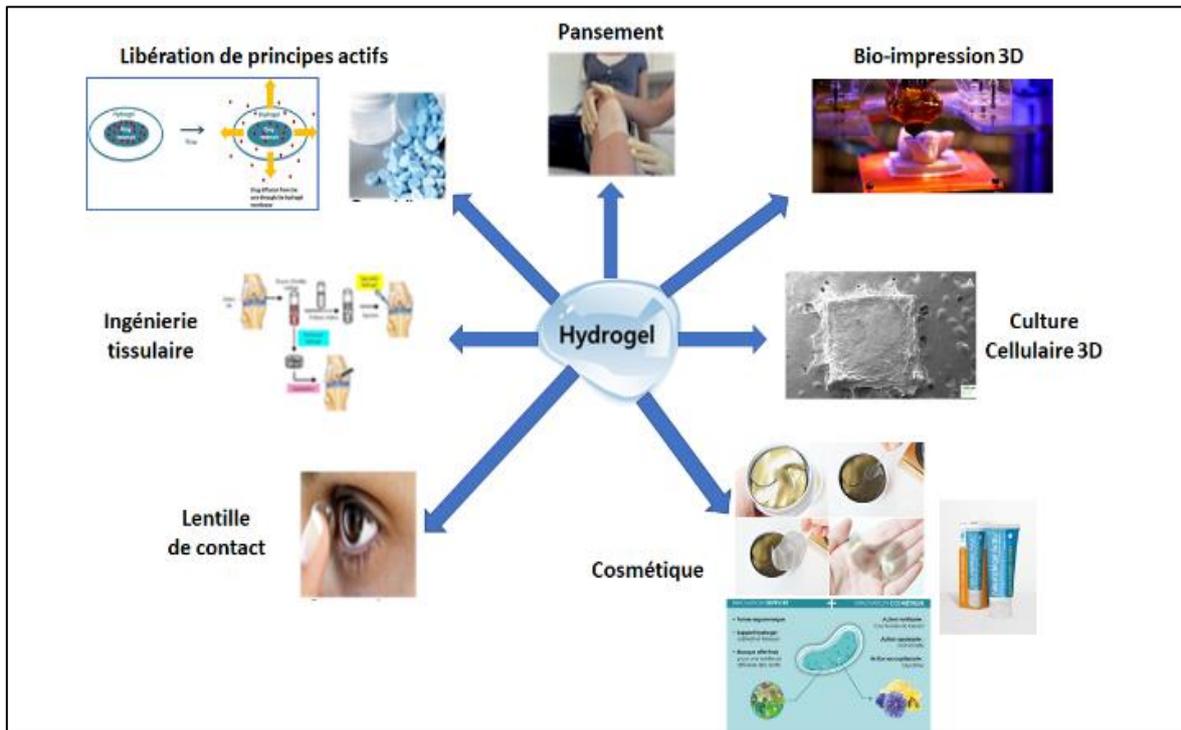


Figure A-19 : Principales applications des hydrogels

### II.6.1. Culture cellulaire

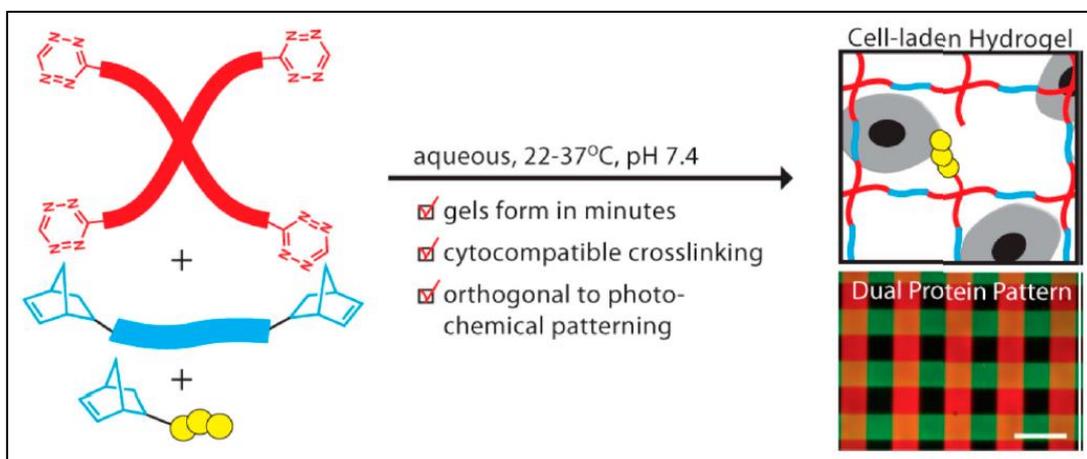
Les hydrogels sont de plus en plus étudiés comme des matériaux pour l'ingénierie tissulaire<sup>233</sup>. Depuis plus de 35 ans, ils ont été utilisés en tant que structures support (scaffold) pour l'ingénierie et notamment la reconstruction tissulaire<sup>234</sup>. Ces matériaux peuvent contenir des pores suffisamment grands pour accueillir des cellules vivantes. Ils peuvent également séquestrer des facteurs de croissances soit pour les libérer suite à la dégradation, ou pour « nourrir » les cellules vivantes qui peuvent y pénétrer à travers les pores.

En tant que matériaux destinés à l'ingénierie tissulaire, les hydrogels présentent un avantage significatif par rapport à des alternatives plus hydrophobes comme le PLGA. Cet avantage se traduit par la facilité avec laquelle on peut incorporer de façon covalente les ligands peptidiques des récepteurs membranaires cellulaires, afin de stimuler l'adhérence, la propagation et la croissance des cellules dans la matrice des hydrogels. Toutefois, la faible

résistance mécanique de ces derniers cause des difficultés importantes au niveau de la manipulation ce qui constitue l'inconvénient majeur de ces matériaux<sup>235</sup>. Un autre défi à surmonter est la stérilisation dont la procédure est un peu compliquée dans le cas des hydrogels. Ces inconvénients doivent être surmontés pour que les hydrogels deviennent plus pratiques et utiles dans ce domaine passionnant. Ces hydrogels envahis par des cellules (cancéreuses ou non) peuvent également être utilisés pour tester l'action de composés antitumoraux<sup>236</sup>.

Les hydrogels avec une teneur élevée en eau et des propriétés mécaniques semblables à celles des tissus, sont donc capables de se combiner avec des cellules pour concevoir des tissus variés *in vivo* et *in vitro*<sup>237,238</sup>. La création d'un environnement artificiel bénéfique à la croissance des cellules biologiques permettant aussi leur interaction avec leur environnement dans les trois dimensions, est une exigence cruciale pour la construction d'une quantité suffisante de tissu 3D régénérateur.

*Alge et al.* ont rapporté une nouvelle voie de réticulation chimique par « click chemistry » entre du PEG-tétrazine et un peptide-dinorbornène pour former des hydrogels capables d'encapsuler des cellules pour la culture cellulaire 3D<sup>239</sup> (Figure A-20). Ils ont choisi de fonctionnaliser le PEG avec des motifs de benzylamine tétrazine vue sa haute réactivité avec un norbornène via une cinétique très rapide.



**Figure A-20** : Synthèse d'un hydrogel destiné à la culture cellulaire 3D par la chimie click<sup>239</sup>

*Kaemmerer et al.*<sup>240</sup> ont synthétisé des hydrogels à base de gélatine modifiée par l'anhydride méthacrylique (GelMA) et les ont utilisés comme des modèles à base de sphéroïde pour le traitement *in vivo* et *in vitro* du cancer de l'ovaire (Figure A-21). La taille des hydrogels, les propriétés mécaniques et de diffusion ont été établies en contrôlant les paramètres de synthèse et les conditions de modification de la gélatine et de la gélification. De tels matériaux

à base de GelMA sont reproductibles, peu coûteux et adaptés pour la culture des cellules tumorales en 3D.

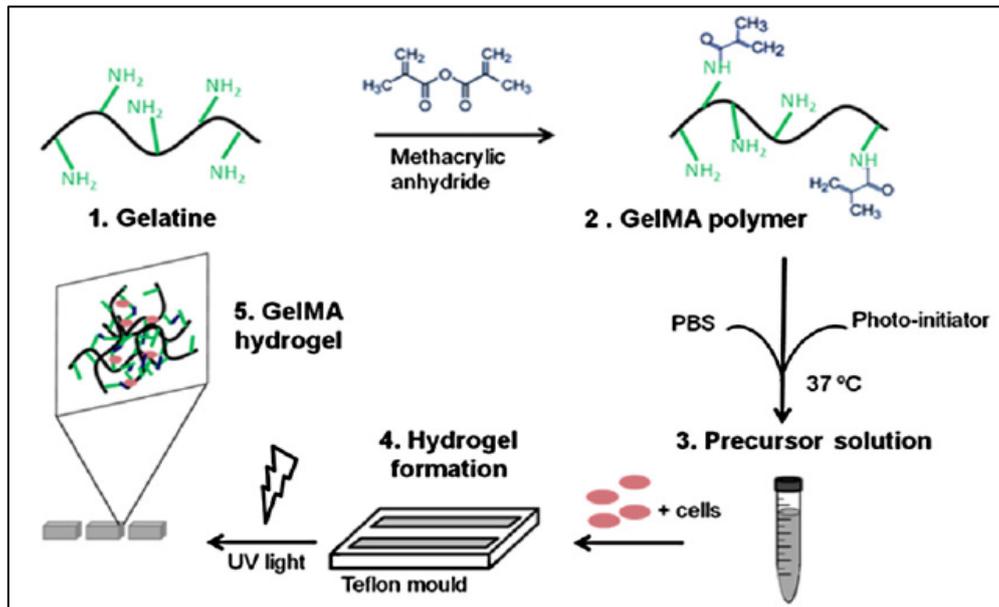


Figure A-21 : Préparation d'un hydrogel à base de GelMA<sup>240</sup>

## II.6.2. Séquestration et libération de principes actifs

La structure poreuse des hydrogels fournit une bonne matrice pour le piégeage et la protection de principes actifs contre les environnements hostiles. La quantité et la taille des pores peuvent être contrôlées en variant la densité et les conditions de la réticulation. Le taux de libération de l'actif, un autre paramètre très important pour cette application, dépend principalement du coefficient de diffusion du principe actif séquestré dans le réseau 3D mais aussi dans des systèmes adaptatifs, des conditions contrôlées sous l'effet d'un stimulus adapté (température, pH,...). La vectorisation est également possible par la présence de molécules cibles pour assurer une bonne efficacité. La biocompatibilité et la biodégradabilité peuvent être assurées en utilisant des matrices à base de polymères naturels comme les polysaccharides. Toutes ces propriétés confèrent aux hydrogels un grand potentiel pour la séquestration et la libération de principes actifs.

Les copolymères triblocs Poly(éthylène oxide)-*b*-poly(propylène oxide)-*b*-poly(éthylène oxide) (PEO-PPO-PEO), connus sous le nom générique de Poloxamer<sup>®</sup>, ont été largement utilisés dans le domaine pharmaceutique<sup>177</sup>. *Paavola et al.* ont fabriqué des hydrogel injectables à base de méthylcellulose (MC), hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), carboxyméthylcellulose (CMC), et Poloxamer pour transporter et contrôler la libération de lidocaïne (anesthésique local)<sup>241</sup>. Toutefois, les vitesses de diffusion des molécules actives à travers la matrice des hydrogels obtenus à partir de ces Poloxamer<sup>®</sup> se sont avérées élevées et

la durée de libération reste donc limitée. Ces matériaux peuvent être améliorés par une réticulation chimique avec d'autres groupements fonctionnels comme l'éthoxysilane ou une amine<sup>242,243</sup>.

La séquestration des principes actifs peut aussi être envisagée à l'aide d'interactions plus fortes avec la matrice de l'hydrogel. *Xiong et al.* ont ainsi élaboré un hydrogel par chimie supramoléculaire capable de se coupler à la doxorubicine (DOX). Tout d'abord, ils ont incorporé la DOX au sein d'un polyaldéhyde via une interaction hôte-invité. Cette interaction a été établie entre la cyclodextrine préalablement greffée sur le polyaldéhyde et l'adamantane préalablement couplée à la doxorubicine. La gélification a été produite par l'ajout de carboxyméthylcellulose donnant naissance à un hydrogel contenant la DOX (Figure A-22). La libération de ce médicament anticancéreux est déclenchée par un stimulus acide<sup>244</sup>.

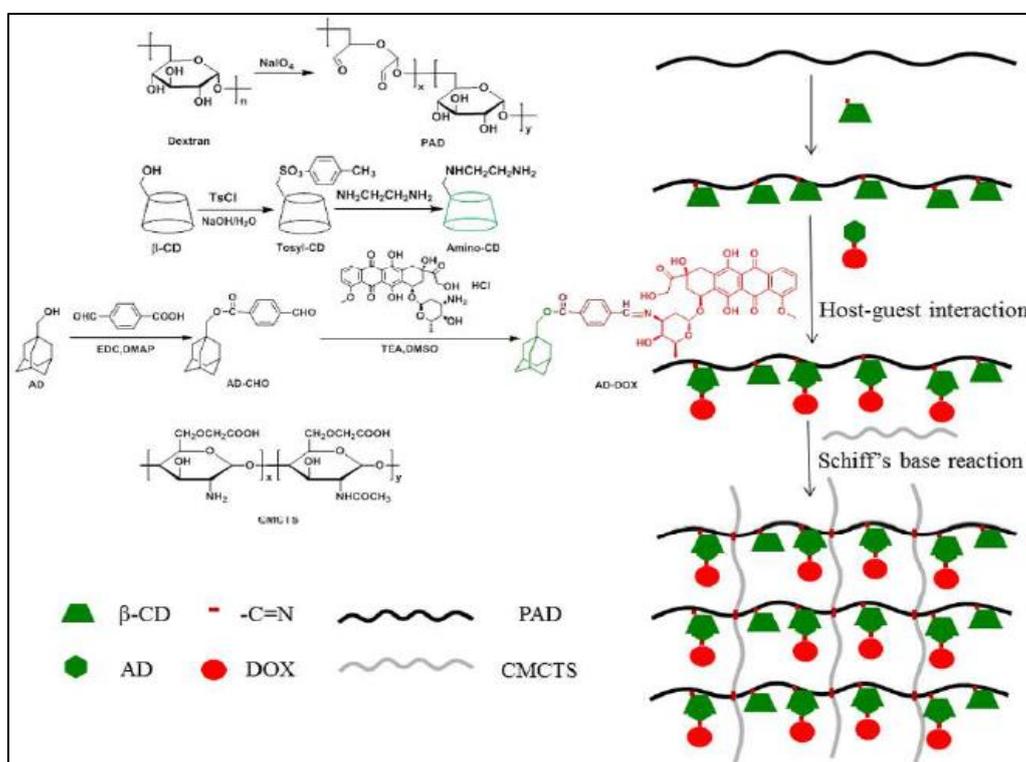


Figure A-22 : Synthèse d'un hydrogel chargé par la doxorubicine<sup>244</sup>

### II.6.3. Industrie cosmétique

Le développement du marché et des produits proposés dans l'industrie cosmétique ne cesse pas d'augmenter. Dans ce contexte les hydrogels sont de plus en plus utilisés et principalement les matrices à base de polysaccharides moins allergènes et issus de ressources renouvelables comparés à leurs homologues de synthèse<sup>245</sup>. Un nombre important de produits cosmétiques et de soins se basent actuellement sur cette nouvelle génération d'ingrédients<sup>232</sup>.

Le chitosane et le carboxyméthylhexasanoylchitosane ont été récemment acceptés par le « Personal Care Products Council » comme de nouveaux ingrédients cosmétiques selon la nomenclature INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients). Bien que certains chercheurs aient rapporté que les hydrogels à base de chitosane et de ses dérivés peuvent être utilisés comme des systèmes pour des applications cosmétiques<sup>246</sup>, à nos connaissances aucune étude n'a encore démontré que ces hydrogels peuvent être utilisés comme des ingrédients actifs dans la formulation des produits cosmétiques.

Les hydrogels à base de collagène modifié, d'acide hyaluronique ou de polyvinylpyrrolidone (Pecogel<sup>®</sup>) sont utilisés dans la formulation de masques capables d'hydrater la peau et leur capacité à rétablir leur élasticité favorise leur action anti-âge<sup>247</sup>. Une large gamme de Pecogel<sup>®</sup> existe dans le marché avec des différences au niveau de leur composition et/ou méthode de réticulation. Ces hydrogels sont aussi adaptés pour les formulations cosmétiques de type crème solaire ou mascara.

Un hydrogel pH-sensible à base de poly(acide méthacrylique-*co*-méthacrylate d'éthylène glycol) (poly(MAA-*co*-EGMA)) a été développé par *Lorenz* pour la libération de principe actif cosmétique comme l'arbutine, l'adénosine et la niacinamide, molécules efficaces dans le traitement des rides et le blanchissement de la peau<sup>248</sup>. Ces hydrogels modifient leur perméabilité en réponse au changement de pH. En effet, à pH = 4, le principe actif est retenu à l'intérieur de la matrice tandis qu'au contact de la peau (pH  $\geq$  6), la perméabilité augmente et par conséquent l'actif est libéré. Ce comportement des hydrogels est expliqué par la déprotonation des groupements acide carboxylique de MAA.

Pour conclure ce volet, comparés à d'autres types de matériaux, les hydrogels ont des propriétés distinctes et uniques telle qu'une teneur élevée en eau, un comportement de gonflement contrôlable, une facilité de construction ainsi qu'une biocompatibilité possible, ce qui a suscité l'intérêt des chercheurs pour développer ces matériaux 3D et des industriels pour les utiliser dans divers secteurs d'application. De ce fait, actuellement les hydrogels sont largement présents dans les produits de tous les jours et leur potentiel n'a pas encore été pleinement exploré. Ces matériaux ont déjà prouvé leur efficacité en s'intégrant dans le marché des pansements et des lentilles de contact. De nombreux hydrogels destinés à la libération de principe actif ou en tant que « scaffolds » pour l'ingénierie tissulaire ont été conçus et même brevetés mais il n'y en a qu'une faible quantité mise sur le marché en raison de leurs coûts de production élevés. D'autres progrès sont encore nécessaires pour élargir leur champ d'application.

### III. La nature : une source d'inspiration

Depuis des décennies et dans le monde entier, la nature a inspiré et inspire tous les scientifiques de différents domaines de recherche, allant de la biologie moléculaire à la science des matériaux. La façon, dont la vie a été maintenue et a évolué, a poussé les chercheurs à étudier les conceptions les plus complexes de la nature et à les utiliser comme source d'inspiration pour améliorer constamment notre monde.

#### III.1. Biomimétisme

##### III.1.1. Définition

Selon *Benyus*<sup>249</sup>, le biomimétisme est le processus qui consiste à s'inspirer de la nature pour concevoir des systèmes innovants. C'est devenu une façon de penser de plus en plus courante. Comment les matériaux sont-ils élaborés par la nature ? Comment la nature utilise-t-elle le caractère amphiphile des molécules ? Comment la nature protège-t-elle certaines molécules des autres dans le même système et environnement ? Comment la nature n'active-t-elle les enzymes qu'en cas de besoin ? Comprendre comment la nature fait si bien les choses avec toujours plus d'imagination que nous, comme le disait *Feynman* (prix de Nobel de physique 1965). Les réponses à toutes ces questions sont souvent le point de départ pour élaborer des stratégies innovantes et de nouveaux matériaux et produits.

Pour accéder à la définition exacte du biomimétisme, il faut tout d'abord connaître l'évolution de la définition des termes et des principes reliés à la bio-inspiration.

Le dictionnaire anglais d'Oxford attribue la première utilisation de l'adjectif « biomimétique » dans la revue *Science* (volume 132) publiée en décembre 1960. Deux articles publiés avec un intervalle de deux mois, proposent chacun une nouvelle convention de nomination pour les dispositifs qui imitent des fonctions biologiques. L'auteur du premier article revendique l'utilisation du suffixe « mime » pour de tels dispositifs<sup>250</sup> donnant naissance au terme « biomimétique » qui n'apparaissait dans aucun des articles référencés.

Ce n'est finalement qu'en 1974 que le terme « biomimétique » a été défini pour la première fois dans le dictionnaire de Merriam-Webster comme étant « l'étude de la formation, de la structure ou de la fonction des substances et de matériaux biologiquement produits comme les enzymes ou la soie, et de procédés et de mécanismes biologiques par exemple la photosynthèse ou la synthèse protéique dans le but de synthétiser des produits similaires par des mécanismes artificiels qui imitent ceux provenant de la nature ». Cette définition met

l'accent sur les processus et la synthèse associés d'avantage à la chimie qu'aux autres sciences et à une échelle limitée.

L'invention d'un terme similaire « bionique » a été introduite également en 1960 par *Steele* pendant une conférence<sup>251</sup>. Ce dernier n'a pas précisé la définition du terme mais il a interprété le sujet des défis potentiels que la recherche en biomimétique pourrait rencontrer<sup>252</sup>. Le mot « bionique » est apparu dans le dictionnaire Merriam-Webster en 1960 en tant que la science concernée par l'application des données à propos du fonctionnement des systèmes biologiques pour trouver des solutions aux problèmes d'ingénierie.

Les premières définitions des deux termes « biomimétique » et « bionique » ont mis l'accent sur le développement de produits par une coopération interdisciplinaire entre l'ingénierie, la biologie et les mathématiques. Par contre, ils n'ont pas pris en compte le terme de durabilité et de produits verts. Ce n'est que beaucoup plus tard que ces critères sont introduits dans les principes de la « bionique ». Ils étaient considérés comme des principes communs aux systèmes biologiques<sup>253</sup>. Si, au début de son apparition, le terme « bionique » n'était pas particulièrement lié au contexte de la robotique et de l'intelligence artificielle, il a certainement adopté cette connotation dans les pays anglophones lors de l'apparition du roman de *Martin Caidin* intitulé « Cyborgen » en 1972 qui a été adapté en 1974 en série télévisée « The Six Million Dollar Man ». De ce fait, le terme « bionique » est devenu lié à la conception d'une ou des parties d'un corps artificiel typiquement électromécanique. La communauté scientifique des pays anglophones a largement abandonné ce terme puisqu'il impliquait une force surnaturelle mais il reste encore utilisé dans la médecine, la robotique et l'intelligence dans les pays germanophones<sup>251</sup>.

L'utilisation du mot « biomimétisme » s'est réellement imposée à partir des années 1990 et même s'il était utilisé auparavant, son sens était encore flou. Ce terme a été ensuite popularisé par *Benyus* en 1997 dans son livre « Biomimicry : innovation inspired by nature » et qui l'a défini comme étant une nouvelle science qui étudie les modèles de la nature puis imite ou s'inspire de ces conceptions et processus pour résoudre les problèmes de l'humanité dont l'objectif principal est la durabilité<sup>254</sup>. Au fur et à mesure du temps, d'autres définitions sont apparues comme celle d'*Ataide* qui a référé le « biomimétisme » à la discipline d'application des principes de la nature pour résoudre les problèmes de l'humanité<sup>254</sup>. Une autre définition a été mise au point par *Nieuwenhuis & Lammgard* considérant le « biomimétisme » comme la tentative d'imiter les processus naturels dans les environnements créés par l'homme<sup>255</sup>. En France, entre 2014 et 2015, le ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de

l'Energie (MEDDE) a proposé deux définitions de ce terme. La première est basée sur le fait d'observer et de reproduire artificiellement des propriétés essentielles d'un ou plusieurs systèmes biologiques pour mettre au point des procédés et des organisations permettant un développement durable des sociétés à un faible coût économique et environnemental. Tandis que la deuxième définition est apparue dans la Stratégie Nationale de Transition Ecologique vers un Développement Durable (SNTEDD) 2015-2020 qui l'a interprétée comme une démarche consistant à aller chercher notre inspiration, pour une innovation durable, dans la nature.

Toutes ces définitions ont rendu leur compréhension plus compliquée au sein de la communauté scientifique. Pour résoudre ce problème, le Comité Technique ISO 266 a clarifié la définition de tous les termes par la normalisation de la biomimétique et ses dérivés. Les définitions actuelles sont donc :

- « Bionique » : Discipline technique qui cherche à reproduire, améliorer ou remplacer des fonctions biologiques par leurs équivalents électroniques et/ou mécaniques.
- « Biomimétique » : Coopération interdisciplinaire de la biologie et de la technologie ou d'autres domaines d'innovation dans le but de résoudre des problèmes pratiques par le biais de l'analyse fonctionnelle des systèmes biologiques, de leur abstraction en modèles, ainsi que le transfert et l'application de ces modèles à la solution.
- « Biomimétisme » : Philosophie et approches conceptuelles interdisciplinaires prenant pour modèle la nature afin de relever les défis du développement durable.

### III.1.2. Exemples de systèmes biomimétiques

Dans les sciences, les premiers travaux sont apparus en 1882 par *Metchnikoff* (prix Nobel de physiologie ou médecine 1908) qui a découvert l'immunité. Cette découverte a été inspirée du mécanisme de défense des larves d'étoiles de mer à partir duquel il a introduit la phagocytose comme la défense auto-immune d'un organe. En se basant sur ces travaux, les biologistes marins *Portier & Charles Richet* (prix Nobel de physiologie ou médecine 1913) ont découvert l'anaphylaxie (réaction allergique exacerbée) suite à leurs travaux sur les venins sécrétés par les filaments des méduses physalies océaniques. Ensuite, le biochimiste allemand *Otto von Warburg* (prix de Nobel de physiologie ou médecine 1931), inspiré par les oursins a mis au point le mécanisme qui empêche plusieurs spermatozoïdes de pénétrer le même ovule. Puis, on trouve les études de *Hodgkin & Huxley* (prix Nobel de physiologie ou médecine 1963) sur des encornets qui leur ont permis de définir le mécanisme de transmission des influx

nerveux. Le secret de la mémoire à long terme des Aplysies et la Cycline B (protéine principale impliquées dans la régulation du cycle cellulaire) ont été découverts respectivement par *Kandel* (prix Nobel de physiologie ou médecine 2000) et *Hunt et al.* (prix Nobel de physiologie ou médecine 2001). Shimomura (prix Nobel de physiologie ou médecine 2008) a déchiffré la protéine fluorescente verte (GFP) à partir d'une méduse *Aequorea Victoria*. Par l'étude d'un protozoaire cilié appelé *Tetrahymena*, *Blackburn, Greider & Szvostak* (prix Nobel 2009) ont pu définir le mécanisme de réplication des chromosomes 'primordial' dans le traitement du cancer et du vieillissement.

En ce qui concerne les hydrogels, cette imitation n'est pas aussi facile qu'il n'y paraît car il existe des différences fondamentales dans la façon dont les systèmes naturels sont formés et les procédés d'élaboration de systèmes synthétiques surtout dans le domaine de la chimie<sup>256</sup>. Dans la nature, l'évolution se produit au niveau moléculaire pour augmenter l'efficacité et répondre aux besoins biologiques. Les systèmes synthétiques se basent quant à eux plutôt sur une approche macroscopique. L'approche « top-down » n'est pas capable de produire exactement le même objet que l'approche « bottom-up ». Pour cette raison, imiter les systèmes naturels semble produire des objets qui peuvent ressembler à ces systèmes mais ils ne peuvent pas acquérir les mêmes fonctions.

L'une des propriétés primordiales que les hydrogels doivent posséder pour imiter les systèmes naturels est la vitesse de réponse. On retrouve ces propriétés dans le comportement des plantes sensibles (par exemple *Minosa pudicia*), des cellules non musculaires, des moteurs flagellaires bactériens et des systèmes contractiles musculaires<sup>257</sup>. Ils ont évolué de façon remarquable depuis des milliers d'années. De ce fait, pour les imiter, il faut souvent les déconstruire pour mieux les comprendre et par conséquent faciliter leur conception<sup>256</sup>.

### **III.2. Exemples de dérivés naturels greffés sur des polysaccharides**

Les plantes dominent quasiment tous les environnements terrestres avec une incroyable diversité écologique, structurelle et chimique. Elles ont également la capacité de s'adapter aux changements environnementaux et climatiques et d'affronter de nouveaux stress. Elles ont ainsi pu résister aux dommages causés par les attaques bactériennes ou fongiques, la lumière UV, la sécheresse, la perte d'un support structurel ou encore les fluctuations importantes et extrêmes de la température<sup>258</sup>. Cette résistance et cette adaptation sont dues principalement à l'évolution de nouveaux mécanismes de protection spécialisés à partir du métabolite<sup>259</sup>. Au lieu d'éviter les contraintes environnementales par la mobilité, les plantes s'adaptent en construisant des

barrières physiques et en produisant des composés spécifiques et actifs pour faire face aux environnements hostiles<sup>260</sup>. Parmi ces produits, on trouve les composés phénoliques et les acides gras insaturés.

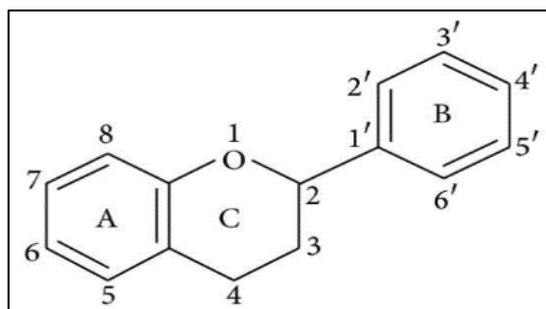
### III.2.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols constituent un groupe très large de métabolites secondaires présents dans toutes les plantes et représentent les substances phyto-chimiques les plus attractives en raison de leur utilisation potentielle en tant qu'additifs dans l'industrie alimentaire, cosmétique, et la médecine. Actuellement, l'intérêt des chercheurs et des industriels est de les récupérer à partir de la flore sauvage, des plantes cultivées et des déchets de l'agriculture et de l'industrie alimentaire. Les composés phénoliques sont considérés comme les constituants les plus abondants des plantes. Les principales sources de ces composés sont les fruits et légumes, les grains, les céréales, les baies, les boissons (vin, thé et jus), les olives et les plantes aromatiques. Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont porté une attention particulière à la présence de ces composés dans le bois et les déchets agricoles et industriels<sup>261,262</sup>.

Les composés phénoliques sont donc l'un des groupes de composés aromatiques les plus nombreux et les plus largement distribués dans le règne végétal avec plus de 8000 structures phénoliques actuellement connus dont les flavonoïdes présentent plus de 4000<sup>263</sup>. En général, ces composés sont présents sous forme d'ester ou de glycoside conjugué à d'autres composés comme les alcools, les acides gras hydroxylés, les stérols et les glucosides. D'un point de vue chimique, les polyphénols sont des composés naturels à structure aromatique contenant un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou sans voisinage d'un hétérocycle et qui contiennent des groupements fonctionnels comme les hydroxyle, carboxyle, méthoxy et carbonyle. Selon leur fonction biologique, les composés phénoliques peuvent être partagés en deux classes ; les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

#### III.2.1.1. Les flavonoïdes

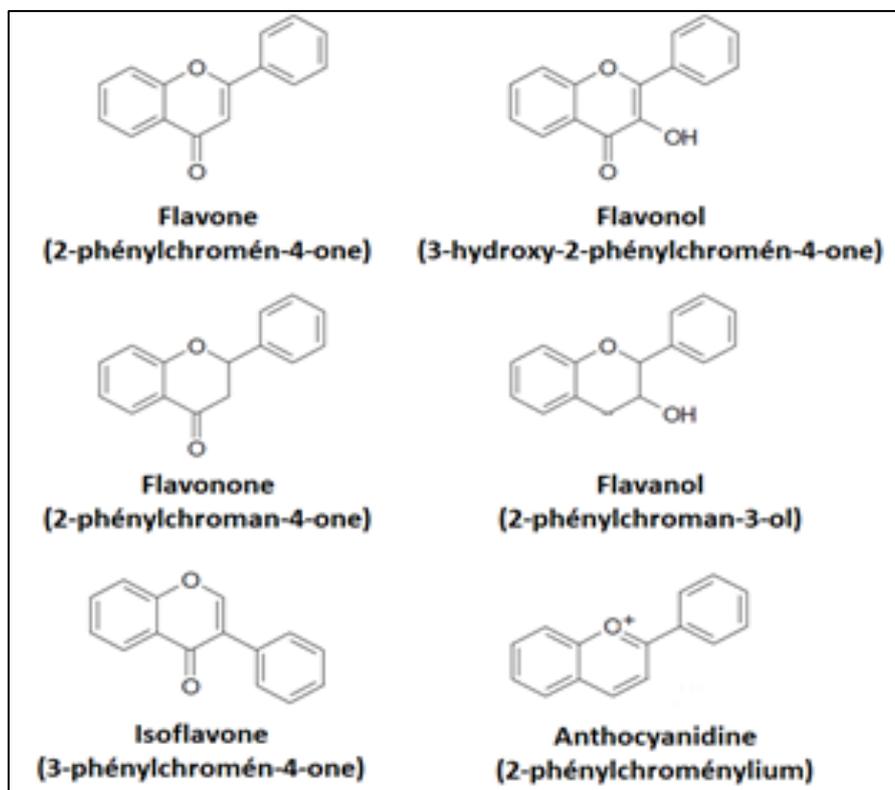
Les flavonoïdes, présents principalement sous forme de glycosides, sont une classe de composés phénoliques qui, avec les caroténoïdes et la chlorophylle, sont responsables de la couleur de nombreuses espèces de fleurs et de fruits<sup>264</sup>. Les flavonoïdes possèdent plusieurs propriétés biologiques y compris des activités antibactériennes, anti-inflammatoires, antiallergiques et antithrombiques<sup>265</sup>. Le terme flavonoïde est attribué aux composés polyphénoliques de structure générale C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> dans laquelle deux cycles aromatiques (A et B) sont liés par un pyrane (C) (Figure A-23).



**Figure A-23** : Structure chimique de base d'un flavonoïde

Selon l'état d'oxydation du noyau central, les flavonoïdes sont divisés en six sous-groupes : flavones, flavonols, flavanols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines (Figure A-24)<sup>266</sup>. Ces sous-groupes se distinguent également par le nombre, la position et la nature des substituants des cycles aromatiques.

Vues leurs structures chimiques hydrophobes et leurs propriétés biologiques intéressantes, les flavonoïdes ont été largement utilisés pour les modifications hydrophobes des polysaccharides. De nombreuses études ont été menées sur leur greffage à travers différentes voies de modification (Voir A-I.2.1 et A-I.3.1). Pour plus de détails, la revue de *Liu et al.* regroupe les principales modifications des polysaccharides par des flavonoïdes<sup>267</sup>.



**Figure A-24** : Structures chimiques des six sous-groupes des flavonoïdes

### III.2.1.2. Les composés phénoliques non-flavonoïdes

Ils peuvent être classés selon leur structure chimique avec les groupes suivants : les lignanes, les stilbènes et les acides phénoliques<sup>268</sup>.

Les lignanes constituent un groupe de composés phénoliques naturels avec des squelettes carbonés dérivés de deux unités phénylpropane reliées par au moins une liaison carbone-carbone entre les deux  $\beta$ -carbones centraux des chaînes  $C_3$  (lignanes) ou par d'autres liaisons que  $\beta$ - $\beta'$ -carbone-carbone (Figure A-25). Dans les deux cas de liaison, les composés obtenus sont appelés néolignanes<sup>269</sup>. Dans la nature, les lignanes sont présents sous forme d'aglycones tandis que leurs glycosides ne sont présents qu'en petites quantités<sup>261</sup>.

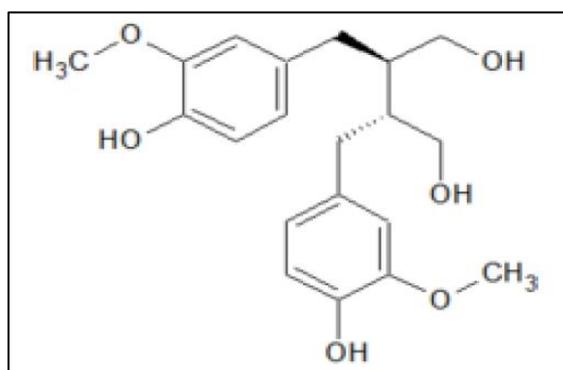


Figure A-25 : Structure chimique de la lignane

Les stilbènes sont une autre classe de composés phénoliques non-flavonoïdes avec le 1,2-diphényléthylène comme structure de base. Le resvératrol (Figure A-26) est le principal composé de cette classe. Il peut exister sous forme de deux stéréo-isomères de configuration cis ou trans<sup>270</sup>. Le resvératrol se trouve dans des petits fruits comme le raisin, le bleuet ou encore l'arachide<sup>271</sup>. L'intérêt pour ce composé vient de la possibilité de son utilisation dans le traitement des maladies cardiovasculaires, dans la protection des neurones et aussi dans la lutte contre les déficiences motrices qui conduisent aux problèmes de mobilité des personnes âgées<sup>272</sup>.

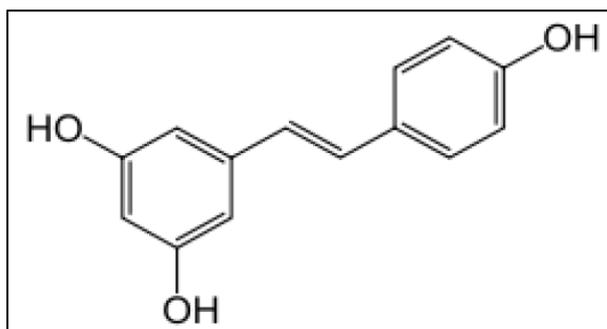
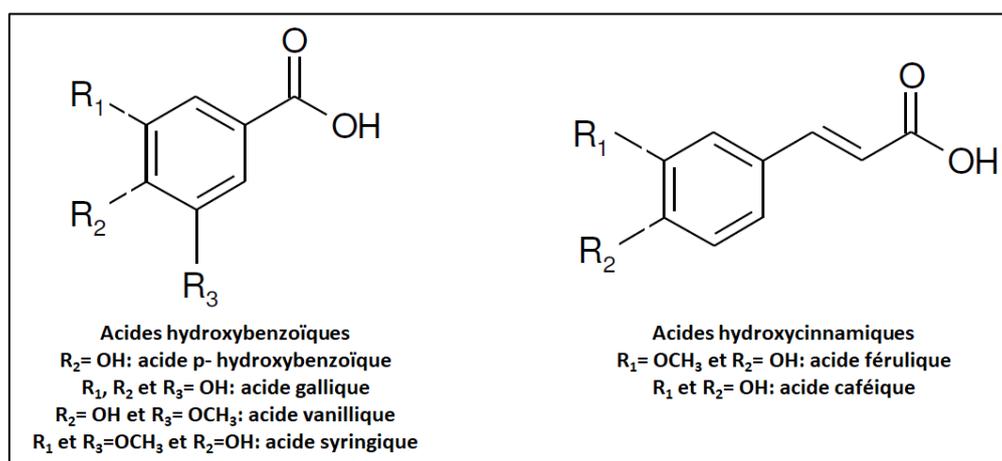


Figure A-26 : Structure chimique du resvératrol

La dernière classe des composés phénoliques non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques. Ils sont caractérisés par la présence d'une fonction acide carboxylique et d'un noyau aromatique substitué par un ou plusieurs fonctions hydroxyle. Les acides phénoliques sont les polyphénols les plus abondants dans les aliments ( $\approx 30\%$ ) et se trouvent sous différentes formes dans les plantes y compris les aglycones (acides phénoliques libres), les esters, les glycosides et/ou les complexes liés<sup>273</sup>. Selon la position du groupe hydroxyle, les acides phénoliques peuvent être divisés en deux principaux groupes : les acides hydroxybenzoïques (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) et les acides hydroxycinnamiques (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Figure A-27)<sup>263</sup>.

Les acides hydroxybenzoïques les plus courants sont les acides gallique, vanillique et syringique. Parmi les acides hydroxycinnamiques, les acides caféique et férulique sont les composés les plus abondants dans les aliments. L'acide caféique se trouve principalement sous forme d'ester (acide chlorogénique) et il est largement obtenu à partir du café, des fruits et des légumes<sup>274</sup>.



**Figure A-27** : Structures des principaux acides phénoliques

L'acide férulique (FA) (acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique) est le composé phénolique le plus abondant des acides hydroxycinnamiques contenus dans les parois cellulaires végétales des céréales et représente près de 95% des acides phénoliques présents dans le son de blé, les céréales et le maïs<sup>275</sup>. Il est couplé par un lien ester aux polysaccharides de la paroi cellulaire, principalement les arabinoxylanes, polysaccharides les plus abondants<sup>276</sup> (Figure A-28). Plusieurs études ont montré des propriétés et des rôles très intéressants de FA. Il possède une large palette d'activités notamment des activités antioxydantes, antiallergiques, antimicrobiennes, biocompatibles, anti-inflammatoires, antivirales, antithrombotiques, antidiabétiques, anticancéreuses, anti-hépatotoxiques et photoprotectrices<sup>277</sup>. Par conséquent, on le trouve dans de nombreuses applications dans divers secteurs<sup>277</sup>. En plus de ces propriétés,

ce composé phénolique a la capacité de dimériser par oxydation en présence de laccase<sup>278,279</sup>, une enzyme largement distribuée dans les plantes, les champignons, les bactéries et les insectes et qui forme avec ses homologues la famille des oxydases multi-cuivrés.

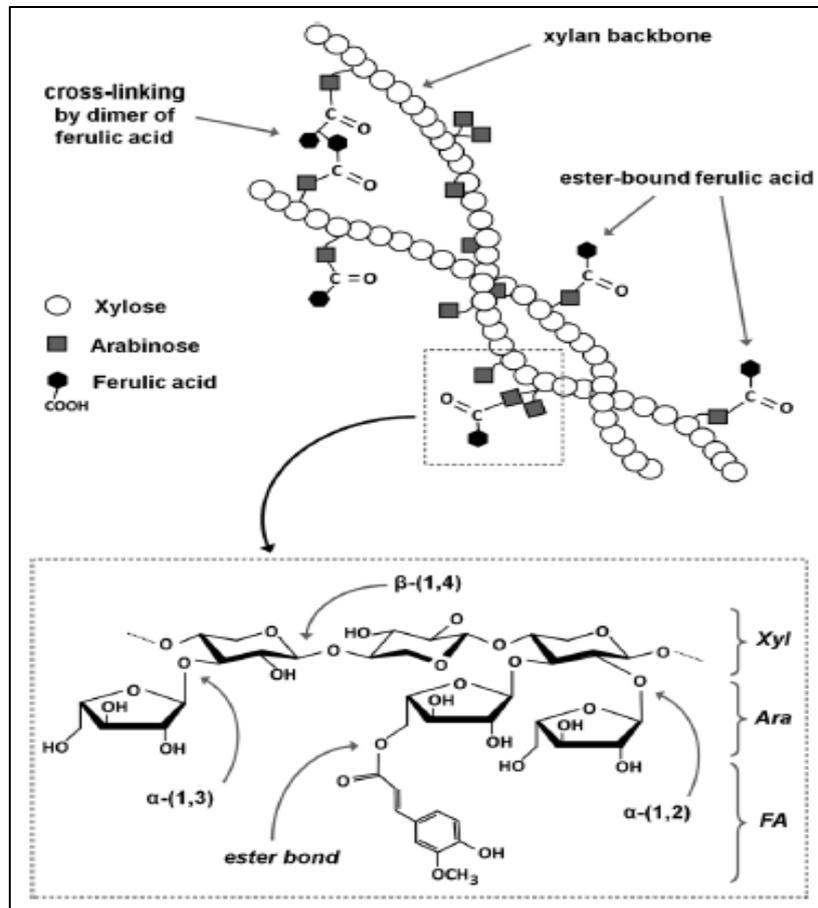
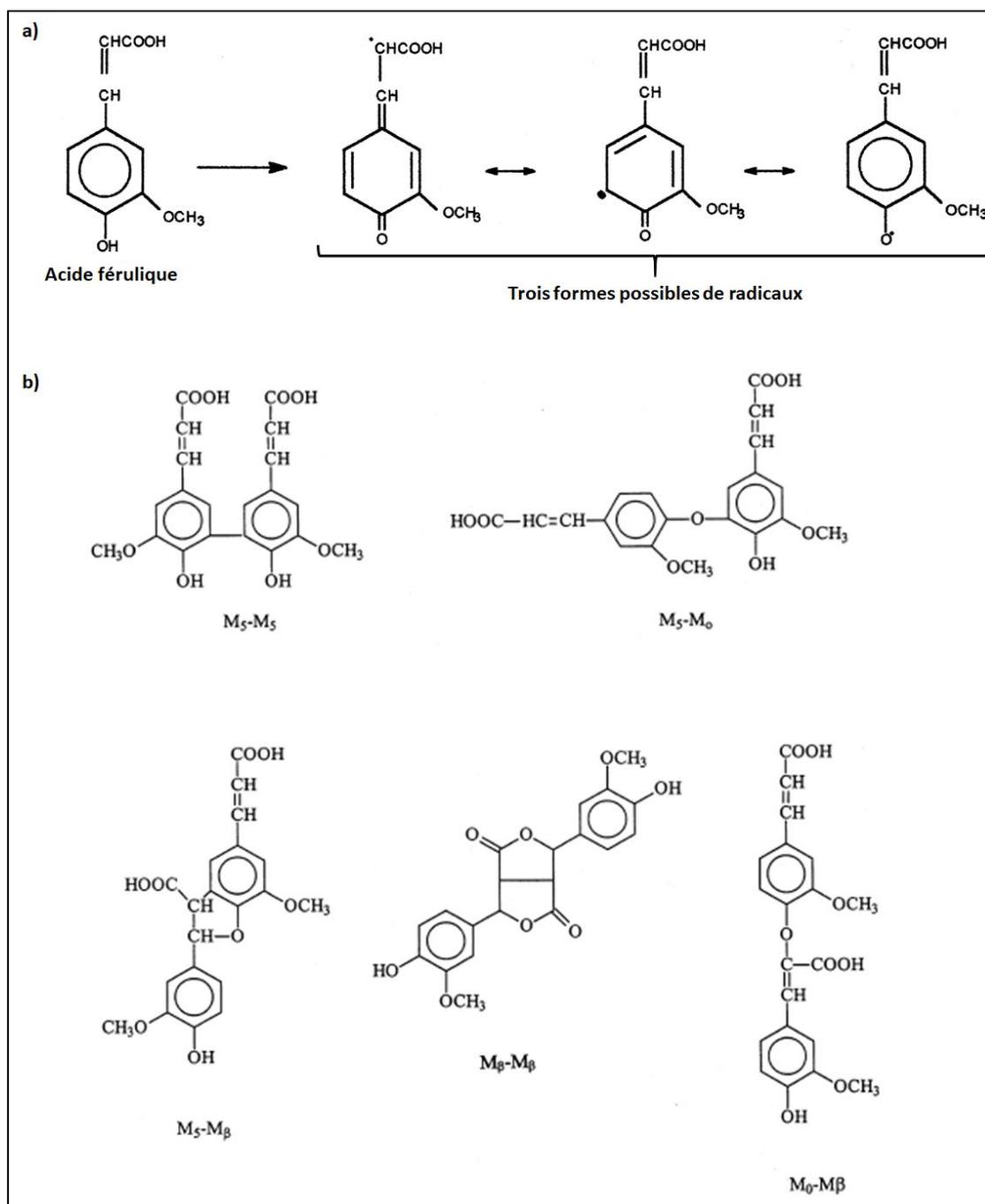


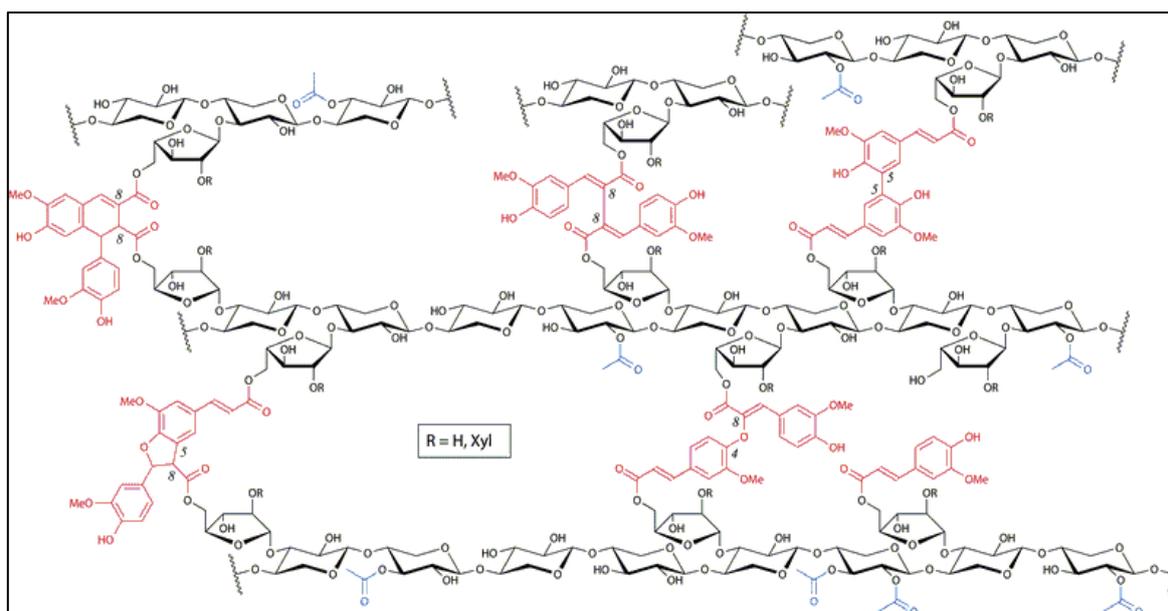
Figure A-28 : Acide férulique lié à l'arabinoxylane du son de blé<sup>280</sup>

Selon les travaux de *Carunchio et al.*, suite à l'oxydation par la laccase, trois différents radicaux de FA ( $M_O$ ,  $M_5$  et  $M_\beta$ ) peuvent se former ce qui induit la possibilité de production de cinq différentes formes de dimères ( $M_5-M_5$ ,  $M_5-M_O$ ,  $M_5-M_\beta$ ,  $M_\beta-M_\beta$ ,  $M_O-M_\beta$ ) sans tenir compte du dimère  $M_O-M_O$  qui peut se former suite à la liaison O-O vue l'instabilité des peroxydes de diaryle<sup>279</sup> (Figure A-29). *Adelakun et al.* ont également étudié les différentes formes possibles de dimères de FA et ont démontré que les formes  $M_5-M_\beta$  et  $M_\beta-M_\beta$  sont les plus prédominantes<sup>278</sup>.



**Figure A-29 :** a) Structure des trois formes possibles de radicaux d'acide férulique<sup>279</sup>. b) Les cinq formes possibles de dimères d'acide férulique<sup>279</sup>

Les dimères de FA ont été observés dans les grains et la paroi cellulaire des plantes dont le rôle est de réticuler par liaison covalente les chaînes arabinoxylane et éventuellement les arabinoxylane et lignine pour renforcer la structure de ces espèces. Ces nœuds de réticulation permettent également l'élaboration d'hydrogels capables de retenir l'eau autour des graines, nécessaire à la croissance des plantes (Figure A-30).



**Figure A-30** : Structure de l'hémicellulose de la paroi cellulaire de l'herbe montrant la réticulation des arabinoxylyanes par les dimères d'acide férulique représentés en couleur rouge<sup>281</sup>

L'acide férulique a fait l'objet de plusieurs modifications chimiques de polysaccharides afin d'améliorer les propriétés biologiques de ces derniers et surtout leurs activités antioxydantes. Les premiers travaux de greffage de FA ont été réalisés sur la cellulose afin d'améliorer son hydrosolubilité (en réduisant la cristallinité de ce polysaccharide) et son activité antioxydante. La réaction de modification est basée sur la création de lien ester entre l'acide carboxylique de l'acide férulique et les fonctions hydroxyle de la cellulose<sup>282</sup>. Deux différentes méthodes ont été testées. La 1<sup>ère</sup> a été faite dans un milieu homogène DMAc/LiCl à 80°C pendant 30 min et a abouti à un DS de 56%. La 2<sup>ème</sup> méthode a été réalisée dans un milieu hétérogène l'éther diéthylique anhydre en utilisant le chlorure de thionyle et la pyridine à 0°C pendant 1h et le DS obtenu était de 68%. La 1<sup>ère</sup> méthode a été également utilisée par *Cassano et al.* afin de greffer l'acide férulique sur un hydrogel de dextrane et ils ont obtenu un DS de 0,4%<sup>36</sup>. L'amélioration de l'hydrosolubilité et des propriétés antioxydantes du chitosane a été aussi visée par *Woranuch et al.* par le greffage de FA détaillé précédemment (Voir A-I.2.3.1)<sup>123</sup>. L'acide férulique a été aussi greffé sur l'acide hyaluronique en utilisant l'agent de couplage bisimidazole dans le formamide. Différents DS ont été obtenus allant de 3 à 17%. Une diminution notable de la solubilité des dérivés HA-FA dans NaCl 0,2M a été observée et une insolubilité totale a été détectée à partir d'un DS de 15%<sup>283</sup>. Cette chimie d'imidazole a été utilisée également dans d'autres travaux plus récents dans le but de modifier l'amidon par l'acide férulique mais cette fois en utilisant le CDI comme agent de couplage. La synthèse repose sur la création de lien ester entre les fonctions OH du polysaccharide et la fonction acide du composé phénolique. La

réaction s'est déroulée dans le DMSO anhydre sous diazote et à une température de 60°C pendant 16h et les DS obtenus varient entre 13 et 35%<sup>28</sup>. Récemment, *Yang et al.* ont réussi à greffer l'acide férulique sur le chitosane dans un milieu aqueux en utilisant la laccase de *Bacillus vallismortis fmb-103* (fmb-rL103)<sup>284</sup>. Après plusieurs tests, les conditions optimales de la réaction étaient : un pH= 6.5, temps de réaction 1h, température 60°C et une concentration de laccase de 3U/mL. Ces conditions ont permis l'obtention d'un DS de 19,2 et 22,5 % pour deux chitosanes de forte masse molaire  $1,5 \times 10^5$  et  $4 \times 10^5$  g/mol respectivement.

L'origine naturelle de l'acide férulique, son abondance, ses applications potentielles, la possibilité de le greffer sur des polysaccharides et sa capacité à dimériser par la laccase nous ont inspiré pour trouver une idée originale et innovatrice pour élaborer des hydrogels à propriétés contrôlées.

### III.2.2. Les acides gras

Les principaux constituants des huiles végétales sont les triglycérides qui sont obtenus à partir de l'estérification du glycérol. Leurs structures sont composées de trois acides gras. Ces acides représentent 95% de la masse totale des triglycérides et sont très abondants dans les aliments<sup>285</sup>. Chaque huile végétale contient différents triglycérides avec différentes chaînes d'acide gras. Les acides gras (AG) et ses esters méthyliques peuvent être récupérés et purifiés de l'huile végétale respectivement par saponification et transestérification au méthanol. Les acides gras présentent un nombre de carbone variable de 4 à 36 carbones saturés, mono ou polyinsaturés appelés alors 'oméga-x' avec x le nombre d'insaturations pouvant aller jusqu'à 6. La composition des huiles végétales en acide gras varie en fonction de la plante, de la culture, de la saison, des conditions de croissance, de l'année et de l'emplacement des cultures. Le Tableau A-5 regroupe les compositions en acide gras des huiles végétales les plus courantes.

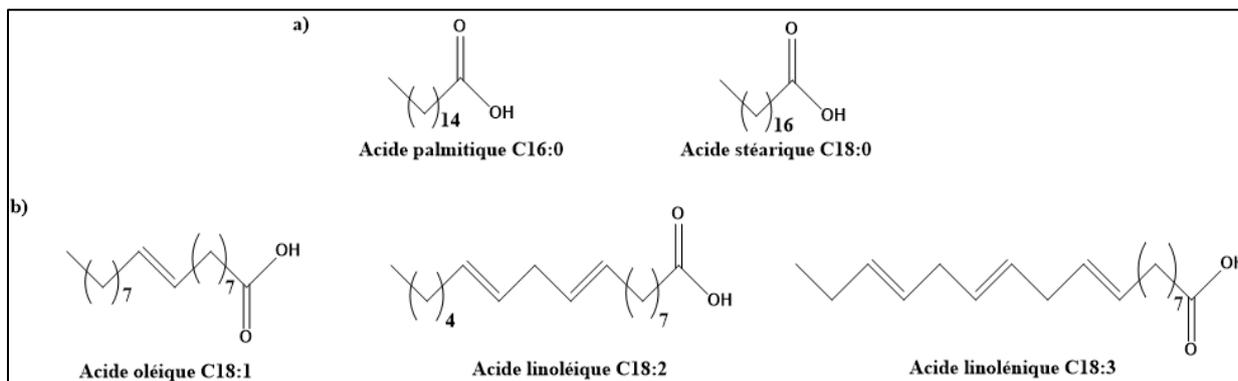
**Tableau A-5 : Composition en acide gras des principales huiles végétales**

Huile végétale	Cn :x <sup>a</sup>								
	14 :0	16 :0	16 :1	18 :0	18 :1	18 :2	18 :3	20 :0	20 :1
<b>Colza</b>	0,1	4,1	0.3	1,8	60,9	21	8,8	0,7	1
<b>Maïs</b>	0,1	10,9	0.2	2	25,4	59,6	1,2	0,4	0
<b>Lin</b>	0	5,5	0	3,5	19,1	15,3	56,6	0	0
<b>Olive</b>	0	13,7	1.2	2,5	71,1	10	0,6	0,9	0
<b>Palme</b>	1	44,4	0.2	4,1	39,3	10	0,4	0,3	0

<b>Soja</b>	0,1	11	0.1	4	23,4	53,2	7,8	0,3	0
<b>Tournesol</b>	0	6,1	0	3,9	42,6	46,4	1	0	0
<b>Ricin</b>	0	0,8- 1,1	0	0,7-1	2,2- 3,3	4,1- 4,7	0,5- 0,7	0	0

<sup>a</sup> Cn :x avec Cn le nombre de carbone et x le nombre d'insaturation

Parmi les acides gras saturés (AGS), l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C18 :0) sont les plus connus (Figure A-31-a). Les acides gras insaturés (AGI) produits naturellement ont une configuration *trans* et se trouvent généralement dans les produits laitiers et les viandes ainsi que dans les huiles végétales. Une consommation élevée d'AGI *trans* augmente les taux de lipoprotéines à basse densité (LDL) et réduit la concentration de lipoprotéines à haute densité (HDL)<sup>286</sup>. Les acides gras insaturés les plus connus sont l'acide oléique (C18 :1), linoléique (C18 :2) et linoléique (C18 :3) (Figure A-31-b).



**Figure A-31** : Structures des acides gras les plus répandus : **a)** saturés. **b)** insaturés

Les acides gras sont généralement classés en fonction de  $n$  dont dépendent leurs propriétés physiques en particulier leur solubilité dans l'eau. Jusqu'à  $n < 12$ , les AG ont des chaînes aliphatiques courtes et sont donc généralement solubles dans l'eau et si  $n \geq 12$  ils perdent leur hydrosolubilité. Comme toutes les molécules amphiphiles dans les solvants polaires, les acides gras ont des propriétés tensioactives et émulsifiantes. Les AG sont solubles dans la plupart des solvants organiques comme l'éthanol et le DMSO. Ils possèdent plusieurs fonctions biologiques qui peuvent être classées en quatre grands groupes : stockage, structure, signalisation et transport. La majorité des organismes les utilisent pour stocker de l'énergie sous forme d'huiles (pour les plantes et poissons) et sous forme de graisses (dans le cas des mammifères) car ils peuvent libérer plus d'énergie que les sucres lors de leur oxydation. L'une des fonctions structurelles les plus importantes des acides gras est leur présence sous formes de phospholipides et de stérols dans la membrane biologique formant une couche bi-lipidique qui

agit comme une barrière aux molécules et ions polaires. Les AG peuvent aussi jouer le rôle de cofacteurs d'enzymes, d'émulsifiants, d'hormones et de messagers intracellulaires. Ils jouent un rôle actif dans le trafic métabolique. Les AG peuvent également réagir comme molécules capables d'absorber la lumière visible<sup>286</sup>.

Dans la littérature, de nombreuses études ont été menées dont le but était la modification hydrophobe des polysaccharides par ces acides gras afin d'obtenir des dérivés amphiphiles. Parmi ces études, on peut citer celle d'*Huerta-Angeles et al.* qui ont couplé l'acide hyaluronique avec l'acide linoléique (C18 :3) par la méthode des anhydrides mixtes de benzoyle dans des conditions douces<sup>287</sup>. Ils ont utilisé un mélange de solvant eau/isopropanol (0,7/0,3, v/v) et le couple DMAP/ETA comme agent de couplage pendant 2h à 25°C. Avec ces conditions opératoires, ils ont obtenu des DS allant de 8,5 à 10,7 %. La séquestration de médicaments hydrophobes par les dérivés obtenus a été démontrée. *Wang et al.* ont également utilisé les acides gras de l'huile de soja afin de modifier la cellulose (Voir II.2.1)<sup>19</sup>. Les acides linoléique<sup>124</sup>, oléique<sup>121</sup> et stérique<sup>125</sup> ont été aussi greffés sur le chitosane avec la même méthode. Dans les trois cas, les auteurs ont solubilisé le chitosane dans une solution aqueuse d'acide acétique (1% v/v) en présence d'un agent activateur EDC et de l'acide gras solubilisé préalablement dans l'éthanol ou le méthanol. Tous les dérivés obtenus possédaient des propriétés auto-associatives très intéressantes.

Les acides gras insaturés possèdent donc des propriétés importantes, des fonctions biologiques primordiales et contiennent dans leur structure des doubles liaisons qui peuvent être exploités comme des fonctions réactives pour la réticulation. Afin d'explorer une deuxième voie de réticulation 'verte', nous étudierons dans ce travail le greffage d'acide gras insaturés sur des polysaccharides modèles et d'intérêt et l'élaboration d'hydrogels.

## Conclusion

Ce chapitre a débuté par une présentation générale des polysaccharides qui ont été classifiés par la suite en deux groupes selon la présence ou non de charges sur leur squelette. Les principaux polysaccharides neutres et chargés ont été ainsi explorés en mettant en avant les polysaccharides sélectionnés pour notre étude (le pullulane, le carboxyméthylpullulane et l'acide hyaluronique). Les principales modifications chimiques des polysaccharides neutres et chargés par des molécules hydrophobes ont été détaillées avec les différentes stratégies, les conditions opératoires et les agents de couplage utilisés selon la nature des fonctions réactives

présentes sur la molécule hydrophobe et le polysaccharide. Nous avons également reporté le comportement auto-associatif de ces systèmes.

Ensuite, dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux hydrogels physiques et chimiques en exposant les différentes voies possibles de leur formation en accordant une attention particulière aux hydrogels à base de pullulane, de son dérivé CMP et de l'acide hyaluronique. Les propriétés uniques de structure, mécanique et de gonflement des hydrogels ont été aussi présentées prouvant le grand intérêt des chercheurs et des industriels. Cette partie s'est conclue par la présentation des principales applications des hydrogels dans les différents domaines allant de l'ingénierie tissulaire jusqu'au secteur cosmétique.

Pour finir, la nature, qui n'arrête pas de nous fasciner et de nous inspirer, a été explorée en définissant tout d'abord le biomimétisme. Des exemples de systèmes biomimétiques dans différents domaines des sciences de la médecine et de la physiologie et des hydrogels ont été présentés. La nature est également une source de molécules aux propriétés et fonctions biologiques notables parmi lesquels nous avons cité les composés phénoliques et les acides gras auxquels appartiennent respectivement l'acide férulique et les acides gras insaturés. La localisation, la structure et les propriétés de ces deux molécules ou famille de molécules ont été évoquées notamment leurs activités et fonctions biologiques intéressantes dont nous nous sommes inspirés pour nos travaux de recherche.

En se basant sur cette étude bibliographique, nous avons décidé d'élaborer des hydrogels chimiques par deux méthodes. La première, biomimétique, consistera à greffer l'acide férulique sur deux polysaccharides modèles neutre et anionique respectivement le pullulane et le carboxyméthylpullulane (CMP). La réticulation des dérivés greffés sera assurée par la laccase, enzyme qui a la capacité de dimériser par oxydation les motifs d'acide férulique pour assurer des points de réticulation. Cette stratégie sera transférée ensuite à un polysaccharide d'intérêt, l'acide hyaluronique. La deuxième méthode consistera à greffer des acides gras insaturés sur le CMP et l'acide hyaluronique. La formation des hydrogels sera assurée cette fois par la photoréticulation des doubles liaisons des AGI présents sur le squelette modifié du polysaccharide.

## Références bibliographiques

1. Dumitriu, S. *Polysaccharides : structural diversity and functional versatility*. (Marcel Dekker, 2005).
2. R.H. Walter. Polysaccharide dispersions: Chemistry and technology in food. *Acad. Press. San Diego, California, USA* 236 (1997).
3. Guo, M. Q., Hu, X., Wang, C. & Ai, L. Polysaccharides: Structure and Solubility. in *Solubility of Polysaccharides* (InTech, 2017).
4. Kouassi, M.C., Thébault, P., Rihouey, C., Dé, E., Labat, B., Picton, L. & Dulong, V. Carboxymethylpullulan Grafted with Aminoguaiacol: Synthesis, Characterization, and Assessment of Antibacterial and Antioxidant Properties. *Biomacromolecules* **18**, 3238–3251 (2017).
5. Dulong, V., Cerf, D. Le, Picton, L. & Muller, G. Carboxymethylpullulan hydrogels with a ionic and/or amphiphilic behavior: Swelling properties and entrapment of cationic and/or hydrophobic molecules. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **274**, 163–169 (2006).
6. Glinel, K., Huguet, J. & Muller, G. Comparison of the associating behaviour between neutral and anionic alkylperfluorinated pullulan derivatives. *Polymer (Guildf)*. **40**, 7071–7081 (1999).
7. Legros, M., Cardinael, P., Dulong, V., Picton, L. & Le Cerf, D. Metastable Amphiphilic Hydrogels Based on Crosslinked Carboxymethylpullulan. *Polym. J.* **40**, 233–240 (2008).
8. Dulong, V., Mocanu, G. & Le Cerf, D. A novel amphiphilic pH-sensitive hydrogel based on pullulan. *Colloid Polym. Sci.* **285**, 1085–1091 (2007).
9. Belbekhouche, S., Ali, G., Dulong, V., Picton, L. & Le Cerf, D. Synthesis and characterization of thermosensitive and pH-sensitive block copolymers based on polyetheramine and pullulan with different length. *Carbohydr. Polym.* **86**, 304–312 (2011).
10. Bauer, W. J., Badoud, R., Löliger, J. & Aebischer, P. *Science et technologie des aliments principes de chimie des constituants et de technologie des procédés*. (Presses polytechniques et universitaires romandes, 2010).
11. Fischer, S., Thümmel, K., Volkert, B., Hettrich, K., Schmidt, I. & Fischer, K. Properties and Applications of Cellulose Acetate. *Macromol. Symp.* **262**, 89–96 (2008).
12. Fernández de la Ossa, M. Á., López-López, M., Torre, M. & García-Ruiz, C. Analytical techniques in the study of highly-nitrated nitrocellulose. *TrAC Trends Anal. Chem.* **30**, 1740–1755 (2011).
13. Zhang, L.-M. New Water-Soluble Cellulosic Polymers: A Review. *Macromol. Mater. Eng.* **286**, 267–275 (2001).
14. Heinze, T. & Koschella, A. Carboxymethyl Ethers of Cellulose and Starch - A Review. *Macromol. Symp.* **223**, 13–40 (2005).
15. Nevell, T. P. Cellulose and its derivatives: Chemistry, biochemistry and applications edited by J. F.

- Kennedy, G. O. Phillips, D. J. Wedlock and P. A. Williams., *Br. Polym. J.* **17**, 378–388 (1985).
16. Desbrieres, J., Peptu, C. A., Savin, C. L. & Popa, M. Chemically Modified Polysaccharides With Applications in Nanomedicine. in *Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value* 351–399 (Elsevier, 2018).
  17. Landoll, L. M. Nonionic polymer surfactants. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **20**, 443–455 (1982).
  18. Nyström, B., Kjøniksen, A.-L., Beheshti, N., Zhu, K. & Knudsen, K. D. Rheological and structural aspects on association of hydrophobically modified polysaccharides. *Soft Matter* **5**, 1328–1340 (2009).
  19. Wang, P. & Tao, B. Y. Synthesis and characterization of long-chain fatty acid cellulose ester (FACE). *J. Appl. Polym. Sci.* **52**, 755–761 (1994).
  20. Maim, C. J., Mench, J. W., Kendall, D. L. & Hiatt, G. D. Aliphatic Acid Esters of Cellulose. Preparation by Acid-Chloride-Pyridine Procedure. *Ind. Eng. Chem.* **43**, 684–688 (1951).
  21. Stuart, M. A. C., Fokkink, R. G., van der Horst, P. M. & Lichtenbelt, J. W. T. The adsorption of hydrophobically modified carboxymethylcellulose on a hydrophobic solid: effects of pH and ionic strength. *Colloid Polym. Sci.* **276**, 335–341 (1998).
  22. Hwang, F. S. & Hogen-Esch, T. E. Fluorocarbon-modified water-soluble cellulose derivatives. *Macromolecules* **26**, 3156–3160 (1993).
  23. Winnik, F. M., Regismond, S. T. A. & Goddard, E. D. Interactions of an Anionic Surfactant with a Fluorescent-Dye-Labeled Hydrophobically-Modified Cationic Cellulose Ether. *Langmuir* **13**, 111–114 (1997).
  24. Trombino, S., Cassano, R., Bloise, E., Muzzalupo, R., Leta, S., Puoci, F. & Picci, N. Design and Synthesis of Cellulose Derivatives with Antioxidant Activity. *Macromol. Biosci.* **8**, 86–95 (2008).
  25. Song, X., He, G., Ruan, H. & Chen, Q. Preparation and Properties of Octenyl Succinic Anhydride Modified Early Indica Rice Starch. *Starch - Stärke* **58**, 109–117 (2006).
  26. Fang, J. ., Fowler, P. ., Sayers, C. & Williams, P. . The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction conditions. *Carbohydr. Polym.* **55**, 283–289 (2004).
  27. Bien, F., Wiege, B. & Warwel, S. Hydrophobic Modification of Starch by Alkali-Catalyzed Addition of 1,2-Epoxyalkanes. *Starch - Stärke* **53**, 555–559 (2001).
  28. Wen, Y., Ye, F., Zhu, J. & Zhao, G. Corn starch ferulates with antioxidant properties prepared by N,N'-carbonyldiimidazole-mediated grafting procedure. *Food Chem.* **208**, 1–9 (2016).
  29. Carvalho, A. J. F., Curvelo, A. A. S. & Gandini, A. Surface chemical modification of thermoplastic starch: reactions with isocyanates, epoxy functions and stearoyl chloride. *Ind. Crops Prod.* **21**, 331–336 (2005).
  30. Cirillo, G., Puoci, F., Iemma, F., Curcio, M., Parisi, O. I., Spizzirri, U. G., Altamari, I. & Picci, N. Starch-quercetin conjugate by radical grafting: synthesis and biological characterization. *Pharm. Dev. Technol.*

- 17, 466–476 (2012).
31. Vieira, N. A. B., Moscardini, M. S., Tiera, V. A. d. O. & Tiera, M. J. Aggregation behavior of hydrophobically modified dextran in aqueous solution: a fluorescence probe study. *Carbohydr. Polym.* **53**, 137–143 (2003).
  32. Vittorio, O., Cirillo, G., Iemma, F., Di Turi, G., Jacchetti, E., Curcio, M., Barbuti, S., Funel, N., Parisi, O. I., Puoci, F. & Picci, N. Dextran-Catechin Conjugate: A Potential Treatment Against the Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pharm. Res.* **29**, 2601–2614 (2012).
  33. Ramírez, J. C., Sánchez-Chaves, M. & Arránz, F. Dextran functionalized by cyclic carbonate groups as supports of bioactive compounds. *Angew. Makromol. Chemie* **206**, 77–85 (1993).
  34. Durand, A. Aqueous solutions of amphiphilic polysaccharides: Concentration and temperature effect on viscosity. *Eur. Polym. J.* **43**, 1744–1753 (2007).
  35. Covis, R., Ladaviere, C., Desbrieres, J., Marie, E. & Durand, A. Synthesis of water-soluble and water-insoluble amphiphilic derivatives of dextran in organic medium. *Carbohydr. Polym.* **95**, 360–365 (2013).
  36. Cassano, R., Trombino, S., Muzzalupo, R., Tavano, L. & Picci, N. A novel dextran hydrogel linking transferulic acid for the stabilization and transdermal delivery of vitamin E. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **72**, 232–238 (2009).
  37. Grote, C. & Heinze, T. Starch Derivatives of High Degree of Functionalization 11: Studies on Alternative Acylation of Starch with Long-chain Fatty Acids Homogeneously in N,N-dimethyl acetamide/LiCl. *Cellulose* **12**, 435–444 (2005).
  38. Nichifor, M. & Carpov, A. Bile acids covalently bound to polysaccharides 1. Esters of bile acids with dextran. *Eur. Polym. J.* **35**, 2125–2129 (1999).
  39. Morgenstern, B. & Kammer, H.-W. Solvation in Cellulose-LiCl-DMAc Solutions. *Trends Polym. Sci.* **3**, 87–91 (1996).
  40. Höfle, G., Steglich, W. & Vorbrüggen, H. 4-Dialkylaminopyridine als hochwirksame Acylierungskatalysatoren. *Angew. Chemie* **90**, 602–615 (1978).
  41. Pottier, C., Morandi, G., Dulong, V., Souguir, Z., Picton, L. & Le Cerf, D. Thermo- and pH-sensitive triblock copolymers with tunable hydrophilic/hydrophobic properties. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **53**, 2606–2616 (2015).
  42. Rouzes, C., Durand, A., Leonard, M. & Dellacherie, E. Surface Activity and Emulsification Properties of Hydrophobically Modified Dextrans. *J. Colloid Interface Sci.* **253**, 217–223 (2002).
  43. Akiyama, E., Yamamoto, T., Yago, Y., Hotta, H., Ihara, T. & Kitsuki, T. Thickening properties and emulsification mechanisms of new derivatives of polysaccharide in aqueous solution: 2. The effect of the substitution ratio of hydrophobic/hydrophilic moieties. *J. Colloid Interface Sci.* **311**, 438–446 (2007).
  44. Hassani, L. N., Hendra, F. & Bouchemal, K. Auto-associative amphiphilic polysaccharides as drug

- delivery systems. *Drug Discov. Today* **17**, 608–614 (2012).
45. Brander, J. & Thorn, I. *Surface Application of Paper Chemicals*. (Springer Netherlands, 1997).
  46. Kjøniksen, A.-L., Beheshti, N., Kotlar, H. K., Zhu, K. & Nyström, B. Modified polysaccharides for use in enhanced oil recovery applications. *Eur. Polym. J.* **44**, 959–967 (2008).
  47. Hoggan, I. A. On dematium pullulans de Bary. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **9**, 100–107 (1923).
  48. Sheoran, S. K., Dubey, K. K., Tiwari, D. P. & Singh, B. P. Directive Production of Pullulan by Altering Cheap Source of Carbons and Nitrogen at 5 L Bioreactor Level. *ISRN Chem. Eng.* **2012**, 1–5 (2012).
  49. Bernier, B. The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter. *Can. J. Microbiol.* **4**, 195–204 (1958).
  50. Bender, H., Lehmann, J. & Wallenfels, K. [Pullulan, an extracellular glucan from *Pullularia pullulans*]. *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 309–316 (1959).
  51. Mishra, B., Vuppu, S. & Rath, K. The role of microbial pullulan, a biopolymer in pharmaceutical approaches: A review. *J. Appl. Pharm. Sci.* **1**, 45–50 (2011).
  52. Carolan, G., Catley, B. J. & McDougal, F. J. The location of tetrasaccharide units in pullulan. *Carbohydr. Res.* **114**, 237–243 (1983).
  53. Loth, F. *Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives*. 3rd edition. Edited by Roy L. Whistler and James N. BeMiller. *Acta Polym.* **44**, 172–185 (1993).
  54. Wallenfels, K., Bender, H., Keilich, G., & Bechtler, G. On pullulan. The glucan of the slime coat of *Pullularia pullulans*. *Angew. Chemie* **73**, 245–246 (1961).
  55. Wallenfels, K., Keilich, G., Bechtler, G., & Freudenberger, D. Investigations on pullulan. IV. Resolution of structural problems using physical, chemical and enzymatic methods. *Biochem. Z.* **341**, 433–450 (1965).
  56. Bouveng, H. O., Kiessling, H., Lindberg, B., & McKay, J. Polysaccharides elaborated by *Pullularia pullulans*. I. The neutral glucan synthesized from sucrose solutions. *Acta Chem. Scand.* **16**, 615–622 (1962).
  57. Catley, B. J., Ramsay, A. & Servis, C. Observations on the structure of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan. *Carbohydr. Res.* **153**, 79–86 (1986).
  58. Fujii, N., Shinohara, S., Ueno, H., & Imada, K. Polysaccharide produced by *Aureobasidium* sp. (black yeast). *Kenkyu Hokoku-Miyazaki Daigaku Nogakubu.* **31**, 253–262 (1984).
  59. Bender, H., & Wallenfels, K. Investigations on pullulan. II. Specific degradation by means of a bacterial enzyme. *Biochem. Z.* **334**, 79–95 (1961).
  60. Arnosti, C. & Repeta, D. J. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Pullulan and Isomaltose: Complete Assignment of Chemical Shifts. *Starch - Stärke* **47**, 73–75 (1995).
  61. McLntyre, D. D. & Calgary, H. J. V. Structural Studies of Pullulan by Nuclear Magnetic Resonance

- Spectroscopy. *Starch - Stärke* **45**, 406–410 (1993).
62. Zhbankov, R. G., Andrianov, V. M., Ratajczak, H., & Marchewka, M. IIIrd National conference on molecular spectroscopy molecular interactions and recognition, Poland, in 29 (1995).
  63. Shingel, K. I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydr. Res.* **339**, 447–460 (2004).
  64. Leathers, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 468–473 (2003).
  65. Singh, R. S., Saini, G. K. & Kennedy, J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydr. Polym.* **73**, 515–531 (2008).
  66. Petrov, P. T., Shingel, K. I., Scripko, A. D., & Tsarenkov, V. M. The biosynthesis of pullulan by strain BMP-97 of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnologia* **1**, 36–48 (2002).
  67. Cheng, Y. & Xu, T. The effect of dendrimers on the pharmacodynamic and pharmacokinetic behaviors of non-covalently or covalently attached drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 2291–2297 (2008).
  68. Lee, K. Y. & Yoo, Y. J. Optimization of pH for high molecular weight pullulan. *Biotechnol. Lett.* **15**, 1021–1024 (1993).
  69. Adams, G. G. & Harding, S. E. On hydrodynamic methods for the analysis of the sizes and shapes of polysaccharides in dilute solution: A short review. *Food Hydrocoll.* **42**, 318–334 (2014).
  70. Singh, R. S., Saini, G. K. & Kennedy, J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydr. Polym.* **73**, 515–531 (2008).
  71. Kimoto, T., Shibuya, T. & Shiobara, S. Safety studies of a novel starch, pullulan: Chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. *Food Chem. Toxicol.* **35**, 323–329 (1997).
  72. Prajapati, V. D., Jani, G. K. & Khanda, S. M. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydr. Polym.* **95**, 540–549 (2013).
  73. Sharma, C. P. Pullulan as a Promising Biomaterial for Biomedical Applications: A Perspective. *Trends Biomater. Artif. Organs* **20**, 111–116 (2007).
  74. Singh, R. S., Kaur, N., Rana, V. & Kennedy, J. F. Pullulan: A novel molecule for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **171**, 102–121 (2017).
  75. Bragd, P. L., Besemer, A. C. & Bekkum, H. V. TEMPO-derivatives as catalysts in the oxidation of primary alcohol groups in carbohydrates. *J. Mol. Catal. A Chem.* **170**, 35–42 (2001).
  76. Bruneel, D. & Schacht, E. Chemical modification of pullulan: 1. Periodate oxidation. *Polymer (Guildf)*. **34**, 2628–2632 (1993).
  77. Teramoto, N. & Shibata, M. Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. *Carbohydr. Polym.* **63**, 476–481

- (2006).
78. Henni-Silhadi, W., Deyme, M., de Hoyos, M. R., Le Cerf, D., Picton, L. & Rosilio, V. Influence of alkyl chains length on the conformation and solubilization properties of amphiphilic carboxymethylpullulans. *Colloid Polym. Sci.* **286**, 1299–1305 (2008).
  79. Mocanu, G., Vizitiu, D., Mihai, D. & Carpov, A. Chemical reaction on polysaccharides: V. Pullulan chloroalkylation. *Carbohydr. Polym.* **39**, 283–288 (1999).
  80. Bruneel, D. & Schacht, E. Chemical modification of pullulan: 3. Succinylation. *Polymer (Guildf)*. **35**, 2656–2658 (1994).
  81. Na, K., Lee, E. S. & Bae, Y. H. Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity in vitro. *J. Control. Release* **87**, 3–13 (2003).
  82. Yang, W., Chen, H., Gao, F., Chen, M., Li, X., Zhang, M., Zhang, Q., Liu, L., Jiang, Q. & Wang, Y. Self-aggregated Nanoparticles of Cholesterol-modified Pullulan Conjugate as a Novel Carrier of Mitoxantrone. *Curr. Nanosci.* **6**, 298–306 (2010).
  83. Hussain, M. A. & Heinze, T. Unconventional Synthesis of Pullulan Abietates. *Polym. Bull.* **60**, 775–783 (2008).
  84. Hussain, M. A., Shahwar, D., Hassan, M. N., Tahir, M. N., Iqbal, M. S. & Sher, M. An efficient esterification of pullulan using carboxylic acid anhydrides activated with iodine. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **75**, 133–143 (2010).
  85. Zhang, H., Li, X., Gao, F., Liu, L., Zhou, Z. & Zhang, Q. Preparation of folate-modified pullulan acetate nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Drug Deliv.* **17**, 48–57 (2010).
  86. Kaya, A., Du, X., Liu, Z., Lu, J. W., Morris, J. R., Glasser, W. G., Heinze, T., Esker, A. R. Surface Plasmon Resonance Studies of Pullulan and Pullulan Cinnamate Adsorption onto Cellulose. *Biomacromolecules* **10**, 2451–2459 (2009).
  87. Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C. & Zhang, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1650–1662 (2008).
  88. Mocanu, G., Constantin, M. & Carpov, A. Chemical reactions on polysaccharides, 5. Reaction of mesyl chloride with pullulan. *Angew. Makromol. Chemie* **241**, 1–10 (1996).
  89. Keilich, V. G., Salminen, P. & Husemann, E. Permethylierung von polysacchariden. *Die Makromol. Chemie* **141**, 117–125 (1971).
  90. Shibata, M., Nozawa, R., Teramoto, N. & Yosomiya, R. Synthesis and properties of etherified pullulans. *Eur. Polym. J.* **38**, 497–501 (2002).
  91. Duval-Terrié, C., Huguet, J. & Muller, G. Self-assembly and hydrophobic clusters of amphiphilic polysaccharides. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **220**, 105–115 (2003).

92. Miani, M, Gianni, R., Liut, G., Rizzo, R., Toffanin, R. & Delben, F. Gel beads from novel ionic polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **55**, 163–169 (2004).
93. Onda, Y., Muto, H. & Suzuki, S. Cyanoethylpullulan. US 4322524 (1977).
94. Imai, K., Shiomi, T. & Tesuka, Y. JP 0321602 (9121602). (1991).
95. Mocanu, G., Mihai, D., LeCerf, D., Picton, L. & Moscovici, M. Cyclodextrin-anionic polysaccharide hydrogels: Synthesis, characterization, and interaction with some organic molecules (water pollutants, drugs, proteins). *J. Appl. Polym. Sci.* **112**, 1175–1183 (2009).
96. Souguir, Z., Roudesli, S., Picton, L., Le Cerf, D. & About-Jaudet, E. Novel cationic and amphiphilic pullulan derivatives I: Synthesis and characterization. *Eur. Polym. J.* **43**, 4940–4950 (2007).
97. Bruneel, D. & Schacht, E. Chemical modification of pullulan: 2. Chloroformate activation. *Polymer (Guildf)*. **34**, 2633–2637 (1993).
98. Shibata, M., Asahina, M., Teramoto, N. & Yosomiya, R. Chemical modification of pullulan by isocyanate compounds. *Polymer (Guildf)*. **42**, 59–64 (2001).
99. Muroga, Yoshio, Hayashi, K., Fukunaga, M., Kato, T., Shimizu, S. & Kurita, K. Change of the persistence lengths in the conformational transitions of pullulan- and amylose-tricarbanilates. *Biophys. Chem.* **121**, 96–104 (2006).
100. Akiyoshi, K., Deguchi, S., Moriguchi, N., Yamaguchi, S. & Sunamoto, J. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. Formation and characteristics of nanoparticles. *Macromolecules* **26**, 3062–3068 (1993).
101. Ball, D. H., Wiley, B. J. & Reese, E. T. Effect of substitution at C-6 on the susceptibility of pullulan to pullulanases. Enzymatic degradation of modified pullulans. *Can. J. Microbiol.* **38**, 324–327 (1992).
102. Mihai, D., Mocanu, G. & Carpov, A. Chemical reactions on polysaccharides: I. Pullulan sulfation. *Eur. Polym. J.* **37**, 541–546 (2001).
103. Lu, Dianxiang, Wen, X., Liang, J., Gu, Z., Zhang, X. & Fan, Y. A pH-sensitive nano drug delivery system derived from pullulan/doxorubicin conjugate. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **89B**, 177–183 (2009).
104. Shinkai, M., Suzuki, M., Iijima, S. & Kobayashi, T. Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **21**, 125–137 (1995).
105. Bataille, I., Huguet, J., Muller, G., Mocanu, G. & Carpov, A. Associative behaviour of hydrophobically modified carboxymethylpullulan derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **20**, 179–191 (1997).
106. Dulong, V., Mocanu, G., Picton, L. & Le Cerf, D. Amphiphilic and thermosensitive copolymers based on pullulan and Jeffamine®: Synthesis, characterization and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1522–1531 (2012).

107. Glinel, K., Paul Sauvage, J., Oulyadi, H. & Huguet, J. Determination of substituents distribution in carboxymethylpullulans by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **328**, 343–354 (2000).
108. Henni-Silhadi, W., Deyme, Michel, Boissonnade, M. M., Appel, M., Le Cerf, D., Picton, L., Rosilio, V. Enhancement of the Solubility and Efficacy of Poorly Water-Soluble Drugs by Hydrophobically-Modified Polysaccharide Derivatives. *Pharm. Res.* **24**, 2317–2326 (2007).
109. Legros, M., Dulong, V., Picton, L. & Le Cerf, D. Self-organization of Water Soluble and Amphiphile Crosslinked Carboxymethylpullulan. *Polym. J.* **40**, 1132–1139 (2008).
110. Guyomard, A., Nysten, B., Muller, G. & Glinel, K. Loading and Release of Small Hydrophobic Molecules in Multilayer Films Based on Amphiphilic Polysaccharides. *Langmuir* **22**, 2281–2287 (2006).
111. Na, K. & Bae, Y. H. Self-assembled hydrogel nanoparticles responsive to tumor extracellular pH from pullulan derivative/sulfonamide conjugate: characterization, aggregation, and adriamycin release in vitro. *Pharm. Res.* **19**, 681–688 (2002).
112. Akiyoshi, K. & Sunamoto, J. Supramolecular assembly of hydrophobized polysaccharides. *Supramol. Sci.* **3**, 157–163 (1996).
113. Jeong, Young-Il, Na, H.-S., Oh, J.-S., Choi, K.-C., Song, C.-E. & Lee, H.-C. Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly(dl-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan. *Int. J. Pharm.* **322**, 154–160 (2006).
114. Gomez, C. G., Rinaudo, M. & Villar, M. A. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydr. Polym.* **67**, 296–304 (2007).
115. Ronghua, H., Yumin, D. & Jianhong, Y. Preparation and in vitro anticoagulant activities of alginate sulfate and its quaterized derivatives. *Carbohydr. Polym.* **52**, 19–24 (2003).
116. SkjÅk-Bræk, G., Paoletti, S. & Gianferrara, T. Selective acetylation of mannuronic acid residues in calcium alginate gels. *Carbohydr. Res.* **185**, 119–129 (1989).
117. Desbrieres, J. Autoassociative natural polymer derivatives: the alkylchitosans. Rheological behaviour and temperature stability. *Polymer (Guildf)*. **45**, 3285–3295 (2004).
118. Leonard, M., De Boisseson, M. R., Hubert, P., Dalençon, F. & Dellacherie, E. Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. *J. Control. Release* **98**, 395–405 (2004).
119. Pelletier, S., Hubert, P., Lopicque, F., Payan, E. & Dellacherie, E. Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate: Synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions. *Carbohydr. Polym.* **43**, 343–349 (2000).
120. Vallée, F., Müller, C., Durand, A., Schimchowitsch, S., Dellacherie, E., Kelche, C., Cassel, J. C. & Leonard, M. Synthesis and rheological properties of hydrogels based on amphiphilic alginate-amide derivatives. *Carbohydr. Res.* **344**, 223–228 (2009).

121. Huang, L., Cheng, X., Liu, C., Xing, K., Zhang, J., Sun, G., Li, X., Chen, X. Preparation, characterization, and antibacterial activity of oleic acid-grafted chitosan oligosaccharide nanoparticles. *Front. Biol. China* **4**, 321–327 (2009).
122. Hu, W., Li, J., Hou, H., Yan, H. & Feng, Y., Mi, X. & Lin, Q. Preparation and Characterization of Hydrophobic Alginate Derivative Nanocapsules Entrapping I-Cyhalothrin. *Asian J. Chem.* **25**, 9904–9908 (2013).
123. Woranuch, S. & Yoksan, R. Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. *Carbohydr. Polym.* **96**, 495–502 (2013).
124. Liu, C.-G., Chen, X.-G. & Park, H.-J. Self-assembled nanoparticles based on linoleic-acid modified chitosan: Stability and adsorption of trypsin. *Carbohydr. Polym.* **62**, 293–298 (2005).
125. Hu, F.-Q., Ren, G.-F., Yuan, H., Du, Y.-Z. & Zeng, S. Shell cross-linked stearic acid grafted chitosan oligosaccharide self-aggregated micelles for controlled release of paclitaxel. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **50**, 97–103 (2006).
126. Meyer, K. & Palmer, J. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* **107**, 629–634 (1934).
127. Boeriu, C. G., Springer, J., Kooy, F. K., van den Broek, L. A. M. & Eggink, G. Production Methods for Hyaluronan. *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2013**, 1–14 (2013).
128. Levene, P.A. & Lopez-Suarez, J. Mucin and mucoids. *J. Biol. Chem.* **36**, 105–126 (1918).
129. Kendall, F.E., Heidelberger, M. & Dawson, M. H. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group a hemolytic streptococcus. *J. Biol. Chem.* **118**, 61–69 (1937).
130. Boas, N. F. Isolation of hyaluronic acid from the cock's comb. *J. Biol. Chem.* **181**, 573–575 (1949).
131. Dorfman, A. The kinetics of the enzymatic hydrolysis of hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **172**, 377–387 (1948).
132. Ogston, A. G. & Stanier, J. E. The dimensions of the particle of hyaluronic acid complex in synovial fluid. *Biochem. J.* **49**, 585–590 (1951).
133. Weissmann, B. & Meyer, K. The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord <sup>1,2</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1753–1757 (1954).
134. Lapčík, L., De Smedt, S., Demeester, J. & Chabreck, P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **98**, 2663–2684 (1998).
135. Scott, J. E., Cummings, C., Brass, A. & Chen, Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem. J.* **274** ( Pt 3), 699–705 (1991).
136. Scott, J. E. & Heatley, F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a 13C NMR study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4850–4855 (1999).

137. Cowman, M. K. & Matsuoka, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydr. Res.* **340**, 791–809 (2005).
138. Balazs, E. A., Laurent, T. C. & Jeanloz, R. W. Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochem. J.* **235**, 903–903 (1986).
139. Laurent, T. The biology of hyaluronan. Introduction. *Ciba Found. Symp.* **143**, 1–20 (1989).
140. Heatley, F. & Scott, J. E. A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. *Biochem. J.* **254**, 489–93 (1988).
141. Scott, J. E. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB J.* **6**, 2639–45 (1992).
142. Kobayashi, Y., Okamoto, A. & Nishinari, K. Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights. *Biorheology* **31**, 235–44 (1994).
143. Scott, J. E. Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. *Novartis Found. Symp.* **143**, 6–20 (1989).
144. Rwei, S.-P., Chen, S.-W., Mao, C.-F. & Fang, H.-W. Viscoelasticity and wearability of hyaluronate solutions. *Biochem. Eng. J.* **40**, 211–217 (2008).
145. Ghosh, S., Kopal, I., Zanette, D. & Reed, W. F. Conformational contraction and hydrolysis of hyaluronate in sodium hydroxide solutions. *Macromolecules* **26**, 4685–4693 (1993).
146. Meyer, K. Highly viscous sodium hyaluronate. *J. Biol. Chem.* **176**, 993–994 (1948).
147. Blumberg, B. S., Ogston, A. G., Lowther, D. A. & Rogers, H. J. Physicochemical properties of hyaluronic acid formed by *Streptococcus haemolyticus*. *Biochem. J.* **70**, 1–4 (1958).
148. Pisárčik, M., Bakoš, D. & Čeppan, M. Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **97**, 197–202 (1995).
149. Milas, M. & Rinaudo, M. Characterization and Properties of Hyaluronic Acid (Hyaluronan). in *Polysaccharides* (CRC Press, 2004).
150. Tiwari, S. & Bahadur, P. Modified hyaluronic acid based materials for biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **121**, 556–571 (2019).
151. Oerther, S., Maurin, A. C. & Payan, E., Hubert, P., Lopicque, F., Presle, N., Dexheimer, J., Netter, P. & Lopicque, F. High interaction alginate-hyaluronate associations by hyaluronate deacetylation for the preparation of efficient biomaterials. *Biopolymers* **54**, 273–281 (2000).
152. Mlčochová, P., Hájková, V., Steiner, B., Bystrický, S., Kooš, M., Medová, M. & Velebný, V. Preparation and characterization of biodegradable alkylether derivatives of hyaluronan. *Carbohydr. Polym.* **69**, 344–352 (2007).
153. Eenschooten, C., Guillaumie, F., Kontogeorgis, G. M., Stenby, E. H. & Schwach-Abdellaoui, K.

- Preparation and structural characterisation of novel and versatile amphiphilic octenyl succinic anhydride–modified hyaluronic acid derivatives. *Carbohydr. Polym.* **79**, 597–605 (2010).
154. Mlčochová, P., Bystrický, S., Steiner, B., Machová, E., Kooš, M., Velebný, V. & Krčmář, M. Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivatives. *Biopolymers* **82**, 74–79 (2006).
155. Chytil, M. & Pekař, M. Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties: evaluation of self-aggregation. *Carbohydr. Polym.* **76**, 443–448 (2009).
156. Rinaudo M., Auzely R., Kadi S., Bresin. A. & Kubik. E. New derivatives of hyaluronic acid, their preparation process and their uses. WO2007059890A1. (2007).
157. Creuzet, C., Kadi, S., Rinaudo, M. & Auzély-Velty, R. New associative systems based on alkylated hyaluronic acid. Synthesis and aqueous solution properties. *Polymer (Guildf)*. **47**, 2706–2713 (2006).
158. Chen, J. H., Tsai, B. H., Chang, H. T., Chen, M. L., Chen, Y. H., Jan, S. H. & Liu, M. J. Hyaluronic acid derivative with urethane linkage. GB 2408741. (2003).
159. Finelli, I., Chiessi, E., Galessio, D., Renier, D. & Paradossi, G. Gel-Like Structure of a Hexadecyl Derivative of Hyaluronic Acid for the Treatment of Osteoarthritis. *Macromol. Biosci.* **9**, 646–653 (2009).
160. Nakajima, N. & Ikada, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjug. Chem.* **6**, 123–130 (1995).
161. Lee, S. C., Kwon, I. K. & Park, K. Hydrogels for delivery of bioactive agents: A historical perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 17–20 (2013).
162. Wichterle, O. & Lím, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* **185**, 117–118 (1960).
163. Kopeček, J. Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials* **28**, 5185–5192 (2007).
164. Buwalda, S. J., Boere, K. W. M., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Vermonden, T. & Hennink, W. E. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *J. Control. Release* **190**, 254–273 (2014).
165. Liang-chang, D., Qi, Y. & Hoffman, A. S. Controlled release of amylase from a thermal and pH-sensitive, macroporous hydrogel. *J. Control. Release* **19**, 171–177 (1992).
166. Chung, H. J., Lee, Y. & Park, T. G. Thermo-sensitive and biodegradable hydrogels based on stereocomplexed Pluronic multi-block copolymers for controlled protein delivery. *J. Control. Release* **127**, 22–30 (2008).
167. Kirakci, K., Šícha, V., Holub, J., Kubát, P. & Lang, K. Luminescent Hydrogel Particles Prepared by Self-Assembly of  $\beta$ -Cyclodextrin Polymer and Octahedral Molybdenum Cluster Complexes. *Inorg. Chem.* **53**, 13012–13018 (2014).
168. Kono, H. & Teshirogi, T. Cyclodextrin-grafted chitosan hydrogels for controlled drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 299–308 (2015).

169. Lim, F. & Sun, A. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. **210**, 908–910 (1980).
170. Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A. & Peppas, N. A. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv. Mater.* **21**, 3307–3329 (2009).
171. Zhao, F., Yao, D., Guo, R., Deng, L., Dong, A. & Zhang, J. Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Nanomaterials* **5**, 2054–2130 (2015).
172. Tsuji, H. Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation, and Applications. *Macromol. Biosci.* **5**, 569–597 (2005).
173. Voo, W.-P., Ooi, C.-W., Islam, A., Tey, B.-T. & Chan, E.-S. Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour. *Eur. Polym. J.* **75**, 343–353 (2016).
174. Zhao, Q. S., Ji, Q. X., Xing, K., Li, X. Y., Liu, C. S. & Chen, X. G. Preparation and characteristics of novel porous hydrogel films based on chitosan and glycerophosphate. *Carbohydr. Polym.* **76**, 410–416 (2009).
175. Takigami, M., Amada, H., Nagasawa, N., Yagi, T., Kasahara, T., Takigami, S. & Tamada, M. Preparation and properties of CMC gel. *Trans. Res. Soc. JAPAN* **32**, 713–716 (2007).
176. Liu, G., Yuan, Q., Hollett, G., Zhao, W., Kang, Y. & Wu, J. Cyclodextrin-based host–guest supramolecular hydrogel and its application in biomedical fields. *Polym. Chem.* **9**, 3436–3449 (2018).
177. Hoare, T. R. & Kohane, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer (Guildf)*. **49**, 1993–2007 (2008).
178. Hennink, W. . & van Nostrum, C. . Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 13–36 (2002).
179. Jayaramudu, T., Raghavendra, G. M., Varaprasad, K., Sadiku, R. & Raju, K. M. Development of novel biodegradable Au nanocomposite hydrogels based on wheat: For inactivation of bacteria. *Carbohydr. Polym.* **92**, 2193–2200 (2013).
180. Said, H. M., Abd Alla, S. G. & El-Naggar, A. W. M. Synthesis and characterization of novel gels based on carboxymethyl cellulose/acrylic acid prepared by electron beam irradiation. *React. Funct. Polym.* **61**, 397–404 (2004).
181. Caló, E. & Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* **65**, 252–267 (2015).
182. de Nooy, A. E., Capitani, D., Masci, G. & Crescenzi, V. Ionic polysaccharide hydrogels via the Passerini and Ugi multicomponent condensations: synthesis, behavior and solid-state NMR characterization. *Biomacromolecules* **1**, 259–267 (2000).
183. Sperinde, J. J. & Griffith, L. G. Synthesis and Characterization of Enzymatically-Cross-Linked

- Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Macromolecules* **30**, 5255–5264 (1997).
184. Lee, I. & Akiyoshi, K. Single molecular mechanics of a cholesterol-bearing pullulan nanogel at the hydrophobic interfaces. *Biomaterials* **25**, 2911–2918 (2004).
185. Nishikawa, T., Akiyoshi, K. & Sunamoto, J. Supramolecular Assembly between Nanoparticles of Hydrophobized Polysaccharide and Soluble Protein Complexation between the Self-Aggregate of Cholesterol-Bearing Pullulan and .alpha.-Chymotrypsin. *Macromolecules* **27**, 7654–7659 (1994).
186. Akiyoshi, K., Sasaki, Y. & Sunamoto, J. Molecular Chaperone-Like Activity of Hydrogel Nanoparticles of Hydrophobized Pullulan: Thermal Stabilization with Refolding of Carbonic Anhydrase B. *Bioconj. Chem.* **10**, 321–324 (1999).
187. Na, K., Bum Lee, T., Park, K.-H., Shin, E.-K., Lee, Y.-B. & Choi, H.-K. Self-assembled nanoparticles of hydrophobically-modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system. *Eur. J. Pharm. Sci.* **18**, 165–173 (2003).
188. Jung, S.-W., Jeong, Y.-I. & Kim, S.-H. Characterization of hydrophobized pullulan with various hydrophobicities. *Int. J. Pharm.* **254**, 109–121 (2003).
189. Gupta, M. & Gupta, A. K. Hydrogel pullulan nanoparticles encapsulating pBUDLacZ plasmid as an efficient gene delivery carrier. *J. Control. Release* **99**, 157–166 (2004).
190. Mocanu, G., Mihai, D., Picton, L., LeCerf, D. & Muller, G. Associative pullulan gels and their interaction with biological active substances. *J. Control. Release* **83**, 41–51 (2002).
191. Lack, S., Picton, L., LeCerf, D., Dulong, V., Argillier, J.F, Glinel, K. & Muller, G. Elaboration and characterization of matrixes based on polysaccharide for entrapment applications. *PMSE Prepr.* **89**, 349–350 (2003).
192. Autissier, A., Letourneur, D. & Le Visage, C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **82A**, 336–342 (2007).
193. Morimoto, N., Endo, T., Iwasaki, Y. & Akiyoshi, K. Design of Hybrid Hydrogels with Self-Assembled Nanogels as Cross-Linkers: Interaction with Proteins and Chaperone-Like Activity. *Biomacromolecules* **6**, 1829–1834 (2005).
194. Khunmanee, S., Jeong, Y. & Park, H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *J. Tissue Eng.* **8**, 1–16 (2017).
195. Tomihata, K. & Ikada, Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *J. Biomed. Mater. Res.* **37**, 243–251 (1997).
196. Barbucci, R., Fini, M., Giavaresi, G., Torricelli, P. & Giardino, R., Lamponi, S. & Leone, G. Hyaluronic acid hydrogel added with ibuprofen-lysine for the local treatment of chondral lesions in the knee: In vitro and in vivo investigations. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **75B**, 42–48 (2005).
197. Vercruyse, K. P., Marecak, D. M., Marecek, J. F. & Prestwich, G. D. Synthesis and *in Vitro* Degradation

- of New Polyvalent Hydrazide Cross-Linked Hydrogels of Hyaluronic Acid. *Bioconjug. Chem.* **8**, 686–694 (1997).
198. Jia, X., Colombo, G., Padera, R., Langer, R. & Kohane, D. S. Prolongation of sciatic nerve blockade by in situ cross-linked hyaluronic acid. *Biomaterials* **25**, 4797–4804 (2004).
199. Prestwich, G. D., Marecak, D. M., Marecek, J. F., Vercruyse, K. P. & Ziebell, M. R. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J. Control. Release* **53**, 93–103 (1998).
200. Huin-Amargier, C., Marchal, P., Payan, E., Netter, P. & Dellacherie, E. New physically and chemically crosslinked hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **76A**, 416–424 (2006).
201. Luo, Y., Kirker, K. R. & Prestwich, G. D. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *J. Control. Release* **69**, 169–184 (2000).
202. Zarebinski, T. I., Doty, N. J., Erickson, I. E., Srinivas, R., Wirostko, B. M. & Tew, W. P. Thiolated hyaluronan-based hydrogels crosslinked using oxidized glutathione: An injectable matrix designed for ophthalmic applications. *Acta Biomater.* **10**, 94–103 (2014).
203. Dubbini, A., Censi, R., Butini, M. E., Sabbieti, M. G. & Agas, D., Vermonden, T. Di & Martino, P. Injectable hyaluronic acid/PEG-p(HPMAM-lac)-based hydrogels dually cross-linked by thermal gelling and Michael addition. *Eur. Polym. J.* **72**, 423–437 (2015).
204. Park, Y. D., Tirelli, N. & Hubbell, J. A. Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks. *Biomaterials* **24**, 893–900 (2003).
205. Yu, F., Cao, X., Li, Y., Zeng, L., Yuan, B. & Chen, X. An injectable hyaluronic acid/PEG hydrogel for cartilage tissue engineering formed by integrating enzymatic crosslinking and Diels–Alder “click chemistry.” *Polym. Chem.* **5**, 1082–1090 (2014).
206. Kurisawa, M., Chung, J. E., Yang, Y. Y., Gao, S. J. & Uyama, H. Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid–tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Chem. Commun.* 4312–4314 (2005).
207. De Gennes, P. G. Scaling concepts in polymer physics. *Cornell Univ. Press* 13–233 (1979).
208. Flory, P. J., Rabjohn, N. & Shaffer, M. C. Dependence of elastic properties of vulcanized rubber on the degree of cross linking. *J. Polym. Sci.* **4**, 225–245 (1949).
209. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. & Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27–46 (2000).
210. Anseth, K. S., Bowman, C. N. & Brannon-Peppas, L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* **17**, 1647–1657 (1996).
211. Ganji, F., Ganji, F. & Vasheghani-farahani, S. Theoretical description of hydrogel swelling: a review. *Iran.*

- Polym. J.* **19**, 375–398 (2015).
212. Flory, P. J. & Rehner, J. Statistical theory of chain configuration and physical properties of high polymers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **44**, 419–429 (1943).
213. Tran, N. Q., Joung, Y. K., Lih, E. & Park, K. D. In Situ Forming and Rutin-Releasing Chitosan Hydrogels As Injectable Dressings for Dermal Wound Healing. *Biomacromolecules* **12**, 2872–2880 (2011).
214. Nafea, E. H., Poole-Warren, A. M. L. A. & Martens, P. J. Immunisolating semi-permeable membranes for cell encapsulation: Focus on hydrogels. *J. Control. Release* **154**, 110–122 (2011).
215. Bodugoz-Senturk, H., Macias, C. E., Kung, J. H. & Muratoglu, O. K. Poly(vinyl alcohol)–acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials* **30**, 589–596 (2009).
216. Demange, E., Kassim, Y., Petit, C., Buquet, C., Dulong, V. & Le Cerf, D., Buchonnet, G. & Vannier, J. P. Survival of cord blood haematopoietic stem cells in a hyaluronan hydrogel for ex vivo biomimicry. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **7**, 901–910 (2013).
217. Le Visage, C. & Letourneur, D. Method for Preparing Porous Scaffold for Tissue Engineering, Cell Culture and Cell Delivery. US 9522218B2. (2017).
218. Milani, A. H., Freemont, A. J., Hoyland, J. A., Adlam, D. J. & Saunders, B. R. Injectable Doubly Cross-Linked Microgels for Improving the Mechanical Properties of Degenerated Intervertebral Discs. *Biomacromolecules* **13**, 2793–2801 (2012).
219. Davis, M. E., Hsieh, P. C. H., Takahashi, T., Song, Q. & Zhang, S., Kamm, R. D., Grodzinsky, A. J., Anversa, P. & Lee, R. T. Local myocardial insulin-like growth factor 1 (IGF-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8155–8160 (2006).
220. Shpaisman, N., Sheihet, L., Bushman, J., Winters, J. & Kohn, J. One-Step Synthesis of Biodegradable Curcumin-Derived Hydrogels as Potential Soft Tissue Fillers after Breast Cancer Surgery. *Biomacromolecules* **13**, 2279–2286 (2012).
221. Tasoglu, S. & Demirci, U. Bioprinting for stem cell research. *Trends Biotechnol.* **31**, 10–19 (2013).
222. Huynh, C. T., Nguyen, M. K. & Lee, D. S. Injectable Block Copolymer Hydrogels: Achievements and Future Challenges for Biomedical Applications. *Macromolecules* **44**, 6629–6636 (2011).
223. Lei, Y., Rahim, M., Ng, Q. & Segura, T. Hyaluronic acid and fibrin hydrogels with concentrated DNA/PEI polyplexes for local gene delivery. *J. Control. Release* **153**, 255–261 (2011).
224. Angeloni, N. L., Bond, C. W., Tang, Y., Harrington, D. A. & Zhang, S., Stupp, S. I., McKenna, K. E. & Podlasek, C. A. Regeneration of the cavernous nerve by Sonic hedgehog using aligned peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials* **32**, 1091–1101 (2011).
225. Gasmi, S. N., Rihouey, C., Picton, L. & Le Cerf, D. Hydrolysis of pullulan by entrapped pullulanase in Ca/alginate beads. *Biopolymers* **101**, 938–944 (2014).

226. Koutsopoulos, S. & Zhang, S. Two-layered injectable self-assembling peptide scaffold hydrogels for long-term sustained release of human antibodies. *J. Control. Release* **160**, 451–458 (2012).
227. Chow, L. W., Wang, L., Kaufman, D. B. & Stupp, S. I. Self-assembling nanostructures to deliver angiogenic factors to pancreatic islets. *Biomaterials* **31**, 6154–6161 (2010).
228. McCann, J., Thaiboonrod, S., Ulijn, R. V. & Saunders, B. R. Effects of crosslinker on the morphology and properties of microgels containing N-vinylformamide, glycidylmethacrylate and vinylamine. *J. Colloid Interface Sci.* **415**, 151–158 (2014).
229. Hamidi, M., Azadi, A. & Rafiei, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1638–1649 (2008).
230. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 3–12 (2002).
231. Kashyap, N., Kumar, N. & Kumar, M. N. V. R. Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **22**, 107–150 (2005).
232. Patravale, V. B. & Mandawgade, S. D. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *Int. J. Cosmet. Sci.* **30**, 19–33 (2008).
233. Drury, J. L. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337–4351 (2003).
234. Moreira Teixeira, L. S., Feijen, J., van Blitterswijk, C. A., Dijkstra, P. J. & Karperien, M. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials* **33**, 1281–1290 (2012).
235. Hutmacher, D. W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **12**, 107–124 (2001).
236. David, L., Dulong, V., Le Cerf, D., Cazin, L., Lamacz, M. & Vannier, J.-P. Hyaluronan hydrogel: An appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity. *Acta Biomater.* **4**, 256–263 (2008).
237. Nicodemus, G. D. & Bryant, S. J. Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* **14**, 149–165 (2008).
238. Baroli, B. Hydrogels for Tissue Engineering and Delivery of Tissue-Inducing Substances. *J. Pharm. Sci.* **96**, 2197–2223 (2007).
239. Alge, D. L., Azagarsamy, M. A., Donohue, D. F. & Anseth, K. S. Synthetically Tractable Click Hydrogels for Three-Dimensional Cell Culture Formed Using Tetrazine–Norbornene Chemistry. *Biomacromolecules* **14**, 949–953 (2013).
240. Kaemmerer, E., Melchels, F. P. W., Holzapfel, B. M., Meckel, T., Hutmacher, D. W. & Loessner, D. Gelatine methacrylamide-based hydrogels: An alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta Biomater.* **10**, 2551–2562 (2014).

241. Paavola, A., Yliruusi, J., Kajimoto, Y., Kalso, E., Wahlström, T. & Rosenberg, P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. *Pharm. Res.* **12**, 1997–2002 (1995).
242. Sosnik, A. & Cohn, D. Ethoxysilane-capped PEO–PPO–PEO triblocks: a new family of reverse thermo-responsive polymers. *Biomaterials* **25**, 2851–2858 (2004).
243. Kim, M. R. & Park, T. G. Temperature-responsive and degradable hyaluronic acid/Pluronic composite hydrogels for controlled release of human growth hormone. *J. Control. Release* **80**, 69–77 (2002).
244. Xiong, L., Luo, Q., Wang, Y., Li, X., Shen, Z. & Zhu, W. An injectable drug-loaded hydrogel based on a supramolecular polymeric prodrug. *Chem. Commun.* **51**, 14644–14647 (2015).
245. Peppas, N. A. & Am Ende, D. J. Controlled release of perfumes from polymers. II. Incorporation and release of essential oils from glassy polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **66**, 509–513 (1997).
246. Aranaz, I., Acosta, N., Civera, C., Elorza, B., Mingo, J., Castro, C., Gandía, M. & Heras Caballero, A. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *Polymers (Basel)* **10**, 1–25 (2018).
247. An, S. M., Ham, H., Choi, E. J., Shin, M. K., An, S. S., Kim, H. O. & Koh, J. S. Primary irritation index and safety zone of cosmetics: retrospective analysis of skin patch tests in 7440 Korean women during 12 years. *Int. J. Cosmet. Sci.* **36**, 62–67 (2014).
248. Lorenz, D. H. Skin adhesive hydrogel, its preparation and uses. US5306504 A. (1992).
249. Benyus, J. M. *Biomimicry : innovation inspired by nature*. (Morrow, 1997).
250. van Bergeijk, W. A. Nomenclature of Devices Which Simulate Biological Functions. *Science* **132**, 1248–1249 (1960).
251. Vincent, J. F. V. Biomimetics — a review. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* **223**, 919–939 (2009).
252. Steele, J. How do we get there? Bionics Symposium: Living prototypes – The Key to New Technology. *Wright-Patterson Air Force Base, Ohio, Wright Air Dev. Div.* (1960).
253. Nachtigall, W. Bionikdesign in Stichworten. in *Vorbild Natur* 47–58 (Springer Berlin Heidelberg, 1997).
254. Ataide, R. The Global Biomimicry Efforts: An Economic Game Changer. *Fermian Bus. Econ. Inst.* **1**, 9–43 (2010).
255. Nieuwenhuis, P. & Lammgard, C. Expanding industrial ecology’s ecological metaphor- an historical. in *International Greening of Industry Network Conference, Seoul* (2010).
256. Nassiri-mofakham, F., Huhns, M. N. & Ghasem-aghaee, N. *Current and Future Developments in Artificial Intelligence*. **1**, (2017).
257. Baek, N., Park, K. Natural polymer gels with fast responses. *Reflexive Polym. Hydrogels. Underst. Des. Fast Responsive Polym. Syst.* 85–96 (2004).

258. Raven, J. A. Physiological correlates of the morphology of early vascular plants. *Bot. J. Linn. Soc.* **88**, 105–126 (1984).
259. Sarkar, P., Bosneaga, E. & Auer, M. Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *J. Exp. Bot.* **60**, 3615–3635 (2009).
260. Dixon, R. A. Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843–847 (2001).
261. Ignat, I., Volf, I. & Popa, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821–1835 (2011).
262. Stevanovic, T., Diouf, P. & Garcia-Perez, M. Bioactive Polyphenols from Healthy Diets and Forest Biomass. *Curr. Nutr. Food Sci.* **5**, 264–295 (2009).
263. Tsao, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231–1246 (2010).
264. El Gharras, H. Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 2512–2518 (2009).
265. Pyrzynska, K. & Biesaga, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC Trends Anal. Chem.* **28**, 893–902 (2009).
266. Dai, J. & Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15**, 7313–7352 (2010).
267. Liu, J., Wang, X., Yong, H., Kan, J. & Jin, C. Recent advances in flavonoid-grafted polysaccharides: Synthesis, structural characterization, bioactivities and potential applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **116**, 1011–1025 (2018).
268. Vladimir-Kneevi, S., Blaekovi, B., Bival, M. & Babac, M. Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health. in *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health* 155–180 (InTech, 2012).
269. Ferrazzano, G., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G. & Pollio, A. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. *Molecules* **16**, 1486–1507 (2011).
270. Giovinazzo, G., Ingrosso, I., Paradiso, A., De Gara, L. & Santino, A. Resveratrol Biosynthesis: Plant Metabolic Engineering for Nutritional Improvement of Food. *Plant Foods Hum. Nutr.* **67**, 191–199 (2012).
271. Rimando, A. & Suh, N. Biological/Chemopreventive Activity of Stilbenes and their Effect on Colon Cancer. *Planta Med.* **74**, 1635–1643 (2008).
272. Kelsey, N. A., Wilkins, H. M. & Linseman, D. A. Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents. *Molecules* **15**, 7792–7814 (2010).
273. Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules* **15**, 8813–8826 (2010).
274. Ndhllala, A., Moyo, M. & Van Staden, J. Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules?

- Molecules* **15**, 6905–6930 (2010).
275. Naczek, M. & Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1523–1542 (2006).
276. Mendis, M., Leclerc, E. & Simsek, S. Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. *Carbohydr. Polym.* **139**, 159–166 (2016).
277. Kumar, N. & Pruthi, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnol. Reports* **4**, 86–93 (2014).
278. Adedokun, O. E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I. R., Le Roes-Hill, M. & Burton, S. G. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **74**, 29–35 (2012).
279. Carunchio, F., Crescenzi, C., Girelli, A. M., Messina, A. & Tarola, A. M. Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. *Talanta* **55**, 189–200 (2001).
280. Anson, N. M., Hemery, Y. M., Bast, A. & Haenen, G. R. M. M. Optimizing the bioactive potential of wheat bran by processing. *Food Funct.* **3**, 362–375 (2012).
281. Vismeh, R., Lu, F., Chundawat, S. P. S., Humpala, J. F., Azarpira, A., Balan, V., Dale, B. E., Ralph, J. & Jones, A. D. Profiling of diferulates (plant cell wall cross-linkers) using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analyst* **138**, 6683–6692 (2013).
282. Trombino, S., Cassano, R., Bloise, E., Muzzalupo, R., Leta, S., Puoci, F. & Picci, N. Design and Synthesis of Cellulose Derivatives with Antioxidant Activity. *Macromol. Biosci.* **8**, 86–95 (2008).
283. Valacchi, G., Grisci, G., Sticozzi, C., Lim, Y., Paolino, M. & Giuliani, G., Mendichi, R., Belmonte, G., Artusi, R., Zanardi, A., Garofalo, P., Giorgi, G., Cappelli, A. & Rovati, L. Wound healing properties of hyaluronan derivatives bearing ferulate residues. *J. Mater. Chem. B* **3**, 7037–7045 (2015).
284. Yang, J., Sun, J., An, X. & Zheng, M., Lu, Z., Lu, F. & Zhang, C. Preparation of ferulic acid-grafted chitosan using recombinant bacterial laccase and its application in mango preservation. *RSC Adv.* **8**, 6759–6767 (2018).
285. Montero de Espinosa, L. & Meier, M. A. R. Plant oils: The perfect renewable resource for polymer science?! *Eur. Polym. J.* **47**, 837–852 (2011).
286. Butterworth, P. J. Lehninger: principles of biochemistry (4th edn). *Cell Biochem. Funct.* **23**, 293–294 (2005).
287. Huerta-Angeles, G., Brandejsová, M., Kulháněk, J. & Pavlík, V., Šmejkalová, D., Vágnerová, H. & Velebný, V. Linolenic acid grafted hyaluronan: Process development, structural characterization, biological assessing, and stability studies. *Carbohydr. Polym.* **152**, 815–824 (2016).

# **Chapitre B- Matériels et Méthodes**

---



## Sommaire

Introduction.....	101
I. Méthodes de caractérisation du greffage chimique .....	103
I.1. Spectroscopie Infra-Rouge (IR) .....	103
I.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	104
I.3. Dosage de Folin-Ciocalteu.....	107
II. Méthodes de caractérisation physico-chimiques .....	110
II.1. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco/UV .....	110
II.2. Rhéologie .....	114
II.2.1. Régime permanent .....	114
II.2.2. Régime dynamique.....	116
II.2.3. Appareillage et conditions d'analyse.....	119
III. Étude de la gélification .....	120
III.1. Mesure de l'activité enzymatique de la laccase.....	120
III.2. Etude rhéologique.....	121
III.2.1. Hydrogels biomimétiques par voie enzymatique .....	122
III.2.2. Hydrogels obtenus par photoréticulation .....	123
III.3. Propriétés de gonflement .....	123
IV. Activités biologiques.....	125
IV.1. Propriétés antioxydantes.....	125
IV.2. Tests de cytotoxicité.....	128
IV.2.1. Culture cellulaire des fibroblastes .....	129
IV.2.2. Préparation des échantillons à tester .....	129
IV.2.3. Test Live/Dead .....	130
IV.2.4. Test à l'Alamar Blue® .....	130
V. Réactifs et solvants utilisés.....	131
Références bibliographiques .....	136



## Introduction

Ce chapitre Matériels et Méthode est composé de 5 parties. La première partie regroupe les différentes méthodes utilisées pour la mise en évidence et la quantification des différentes réactions de greffage. La seconde rassemble les techniques employées pour déterminer les caractéristiques et propriétés physico-chimiques des polysaccharides précurseurs et modifiés chimiquement. La troisième partie est consacrée à l'élaboration des hydrogels ainsi qu'aux techniques permettant leurs caractérisations. La quatrième partie concerne les tests réalisés pour évaluer les activités biologiques des polysaccharides précurseurs et de leurs dérivés greffés. La dernière partie présente les polysaccharides précurseurs et les différents composés chimiques utilisés lors de notre étude.

## I. Méthodes de caractérisation du greffage chimique

### I.1. Spectroscopie Infra-Rouge (IR)

#### - Principe

La spectroscopie Infrarouge est basée sur l'interaction entre la matière et le rayonnement dans la partie infra-rouge du spectre électromagnétique. En spectroscopie IR, l'énergie de transition est souvent exprimée en termes de nombre d'ondes  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) car elle est directement proportionnelle à l'énergie  $E(J) = 1,986 \times 10^{-23} \times \nu$ . Le domaine de l'IR peut être divisé en trois régions : l'IR lointain (FIR)  $\nu$  entre 10 et 200  $\text{cm}^{-1}$  ( $\lambda$  entre  $10^{-3}$  et  $5 \times 10^{-5}$  m), l'IR moyen (MIR)  $\nu$  entre 200 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  ( $\lambda$  entre  $5 \times 10^{-5}$  et  $1,4 \times 10^{-6}$  m) et l'IR proche (NIR)  $\nu$  entre 4000 et 12 800  $\text{cm}^{-1}$  ( $\lambda$  entre  $1,4 \times 10^{-6}$  et  $7,8 \times 10^{-7}$  m). L'IR moyen est la région utilisée pour l'étude des vibrations fondamentales.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) repose sur l'utilisation des mesures dans le domaine temporel du rayonnement électromagnétique pour mesurer la cohérence temporelle de la lumière (Figure B-1). Après avoir traversé l'échantillon, l'interférogramme est mesuré. La transformée de Fourier mathématique est ensuite exécutée sur cet interférogramme donnant un spectre identique à celui de la spectroscopie IR classique (dispersive). La mesure d'un spectre est plus rapide avec la technique FTIR car l'information est recueillie simultanément à toutes les fréquences permettant la collecte de plusieurs scans et d'en faire la moyenne ce qui entraîne une amélioration de la sensibilité.

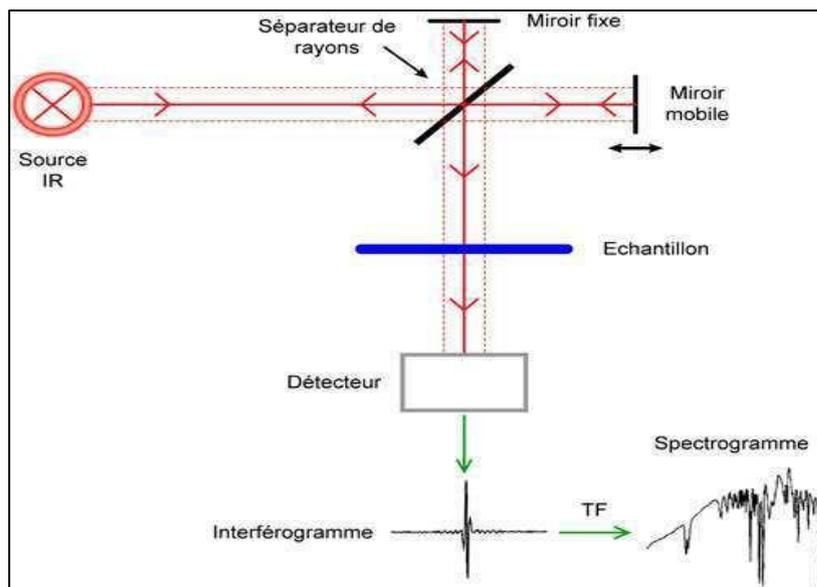


Figure B-1 : Principe de fonctionnement de la spectroscopie FTIR

- **Appareillage**

L'analyse IR a été réalisée directement sur la forme solide des produits grâce au spectrophotomètre Nicolet IS50 FT-IR (Thermo Scientific, USA) lié au logiciel OMNIC qui nous a servi par la suite pour le traitement des résultats obtenus. L'acquisition des spectres a été effectuée sur une plage de longueur d'ondes entre 600 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  avec l'accumulation de 128 scans et une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

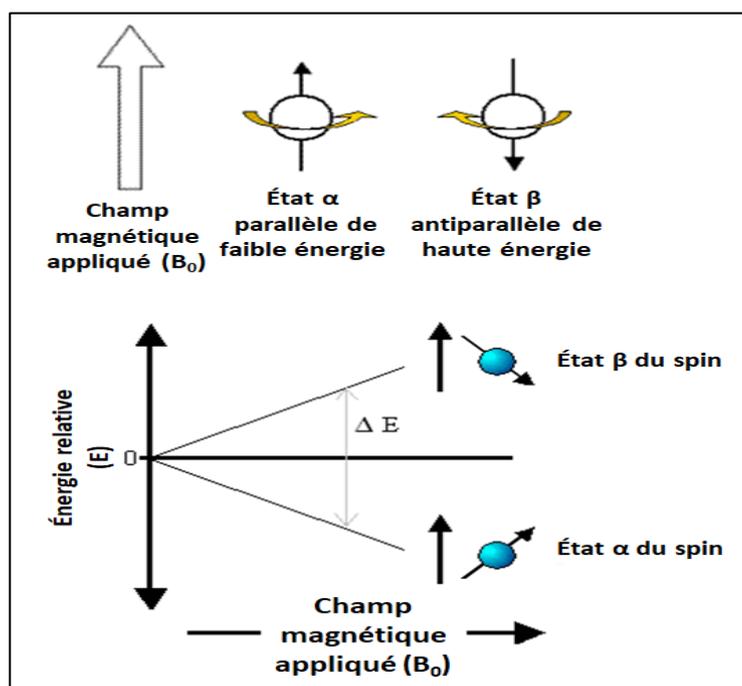
## I.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

- **Principe**

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire permet de déterminer les structures moléculaires en se basant sur la rotation des noyaux atomiques appelée spin nucléaire ( $I$ ). Tout comme les électrons qui ont un spin  $I = +\frac{1}{2}$  ou  $I = -\frac{1}{2}$ , certains noyaux atomiques possèdent également des spins chargés capables de créer un champ magnétique appelé moment magnétique ce qui permet de les étudier par RMN. Les noyaux avec des nombres pairs de neutrons et de protons n'ont aucun spin tandis que ceux avec des nombres impairs de neutrons et de protons ont des spins entiers. Le  $^1\text{H}$  (1 proton, 0 neutron) et le  $^{13}\text{C}$  (6 protons et 7 neutrons) contiennent des spins demi-entiers et sont donc utilisés en RMN.

En absence de champ magnétique externe ou appliqué ( $B_0$ ), les spins nucléaires sont orientés au hasard. Par contre, en appliquant un champ magnétique, les spins s'orientent par

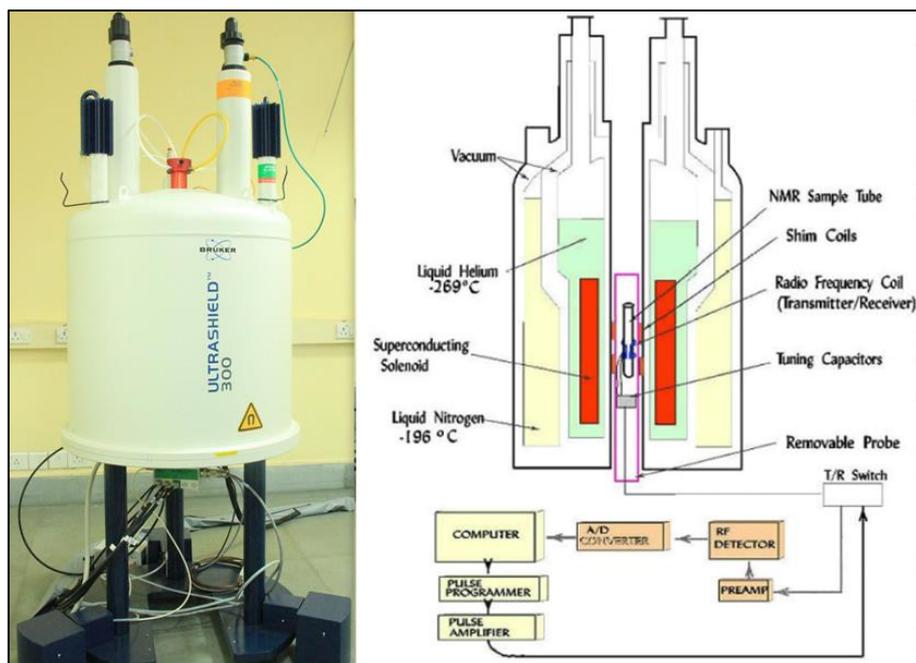
rapport au champ appliqué et possèdent deux états différents : un état de basse énergie parallèle à la force appliquée (état  $\alpha$ ) et un état antiparallèle d'énergie plus élevée (état  $\beta$ ). La différence d'énergie ( $\Delta E$ ) entre les deux états  $\alpha$  et  $\beta$  du spin varie proportionnellement à l'intensité du champ magnétique appliqué (Figure B-2). La valeur de  $\Delta E$  est à peu près de 0,02 cal/mol et se trouve dans la région de radiofréquence. L'énergie émise dans cette région produit un signal RMN.



**Figure B-2 :** Orientation des spins nucléaires suite à l'application d'un champ magnétique  $B_0$

- Appareillage

Les spectres RMN ont été enregistrés à température ambiante à l'aide du spectrophotomètre Bruker Advance AC-P 300 MHz (USA) dont les constituants sont présentés dans la figure suivante (Figure B-3).



**Figure B-3 :** Schéma représentatif d'un spectrophotomètre Bruker Advance AC-P 300 MHz

Dans notre étude, nous avons utilisé la RMN proton (RMN- $^1\text{H}$ ) pour caractériser les différents composés organiques, évaluer le degré de substitution (DS) et pour déterminer la pureté des dérivés obtenus suite au greffage de l'acide férulique ou de l'amine/acide gras insaturé sur les polysaccharides (PS) précurseurs : le pullulane, le carboxyméthylpullulane et l'acide hyaluronique. Pour cela, les différents échantillons sont dissous dans un solvant deutéré approprié à des concentrations convenables et introduits dans un tube de 5 mm. Le degré de substitution (DS) est défini comme étant le taux d'incorporation de motifs de la molécule greffée (acide férulique ou amine/acide gras insaturé) par rapport à l'unité de répétition du polysaccharide : (anhydroglucose (AGU) dans le cas du pullulane et du CMP, acide glucuronique lié N-acétylglucosamine (GAG) dans le cas de l'acide hyaluronique). Tous les spectres obtenus ont été traités par le logiciel MestReNova v.6.0.2-5475 en prenant le pic du solvant deutéré comme référence pour calibrer les déplacements chimiques des différents pics du spectre.

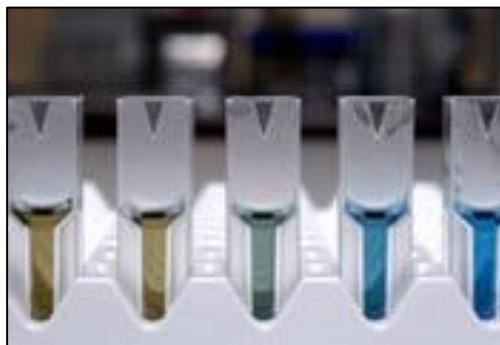
Dans le cas du pullulane greffé acide férulique, les produits obtenus ont été préparés à une concentration de 30 g/L dans un mélange  $\text{D}_2\text{O}$  et soude deutéré NaOD (30% massique dans  $\text{D}_2\text{O}$ ) à une proportion de 85/15 (v/v) pour assurer la bonne solubilité des échantillons. Avant de les analyser, les échantillons ont été agités à  $60^\circ\text{C}$  pendant 4h. Le même mélange solvant a été utilisé pour préparer les solutions des dérivés d'acide hyaluronique greffé acide férulique et amine gras insaturé mais à une concentration de 10g/L avec une agitation magnétique à l'ambiante pendant 48h pour réduire la viscosité des échantillons à analyser. Cette même

concentration a été appliquée dans la préparation des tubes RMN des dérivés de CMP greffé acide férulique et amine/acide gras insaturé mais dans le D<sub>2</sub>O uniquement sans utiliser la soude deutéré et en agitant pendant 16h à l'ambiante.

La procédure pour remonter au DS sera donnée dans les parties résultats.

### I.3. Dosage de Folin-Ciocalteu

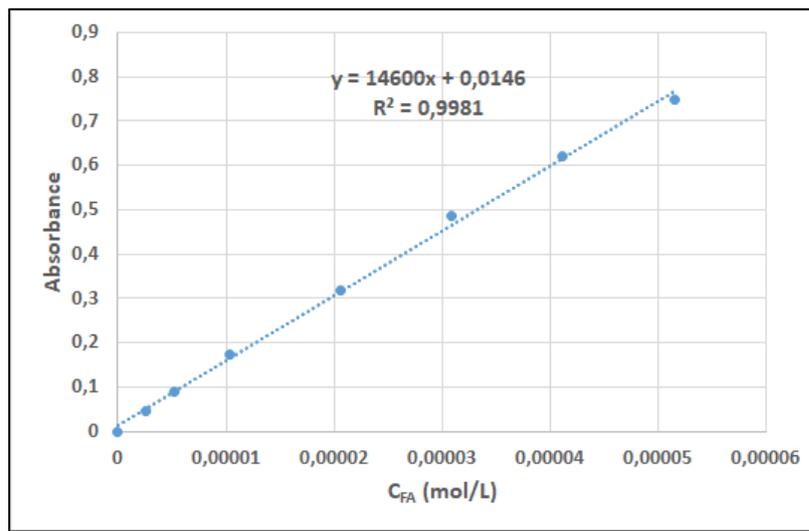
Le dosage de Folin-Ciocalteu permet de doser spécifiquement les composés phénoliques ou polyphénols qui sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyle<sup>1-3</sup>. Cette méthode sera utilisée sur les polysaccharides greffés acide férulique pour confirmer les DS obtenus par la RMN du proton. Ce dosage nécessite l'utilisation d'un réactif constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique appelé réactif de Folin-Ciocalteu. Les composés phénoliques présents dans l'échantillon s'oxydent en présence de ce réactif qui est à son tour réduit en un mélange d'oxydes de tungstène et de molybdène bleus produisant ainsi une coloration dont l'absorption maximale est comprise entre 725 et 750 (Figure B-4). L'absorption mesurée correspond alors à la quantité de phénol présent dans l'échantillon que l'on va relier à la quantité d'acide férulique et donc au DS.



**Figure B-4 :** Évolution de la coloration des échantillons contenant un phénol suite à la réaction avec le réactif de Folin-Ciocalteu

Dans notre cas, une courbe d'étalonnage a été effectuée avec différentes concentrations de FA (Figure B-5). Les échantillons ont été préparés comme suit ; des masses différentes d'acide férulique ont été solubilisées dans 1 mL d'un mélange d'eau milli-Q et éthanol absolue (90/10, v/v) de façon à obtenir des concentrations allant de  $5 \times 10^{-4}$  jusqu'à  $10^{-2}$  g/L, soit de  $2,57 \times 10^{-6}$  à  $5,15 \times 10^{-5}$  mol/L. Puis, on prélève 0,2 mL de chaque solution et on l'introduit dans un flacon en verre de 20 mL auquel on ajoute 18,8 mL de solution aqueuse de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhydre (42,5 g/L). Le mélange a été vivement agité au Vortex pendant quelques minutes puis on y

ajoute 1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu. Le mélange a été de nouveau agité vivement puis placé dans un bain marie à 70°C pendant 20 min. Ensuite, l'absorbance des solutions refroidies a été mesurée à une longueur d'onde de 750 nm en utilisant le spectrophotomètre UV-visible Cary 100 Bio (Varian, USA). Les échantillons des dérivés obtenus ont été préparés selon la même procédure mais à une concentration de 20 g/L dans le cas des systèmes à base de pullulane (PUL-FA) et de 5g/L pour ceux à base d'acide hyaluronique greffé d'acide férulique (HA-FA).



**Figure B-5 :** Étalonage pour la méthode de dosage de Folin-Ciocalteu réalisé à partir de solutions d'acide férulique

Les polysaccharides greffés (PS-FA) ont été étudiés pour remonter à la quantité de FA contenu dans ces échantillons à l'aide de l'équation de régression linéaire :  $A = 14\,600 \times C_{FA} + 0,0146$  avec  $r^2 = 0,998$ . Toutes les analyses ont été effectuées en triplicata et chaque valeur obtenue représente la moyenne de trois expériences indépendantes.

Le DS d'acide férulique obtenu par cette méthode ( $DS_{FA(Folin)}$ ) a été calculé comme suit :

$$DS_{FA(Folin)} = \frac{n_{FA}}{n_{PS-FA}} = \frac{C_{FA}}{C_{PS-FA}} \quad (\text{Eq. B1})$$

avec  $C_{FA}$ , la concentration de FA dans les échantillons déterminée avec la courbe d'étalonnage (en mol/L).

$$\text{or } C_{PS-FA} = \frac{C_s}{M_{0(PS-FA)}} \quad (\text{Eq. B2})$$

avec  $C_s$ , la concentration en g/L des échantillons analysés et  $M_{0(PS-FA)}$ , la masse molaire du motif de répétition du dérivé de polysaccharide greffé acide férulique (PS-FA).

$$\text{Donc l'Eq. B1 devient: } DS_{FA(Folin)} = \frac{C_{FA} \times M_{0(PS-FA)}}{C_s} \quad (\text{Eq. B3})$$

La quantité totale d'acide férulique peut être également exprimée en équivalent de FA (FA<sub>éq</sub>) en mg/g de dérivé PS-FA par l'équation suivante :

$$FA_{éq} = \frac{M_{FA} \times DS_{FA}}{M_{0(PS-FA)}} \times 10^3 \quad (\text{Eq. B4})$$

avec M<sub>FA</sub>, la masse molaire d'acide férulique.

Dans le cas des dérivés PUL-FA, la masse molaire du motif de répétition M<sub>0(PS-FA)</sub> est égale à : M<sub>0(PUL-FA)</sub> = 162 + (176,18 × DS<sub>FA(Folin)</sub>) et l'équation B3 devient :

$$DS_{FA(Folin)} = \frac{C_{FA} \times 162}{C_s - (176,18 \times C_{FA})} \quad (\text{Eq. B5})$$

et l'équation B4 devient:

$$FA_{éq} = \frac{M_{FA} \times DS_{FA}}{162 + (176,18 \times DS_{FA})} \quad (\text{Eq. B6})$$

Dans le cas des dérivés CMP-FA, la masse molaire du motif de répétition M<sub>0(PS-FA)</sub> est égale à : M<sub>0(CMP-FA)</sub> = 162 + (80 × DS<sub>COONa</sub>) + (310 × DS<sub>FA(Folin)</sub>) et l'équation B3 devient :

$$DS_{FA(Folin)} = \frac{C_{FA} \times (162 + (80 \times DS_{COONa}))}{C_s - (310 \times C_{FA})} \quad (\text{Eq. B7})$$

et l'équation B4 devient:

$$FA_{éq} = \frac{M_{FA} \times DS_{FA}}{162 + (80 \times DS_{COONa}) + (310 \times DS_{FA})} \quad (\text{Eq. B8})$$

Dans le cas des dérivés HA-FA en utilisant l'acide adipique dihydrazide (ADH) comme bras espaceur, la masse molaire du motif de répétition M<sub>0(PS-FA)</sub> est égale à M<sub>0(HA-ADH-FA)</sub> = 402,31 + (309,38 × DS<sub>FA(Folin)</sub>) et l'équation B3 devient :

$$DS_{FA(Folin)} = \frac{C_{FA} \times 402,31}{C_s - (309,38 \times C_{FA})} \quad (\text{Eq. B9})$$

et l'équation B4 devient:

$$FA_{éq} = \frac{M_{FA} \times DS_{FA}}{402,31 + (309,38 \times DS_{FA})} \quad (\text{Eq. B10})$$

Lorsque le bras espaceur est de l'acide malonique dihydrazide (MDH), la masse molaire du motif de répétition  $M_{0(PS-FA)}$  est  $M_{0(HA-MDH-FA)} = 402,31 + (267,3 \times DS_{FA(Folin)})$  et l'équation B3 devient :

$$DS_{FA(Folin)} = \frac{C_{FA} \times 402,31}{C_s - (267,3 \times C_{FA})} \quad (\text{Eq. B11})$$

et l'équation B4 devient:

$$FA_{\acute{e}q} = \frac{M_{FA} \times DS_{FA}}{402,31 + (267,3 \times DS_{FA})} \quad (\text{Eq. B12})$$

## II. Méthodes de caractérisation physico-chimiques

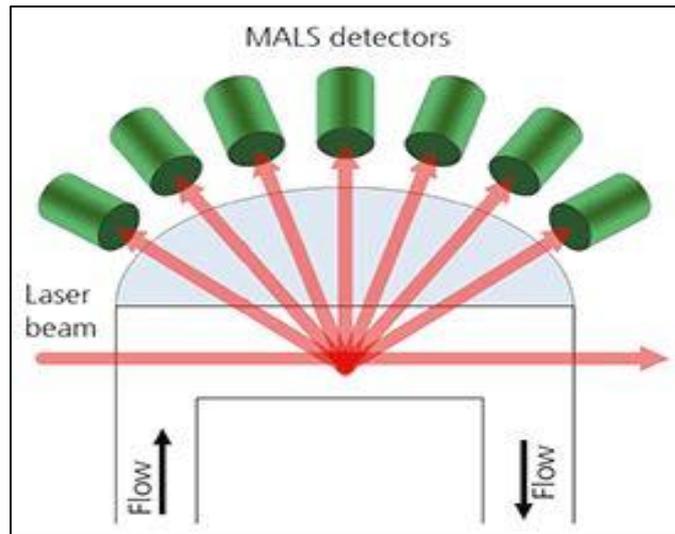
### II.1. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco/UV

#### - Principe

La chromatographie d'exclusion stérique (ou Size Exclusion Chromatography : SEC) est une méthode de chromatographie liquide basée sur la différence de pénétration des macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique ( $V_h$ ) dans les pores de tailles variables de la phase stationnaire. La séparation des macromolécules s'effectue dans le sens décroissant de leur  $V_h$ . Après un étalonnage adapté, cette technique donne accès aux masses molaires moyennes en nombre ( $M_n$ ) et en masse ( $M_w$ ) ainsi qu'à la dispersité des masses molaires ( $\mathcal{D} = M_w/M_n$ ).

Le couplage de la SEC avec un détecteur de diffusion statique de lumière multi-angle (Multi Angle Light Scattering : MALS) est devenue une technique très utilisée car elle permet de s'affranchir de l'étalonnage. En effet, dans ce système, la diffusion de la lumière en régime diluée, i.e. en présence de macromolécules à l'état isolé, permet l'accès aux grandeurs macromoléculaires ( $M_n$ ,  $M_w$ ,  $\mathcal{D}$ ) et la SEC devient ici uniquement une méthode de fractionnement stérique en amont de la caractérisation par diffusion de la lumière.

La diffusion multi-angles de la lumière est basée sur la mesure de l'intensité diffusée d'un soluté en solution qui est proportionnelle à sa concentration et à sa masse molaire. L'intensité diffusée peut également varier selon l'angle d'observation (Figure B-6) en fonction de la taille de l'objet diffusant en particulier de son rayon de giration ( $R_g$ ).



**Figure B-6 :** Principe de détection multi-angles

La diffusion peut être isotrope c'est-à-dire identique dans toutes les directions de l'espace si  $R_g < \lambda/20$  soit environ 35nm (avec  $\lambda=700\text{nm}$  en laser rouge) ou bien anisotrope si  $R_g > \lambda/20$ . Dans le cas d'une diffusion anisotrope, la dépendance angulaire liée au facteur de forme  $P(\theta)$  permettra l'accès au rayon de giration.  $P(\theta)$  décrit alors la diminution de l'intensité diffusée avec  $\theta$ .  $P(\theta)$  est exprimé comme suit :

$$P(\theta) = 1 - \frac{16 \times \pi^2}{3 \times \lambda^2} \times R_g^2 \times \sin^2 (\theta/2) \quad (\text{Eq. B13})$$

avec  $\lambda$  la longueur d'onde de la lumière incidente dans un solvant donné,  $R_g$  le rayon de giration qui décrit la distribution de la masse autour du centre de gravité et exprime ainsi la taille d'une particule quelle que soit sa forme. L'équation B13 permet donc de calculer le rayon de giration à partir de la pente initiale de la variation angulaire de l'intensité lumineuse diffusée.

La mesure en diffusion de la lumière passe par la détermination de l'intensité de la lumière diffusée par les macromolécules seules exprimée par le rapport de Rayleigh ( $R_\theta$ ) défini comme suit à un angle  $\theta$ :

$$R_\theta = f \frac{(I_\theta - I_{\theta\text{solvant}})}{I_0} \quad (\text{Eq. B14})$$

avec  $I_\theta$  l'intensité de la lumière diffusée par l'échantillon ;  $I_{\theta\text{solvant}}$ , l'intensité de la lumière diffusée par le solvant ;  $I_0$ , l'intensité du rayonnement incident et  $f$ , une constante expérimentale liée à la géométrie de l'appareil.

L'équation générale de la diffusion multi-angles de la lumière intégrant le facteur de forme (P(θ)) est donnée par la relation de Zimm :

$$\frac{k \times C}{\Delta R} = \frac{1}{M_w} \times \left( 1 + \frac{q^2 \times R_g^2}{3} \right) + (2 \times A_2 \times C) \quad (\text{Eq. B15})$$

avec C, la concentration en polymère,  $\Delta R_\theta$  la différence du rapport de Rayleigh à un angle donné entre la solution polymère à la concentration C et le solvant,  $M_w$  la masse molaire moyenne en poids,  $R_g$  le rayon de giration,  $A_2$  le 2<sup>ème</sup> coefficient du Viriel (paramètre thermodynamique de solvation du polymère dans le solvant), q la fonction d'onde ( $q=4\pi\sin(\theta/2)/\lambda$ ) et K une constante optique telle que :

$$k = \frac{4 \times \pi^2 \times n_0}{\lambda_0^4 \times N_A} \times (dn/dc)^2 \quad (\text{Eq. B16})$$

où  $n_0$ , l'indice de réfraction du solvant à la longueur d'onde du rayonnement incident ;  $\lambda_0$ , la longueur d'onde du rayonnement incident ;  $N_A$ , le nombre d'Avogadro et  $(dn/dc)$ , l'incrément d'indice de réfraction du soluté dans le solvant.

La concentration en polymère ( $C_i$ ) de chaque fraction éluée par la SEC est donnée par le détecteur réfractométrique différentiel (DRI) en ligne via la connaissance de l'incrément d'indice de réfraction  $dn/dC$ .

Ainsi pour chaque fraction éluée  $i$  supposée monodisperse du chromatogramme, le couplage SEC/MALS/DRI donne la concentration  $C_i$  et l'intensité diffusée en fonction de l'angle permettant l'accès à  $M_i$ , la masse molaire et  $R_{gi}$ , le rayon de giration (le cas échéant). L'intégration de l'ensemble du chromatogramme donne ainsi les masses molaires (ou rayon de giration) en nombre et en poids selon :

$$M_n = \frac{\sum n_i \times M_i}{\sum n_i} \quad (\text{Eq. B17})$$

$$M_w = \frac{\sum n_i \times M_i^2}{\sum n_i \times M_i} \quad (\text{Eq. B18})$$

Ainsi que la dispersité des masses molaires  $\mathbb{D}$  telle que :

$$\mathbb{D} = \frac{M_w}{M_n} \quad (\text{Eq. B19})$$

La viscosité intrinsèque ( $[\eta]$ ) de chaque fraction éluée de l'échantillon analysé peut être également déterminée en couplant un détecteur viscosimétrique (Visco) à la ligne d'analyse. La détermination de la viscosité relative passe alors par la mesure de différences de pression dans l'appareil avec un montage de type pont de Wheatstone. Connaissant  $C_i$ , il est alors possible de remonter à la viscosité réduite permettant l'accès à la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  via la relation d'Huggins.

La connaissance de la distribution des masses molaires conjointement à la distribution des  $[\eta]$  donne naturellement accès à la relation de Mark-Houwink-Sakurada :

$$[\eta] = K \times M^a \quad (\text{Eq. B20})$$

Cette relation, classique pour des polymères en solution permet de caractériser leur conformation à travers le coefficient  $a$ . Ainsi quand le polymère est compact, l'indice  $a$  tend vers une valeur de 0,5 (valeur critique dite des conditions thêta ( $\Theta$ )), cet indice atteint une valeur entre 0,7 et 0,8 quand il s'agit d'une pelote statistique en bon solvant tandis que pour une conformation plus rigide, l'indice  $a$  augmente jusqu'à une valeur théorique de 1,8.

La détermination de  $[\eta]$  permet également de remonter au rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) à partir de la relation de Einstein-Simha (Eq. B21) en supposant que la conformation de la molécule est sphérique :

$$R_h = \left( \frac{3 \times [\eta] \times M}{4 \times \pi \times v \times N_A} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (\text{Eq. B21})$$

avec  $[\eta]$  la viscosité intrinsèque,  $M$  la masse molaire,  $N_A$  le nombre d'Avogadro et  $v$  un facteur qui vaut 2,5 dans le cas d'une conformation sphérique.

#### - Appareillage

L'analyse des échantillons a été réalisée à 25°C en couplant la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) à quatre détecteurs : un détecteur de diffusion statique de lumière multi-angle (MALS) (DAWN HELEOS, Wyatt Technology, USA) équipé d'un laser Ga-As ( $\lambda = 690$  nm) et d'une cellule K5 de 66  $\mu\text{L}$  et 18 photodiodes (normalisée avec le détecteur à 90° en utilisant l'albumine de sérum de bovin (BSA)), un détecteur réfractométrique différentiel (DRI) (RID-10A, Shimadzu, Japon), un détecteur viscosimétrique (Visco) (ViscostarII, Wyatt Technology, USA) et un spectrophotomètre ultraviolet (UV) (SPD-M20A Shimadzu, Japon).

La ligne SEC est composée d'un dégazeur (DGU-20A3 Shimadzu, Japon), d'une pompe (LC10Ai Shimadzu, Japon) avec un débit de 0,5 mL/min, d'une colonne de garde pour la protection (OHPAK SB-G, Shodex, Japon) et de deux colonnes en série (OHPAK SB 804 et 806 HQ, Shodex, Japon). Les colonnes sont composées d'un gel poreux de polyhydroxyméthylmétacrylate. Une solution aqueuse de  $\text{LiNO}_3$  (0,1M), filtrée préalablement sur un filtre de 0,1  $\mu\text{m}$  (Millipore, USA), a été utilisée comme éluant.

Tous les échantillons à analyser ont été préparés à une concentration de 1g/L dans  $\text{LiNO}_3$  0,1 mol/L à température ambiante avec une agitation magnétique de 400 tr/min pendant une nuit. Les solutions filtrées, sur un filtre en cellulose régénérée de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, USA), ont été injectées (100  $\mu\text{L}$ ) en utilisant une vanne d'injection automatique (SIL-20A Shimadzu, Japon). Toutes les données acquises ont été traitées par le logiciel Astra 6.1.7.16 via la procédure Zimm d'ordre 1. La concentration de chaque fraction éluée a été déterminée par DRI avec un incrément d'indice de réfraction  $dn/dc$  de 0,15 mL/g pour le pullulane<sup>4</sup> et ses dérivés, 0,14 mL/g pour le CMP<sup>5</sup> et ses dérivés et 0,155 mL/g pour l'acide hyaluronique et ses dérivés<sup>6</sup>.

## II.2. Rhéologie

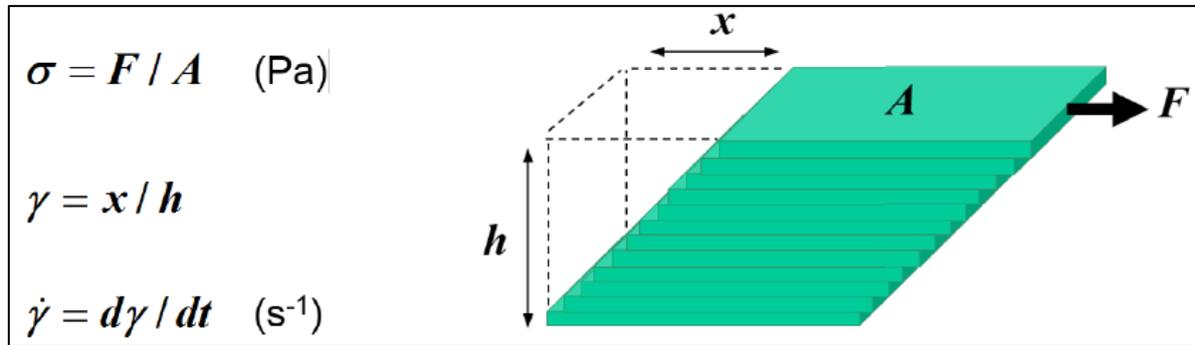
La rhéologie est définie comme étant l'étude de l'écoulement ou de la déformation d'un matériau soumis à une contrainte de cisaillement. La rhéologie concerne donc principalement l'étude du comportement des liquides visqueux ou viscoélastiques. Elle peut cependant permettre dans une certaine mesure la caractérisation de matériaux mous élastiques tels que les gels. La rhéologie en mode écoulement permet les mesures de viscosité, tandis que le mode dynamique dans le domaine de linéarité des propriétés viscoélastiques permet l'accès aux propriétés mécaniques (évaluation des modules de viscosité ( $G''$ ) et d'élasticité ( $G'$ )).

### II.2.1. Régime permanent

Le régime permanent est dédié à l'étude de l'écoulement des solutions de polymère. Le matériau subit un cisaillement entre une surface fixe et une surface mobile. Dans un écoulement laminaire ce matériau peut alors être assimilé à une succession de couches minces superposées glissant les unes sur les autres indépendamment et sans échange de matière. Le déplacement de ces couches présente alors un profil de gradient où la couche au contact de la surface fixe ne bouge pas et où la couche au contact de la surface mobile se déplace le plus vite (Figure B-7)..

L'application d'une contrainte ( $\sigma$ ), définie comme étant la force ( $F$ ) agissant sur une unité de surface ( $A$ ), entraîne le déplacement du matériau pour lequel nous allons mesurer la

déformation ( $\gamma$ ) ainsi que le gradient ou taux de cisaillement appelé aussi improprement vitesse de cisaillement ( $\dot{\gamma}$ ) qui correspond au gradient de déformation dans le temps ( $d\gamma/dt$ ).



**Figure B-7 :** Quantification de la déformation et de la vitesse de déformation des couches d'un fluide glissant les unes sur les autres dans un écoulement laminaire

Le rapport entre la contrainte de cisaillement ou 'shear stress' ( $\sigma$ ) et le gradient de cisaillement ou 'shear rate' ( $\dot{\gamma}$ ) conduit, selon la loi de Newton, à la viscosité ( $\eta$ ) qui est une mesure quantitative de la friction interne du fluide associée à l'amortissement ou à la perte de l'énergie cinétique dans le système quand une contrainte est appliquée :

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad (\text{Eq. B22})$$

avec  $\eta$  la viscosité exprimée en Pa.s,  $\sigma$  la contrainte exprimée en Pa,  $\dot{\gamma}$  le gradient de cisaillement exprimée en  $\text{s}^{-1}$ . La viscosité dépend de la température, de la pression, de la concentration et de la masse molaire du polymère et selon les cas du gradient de cisaillement.

Deux grandes familles d'écoulement sont généralement rapportées : les fluides newtoniens et non newtoniens (Figure B-8). Les fluides newtoniens, les plus simples présentent une relation linéaire entre la contrainte et le gradient de cisaillement. En d'autres termes, la viscosité est indépendante du cisaillement. Les fluides non newtoniens se divisent également en 2 familles distinctes : les fluides rhéofluidifiants qui voient la viscosité diminuer sous l'effet du cisaillement (comportement le plus fréquent notamment en présence de solution de polymère) et les fluides rhéoépaississants pour lesquels la viscosité augmente sous l'effet du cisaillement (comportement plus rare rencontré dans les suspensions de certains amidons de maïs par exemple).

Enfin certains matériaux présentent des comportements du type fluides à seuil de contrainte. Dans ce cas, une contrainte minimale (contrainte seuil) est nécessaire pour 'déclencher' l'écoulement. En fait cette contrainte seuil est éminemment dépendante du temps.

Une fois cette contrainte seuil franchie, le comportement peut être newtonien (fluides plastiques de Bingham) ou bien rhéofluidifiants (fluides pseudoplastiques ou de Casson).

Pour ces comportements spécifiques, des modèles pertinents existent tels que le modèle de Cross ou Williamson pour les fluides rhéofluidifiants ou encore le modèle d'Herschel Bulkley pour les fluides à seuil de Casson.

Dans le cas des comportements non-Newtoniens (rhéofluidifiant, Casson et plus rarement rhéoépaississant), un phénomène de thixotropie peut être observé. Un fluide est dit thixotrope, lorsque le retour à la viscosité initiale dépend du temps. Ceci s'explique par des modifications de structures qui dépendent du temps ou par des réarrangements structurels non instantanés.

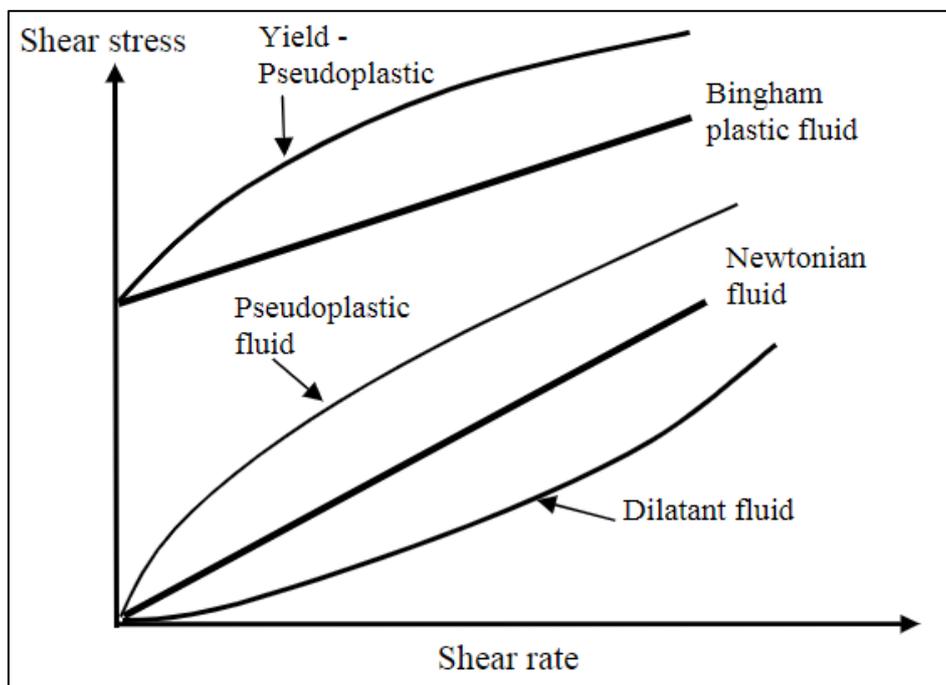
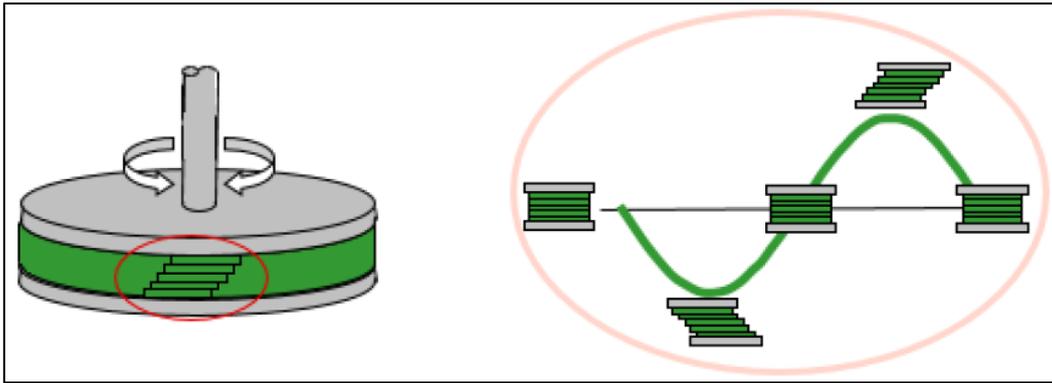


Figure B-8 : Types de comportement d'écoulement d'un fluide<sup>7</sup>

### II.2.2. Régime dynamique

Le régime dynamique permet de caractériser les propriétés mécaniques (viscoélastiques) des matériaux en fonction d'une contrainte de cisaillement (amplitude de cisaillement) et de l'oscillation. Pour ceci, une contrainte de cisaillement sinusoïdale est imposée à une pulsation ( $\omega$ ) (exprimée en rad/s et proportionnelle à la fréquence avec  $\omega = 2 \times \pi \times f$ ) (Figure B-9).

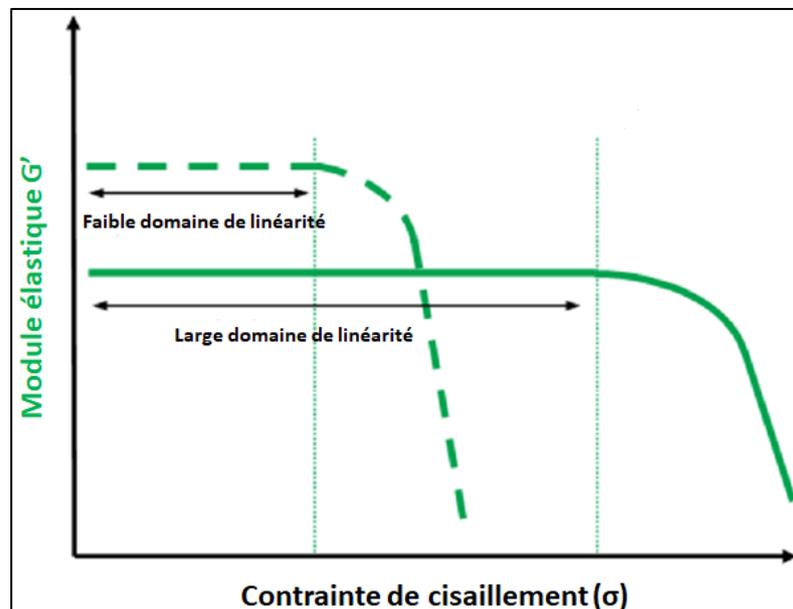


**Figure B-9 :** Illustration de la déformation d'un échantillon placé entre deux plans parallèles et soumis à une contrainte de cisaillement sinusoïdale

La contrainte de cisaillement appliquée est représentée donc par l'équation suivante :

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t) \quad (\text{Eq. B23})$$

Le balayage de la contrainte à une fréquence de sollicitation donnée permet de déterminer le domaine linéaire du matériau qui correspond au domaine où la contrainte appliquée est insuffisante pour déstructurer le matériau (domaine de réponse linéaire) (Figure B-10).



**Figure B-10 :** Schéma représentatif de deux domaines de linéarité (faible et large)

La déformation résultante du matériau est alors mesurée dans le domaine de linéarité. C'est une fonction identique à la contrainte mais avec un déphasage ( $\delta$ ) :

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (\text{Eq. B24})$$

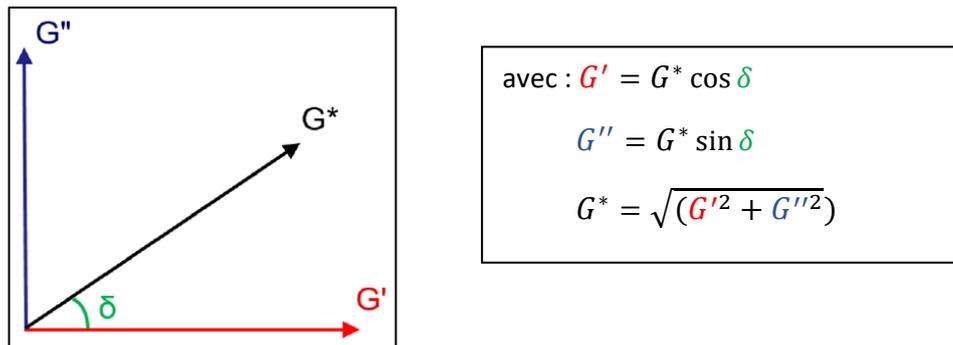
Le rapport entre la contrainte appliquée et la déformation mesurée donne le module complexe  $G^*$  qui correspond à la quantification de la rigidité ou de la résistance du matériau à la déformation et regroupe ainsi les contributions élastiques et visqueuses :

$$G^* = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \quad (\text{Eq. B25})$$

Il est également possible de définir la viscosité complexe ( $\eta^*$ ) qui mesure la résistance totale du matériau à l'écoulement en fonction de la pulsation ( $\omega$ ) :

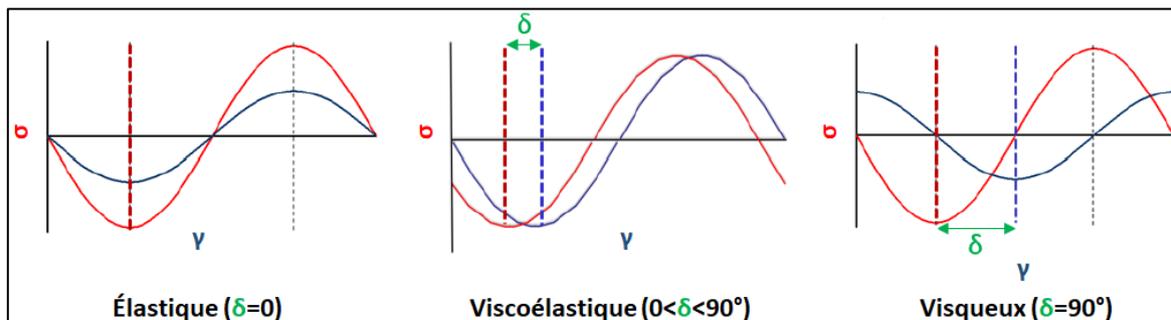
$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} \quad (\text{Eq. B26})$$

En utilisant la trigonométrie, il est possible de déterminer les composantes élastique  $G'$  (de conservation) et visqueuse  $G''$  (de perte) du module comme le montre le diagramme vectoriel suivant (Figure B-11).



**Figure B-11** : Relation géométrique entre  $G^*$  et ses composantes  $G'$  et  $G''$

$G'$  représente la capacité du matériau à stocker de l'énergie tandis que  $G''$  représente la perte de l'énergie. Le déphasage ( $\delta$ ) est égal à 0 pour un matériau purement élastique et à  $\pi/2$  pour un matériau totalement visqueux. Les matériaux viscoélastiques ont une valeur de déphasage comprise entre 0 et  $\pi/2$  (Figure B-12).



**Figure B-12** : Relation entre la contrainte et la déformation pour un matériau élastique, viscoélastique et visqueux

Par conséquent, le module de conservation ( $G'$ ) (en phase avec la sollicitation) et le module de perte ( $G''$ ) (en déphasage de  $\delta$  avec la sollicitation) peuvent être calculés selon les équations suivantes :

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad (\text{Eq. B27})$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad (\text{Eq. B28})$$

Pour déterminer  $G'$  et  $G''$  (exprimés en Pa), il est nécessaire de se déplacer dans le domaine linéaire où ces deux modules sont indépendants de la contrainte imposée. Dans le cas d'un matériau viscoélastique, à basse fréquence,  $G' < G''$  et donc le comportement de type visqueux (liquide) est dominant alors qu'à haute fréquence  $G' > G''$  et donc le comportement de type élastique (solide) est dominant. La fréquence à laquelle  $G'$  et  $G''$  se croisent est égale à  $1/\tau$  avec  $\tau$  le temps de relaxation.  $\delta$  est souvent exprimé par la tangente de perte ( $\tan \delta$ ) selon la relation suivante :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (\text{Eq. B29})$$

### II.2.3. Appareillage et conditions d'analyse

L'étude rhéologique (en modes permanent et dynamique), a été réalisée à l'aide du rhéomètre Discovery HR-2 (TA Instrument, UK) en utilisant deux géométries : une géométrie 'doubles-cylindres concentriques' de taille standard (aluminium – gap 500  $\mu\text{m}$ ) et une géométrie cône-plan (diamètre 4 cm, angle 2°, gap 57  $\mu\text{m}$ ). Une température de 25°C a été maintenue le long des analyses à l'aide d'un effet Peltier et les mesures ont été reproduites trois fois. Les résultats obtenus ont été traités avec le logiciel Trios V 4.1.1.33003.

Dans le cas du pullulane et des dérivés obtenus, les solutions ont été préparées à des concentrations de 40, 70 et 100 g/L dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5). Le même tampon a été utilisé pour préparer les solutions de CMP et ses dérivés greffés acide férulique mais à une concentration de 20g/L. Dans ces deux cas, les analyses ont été effectuées en employant la géométrie 'doubles-cylindres concentriques'.

Dans le cas d'acide hyaluronique et des produits à base de HA obtenus suite au greffage de l'acide férulique, les échantillons ont été préparés dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) à des concentrations de 5, 10 et 15 g/L. Concernant l'acide hyaluronique, le CMP et leurs dérivés greffés amine/acide gras insaturé, les produits ont été solubilisés dans

l'eau milli-Q de manière à avoir des concentrations de 5, 10 et 15 g/L. Dans ces cas, la géométrie utilisée était la géométrie cône-plan 4cm vue la viscosité élevée de ces échantillons.

### III. Étude de la gélification

#### III.1. Mesure de l'activité enzymatique de la laccase

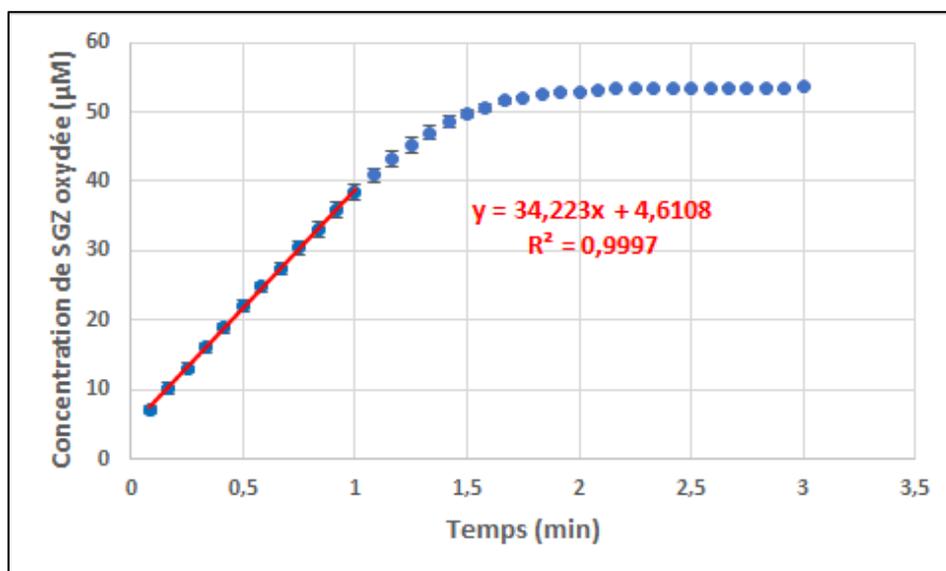
Cette partie concerne uniquement les hydrogels biomimétiques obtenus par voie enzymatique à partir des dérivés greffés acide férulique.

La laccase (*p*-diphénol : dioxygène oxydoréductase) appartient à la famille des enzymes oxydases multi-cuivres. Chaque molécule contient quatre ions cuivre capables d'oxyder des noyaux aromatiques tel que les composées phénoliques en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons permettant l'élimination des radicaux hydrogène des fonctions hydroxyle<sup>8</sup>. La laccase possède 15 à 30% de glucides et une masse molaire comprise entre  $6 \times 10^4$  et  $9 \times 10^4$  g/mol<sup>9</sup>. Elle est largement distribuée dans les bactéries, les champignons et les insectes.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé deux laccases d'origine différente. La première provient du champignon *Trametes vericolor* tandis que la seconde est extraite du champignon *Pleurotus ostreatus*. Ces deux enzymes (EC 1.10.3.2) ont été achetées chez Sigma avec des activités respectives  $\geq 0,5$  U/mg et  $\geq 4$  U/mg. Une unité d'enzyme (U) correspond à la quantité de la laccase nécessaire pour oxyder 1  $\mu$ mol de pyrocatechol (benzène-1,2-diol) par minute à 25 °C, à pH 5 dans le cas de la laccase de *Trametes vericolor* et à pH 4,5 dans le cas de la laccase de *Pleurotus ostreatus* (données fournies par Sigma).

Avant de procéder à la gélification des dérivés de polysaccharides greffés acide férulique (PUL-FA, CMP-FA et HA-FA), nous avons souhaité évaluer l'activité des deux laccases utilisées afin de ne pas raisonner en masse d'enzyme mais en activité d'enzyme afin de s'affranchir de ce paramètre qui peut varier d'un lot à l'autre ainsi que dans le temps. Cette activité est obtenue via l'oxydation de la syringaldazine (SGZ)<sup>10,11</sup>. Pour cela, la laccase est solubilisée dans un tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH= 5,5) à une concentration de 0,1 g/L. En même temps, la syringaldazine est solubilisée dans l'éthanol à une concentration de 0,8 mM. Puis, dans une cuve semi-micro (VWR, France), on introduit 20  $\mu$ L de la solution de laccase, 350  $\mu$ L de la solution de SGZ et 1,63 mL du tampon citrate/phosphate. Un suivi cinétique de l'oxydation enzymatique de la SGZ est réalisé pendant 3 min en mesurant l'absorbance de la solution à une longueur d'onde de 530 nm chaque 5 secondes à l'aide du spectrophotomètre UV-visible Cary 100 Bio (Varian, USA). La mesure de l'absorbance permet

de remonter à la concentration de SGZ oxydée en utilisant le coefficient d'extinction ( $\epsilon$ ) de  $65000 \text{ L/mol.cm}^{12}$ . L'activité enzymatique de la laccase est déterminée à partir de la pente de la partie linéaire au début de la courbe de la concentration de SGZ oxydée en fonction du temps (Figure B-13).



**Figure B-13 :** Évolution de la concentration de SGZ oxydée ( $[\text{SGZ}]_{\text{initiale}} = 0,14 \text{ mM}$ ) lors de l'action de la laccase de *Trametes versicolor* ( $[\text{laccase}]_{\text{initiale}} = 10^{-3} \text{ g/L}$ ) en fonction du temps dans le mélange tampon citrate-phosphate/éthanol (82,5/17,5, v/v) à  $25^\circ\text{C}$  (partie linéaire de la courbe en rouge)

Le rapport pente / concentration en laccase correspond à l'activité de l'enzyme. Cette analyse a été réalisée trois fois avec une très bonne répétabilité qui donne dans notre cas une activité de  $3,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  c'est-à-dire  $3,5 \text{ U mg}^{-1}$  ou  $58,3 \text{ nkat mg}^{-1}$  (avec  $1 \text{ U} = \frac{1}{6} \times 10^2 \text{ nkat}$ ) pour la laccase de *Trametes versicolor* et une activité de  $6 \text{ U mg}^{-1}$ , soit  $100 \text{ nkat mg}^{-1}$  pour la laccase de *Pleurotus ostreatus*. Une unité d'enzyme (U) est définie comme étant la quantité de la laccase nécessaire pour oxyder  $1 \mu\text{mol}$  de SGZ par minute. Nous n'avons pas constaté de variation significative au cours du temps et des lots de ces activités.

### III.2. Etude rhéologique

La réaction de gélification a été réalisée *in situ* dans le rhéomètre Discovery HR-2 de TA Instrument (UK). Ce dernier nous a permis de suivre la cinétique de la formation de l'hydrogel en mesurant les modules de conservation ( $G'$ ) et de perte ( $G''$ ) en fonction du temps et de déterminer leurs propriétés mécaniques finales. Une fréquence de  $1 \text{ Hz}$  et une déformation de  $2\%$  ont été imposées (domaine viscoélastique linéaire). Les mesures ont été reproduites en

trois exemplaires et ont montré une bonne reproductibilité. Le Tableau B-1 présente un exemple de reproductibilité dans le cas des dérivés HA-FA.

**Tableau B-1 : Exemple de test de reproductibilité de l'étude rhéologique de la réaction de gélification dans le cas des dérivés HA-FA**

Produit	$G'$ (t=70 min) (Pa)	$G'_{\text{moy}}$ (t=70 min) (Pa)	$G''$ (t=70 min) (Pa)	$G''_{\text{moy}}$ (t=70 min) (Pa)	$t_{\text{gel}}$ (min)	$t_{\text{gel moy}}$ (min)
HA-FA	99	93,7	0,82	0,87	2,3	2,1
HA-FA bis	93	$\pm 5,4\%$	0,83	$\pm 9,5\%$	2,15	$\pm 11\%$
HA-FA tris	89		0,97		1,85	

### III.2.1. Hydrogels biomimétiques par voie enzymatique

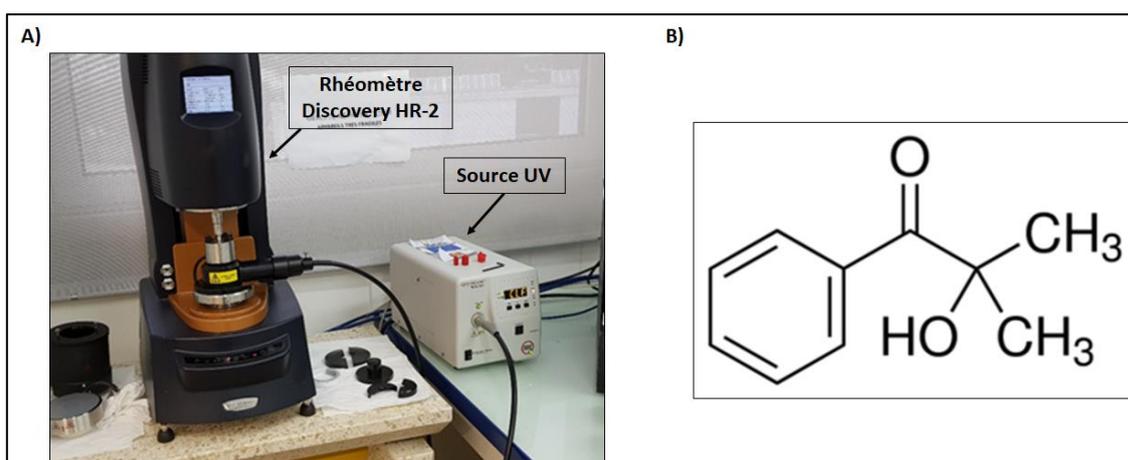
Dans le cas des dérivés de pullulane greffé acide férulique (PUL-FA), trois concentrations (40,70 et 100 g/L) ont été préparées dans le tampon citrate/phosphate (0,1M, pH=5,5) à température ambiante. Une solution concentrée (1g/L) de laccase *Trametes versicolor* a été également préparée dans le même milieu. Cette solution a été ensuite diluée pour obtenir 3 concentrations différentes qui permettent ensuite d'avoir après ajout dans la solution de PUL-FA, 3 activités en enzyme (0,5 ; 1 et 2 nkat). Le mélange (PUL-FA + laccase) est réalisé manuellement (environ 1 à 2 min). Il est introduit immédiatement après dans la géométrie 'doubles-cylindres concentriques' du rhéomètre. Le temps écoulé pendant l'agitation manuelle et l'introduction de la solution dans la géométrie du rhéomètre a été pris en compte dans le tracé des courbes de  $G'$ ,  $G''$ ,  $\eta^*$  et  $\tan \delta$  en fonction du temps.

Cette même procédure a été utilisée pour la gélification des CMP-FA greffé acide férulique mais à une concentration de 20 g/L et une activité enzymatique de 0,2 ; 1 et 2 nkat en laccase de *Pleurotus ostreatus*.

Pour les dérivés HA-FA, une géométrie cône-plan (4 cm, angle 2°) a été utilisée en raison de la plus forte viscosité du HA. Selon la masse molaire du HA, nous avons travaillé à 5 ; 10 et 15g/L. La solution de HA-FA est versée et étalée sur le plateau du rhéomètre à laquelle un petit volume d'une solution de laccase est ajouté directement pour avoir une activité de 0,1 ; 0,2 ou 1 nkat. La mesure est déclenchée après environ 40 secondes (temps de la baisse de la géométrie). Ce temps a été pris en compte dans les mesures rhéologiques.

### III.2.2. Hydrogels obtenus par photoréticulation

Pour suivre la cinétique de la formation des hydrogels obtenus par photoréticulation, le rhéomètre avec une géométrie cône-plan spécifique (2 cm, angle 2°, gap 57  $\mu\text{m}$ ) a été relié à une photodiode UV de longueur d'onde entre 320 et 500 nm avec un pic primaire à 365 nm (UV Light Guide Accessory TA Instrument, UK). Le plan est en quartz permettant l'illumination de la solution par le dessous (Figure B-14-A). Un même protocole a été utilisé pour les dérivés du CMP et du HA modifiés amine/acide gras insaturé. Elle consiste à préparer à température ambiante une solution de 50 g/L dans le cas du CMP modifié et de 25 g/L dans le cas du HA modifié dans l'eau milli-Q à laquelle une solution de Darocur® 1173 (photoamorceur) (Figure B-14-B) est ajoutée de façon à obtenir une concentration de 15g/L de Darocur® dans la solution finale. Le mélange est vigoureusement agité pendant 30 s et introduit ensuite sur la géométrie plane du rhéomètre. La mesure est ainsi déclenchée et après 2 min, une irradiation à l'intensité de 70  $\text{mW}/\text{cm}^2$  pendant 3 min a été exercée déclenchant ainsi la photoréticulation et par conséquent le début de la gélification.



**Figure B-14 :** A) Rhéomètre Discovery HR-2 lié à une source UV (UV Light Guide Accessory) pour l'étude rhéologique *in situ* de la gélification par photoréticulation.

B) Structure du Darocur® 1173

### III.3. Propriétés de gonflement

Faute de temps, lors de ce travail de thèse, nous avons pu évaluer uniquement les propriétés de gonflement des hydrogels biomimétiques obtenus par voie enzymatique.

Le protocole d'élaboration de ces hydrogels a été décrit dans la partie III.2.1. La seule différence se situe au niveau des volumes afin d'obtenir suffisamment de matière hydrogel pour réaliser les études de gonflement et au niveau du temps de réaction de la réticulation qui a été

fixé à 24h. Les hydrogels obtenus ont été soigneusement lavés à l'eau milli-Q pour éliminer le sel et l'enzyme, congelés puis lyophilisés pendant 1 semaine. Pour la cinétique de gonflement, une masse connue exactement d'hydrogel sec a été immergée dans 20 mL d'eau milli-Q à température ambiante et à pression atmosphérique jusqu'à atteindre l'équilibre de gonflement. La prise en eau a été suivie pendant la phase de gonflement où à chaque temps  $t$ , l'hydrogel est retiré de la solution et est pesé après l'élimination de l'excès d'eau par des lingettes pour tâches délicates (Kimtech). Le taux de gonflement d'hydrogel a été calculé à chaque temps de mesure par la relation suivante :

$$Q = \frac{m - m_0}{m_0} \quad (\text{Eq. B30})$$

avec  $m$  la masse de l'hydrogel à l'instant  $t$  et  $m_0$  la masse de l'hydrogel sec avant le gonflement.

Les conditions de synthèse des hydrogels à partir des 3 polysaccharides greffés FA ainsi que les conditions de mesure des gonflements sont récapitulées dans le Tableau B-2.

**Tableau B-2 : Récapitulatif des conditions de synthèse et de mesures de gonflements des différents hydrogels**

<b>Produit</b>	<b>Concentration en polysaccharide (g/L)</b>	<b>Activité enzymatique (nkat)</b>	<b>Milieu d'étude</b>
<b>PUL-FA</b>	40 – 70 – 100	0,5 – 1 – 2	Eau milli-Q
<b>CMP-FA</b>	20	2	Eau milli-Q Tampon citrate/phosphate (0,1mol/L, pH=5,5) NaCl 0,15 mol/L
<b>HA-FA</b>	5 – 10 – 15	0,1 – 0,2 – 1	Eau milli-Q NaCl 2 mol/L HCl (pH = 2) HCl (pH = 4)

Chaque expérience de gonflement a été réalisée trois fois pour donner la valeur moyenne qui est peu éloignée des trois mesures (bonne répétabilité).

## IV. Activités biologiques

### IV.1. Propriétés antioxydantes

#### - Principe

Les antioxydants sont considérés comme des composés bioactifs importants en raison de leurs nombreux bienfaits pour la santé et de leur rôle pivot dans le retardement du rancissement oxydatif de nombreux aliments. Un antioxydant est une molécule capable d'inhiber l'oxydation d'autres molécules. L'oxydation est une réaction chimique basée sur le transfert d'un électron ou d'un hydrogène d'une substance à un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui peuvent déclencher des réactions en chaîne. En se produisant dans une cellule, ces dernières réactions peuvent endommager et causer la mort cellulaire. Les antioxydants ont la capacité d'arrêter la propagation de ces réactions oxydatives en éliminant ou en piégeant les radicaux libres. Ils sont également responsables des mécanismes de défense de l'organisme contre les pathologies associées à l'attaque des radicaux libres. Par conséquent, l'apport d'antioxydants d'origine végétale est primordial dans la prévention des maladies dégénératives causées par le stress oxydant comme l'Alzheimer, le cancer, le Parkinson et l'athérosclérose. Une classification des principaux antioxydants est représentée dans la figure suivante (Figure B-15).

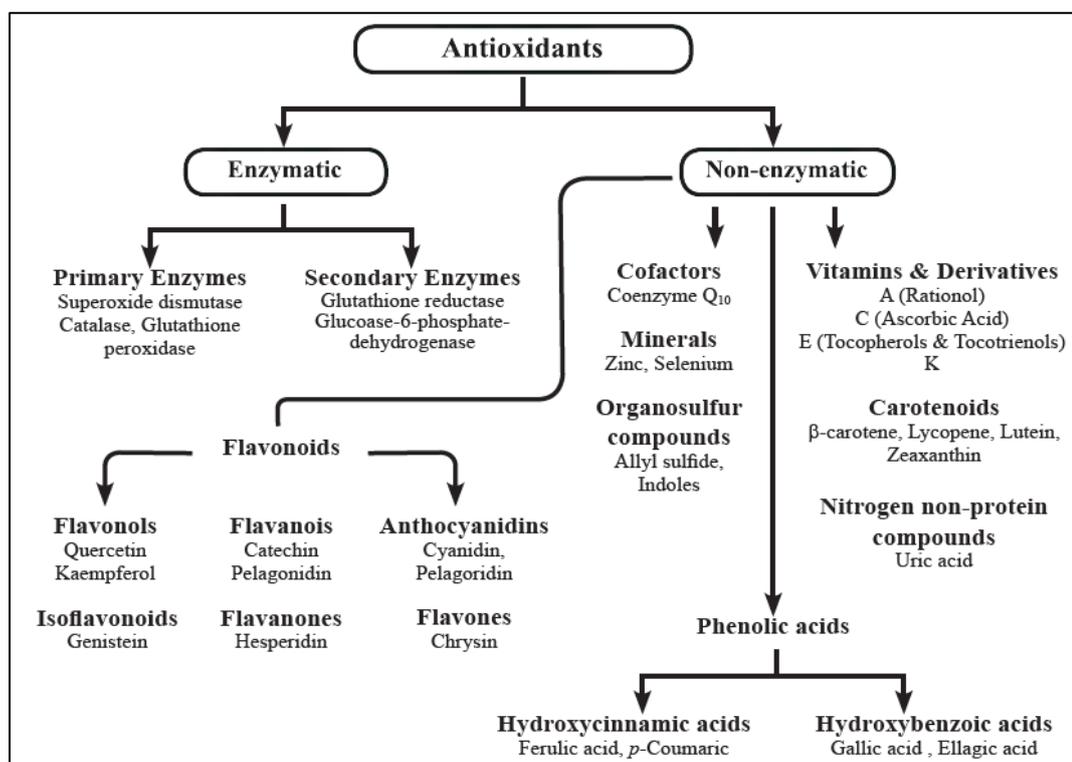
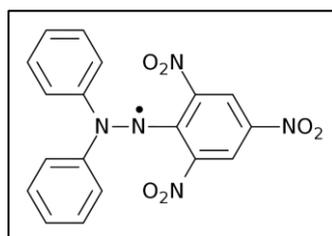


Figure B-15 : Classification des antioxydants<sup>13</sup>

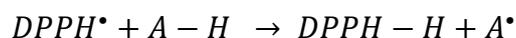
Les diverses méthodes permettant l'évaluation de l'activité antioxydante sont basées sur trois techniques différentes : la spectrométrie, l'électrochimie et la chromatographie. Mais la technique la plus utilisée reste celle de spectrométrie dont les tests les plus répandus sont FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Poxer), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), les radicaux ABTS<sup>•</sup> (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) et les radicaux libres DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Dans nos travaux, nous avons choisi d'évaluer les propriétés antioxydantes de nos produits par la méthode des radicaux libres DPPH<sup>•</sup> souvent utilisée dans le cas des composés phénoliques<sup>14,15</sup> permettant ainsi quelques comparaisons.

Le DPPH<sup>•</sup> est un radical libre stable sous forme de poudre de couleur violet intense. Sa structure montre la présence d'un électron de valence non apparié sur un atome d'azote (Figure B-16).

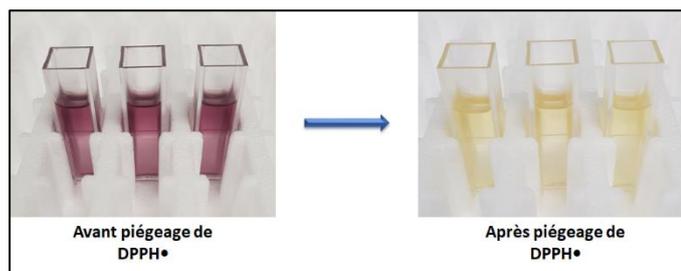


**Figure B-16 :** Structure chimique du radical libre DPPH<sup>•</sup>

La stabilité du radical est assurée par la délocalisation de cet électron responsable aussi de la couleur du radical. En présence d'un agent antioxydant, les radicaux libres DPPH<sup>•</sup> vont être piégés. La réaction de piégeage du DPPH<sup>•</sup> par un antioxydant (A-H) peut être présentée comme suit :



Les antioxydants réagissent avec le DPPH<sup>•</sup> et le réduisent en DPPH-H causant ainsi la baisse de l'intensité de la coloration qui passe de violet à jaune (Figure B-17). De ce fait, une diminution d'absorbance est observée.



**Figure B-17 :** Évolution de la coloration des échantillons suite au piégeage des radicaux libres DPPH<sup>•</sup>

Le degré de décoloration indique le potentiel de piégeage des agents antioxydants en termes de capacité à donner des hydrogènes. Le pourcentage de piégeage des radicaux libres DPPH• peut être alors calculé par des mesures d'absorbance des solutions de DPPH• en absence et en présence d'un agent antioxydant à l'aide de la spectroscopie UV-Visible selon l'équation suivante :

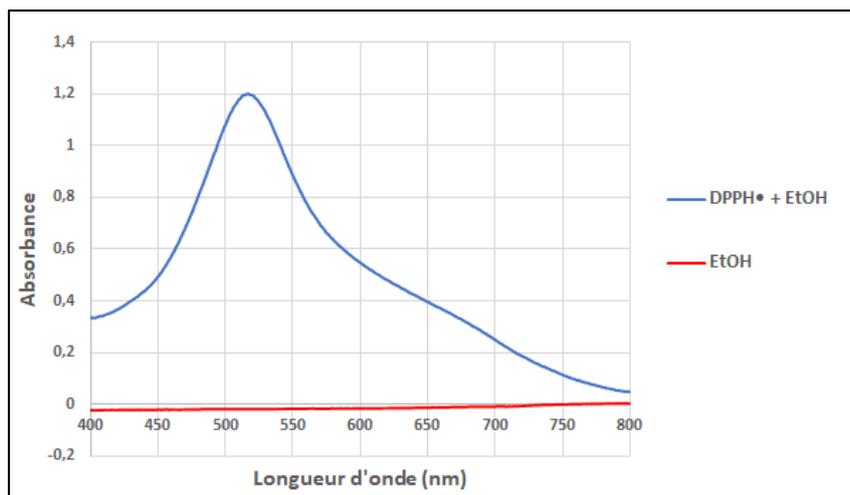
$$\% \text{ de piégeage des radicaux DPPH}^\bullet = \left( 1 - \frac{Abs_{(antioxydant+DPPH^\bullet)}}{Abs_{DPPH^\bullet}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. B31})$$

La concentration inhibitrice IC<sub>50</sub>, moyen usuel d'exprimer l'activité antioxydante d'un composé, est définie comme étant la concentration minimale d'agent antioxydant pour laquelle il peut piéger 50% des radicaux (DPPH• dans notre cas). Un produit de forte activité antioxydante possède une faible IC<sub>50</sub>.

- **Conditions d'analyse**

Les tests antioxydants ont été réalisés sur l'acide férulique (FA), les dimères d'acide féruliques (DFA), le pullulane (PUL) et ses dérivés PUL-FA, le CMP et ses dérivés CMP-FA ainsi que l'acide hyaluronique (HA) et ses dérivés HA-FA.

Dans le cas de l'acide férulique et des dimères d'acide férulique, des solutions dans l'éthanol (1mL) à des concentrations allant de 10<sup>-3</sup> g/L jusqu'à 2×10<sup>-2</sup> g/L ont été ajoutées à 1 mL de DPPH• (200µM dans l'éthanol). Le mélange réactionnel de chaque échantillon a été agité pendant 20 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance des échantillons est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 517 nm (longueur d'onde de l'absorbance maximale de DPPH• dans l'éthanol) à l'aide du spectrophotomètre UV-visible Cary 100 Bio (Varian, USA) (Figure B-18). Dans le cas du CMP et ses dérivés CMP-FA, le même protocole a été utilisé excepté pour la concentration initiale de DPPH• fixée à 100 µM au lieu de 200µM et pour la solubilité des échantillons à tester en milieu NaCl 0,15 mol/L / éthanol (50/50, v/v) (5g/L) au lieu de l'éthanol pour éviter leur précipitation (CMP et CMP-FA sont insolubles dans l'éthanol). Le pourcentage de piégeage des radicaux DPPH• par l'acide férulique, les dimères d'acide férulique, le CMP et les CMP-FA a été calculé par l'équation B31.



**Figure B-18** : Spectre d'absorbance du DPPH• dans l'éthanol

Pour le pullulane et ses dérivés (PUL-FA), la concentration finale en DPPH• a été fixée à 100  $\mu\text{M}$  et nous avons testé 3 concentrations finales en polysaccharide (2,5, 5 et 7,5 g/L).

Concernant le HA et ses dérivés (HA-FA), une proportion eau/éthanol (75/25, v/v) a été respectée pour maintenir soluble le polysaccharide. Les concentrations finales utilisées en polysaccharide et en DPPH• ont été respectivement de 1 et 2,5 g/L et 100  $\mu\text{M}$  en DPPH•.

Une étude cinétique de l'évolution du pourcentage de piégeage des solutions de FA, de PUL-FA et de CMP-FA en présence du radical DPPH• a été notamment réalisée. Les mesures d'absorbance ont été réalisées à l'aide du spectrophotomètre UV-visible Cary 100 Bio (Varian, USA) et ont été reproduites en trois exemplaires et chaque valeur correspond à la moyenne de trois expériences indépendantes.

## IV.2. Tests de cytotoxicité

La cytotoxicité est définie comme étant la capacité d'une substance à détruire une cellule vivante. La mise en contact d'un composé cytotoxique avec une cellule saine peut provoquer la nécrose (mort prématurée et non programmée) ou l'apoptose (mort programmée) de la cellule. Compte tenu de cette information, la mesure précise de la cytotoxicité peut s'avérer un outil très utile pour identifier les composés qui peuvent poser certains risques sur la santé humaine. Cette mesure est d'une importance vitale dans la recherche et le développement de nouveaux produits destinés au marché cosmétique, pharmaceutique, biomédical ou alimentaire afin d'assurer la sécurité des consommateurs. Un composé est dit cytocompatible quand il présente une toxicité minimale ou nulle, qui demeure essentielle dans la préparation d'un nouveau produit. À cet égard, les études de cytotoxicité jouent un rôle crucial.

Divers essais biologiques et différentes cellules ont été utilisés pour évaluer cette cytotoxicité. Nous avons choisi d'étudier la cytocompatibilité de l'acide férulique et ses dimères ainsi que les polysaccharides greffés et non greffés par l'acide férulique sur des cellules de souris fibroblastes (L929 - ATCC<sup>®</sup> CCL-1), par deux méthodes : le test qualitatif Live/Dead et le test quantitatif à l'Alamar Blue<sup>®</sup>. Ces tests ont été réalisés au sein de l'équipe « BIOMMAT » de notre laboratoire « Polymères, Biopolymères, Surfaces » (site d'Evreux) sous l'encadrement de Dr. Béatrice Labat.

#### **IV.2.1. Culture cellulaire des fibroblastes**

Les cellules ont été cultivées à l'aide du milieu de culture  $\alpha$ -MEM auquel 10 % de sérum fœtal de bovin (FBS), 2 mM de L-glutamine, 100 mM de pénicilline et 100 mg/mL de streptomycine ont été ajoutés. Des flacons de culture cellulaire de type T75 (75 cm<sup>2</sup>) ont été utilisés pour cultiver les fibroblastes en les maintenant à 37°C dans un incubateur humidifié à 5% de CO<sub>2</sub>. Des vérifications régulières des cellules ont été effectuées à l'aide d'un microscope inversé (Motic, Chine) à contraste de phase le long de leur culture. À environ 80% de sous-confluence, les cellules sont alors détachées par voie enzymatique en utilisant une solution constituée de 0,25 % de Trypsine et 1mM d'éthylène diamine tétraacétique (EDTA) à température ambiante pendant 2 à 3 min. Les cellules détachées sont immédiatementensemencées à une densité de 30 000 cellules/cm<sup>2</sup> sur des supports de verre (lamelle de microscopie de Ø 16 mm) préalablement stérilisés et déposés dans des plaques de culture 12 de puits.

#### **IV.2.2. Préparation des échantillons à tester**

En premier lieu, les polysaccharides précurseurs et modifiés par l'acide férulique ont été stérilisés en les immergeant dans l'éthanol pendant 24h. Ils sont ensuite filtrés sur fritté P4, congelés et lyophilisés. Puis, ils sont solubilisés dans le milieu de culture  $\alpha$ -MEM complet à une concentration de 2,5 et 7,5 g/L dans le cas du pullulane et de ses dérivés (PUL-FA), de 2,5 g/L dans le cas du CMP et de ses dérivés (CMP-FA) et à une concentration de 1 et 2,5 g/L dans le cas de HA et de ses dérivés HA-FA.

Concernant l'acide férulique et ses dimères, une solution à 200mM dans l'EtOH a été tout d'abord préparée. Après des dilutions dans le milieu de culture complet, la concentration des solutions est ramenée à 1mM avec une concentration d'EtOH de 0,5% (v/v), concentration non toxique pour les cellules.

En même temps, nous avons préparé des solutions témoin servant comme contrôle négatif (pour vérifier la bonne croissance et la viabilité des cellules), contrôle positif (milieu toxique pour les cellules) et contrôle solvant (dans le cas des tests avec FA et DiFA) qui étaient respectivement le milieu de culture complet, DMSO 10% et EtOH 0,5%.

### IV.2.3. Test Live/Dead

C'est un test qualitatif permettant l'évaluation de la viabilité des cellules grâce à 2 marqueurs fluorescents : la calcéine-AM (vert) et l'hétérodimère éthidium (rouge)<sup>16,17</sup>.

Les cellules vivantes sont colorées en vert par la calcéine-AM, un colorant hautement lipophile qui correspond à un substrat d'estérase fluorogénique qui, en traversant la membrane cellulaire et pénétrant dans la cellule, se transforme en un produit fluorescent vert lorsqu'il est hydrolysé indiquant que les cellules conservent leur activité estérase. Concernant les cellules mortes, elles sont colorées en rouge par l'hétérodimère éthidium, un acide nucléique fluorophore qui ne peut pénétrer au sein des cellules uniquement lorsque leurs membranes sont endommagées indiquant la perte de l'intégrité de la membrane plasmique.

24h après leur ensemencement à une densité de 30 000 cellules.cm<sup>-2</sup> sur les lamelles de verre déposées dans des plaques de 12 puits, les cellules ont été mises en contact pendant 24h avec les échantillons à tester préalablement préparés. Elles étaient ensuite colorées par le kit Live/Dead pendant 15 min à l'abri de la lumière, puis immédiatement observées sous un microscope à épifluorescence (Zeiss Axio Scope A1, Allemagne) équipé d'une caméra CCD (Motic, Chine) pour l'acquisition des images.

### IV.2.4. Test à l'Alamar Blue®

Pour l'étude de l'activité métabolique cellulaire des fibroblastes L929, nous avons utilisé la méthode à l'Alamar Blue® (AB) (AbD Serotec), indicateur des réactions d'oxydo-réduction pendant la prolifération cellulaire<sup>18,19</sup>. Ce réactif (résazarine) est basé sur l'activité métabolique des cellules viables et sa métabolisation est directement proportionnelle à l'activité proliférative des cellules. Dans le cas de ce test, après 48h de mise en contact des cellules avec les produits à tester, le milieu de culture  $\alpha$ -MEM complet a été remplacé par un milieu de culture contenant 10% d'AB (v/v) préalablement préchauffé à 37°C. Après 2h d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 570 et 600 nm grâce au spectrophotomètre UV-Vis (UV 300, Spectronic Unicam, USA). Tous les tests ont été effectués en trois exemplaires.

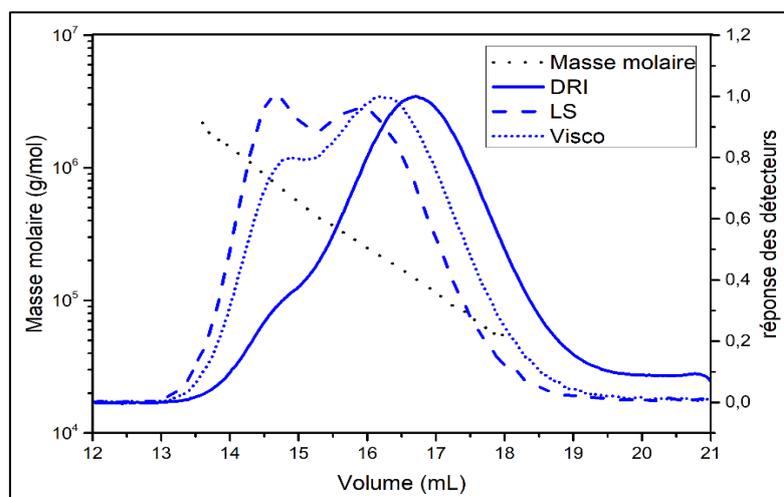
## V. Réactifs et solvants utilisés

Les deux polysaccharides précurseurs de cette étude sont le pullulane (PUL) et l'acide hyaluronique (HA).

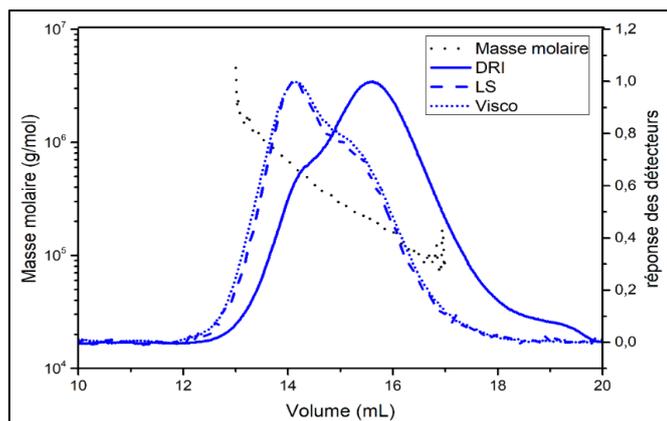
Le pullulane est produit par la société nipponne Hayashibara Biochemical Laboratory (Okayama, Japon). Nous avons utilisé leur référence PI-20. L'acide hyaluronique, sous forme de sel de sodium, est d'origine bactérien (*Streptococcus*). Il a été obtenu auprès de Sigma Aldrich.

Le pullulane a été modifié chimiquement (carboxyméthylation) afin de greffer des fonctions carboxyliques le long du squelette de la chaîne. Cette modification chimique est très bien maîtrisée au laboratoire. Le détail de cette modification chimique ainsi que l'analyse qui lui est associée pour déterminer le degré de substitution ont été regroupés dans l'Annexe 1.

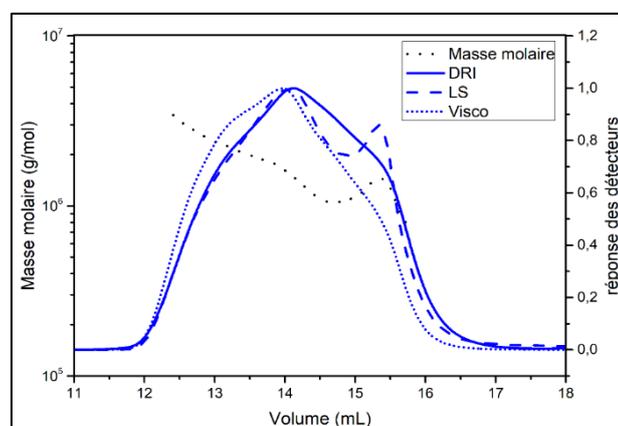
Ces trois polysaccharides ont été analysés par SEC/MALS/Visco/DRI pour obtenir leur caractéristique macromoléculaire au niveau des masses molaires, des tailles et de la viscosité intrinsèque. Les chromatogrammes sont donnés dans les trois figures suivantes.



**Figure B-19 :** Pullulane, profils d'élution dans  $\text{LiNO}_3$  (0,1mol/L) à 25°C de l'indice de réfraction (trait plein), de la diffusion de la lumière à 90° (trait discontinu) et du viscosimètre (trait pointillé) avec la distribution des masses molaires (rond noir)



**Figure B-20** : Carboxyméthylpullulane, profils d'éluion dans  $\text{LiNO}_3$  (0,1mol/L) à 25°C de l'indice de réfraction (trait plein), de la diffusion de la lumière à 90° (trait discontinu) et du viscosimètre (trait pointillé) avec la distribution des masses molaires (rond noir)



**Figure B-21** : Acide hyaluronique, profils d'éluion dans  $\text{LiNO}_3$  (0,1mol/L) à 25°C de l'indice de réfraction (trait plein), de la diffusion de la lumière à 90° (trait discontinu) et du viscosimètre (trait pointillé) avec la distribution des masses molaires (rond noir)

**Tableau B-3** : Grandeurs macromoléculaires caractéristiques des polysaccharides PUL, CMP et HA déterminées par couplage SEC/MALS/DRI/Visco/UV

PS	$M_n$ (g/mol)	$M_w$ (g/mol)	$\bar{D}$	Masse récupérée (%)	$Rh_{(w)}$ (nm)	$[\eta]_w$ (ml/g)	$a$
PUL	144 000	265 000	1,8	81	14	76	0,6
CMP	202 000	328 000	1,6	81	22	235	0,8
HA	1480 000	1680 000	1,1	83	83	1854	-

Le CMP présente des masses molaires plus importantes que le PUL en raison du greffage des groupements carboxyméthyle. Si l'on divise la  $M_n$  par la masse molaire du motif de répétition (162 pour PUL et 226 pour CMP), nous retrouvons le même degré de

polymérisation ( $DP_n = 890$ ) ce qui montre que notre réaction de modification chimique n'est pas dégradante. Autre information donnée par le tableau est la valeur de l'exposant « a » de la relation de Mark Houwink Sakurada qui passe de 0,6 pour PUL à 0,8 pour CMP en raison de la plus grande rigidité de la chaîne et/ou la meilleure solvatation par la présence de groupements ionisés.

Pour le HA, les masses molaires sont beaucoup plus importantes (supérieures au million) mais la séparation n'est pas très bonne. Les valeurs de masses molaires sont données mais il faut les prendre avec prudence. La viscosité intrinsèque est en accord avec les fortes masses molaires. La mauvaise séparation ne permet pas de donner de valeur pour la loi de Mark Houwink Sakurada.

Les différents réactifs et solvants utilisés pendant les étapes de modification chimique ont été regroupés dans le Tableau B-4 en précisant pureté et fournisseur.

**Tableau B-4 : Réactifs et solvants utilisés pendant les modifications chimiques**

Produit	Nom IUPAC	Spécificité	Fabricant
Acide férulique (FA)	Acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique	99 %	Acros Organics
Oleylamine (NH <sub>2</sub> -C18 :1)	(Z)-octadéc-9-enylamine	≥ 98 % (primary amine)	Sigma Aldrich
Acide oléique (C18 :1)	Acide cis-octadéc-9-énoïque	≥ 99 % (GC)	Sigma Aldrich
Acide linoléique (C18 :2)	Acide (9Z,12Z)-octadéca-9,12-diénoïque	≥ 99 %	Sigma Aldrich
1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC)	-	≥ 98 %	Sigma Aldrich
N-hydroxysuccinimide (NHS)	1-hydroxypyrrolidine-2,5-dione	98 %	Sigma Aldrich
Triphénylphosphine (PPh <sub>3</sub> )	-	ReagentPlus <sup>®</sup> , 99%	Sigma Aldrich
N,N-diméthyl-4-aminopyridine (DMAP)	-	≥ 99 %	Sigma Aldrich

Carbonyldiimidazole (CDI)	1,1'- carbonyldiimidazole	≥ 97 %	Sigma Aldrich
Acide méthylsulfonique (MES)	-	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Borohydrure de sodium (NaBH <sub>4</sub> )	Tétrahydruroborate de sodium	99 %	Sigma Aldrich
Chloroacétate de sodium	-	98 %	Sigma Aldrich
Hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAOH)	-	40 wt. % in H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	-	≥ 20 U/g	Sigma Aldrich
Laccase de <i>Trametes versicolor</i>	-	powder, light brown, ≥ 0,5 U/mg	Sigma Aldrich
Laccase de <i>Pleurotus ostreatus</i>	-	≥ 4 U/mg	Sigma Aldrich
Syringaldazine (SGZ)	4-Hydroxy-3,5- diméthoxybenzaldéhy de azine	99 %	Sigma Aldrich
Darocur 1173 <sup>®</sup>	2-hydroxy-2- méthylpropiophénone	97 %	Sigma Aldrich
Acide citrique	acide 2- hydroxypropane- 1,2,3-tricarboxylique	-	VWR
Hydrogénophosphate de sodium dihydraté (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O)	-	pour analyse EMSURE <sup>®</sup>	Merck
Acide chlorhydrique (HCl)	-	32 %, Supelco <sup>®</sup>	VWR
Soude (NaOH)	hydroxyde de sodium	en pastilles, EMSURE <sup>®</sup> pour analyses, Supelco <sup>®</sup>	VWR

Diméthylsulfoxyde (DMSO)	-	99,7 % Extra dry, over Molecular Sieves	Acros Organics
Diméthylformamide (DMF)	-	99,8 % Extra dry, over Molecular Sieves	Acros Organics
Acétone	-	≥ 99 % Technical	VWR
Éthanol absolu	-	≥ 99.8%, AnalaR NORMAPUR® ACS, Reag. Ph. Eur. pour analyses	VWR

Les membranes de dialyse Spectra-Pro (cellulose régénérée, 12-14 kDa) ont été achetées chez Spectrum (Europe). L'eau pure a été obtenue par le système de purification d'eau milli-Q (Millipore, USA).

L'ensemble des réactifs utilisés lors des différentes analyses chimiques et physico-chimiques est listé ci-dessous en séparant les techniques utilisées.

RMN-<sup>1</sup>H : eau deutérée (D<sub>2</sub>O ; 99,9 atom % D, Sigma-Aldrich), soude deutérée (NaOD, 30 wt. % in D<sub>2</sub>O, 99 atom % D, Sigma-Aldrich) et diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d<sub>6</sub>, 99,9 atom % D, Sigma-Aldrich).

Dosage de Folin-Ciocalteu : carbonate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ≥99,9%, VWR) et réactif de Folin-Ciocalteu (VWR).

SEC/MALLS/DRI/Visco/UV : nitrate de lithium (LiNO<sub>3</sub>, 99+%, extra pure, Acros Organics).

Propriétés antioxydantes : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich).

Tests de cytotoxicité : sérum foetal de bovin (FBS, Invitrogen), streptomycine (Sigma-Aldrich), pénicilline (Sigma-Aldrich), L-glutamine (Sigma-Aldrich), Trypsine (Sigma-Aldrich) et éthylène diamine tétraacétique (EDTA, Sigma-Aldrich)

## Références bibliographiques

1. Li, C. & Li, J.-B. Preparation of chitosan-ferulic acid conjugate: Structure characterization and in the application of pharmaceuticals. *Int. J. Biol. Macromol.* **105**, 1539–1543 (2017).
2. Trombino, S., Cassano, R., Bloise, E., Muzzalupo, R., Tavano, L. & Picci, N. Synthesis and antioxidant activity evaluation of a novel cellulose hydrogel containing trans-ferulic acid. *Carbohydr. Polym.* **75**, 184–188 (2009).
3. Folin, O. & Ciocalteu, V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *J. Biol. Chem.* **73**, 627–648 (1927).
4. Duval, C., Le Cerf, D., Picton, L. & Muller, G. Aggregation of amphiphilic pullulan derivatives evidenced by on-line flow field flow fractionation/multi-angle laser light scattering. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **753**, 115–122 (2001).
5. Simon, S., Dugast, J. Y., Le Cerf, D., Picton, L. & Muller, G. Amphiphilic polysaccharides. Evidence for a competition between intra and intermolecular associations in dilute system. *Polymer (Guildf)*. **44**, 7917–7924 (2003).
6. Hafsa, J., Chaouch, M. A., Charfeddine, B., Rihouey, C., Limem, K., Le Cerf, D., Rouatbi, S. & Majdoub, H. Effect of ultrasonic degradation of hyaluronic acid extracted from rooster comb on antioxidant and antiglycation activities. *Pharm. Biol.* **55**, 156–163 (2017).
7. Nguyen, Q.-H. & Nguye, N.-D. Incompressible Non-Newtonian Fluid Flows. in *Continuum Mechanics - Progress in Fundamentals and Engineering Applications* (InTech, 2012).
8. Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. & Sannia, G. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 920–924 (2000).
9. Shradha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M. & Kumar, A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res.* **1**, 1–11 (2011).
10. Carvajal-Millan, E., Guigliarelli, B., Belle, V., Rouau, X. & Micard, V. Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels. *Carbohydr. Polym.* **59**, 181–188 (2005).
11. Stoilova, I., Krastanov, A. & Stanchev, V. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **01**, 208–215 (2010).
12. Bauer, R. & Rupe, C. O. Use of syringaldazine in a photometric method for estimating “free” chlorine in water. *Anal. Chem.* **43**, 421–425 (1971).
13. Caroch, M. & Ferreira, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 15–25 (2013).
14. Wojdyło, A., Oszmiański, J. & Czemerys, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* **105**, 940–949 (2007).

15. Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J. & Codina, C. Comparison between the Radical Scavenging Activity and Antioxidant Activity of Six Distilled and Nondistilled Mediterranean Herbs and Aromatic Plants. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6882–6890 (2002).
16. Gabryel, B., Adamek, M. & Trzeciak, H. I. Does Trimetazidine Exert Cytoprotective Activity on Astrocytes Subjected to Hypoxia In Vitro? *Neurotoxicology* **22**, 455–465 (2001).
17. Kouassi, M.C., Thébault, P., Rihouey, C., Dé, E., Labat, B., Picton, L. & Dulong, V. Carboxymethylpullulan Grafted with Aminoguaiacol: Synthesis, Characterization, and Assessment of Antibacterial and Antioxidant Properties. *Biomacromolecules* **18**, 3238–3251 (2017).
18. Rampersad, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. **12**, 12347–12360 (2012).
19. Aslantürk, Ö. S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. in *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World* (InTech, 2018).



# **Chapitre C- Hydrogels biomimétiques à base de polysaccharide neutre**

---



## Sommaire

Introduction.....	142
I. Greffage de l'acide férulique sur le pullulane (PUL-FA) .....	143
I.1. Différentes stratégies testées .....	143
I.1.1. Greffage basé sur la chimie des carbodiimides.....	144
I.1.2 Greffage par réaction de Mitsunobu.....	148
I.1.3. Greffage par voie enzymatique .....	150
I.1.4. Greffage par la chimie des imidazoles .....	152
I.2. Stratégie retenue .....	154
I.2.1. Protocole de synthèse et conditions opératoires.....	154
I.2.2. Caractérisation structurale.....	156
I.3. Conclusion sur le greffage de l'acide férulique sur le pullulane.....	162
II. Caractérisations physico-chimiques.....	162
II.1. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco/UV .....	162
II.2. Mesures rhéologiques.....	167
II.2.1. Mesures en écoulement.....	167
II.2.2. Mesures dynamiques.....	171
II.2.3. Conclusion sur les propriétés physico-chimiques .....	173
III. Gélification.....	174
III.1. Mode d'obtention des hydrogels PUL-FA .....	174
III.2. Étude rhéologique.....	175
III.2.1. Influence de la quantité d'enzyme .....	177
III.2.2. Influence du degré de substitution.....	179
III.2.3. Influence de la concentration .....	180
III.3. Propriétés de gonflement .....	181
III.4. Conclusion sur la gélification.....	182
Conclusion.....	183
Références bibliographiques .....	186



## Introduction

Comme mentionné précédemment, en raison de la simplicité de sa structure et de sa potentialité en terme de modification chimique, le pullulane a été sélectionné pour notre étude comme polysaccharide modèle neutre pour la conception des hydrogels biomimétiques afin de mimer les phénomènes observés à partir de la réticulation enzymatique initiée par la laccase sur les mucilages d'arabinoxylane porteur d'acide férulique présents à la surface des graines de céréales et aussi dans les parois cellulaires des plantes. Notre objectif sera donc de greffer de l'acide férulique sur du pullulane puis d'obtenir un hydrogel en présence d'une laccase.

De ce fait, dans ce chapitre, nous commencerons par présenter et discuter les différentes stratégies de synthèse envisagées pour le greffage de l'acide férulique et les caractérisations structurales des pullulanes modifiés obtenus. Ensuite, dans une seconde partie, nous nous intéresserons aux caractérisations physico-chimiques en régime dilué, semi-dilué et concentré des solutions aqueuses des produits obtenus suite à la réaction de greffage. L'étude de la gélification de ces produits ainsi que les propriétés mécaniques et de gonflement des hydrogels obtenus feront l'objet de la troisième et dernière partie de ce chapitre.

## I. Greffage de l'acide férulique sur le pullulane (PUL-FA)

### I.1. Différentes stratégies testées

Pour greffer l'acide férulique sur du pullulane, plusieurs voies de synthèse ont été envisagées suivant des protocoles expérimentaux inspirés de la littérature et adaptés à nos réactifs. Le pullulane ne contient dans sa structure que des fonctions alcool primaires et secondaires (voir Chapitre A-I.2.2.2) tandis que l'acide férulique possède une fonction alcool, méthoxy et acide carboxylique (voir Chapitre A-III.2.1.2). Par conséquent, le couplage direct entre le pullulane et l'acide férulique ne pourra avoir lieu qu'en créant un lien ester entre la fonction acide carboxylique de FA et les fonctions alcool du PUL. C'est pour cette raison que dans les stratégies de greffage testées, nous avons utilisé des agents activateurs connus pour leurs grandes réactivités vis-à-vis des réactions d'estérification. En outre, le pullulane est un polysaccharide hydrosoluble et insoluble dans la majorité des solvants organiques (à l'exception du DMSO, du DMF et du DMAc) alors que l'acide férulique est une molécule hydrophobe soluble dans la plupart des solvants organiques et insoluble dans l'eau (sauf en milieu alcalin par la formation de la forme carboxylate). Nous avons donc trois possibilités au niveau du choix du solvant pour la réaction de greffage : soit un milieu aqueux alcalin, soit un

solvant organique (comme DMSO ou DMF), ou soit un mélange de solvant miscible ou non miscible eau/solvant organique. Cependant dans le cas d'un milieu alcalin, la réaction d'estérification est impossible en raison du lien ester très fragile et facilement hydrolysable en présence d'une base par une réaction de saponification. La première possibilité est donc éliminée. Or, le but de notre étude est de concevoir des hydrogels dans des conditions les plus douces possibles. De ce fait, nous avons privilégié dans un premier temps le solvant mixte eau/éthanol qui entre dans les critères de la chimie verte. Nous nous sommes également basés sur la chimie des carbodiimides en utilisant l'EDC comme agent activateur. L'efficacité de cette méthode a été validée que ce soit au sein de notre laboratoire<sup>1-5</sup> ou par d'autres chercheurs<sup>6,7</sup>.

### I.1.1. Greffage basé sur la chimie des carbodiimides

Avant de procéder au greffage de l'acide férulique sur le pullulane, une étude de solubilité de l'acide férulique et du pullulane à une concentration de 10 g/L dans différentes proportions eau/éthanol a été réalisée et les résultats sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau C-1).

**Tableau C-1 : Tests de solubilité du pullulane et de l'acide férulique à une concentration de 10g/L dans différentes proportions de mélange eau/éthanol**

Proportion mélange eau/éthanol (v/v)	Solubilité de pullulane	Solubilité d'acide férulique
100/0	Totalement soluble	Totalement insoluble même à 40°C
90/10	Totalement soluble	Solution trouble
85/15	Solution homogène avec un léger dépôt	Solution trouble
80/20	Solution homogène avec un léger dépôt	Solution trouble
75/25	Solution homogène avec un léger dépôt	Solution homogène avec un léger dépôt
70/30	Solution homogène avec un léger dépôt	Solution homogène avec un léger dépôt
65/35	Solution homogène avec un léger dépôt	Solution homogène avec un léger dépôt
60/30	Solution trouble	Totalement soluble

50/50	Solution trouble	Totalement soluble
0/100	Totalement insoluble	Totalement soluble

Les différents tests de solubilité montrent l'inexistence d'une proportion de mélange eau/éthanol commune où le pullulane et l'acide férulique sont complètement solubles. Par contre, à partir d'une proportion d'eau/EtOH de 75/25 jusqu'à 65/35 (v/v), on obtient une solution homogène mais avec un léger dépôt pour les deux réactifs. Ce résultat nous permet donc d'envisager une réaction de greffage dans le mélange eau/éthanol (70/30, v/v) avec deux étapes décrites dans la Figure C-1.

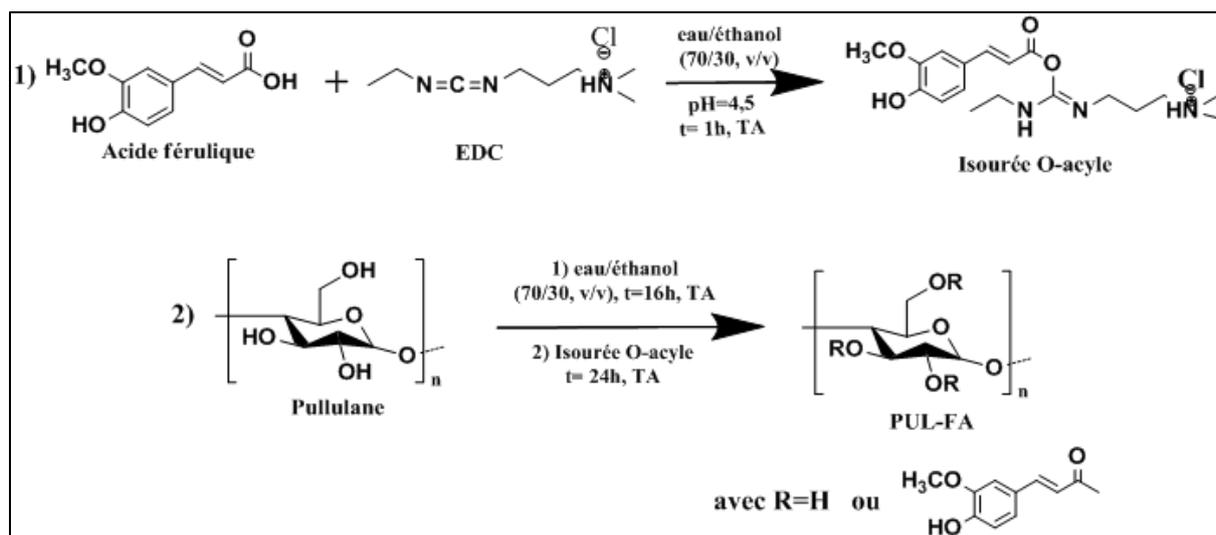
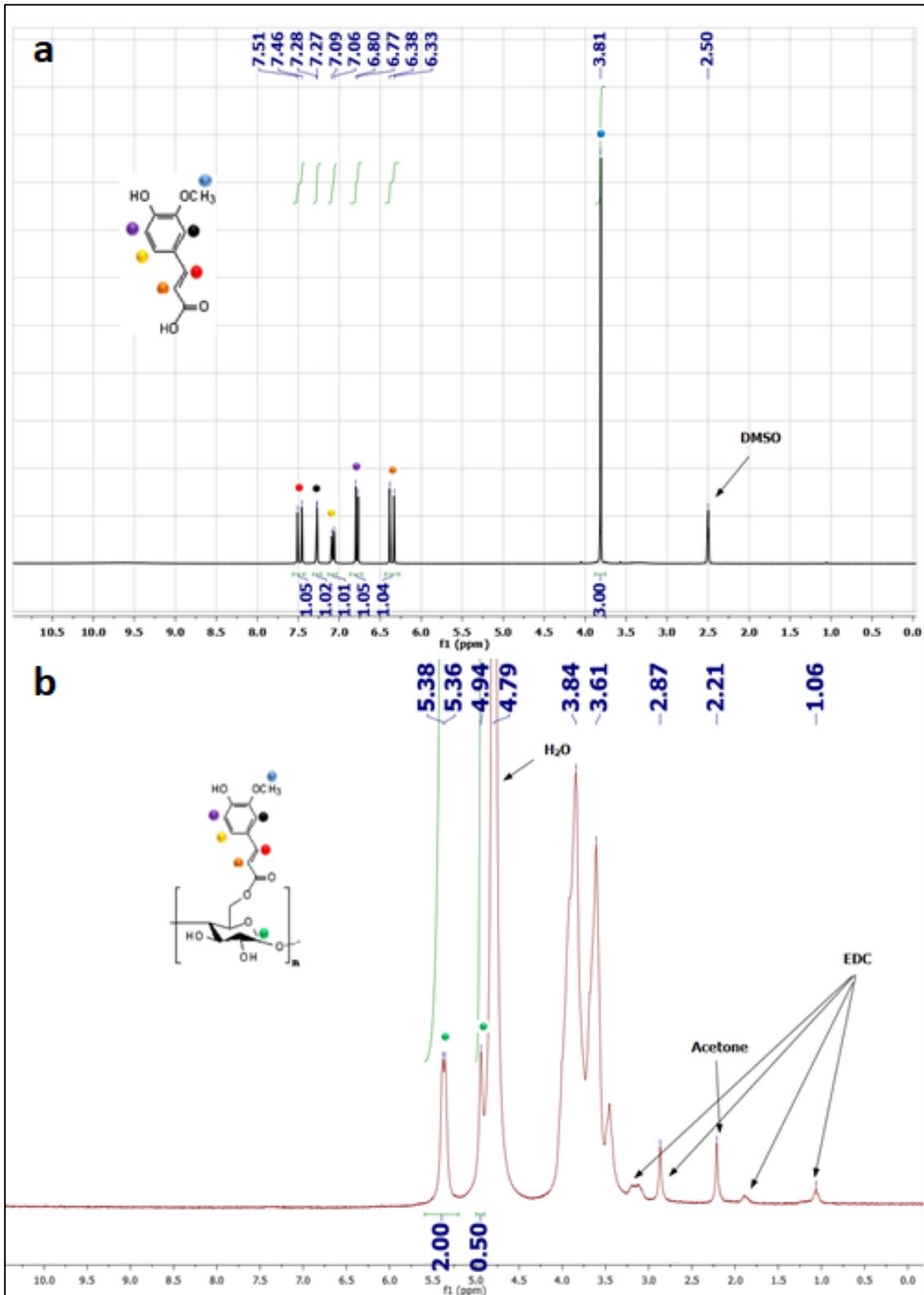


Figure C-1 : Réaction de greffage d'acide férulique sur le pullulane par EDC

La première étape consiste à activer la fonction acide carboxylique de l'acide férulique par l'agent de couplage de type carbodiimide (EDC) dans le milieu eau/EtOH (70/30, v/v) à pH=4,75 (pH optimal de l'activation d'un acide carboxylique par l'EDC) conduisant ainsi à la formation de l'intermédiaire d'isourée O-acyle. Cet intermédiaire est ensuite ajouté à une solution de pullulane préalablement préparée dans le même mélange eau/éthanol (70/30, v/v). Une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 (SN2) va alors se produire et va conduire au greffage de l'acide férulique sur le pullulane en créant un lien ester entre la fonction acide carboxylique de FA et une fonction alcool de PUL.

Remarque : Pendant la deuxième étape, lors de l'ajout de la solution de l'acide férulique activé par EDC à celle du pullulane, une solution trouble laiteuse s'est formée et a persistée jusqu'à la fin de la réaction.

Après purification par précipitation dans l'acétone et après séchage, le produit obtenu (PUL-FA-EDC1) est caractérisé par RMN-<sup>1</sup>H (Figure C-2).



**Figure C-2 :** a) Spectre RMN-<sup>1</sup>H d'acide férulique dans le DMSO-d<sub>6</sub>. b) Spectre RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O du PUL-FA-EDC1 obtenu suite au greffage d'acide férulique sur le pullulane par EDC

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H de l'acide férulique dans le DMSO-d<sub>6</sub> (Figure C-2-a) montre la présence des pics caractéristiques de FA entre 6,3 et 7,5 ppm qui correspondent aux protons aromatiques et éthyléniques et un pic à 3,8 ppm attribué aux 3 protons du méthoxy de l'acide férulique. En comparant ce spectre à celui du produit récupéré après purification (Figure C-2-b), on remarque l'absence de ces pics caractéristiques ce qui montre que le greffage n'a pas eu lieu. Ceci peut être dû d'une part à la non homogénéité du milieu réactionnel (solution trouble) et d'autre part à la grande réactivité de l'intermédiaire d'isourée O-acyle qui peut réagir aussi avec l'eau pour former un produit secondaire stable l'urée N-acyle, empêchant ainsi la réaction du couplage entre le pullulane et l'acide férulique.

Pour éviter la formation du produit secondaire urée N-acyle, la réaction de greffage a été renouvelée en ajoutant le N-hydroxysuccinimide (NHS) connu pour sa capacité à renforcer la résistance à l'hydrolyse de l'intermédiaire isourée O-acyle<sup>8</sup>. Cependant, la caractérisation structurale du produit obtenu a montré l'échec de la réaction de greffage probablement à cause des mêmes problèmes de solubilité. Afin de surmonter celui-ci, nous avons décidé de reprendre la réaction de couplage dans un milieu homogène et avons choisi le DMSO et le DMF solvants communs du pullulane et de l'acide férulique. La réaction de greffage a été testée dans ces deux solvants en utilisant l'EDC avec et sans NHS. Néanmoins, le greffage n'a pas eu lieu. Ceci peut être expliqué par la non réactivité de l'EDC dans les milieux organiques puisque, pour assurer la bonne réactivité de l'agent de couplage EDC, un pH compris entre 3,5 et 4,5 est nécessaire alors qu'en milieu non aqueux il est difficile de contrôler le pH.

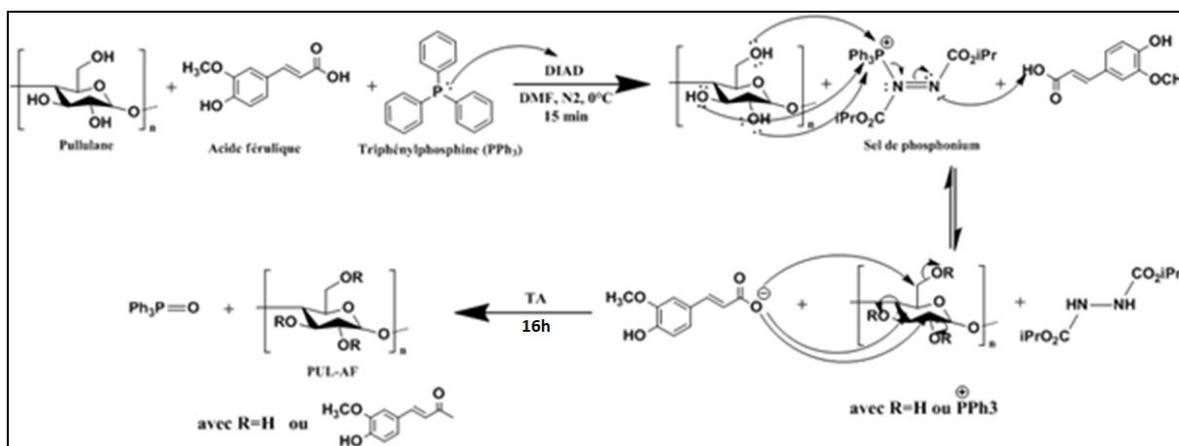
Dans toutes les conditions testées, nous avons également modifié les différents paramètres en jouant sur le nombre d'équivalent d'acide férulique par rapport au pullulane, nombre d'équivalent d'EDC par rapport à l'acide férulique et nombre d'équivalent de NHS par rapport à EDC. Nous avons aussi fait varier le temps de réaction des deux étapes et la température du milieu réactionnel jusqu'à 60°C. Dans le cas de la réaction dans le mélange de solvant eau/éthanol, d'autres proportions que 70/30 (v/v) ont été testées et également un changement de pH (en restant dans la plage de 3,5-4,5) a été réalisé. Tous ces essais n'ont pas abouti à l'incorporation de l'acide férulique sur le pullulane.

En raison du problème de solubilité de l'acide férulique et du pullulane dans toutes les proportions possibles du mélange eau/éthanol et de la non réactivité de l'EDC dans les milieux organiques, nous avons décidé de réaliser les futurs essais de greffage dans le DMSO ou le DMF en changeant l'agent de couplage.

### I.1.2 Greffage par réaction de Mitsunobu

La réaction de Mitsunobu est connue pour sa grande efficacité dans la conversion d'un alcool primaire, secondaire et plus rarement tertiaire en un ester<sup>9</sup>. Elle repose sur la condensation d'un nucléophile acide avec un alcool activé par un sel de phosphonium réactif généré par la combinaison d'un dérivé d'une alkylphosphine ou d'une arylphosphine, généralement le triphénylphosphine (PPh<sub>3</sub>), et d'un composé azoïque, le plus souvent l'azodicarboxylate de diisopropyle (DIAD) ou l'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD).

Par conséquent, cette réaction semble être une bonne solution pour coupler l'acide carboxylique de l'acide férulique avec les fonctions alcool du pullulane. Pour ceci, FA, PUL et PPh<sub>3</sub>, séchés préalablement sous vide pendant 2h, ont été dégazés et solubilisés dans le DMF anhydre sous diazote. Une fois que le mélange est refroidi à 0°C, le DIAD est ajouté formant ainsi l'intermédiaire de sel de phosphonium qui va en premier lieu déprotoner la fonction acide de FA et la rendre plus réactive sous la forme de carboxylate et va se lier en deuxième lieu à l'oxygène des fonctions alcool du pullulane le transformant en bon groupement partant. En plaçant le mélange dans le noir à température ambiante (TA), la 2<sup>ème</sup> étape de la réaction qui consiste à substituer les fonctions alcool activées du PUL selon un mécanisme de SN2 va se produire (Figure C-3).



**Figure C-3** : Réaction de Mitsunobu appliquée pour le couplage du pullulane et de l'acide férulique

Après purification par précipitation dans l'acétone, le produit obtenu (PUL-FA-Mit1) à un DS théorique de 100%, a été caractérisé par RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O (Figure C-4) afin de vérifier l'efficacité de la réaction de Mitsunobu dans le cas de nos réactifs.

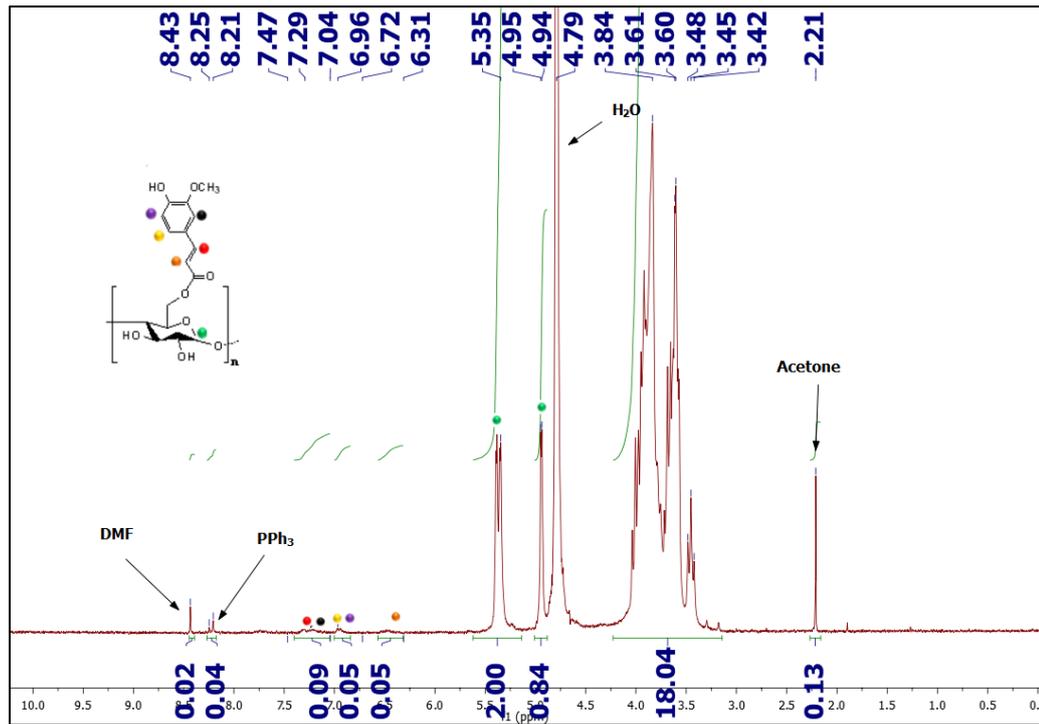


Figure C-4 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O du PUL-FA-Mit1 obtenu par réaction de Mitsunobu

Le spectre confirme la présence des protons aromatiques et éthyléniques de l'acide férulique entre 6,3 et 7,5 ppm. Les protons anomères du PUL en  $\alpha$ -1,4 apparaissent à 5,35 ppm et intègrent pour 2 (2 <sup>1</sup>H  $\alpha$ -1,4 par unité de maltotriose), ces protons seront notre référence afin de calculer le DS, tandis que le proton anomère en  $\alpha$ -1,6 apparait vers 4,95 ppm et intègre pour 0,84 (1 <sup>1</sup>H en  $\alpha$ -1,6 par unité de maltotriose). Le massif des pics observé entre 3,4 et 3,9 ppm correspond à tout le reste des <sup>1</sup>H du PUL confondu avec les 3 protons du méthoxy de l'acide férulique. Toutes ces observations confirment ainsi le greffage de l'acide férulique sur le pullulane.

Les pics des protons aromatiques ( $H_{arom}$ ) et éthyléniques ( $H_{éthyl}$ ) de FA intègrent au total pour 0,19 et correspondent à 5 protons. Nous pouvons alors déterminer le degré de substitution expérimental ( $DS_{FA\ RMN}$ ) de l'acide férulique par rapport à une unité maltotriose (MTR) du pullulane selon l'équation suivante :

$$\%DS_{FA\ RMN}/MTR = \frac{I(H_{arom} + H_{éthyl})}{5} \times 100 \quad (\text{Eq. C1})$$

Sachant qu'une unité de maltotriose du PUL est constituée de 3 unités d'anhydroglucose (AGU), l'équation C1 devient :

$$\%DS_{FA\ RMN} = \frac{I(H_{arom} + H_{éthyl})}{5 \times 3} \times 100 \quad (\text{Eq. C2})$$

Par conséquent, par un calcul simple on obtient :

$$\%DS_{FA RMN} = \frac{I(H_{arom} + H_{éthyl})}{5 \times 3} \times 100 = \frac{0,19}{15} \times 100 \cong 1,3 \% \text{ de FA/AGU}$$

La réaction de Mitsunobu semble donc être une voie de modification possible dans l'estérification du pullulane par l'acide férulique. Par contre, cette réaction n'était pas reproductible. En reprenant la même réaction de synthèse sous les mêmes conditions opératoires, le dérivé issu ne contenait plus d'acide férulique. Nous avons donc essayé de changer les conditions de la réaction en jouant sur le nombre d'équivalent des réactifs et de l'agent de couplage, la température et le temps de réaction mais toujours pas de greffage obtenu. Nous avons également changé le solvant en utilisant le DMSO anhydre à la place du DMF en se déplaçant à une température de 20°C au lieu de 0°C pour éviter la cristallisation du DMSO. La réaction de couplage n'a toujours pas été constatée.

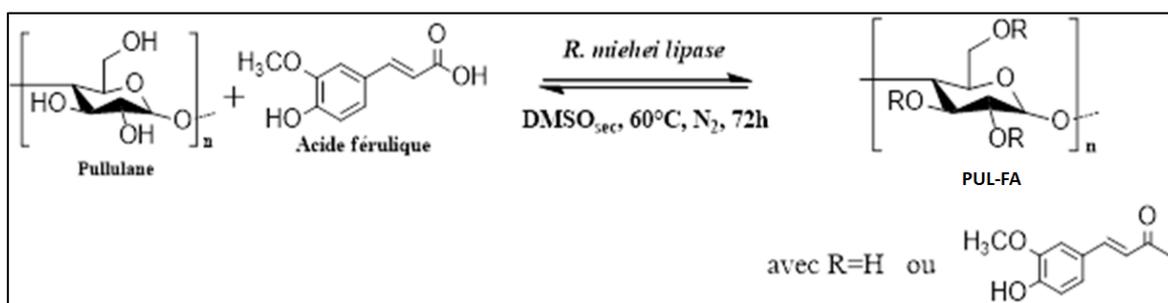
La non reproductibilité de cette voie de modification peut être expliquée par la réactivité non stable de l'intermédiaire sel de phosphonium dans le DMF et le DMSO. Ceci a été démontré dans les travaux de *Camp et al*<sup>10</sup> qui ont observé une diminution du taux d'estérification de l'éthanol par l'acide benzoïque via la réaction de Mitsunobu en augmentant la polarité du solvant organique utilisé. Ils ont conclu que le tétrahydrofurane (THF) est le solvant le plus approprié pour la réaction de Mitsunobu. Dans notre cas, ce solvant ne peut pas être employé vue l'insolubilité du pullulane dans le THF.

### I.1.3. Greffage par voie enzymatique

Les enzymes ont été largement utilisées pour greffer des composés phénoliques sur les polysaccharides, en particulier le chitosane<sup>11,11-15</sup>, c'est une alternative aux approches chimiques parfois moins respectueuses de l'environnement. La modification par voie enzymatique a été généralement effectuée en utilisant des oxydases de polyphénol telles que les tyrosinases, peroxydases et laccases qui ont la capacité de transformer les dérivés phénoliques en des quinones<sup>16-18</sup>. Ces radicaux sont des espèces actives qui peuvent soit se condenser ensemble, soit réagir avec le polysaccharide.

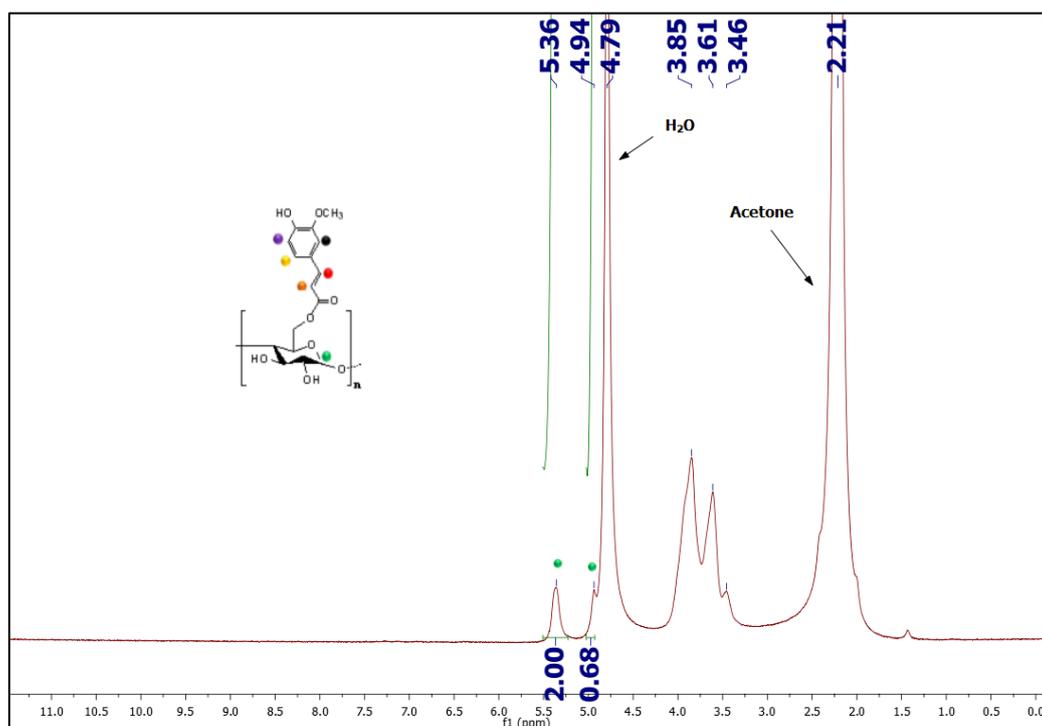
Dans notre étude, la condensation de l'acide férulique doit être évitée pendant l'étape de greffage sur les polysaccharides sélectionnés car c'est cette condensation qui va permettre ultérieurement la réticulation du polysaccharide pour former l'hydrogel. C'est pour cette raison qu'il faut éviter l'utilisation des oxydases. Les lipases ont démontré une efficacité notable dans les réactions d'estérification. *Schär & Nyström* ont réussi à estérifier l'acide férulique par

l'éthanol et le décanol en employant la lipase de *Rhizomucor miehei* dans l'hexane à 61°C<sup>19</sup>. Nous nous sommes inspirés de ces travaux en adaptant le mode opératoire sur nos réactifs. L'acide férulique et le pullulane ont été solubilisés dans le DMSO sec ou dans le DMF anhydre (PUL est insoluble dans l'hexane) en présence de la lipase de *Rhizomucor miehei*. Le milieu réactionnel a été mis dans un bain d'huile à 60°C sous diazote et sous agitation magnétique pendant 72h (Figure C-5).



**Figure C-5 :** Réaction de greffage de l'acide férulique sur le pullulane par voie enzymatique

L'effet de tous les paramètres de synthèse (température, temps de réaction et nombre d'équivalents des réactifs) a été examiné. La caractérisation des différents produits obtenus après purification par RMN-<sup>1</sup>H, dont un exemple (PUL-FA-Lip1) est présenté dans la Figure C-6, a montré le non greffage de FA. Ceci est sûrement dû à la non réactivité de l'enzyme dans le DMSO et le DMF.

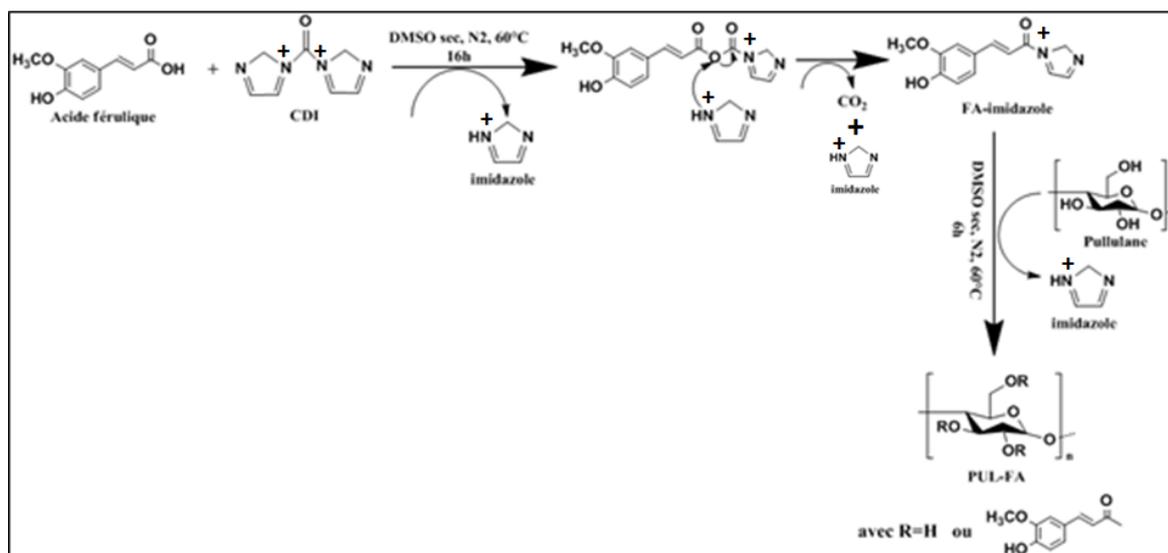


**Figure C-6 :** Exemple de spectre RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O du PUL-FA-Lip1

### I.1.4. Greffage par la chimie des imidazoles

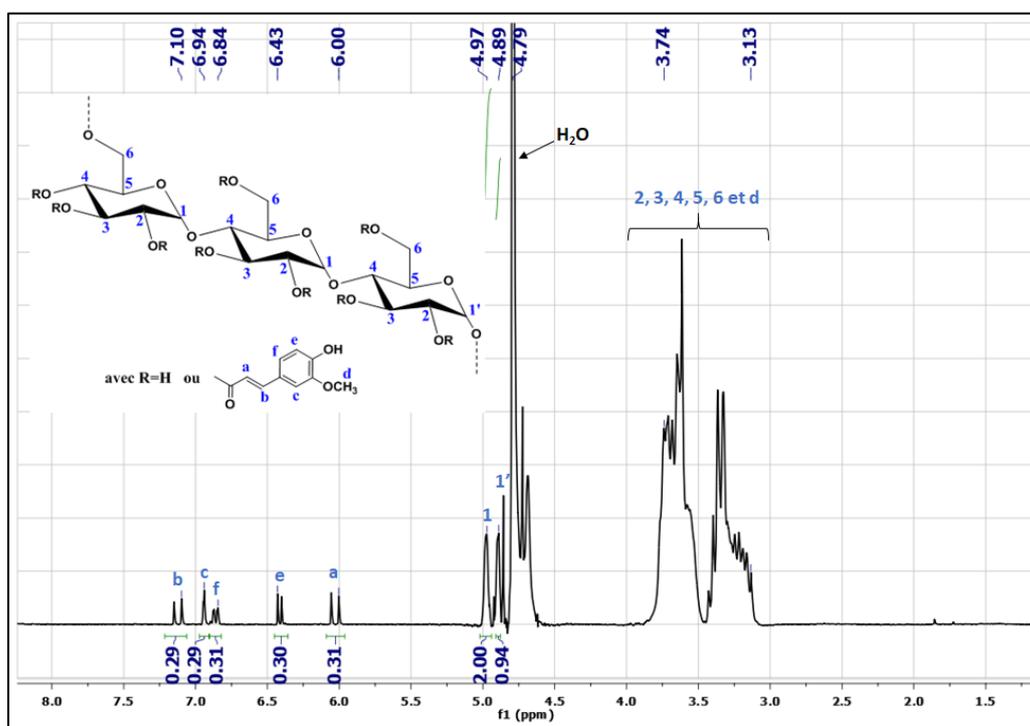
Les imidazoles ont fait preuve d'une grande efficacité dans la réaction de greffage de l'acide férulique sur l'acide hyaluronique<sup>20</sup> et l'amidon<sup>21</sup> par l'utilisation respective du bisimidazole et du carbonyldiimidazole (CDI) comme agent de couplage (voir Chapitre A-III.2.1.2). Le CDI est connu comme étant un agent activateur vert avec une toxicité beaucoup plus faible voire négligeable comparée à d'autres agents. En employant cet agent, seuls le dioxyde de carbone et l'imidazole sont générés dans le milieu réactionnel comme sous-produits. Ce sont deux produits non toxiques et facilement éliminables du milieu réactionnel. Un autre avantage de l'utilisation du CDI est l'absence de risque de formation de réactions secondaires pendant la réaction de modification même en milieu DMSO<sup>22</sup>.

De ce fait, nous avons essayé de greffer l'acide férulique sur le pullulane en utilisant le CDI via deux étapes successives (Figure C-7). La première repose sur l'activation *in situ* de l'acide férulique par le CDI ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire très réactif avec le départ d'un imidazole. Cet intermédiaire va se réarranger rapidement créant ainsi un intermédiaire plus stable, le FA-imidazole accompagné du départ de CO<sub>2</sub>. Sachant que l'imidazole est un bon groupe partant, une fois le pullulane est ajouté au milieu réactionnel, une réaction de SN2 va alors conduire au greffage de l'acide férulique sur le pullulane par la création d'un lien ester entre ces deux derniers.



**Figure C-7** : Réaction de greffage de l'acide férulique sur le pullulane par le carbonyldiimidazole

Un degré de substitution théorique de 100% de FA/AGU a été tout d'abord visé et le produit obtenu après purification était de couleur jaunâtre en raison de la présence importante d'acide férulique greffé. Cela a été confirmé par l'insolubilité du composé obtenu dans l'eau à une concentration de 20g/L. Une teneur trop importante en motif acide férulique bascule la balance hydrophile-hydrophobe du dérivé PUL-FA obtenu vers l'insolubilité aqueuse. Cette fois nous avons donc obtenu une très bonne efficacité du greffage. Par conséquent, cette réaction a été reprise sous les mêmes conditions mais en diminuant le DS théorique visé jusqu'à 60%. Dans ce cas, le dérivé obtenu (PUL-FA-60%) était beaucoup plus soluble dans l'eau avec une légère turbidité. L'analyse RMN-<sup>1</sup>H de PUL-FA-60% dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v) a donc été réalisée (Figure C-8).



**Figure C-8** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v) de PUL-FA-60% obtenu suite au greffage par CDI

On constate l'apparition des pics aromatiques et éthyléniques de l'acide férulique (entre 6 et 7,2 ppm) dont la somme intègre pour 1,5 confirmant la présence de ces molécules au sein du produit obtenu et par conséquent le bon déroulement de la réaction de greffage. Le degré de substitution a été alors déterminé en appliquant l'équation C2 explicité précédemment. Nous avons obtenu un degré de substitution expérimental ( $DS_{FA}^{RMN}$ ) de 10% de FA/AGU, soit une efficacité de greffage de 17%.

La reproductibilité de cette nouvelle voie de modification a été ensuite évaluée en renouvelant la réaction dans les mêmes conditions en visant toujours le même DS théorique (60%). Les deux produits obtenus (PUL-FA-60%bis et PUL-FA-60%tris) possèdent le même critère de solubilité dans l'eau que celui de PUL-FA-60% et leurs spectres RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v) étaient identiques avec une légère différence au niveau de DS<sub>FA RMN</sub> (10,5% pour le PUL-FA-60%bis et 9,4% dans le cas de PUL-FA-60%tris).

Tous ces résultats confirment bien l'efficacité et la bonne reproductibilité de la réaction de greffage de l'acide férulique sur le pullulane dans le DMSO en utilisant le CDI comme agent de couplage.

## I.2. Stratégie retenue

Vue sa grande efficacité, sa bonne reproductibilité et ses conditions respectueuses de l'environnement (agent activateur et solvant peu toxique), la stratégie basée sur la chimie des imidazoles a été sélectionnée pour le greffage de l'acide férulique sur le pullulane. Dans le reste de ce chapitre, nous nous intéresserons uniquement à cette voie de synthèse et aux produits greffés obtenus suite à cette méthode.

### I.2.1. Protocole de synthèse et conditions opératoires

Le CDI et le DMSO anhydre ont été choisis respectivement comme agent de couplage et solvant de la réaction. Dans toutes les réactions de greffage, le CDI a été introduit en quantité stœchiométrique par rapport à l'acide férulique (Tableau C-2). Nous avons continué à réduire la quantité initiale en FA pour conserver une solubilité du produit de synthèse et donc testé deux autres DS théoriques de synthèse : 15 et 30%. Plusieurs essais (environ 6 pour chaque DS théorique) ont été effectués pour confirmer la reproductibilité de cette réaction de greffage et pour obtenir suffisamment de produits afin de réaliser les études physico-chimiques et de synthèse d'hydrogels. Un exemple de protocole est présenté ci-dessous. Il correspond à un DS théorique égal à 60%.

La première étape consiste à activer l'acide férulique par CDI pour obtenir l'intermédiaire réactif FA-imidazole. Pour ce faire, dans un ballon bicol de 100 mL, on introduit 1,15 g de FA (5,92 mmol) et 0,96 g de CDI (5,92 mmol) qu'on solubilise dans 20 mL de DMSO anhydre. La solution est ensuite dégazée sous diazote (pour éviter les réactions secondaires<sup>23</sup>) à TA pendant 15 min et placée dans un bain d'huile à 60°C pendant 16h sous agitation magnétique de 400 tr/min. La deuxième étape est déclenchée par l'ajout goutte à goutte de 1,6 g de pullulane (9,87 mmol) dissout au préalable dans 60 mL de DMSO anhydre et dégazé sous

diazote. Le mélange est ensuite laissé à 60°C sous agitation pendant 6h permettant ainsi le greffage de l'acide férulique sur le pullulane par la création d'un lien ester entre ces deux derniers via un mécanisme de substitution nucléophile d'ordre 2 (SN2). À la fin de la réaction, la solution est précipitée dans 500 mL d'acétone, filtrée sur un fritté P4 et le précipité est lavé 3 fois avec 100 mL d'acétone. Avant d'être séché sous vide, le précipité est de nouveau mis en contact avec 500 mL d'acétone pendant 24h pour éliminer l'imidazole, l'acide férulique et le CDI qui n'ont pas réagi. Des traces résiduelles de CDI, DMSO et acétone sont encore visibles par RMN-<sup>1</sup>H. De ce fait, une étape supplémentaire de purification est réalisée. Elle consiste à solubiliser le précipité obtenu dans l'eau milli-Q à une concentration de 10 g/L. Cette solution est ensuite dialysée (membrane de dialyse Spectra-Por 12×10<sup>3</sup>-14×10<sup>3</sup> g/mol) contre l'eau milli-Q jusqu'à obtenir une conductivité des eaux de dialyse proche de celle de l'eau milli-Q (entre 4 et 6 µS). Enfin, la solution dialysée de PUL-FA est congelée et lyophilisée pendant une semaine. La poudre récupérée est stockée à 4°C.

**Tableau C-2 : Conditions de la réaction de greffage de l'acide férulique sur le pullulane selon le procédé CDI**

DS <sub>FA th</sub> (%)	$\frac{n_{FA}^a}{n_{AGU}}$	$\frac{n_{CDI}^b}{n_{FA}}$	Rendements massiques (%)	Solubilité dans l'eau <sup>c</sup>
15	0,15	1	85 ± 2	Limpide
30	0,3	1	87 ± 3	Légèrement turbide
60	0,6	1	84 ± 2	Légèrement turbide
100	1	1	90	Insoluble

<sup>a</sup> ratio molaire de l'acide férulique par rapport à l'unité AGU (unité de répétition du pullulane)

<sup>b</sup> ratio molaire de l'agent activateur carbonyldiimidazole par rapport à l'acide férulique

<sup>c</sup> tests de solubilité réalisés à une concentration de 10g/L dans l'eau milli-Q à TA

Les poudres lyophilisées des différents produits obtenus sont de couleur jaunâtre qui se réduit avec la diminution du DS théorique en FA. Leur solubilité dans l'eau dépend fortement de la valeur de DS ; une parfaite hydrosolubilité est constatée dans le cas du pullulane le moins modifié. Ceci peut être expliqué par le caractère neutre du pullulane. Les rendements massiques après purification sont bons (environ 85%) avec une bonne reproductibilité de la réaction. Ces valeurs sont proches de celles obtenues par *Wen et al.* (97%) suite au greffage de l'acide férulique sur l'amidon par la même voie de synthèse en visant des DS théoriques de FA/AGU

de l'amidon compris entre 60 et 100%<sup>21</sup>. Il est important de noter que dans ce travail, l'objectif n'était pas d'avoir des systèmes hydrosolubles.

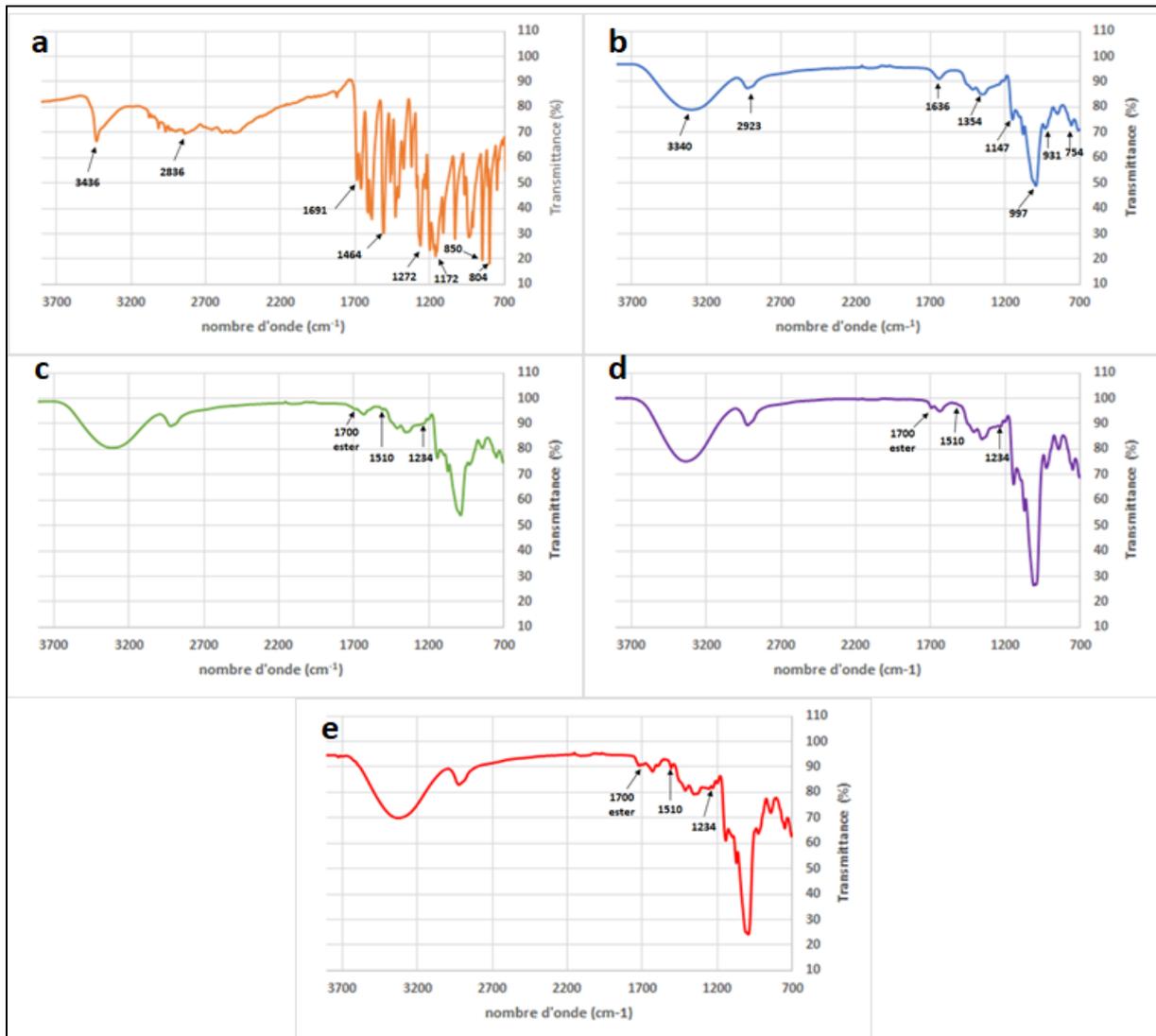
Dans la suite de ce volet, nous nous intéresserons uniquement aux dérivés greffés hydrosolubles obtenus avec les DS théoriques 15, 30 et 60 % qui seront annotés respectivement PUL-FA-T15%, PUL-FA-T30% et PUL-FA-T60%.

## **I.2.2. Caractérisation structurale**

Différentes méthodes de caractérisation qualitatives et quantitatives ont été employées afin de confirmer le greffage de l'acide férulique sur le pullulane et de déterminer le degré de substitution en greffon FA des produits PUL-FA obtenus.

### **I.2.2.1. Spectroscopie IR**

Les dérivés PUL-FA purifiés ont été analysés tout d'abord qualitativement par FT-IR, une méthode de caractérisation rapide et sensible de la plupart des molécules existantes. L'analyse a été réalisée directement sur la poudre lyophilisée pour confirmer l'existence des motifs d'acide férulique par le repérage des liens ester créés entre PUL et FA. Les spectres IR (transmittance = f(nombre d'onde)) de l'acide férulique, du pullulane et des trois dérivés PUL-FA sont présentés dans la Figure C-9.



**Figure C-9 :** Spectres IR de : **a)** Acide férulique (orange). **b)** Pullulane (bleu). **c)** PUL-FA-15% (vert). **d)** PUL-FA-T30% (violet). **e)** PUL-FA-T60% (rouge)

Le spectre IR de l'acide férulique (Figure C-9-a) présente des bandes d'absorption caractéristiques à  $3436\text{ cm}^{-1}$  (vibration d'élongation O-H),  $2836\text{ cm}^{-1}$  (élongation C-H du méthyle),  $1691\text{ cm}^{-1}$  (carbonyle aromatique conjugué),  $1464\text{ cm}^{-1}$  (déformation C-H et vibration du noyau aromatique),  $1272\text{ cm}^{-1}$  (vibration C-O-C asymétrique)  $1172\text{ cm}^{-1}$  (liaison C=O),  $850$  et  $804\text{ cm}^{-1}$  (vibration de deux atomes d'hydrogène adjacents du noyau aromatique). En plus, le massif de pics compris entre  $1200$  et  $1620\text{ cm}^{-1}$  est attribué au noyau aromatique de l'acide férulique. Nous retrouvons le spectre obtenu par Wang *et al*<sup>24</sup>.

Le spectre IR du pullulane (Figure C-9-b) montre une forte absorption à  $3340\text{ cm}^{-1}$  et  $2923\text{ cm}^{-1}$  attribuées respectivement à la vibration d'élongation des groupements O-H et des liaisons C-H  $\text{sp}^3$ . La bande à  $1636\text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration d'élongation de O-C-O et celles à  $1354$  et  $1147\text{ cm}^{-1}$  sont caractéristiques de la déformation des C-O-H et de l'élongation

de C-O-C, respectivement. En outre, le pic intense à  $997\text{ cm}^{-1}$  est attribué à l'élongation des liaisons C<sub>6</sub>-OH alors que ceux de  $931$  et  $754\text{ cm}^{-1}$  appartiennent aux liaisons D-glycosidiques  $\alpha$ -(1,6) et  $\alpha$ -(1,4). Un spectre identique a été signalé par *Cozzolino et al*<sup>25</sup>. ainsi que *Shingel*<sup>26</sup>

Trois nouveaux pics à  $1234$ ,  $1510$  et  $1700\text{ cm}^{-1}$  apparaissent dans le spectre IR des dérivés PUL-FA-T15% (Figure C-9-c), PUL-FA-T30% (Figure C-9-d) et PUL-FA-T60% (Figure C-9-e). Ils proviennent respectivement de la vibration d'élongation du C=O du groupement carboxyle du lien ester établi entre le pullulane et l'acide férulique, de l'élongation C-O de la liaison Ar-OH et de l'élongation C=C du cycle aromatique de FA. On remarque également que même si leur intensité est faible, elle augmente légèrement avec l'augmentation du DS théorique. Ces observations prouvent la présence de l'acide férulique dans les structures des dérivés PUL-FA ce qui signifie le succès du greffage.

### I.2.2.2. Spectroscopie RMN

Afin d'analyser quantitativement et de vérifier la pureté des produits obtenus, les spectres RMN-<sup>1</sup>H ont été effectués en utilisant le mélange D<sub>2</sub>O/NaOD comme solvant deutéré. La soude a pour rôle d'hydrolyser les dérivés PUL-FA par la destruction des liaisons ester créées entre le pullulane et les motifs d'acide férulique afin de s'affranchir de la contrainte de solubilité. Cette réaction d'hydrolyse a été accélérée en chauffant préalablement les solutions à analyser à  $60^{\circ}\text{C}$ . Pour déterminer le temps nécessaire pour une hydrolyse totale, une étude cinétique par RMN-<sup>1</sup>H a été réalisée sur le dérivé PUL-FA-T60% démontrant que l'hydrolyse totale est atteinte au bout de 4h de chauffage (Annexe 2). Les spectres RMN-<sup>1</sup>H obtenus de l'acide férulique, du pullulane et des dérivés PUL-FA-T15% et PUL-FA-T30% réalisés dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v) après chauffage à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 4h sont représentés dans la Figure C-9 tandis que le spectre du dérivé PUL-FA-T60% a été présenté antérieurement (Figure C-10).

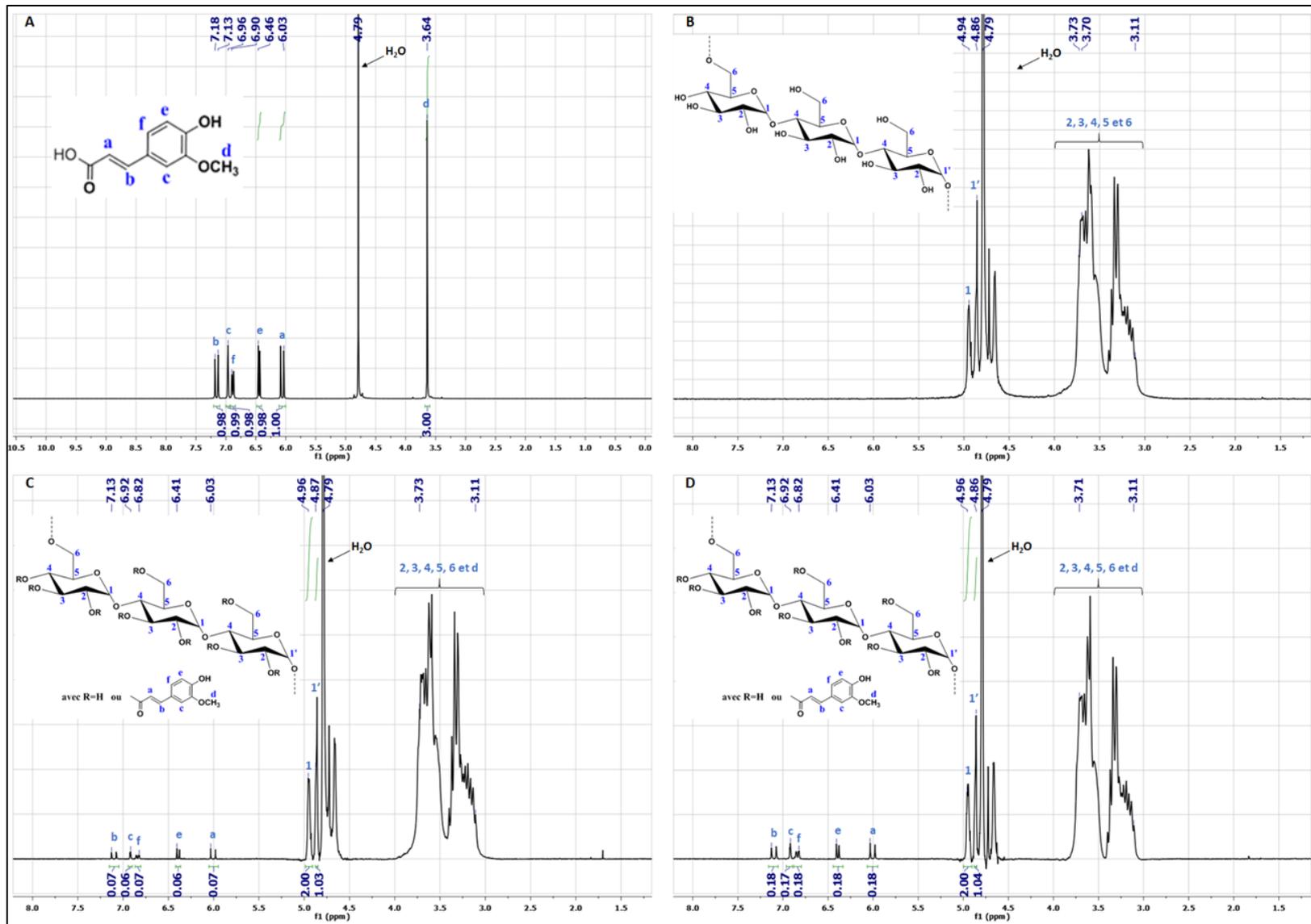


Figure C-10 : Spectres RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v) de : **A**) Acide férulique. **B**) Pullulane. **C**) PUL-FA-T15%. **D**) PUL-FA-T30%

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H typique du pullulane (Figure C-10-A) permet l'attribution des signaux entre 3 - 4 ppm aux protons cycliques non anomères du squelette du pullulane (H<sub>2,3,4,5</sub> et 6). Le proton anomère en α-1,6 (H<sub>1'</sub>) est détecté à 4,86 ppm alors que ceux en α-1,4 (2H<sub>1</sub>) apparaissent à 4,96 ppm.

Le spectre de l'acide férulique (Figure C-10-B) montre tout d'abord un signal à 3,64 ppm qui correspond aux 3 protons du groupement méthoxy (3H<sub>d</sub>). Les protons aromatiques et éthyléniques (5H) sont apparus entre 6 - 7,2 ppm et sont attribués comme suit : δ= 6,03 (H<sub>a</sub>) δ= 6,46 (H<sub>e</sub>) δ= 6,9 (H<sub>f</sub>), δ= 7,13 (H<sub>c</sub>), δ= 7,18 (H<sub>b</sub>).

En comparaison avec le spectre du PUL, les spectres des deux dérivés PUL-FA-T15% (Figure C-10-C) et PUL-FA-T30% (Figure C-10-D) montrent la présence des pics similaires entre 3 - 4 ppm, à 4,86 ppm et 4,97 ppm, caractéristiques du pullulane. On remarque ainsi l'apparition de nouveaux signaux entre 6 - 7,2 ppm qui peuvent être attribués aux protons aromatiques et éthyléniques caractéristiques de l'acide férulique. Concernant le pic des protons méthoxy de FA qui résonnent normalement à 3,64, il semble être confondu avec les pics des protons non anomères du pullulane.

L'intégration du pic à 4,96 ppm référé à 2 (2H<sub>1</sub> anomères en α-1,4 du pullulane) et des pics entre 6 - 7,1 (5 protons aromatiques et éthyléniques de l'acide férulique) permet d'accéder à la valeur du degré de substitution expérimental de FA/AGU obtenue par RMN (DS<sub>FA RMN</sub>) en appliquant l'équation C2 mentionnée précédemment. Ces valeurs sont regroupées dans le Tableau C-3.

**Tableau C-3 : Valeurs moyennes des DS expérimentaux de FA/AGU des produits obtenus déterminées par RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v)**

DS <sub>FA th</sub> (%)	DS <sub>FA RMN</sub> de chaque synthèse (%)	Moyenne des DS <sub>FA RMN</sub> (%)	Efficacité du greffage (%)	FA <sub>éq</sub> (mg/g) <sup>a</sup>
15	1,8 ; 2,2 ; 1,7 ; 2 ; 1,5 ; 2,1	1,9 ± 0,3	13	23,5
30	5,5 ; 6,3 ; 5,6 ; 5,5 ; 6,5 ; 6,4	6,0 ± 0,5	20	67,5
60	11,4 ; 8 ; 9,1 ; 10,8, 9,2 ; 11,2	10,0 ± 1,4	17	108,1

<sup>a</sup> Equivalent d'acide férulique contenu dans le produit obtenu PUL-FA calculé par l'Eq. B6 (Chapitre B-I.3) à partir des valeurs de DS<sub>FA RMN</sub>.

Nous retrouvons sur les DS mesurés la bonne répétabilité des réactions. L'efficacité de la réaction est comprise entre 13 et 20% ce qui est en accord avec les travaux de *Wen et al.*<sup>21</sup> sur le greffage de l'acide férulique sur l'amidon via le même protocole où l'efficacité était de 22%.

La quantité d'acide férulique contenue dans les produits PUL-FA (FA<sub>éq</sub>) a été calculée et démontre une valeur maximale de 108,1 mg de FA par g de PUL. Cette quantité est plus importante que celles observées naturellement sur des arabinoxylanes extraits à l'eau (WEAX) à partir de graines de blé (2,3 mg/g)<sup>27</sup>. Elle reste toutefois inférieure à celle obtenue suite au greffage de l'acide férulique sur l'amidon via la même méthode de couplage (303,9 mg/g)<sup>21</sup> mais dans ce cas, le produit obtenu n'était pas hydrosoluble. Il en est de même pour les travaux de *Woranuch et al.* sur le greffage de l'acide férulique sur le chitosane basé sur la chimie des carbodiimides (294 mg/g)<sup>7</sup>. Dans ce cas, la solubilité était assurée par le caractère ionique du chitosane mais limitée à une concentration maximale de 1,3 g/L.

### I.2.2.3. Dosage de Folin-Ciocalteu

Pour confirmer les DS obtenus par RMN-<sup>1</sup>H, une deuxième méthode de quantification a été réalisée, il s'agit du dosage colorimétrique des composés phénoliques existant dans les produits obtenus via la méthode de Folin-Ciocalteu décrite dans le chapitre B-I.3. Les résultats obtenus avec cette méthode ne sont pas en accord avec ceux déterminés précédemment par RMN (Tableau C-4).

**Tableau C-4 : Récapitulatif des DS expérimentaux de FA/AGU déterminés par les deux techniques RMN et dosage de Folin-Ciocalteu**

DS <sub>FA th</sub> (%)	DS <sub>FA RMN</sub> (%) <sup>a</sup>	DS <sub>FA Folin</sub> (%) <sup>b</sup>	Écart (%) <sup>c</sup>
15	1,9 ± 0,3	0,8 ± 0,3	60
30	6,0 ± 0,5	1,5 ± 0,1	75
60	10,0 ± 1,4	2,5 ± 0,2	75

<sup>a</sup> Degré de substitution de FA/AGU déterminé par RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD

<sup>b</sup> Degré de substitution de FA/AGU déterminé par dosage de Folin-Ciocalteu

<sup>c</sup> Écart entre DS<sub>FA RMN</sub> et DS<sub>FA Folin</sub> calculé comme suit :  $\% \text{Écart} = \frac{DS_{FA RMN} - DS_{FA Folin}}{DS_{FA RMN}}$

La mauvaise solubilité dans le milieu réactif du dosage peut expliquer cette grande différence de valeur. La présence de groupement hydrophobe sur un squelette hydrophile totalement neutre est connue pour associer les chaînes polymères entre elles par l'intermédiaire d'associations hydrophobes entre greffons<sup>28</sup>. Par conséquent, l'oxydation des composés

phénoliques par le réactif de Folin-Ciocalteu n'est que partielle vue cette implication dans les interactions hydrophobes empêchant l'accès et donc la réactivité du réactif de Folin-Ciocalteu à la totalité des greffons d'acide férulique. Cet aspect sera rediscuté dans la caractérisation physico-chimique de ces composés. De ce fait, dans le cas des PUL-FA, cette méthode de quantification n'est pas utilisable.

### **I.3. Conclusion sur le greffage de l'acide férulique sur le pullulane**

Après plusieurs tentatives infructueuses de greffage d'acide férulique sur le pullulane via la chimie des carbodiimides dans un solvant mixte eau/éthanol ou en milieu DMSO et DMF, la réaction de Mitsunobu ainsi qu'une voie enzymatique en milieu DMSO et DMF en raison principalement de problème de solubilité, nous avons pu obtenir, via la chimie des imidazoles, trois dérivés du pullulane avec des taux de greffage expérimentaux déterminés par RMN-<sup>1</sup>H égaux à 2, 6 et 10%. Si les deux premiers semblent parfaitement solubles, l'échantillon présentant le plus fort taux de greffage n'est pas parfaitement soluble puisque la solution obtenue est légèrement trouble. Une purification poussée par lavage à l'acétone et dialyse des solutions contre de l'eau milli Q a permis d'avoir des échantillons purs.

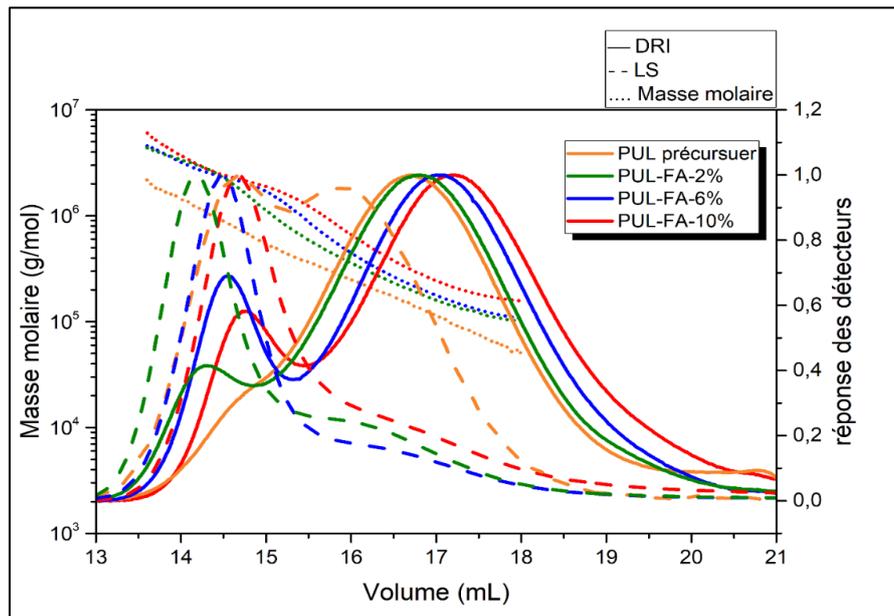
Dans la suite de ce chapitre, pour les dérivés pullulane greffé acide férulique nous utiliserons l'annotation suivante : PUL-FA-DS<sub>FA RMN</sub> avec DS<sub>FA RMN</sub> correspond au degré de substitution expérimental de FA/AGU déterminé par RMN-<sup>1</sup>H. Nous aurons donc trois échantillons en notre possession : PUL-FA-2%, PUL-FA-6% et PUL-FA-10%.

## **II. Caractérisations physico-chimiques**

### **II.1. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco/UV**

Le comportement physico-chimique des produits greffés PUL-FA en solution aqueuse, en régime dilué, a été étudié par chromatographie d'exclusion stérique couplée en ligne avec la diffusion de la lumière multi-angle, un détecteur réfractométrique différentiel, un viscosimètre et un spectrophotomètre ultraviolet. La combinaison de ces détecteurs a permis de calculer pour chaque volume d'élution les grandeurs caractéristiques intrinsèques : masses molaires, viscosité intrinsèque ( $[\eta]$ ) et rayon hydrodynamique ( $R_h$ ). Pour les rayons de giration, il est possible de les obtenir uniquement au-dessus de 20nm, lorsque la diffusion est anisotrope. Dans notre cas, une fraction non négligeable de l'échantillon ne permet pas l'accès au  $R_g$ , il ne sera donc pas possible de donner une valeur moyenne crédible de  $R_g$  sur l'ensemble du pic. Les échantillons

(PUL précurseur et les dérivés PUL-FA) ont été caractérisés à 1 g/L dans  $\text{LiNO}_3$  (0,1 mol/L) à 25°C. Le taux de récupération massique des échantillons analysés (rapport entre l'échantillon récupéré à partir de l'intégration du pic de DRI / la quantité injectée) est de 90% pour le PUL ce qui indique que l'échantillon est quasi-totalement élué par les colonnes et que les résultats peuvent être considérés comme représentatifs. Nous n'obtenons pas 100% car nous ne tenons pas compte de l'eau résiduelle présente dans les poudres lors des pesées. Si le taux de récupération est identique pour l'échantillon le moins greffé (87%), nous constatons une diminution de la récupération avec 80 et 70% pour PUL-FA-6 et PUL-FA-10%. Il y a donc des pertes d'espèces de très grandes tailles à la filtration ou par rétention dans les colonnes (agrégats associés hydrophobes en raison du caractère amphiphile des composés). Cependant, cette perte est faible et la majorité de l'échantillon est analysée. La Figure C-11 illustre la distribution des masses molaires des dérivés greffés PUL-FA et de leur précurseur PUL en fonction du volume d'éluion (entre 13,6 et 18) ainsi que les profils d'éluion. Les grandeurs macromoléculaires moyennes intrinsèques sont regroupées dans le Tableau C-5.



**Figure C-11 :** Profils d'éluion dans  $\text{LiNO}_3$  (0,1 mol/L) à 25°C de l'indice de réfraction (trait plein) et de la diffusion de la lumière à 90° (tirets) avec la distribution des masses molaires (points) de pullulane précurseur (orange), PUL-FA-2% (vert), PUL-FA-6% (bleu) et PUL-FA-10% (rouge).

Les courbes en tirets sont les signaux obtenus en diffusion de lumière à 90°. Elles sont proportionnelles à la masse molaire et à la concentration des fractions éluées. Les courbes en traits pleins représentent les signaux obtenus par le détecteur réfractométrique (DRI), elles sont uniquement proportionnelles à la concentration. Les distributions des masses molaires en

fonction du temps d'élution sont également représentées entre 13,6 et 18 mL (points). Au-delà de 18 mL, le signal de diffusion de la lumière est trop faible pour obtenir une masse molaire.

En comparaison avec le pullulane précurseur, les chromatogrammes des dérivés PUL-FA montrent l'apparition d'une nouvelle population de très grandes masses molaires (faible volume d'élution) qui devient plus prononcée pour les dérivés les plus greffés. Ceci peut être dû à des associations physiques (agrégats) car une faible réticulation covalente des chaînes polymères est impossible dans notre cas. En plus, on constate que les distributions de masse molaire ne sont pas superposées pour les 4 échantillons mais plutôt parallèles avec une augmentation de la masse molaire avec le taux de greffage en FA. À volume d'élution constant (donc taille constante), la masse molaire augmente avec le taux de greffage en FA ce qui montre une conformation plus compacte suite à des associations hydrophobes intra et/ou intermoléculaires entre les motifs greffés d'acide férulique. Ce comportement, classique pour des polymères amphiphiles, est aussi vérifié par le déplacement vers les faibles volumes d'élution de la population majoritaire des dérivés modifiés. Il a été déjà observé par exemple avec l'incorporation de gâïacol sur un dérivé du pullulane<sup>28</sup>.

L'ensemble des caractéristiques macromoléculaires est rassemblé dans le Tableau C-5.

**Tableau C-5 : Grandeurs caractéristiques moyennes intrinsèques du PUL précurseur et des dérivés greffés PUL-FA obtenus par couplage SEC/MALS/DRI/Visco/UV à une concentration de 1 g/L dans LiNO<sub>3</sub> 0,1 mol/L à 25°C**

Échantillon	M <sub>n</sub> (g/mol)	M <sub>w</sub> (g/mol)	M <sub>0</sub> <sup>a</sup> (g/mol)	DP <sub>n</sub> <sup>b</sup>	Rh(w) (nm)	[η] <sub>w</sub> (ml/g)	a <sup>c</sup>	Masse récupérée (%)
PUL précurseur	144 000	265 000	162	889	13,9	76	0,6	90
PUL-FA-2%	231 000	670 000	165,52	1400	17,2	70	0,43	87
PUL-FA-6%	257 000	804 000	172,57	1489	18,1	67	0,42	80
PUL-FA-10%	334 000	815 000	179,62	1859	17,7	57	0,39	70

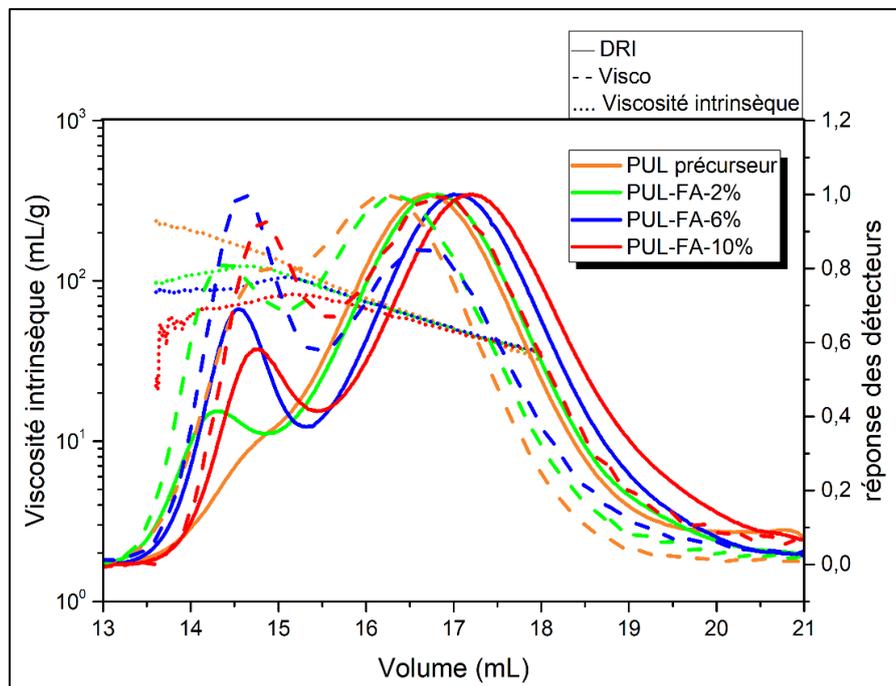
<sup>a</sup> Masse molaire de l'unité de répétition calculée selon l'équation :  $M_0 = 162 + (176,18 \times DS_{FA\ RMN})$

<sup>b</sup> Degré de polymérisation apparent déterminé par la relation :  $DP_n = M_n / M_0$

<sup>c</sup> a est le coefficient de Mark Houwink Sakurada obtenu par l'équation B20 (voir Chapitre B-II.1) obtenu sur la zone d'intégration 15,3 à 18 mL.

On remarque une augmentation significative des masses molaires ( $M_n$  et  $M_w$ ) des produits PUL-FA par rapport au PUL avec un effet significatif de la quantité d'acide férulique greffée. Aucune dégradation n'est constatée et par conséquent, les conditions opératoires de la réaction de greffage sont douces et non dégradantes. Par ailleurs, cette augmentation notable n'est pas uniquement le résultat de l'augmentation attendue de la masse molaire de l'unité de répétition suite à l'incorporation de FA car le degré de polymérisation apparent moyen en nombre ( $DP_n$ ) augmente fortement avec le DS (FA). Cela prouve de nouveau la présence de structures agrégatives dues aux interactions hydrophobes (auto-association) entre les greffons hydrophobes d'acide férulique incorporés au sein du squelette polysaccharidique hydrophile du pullulane.

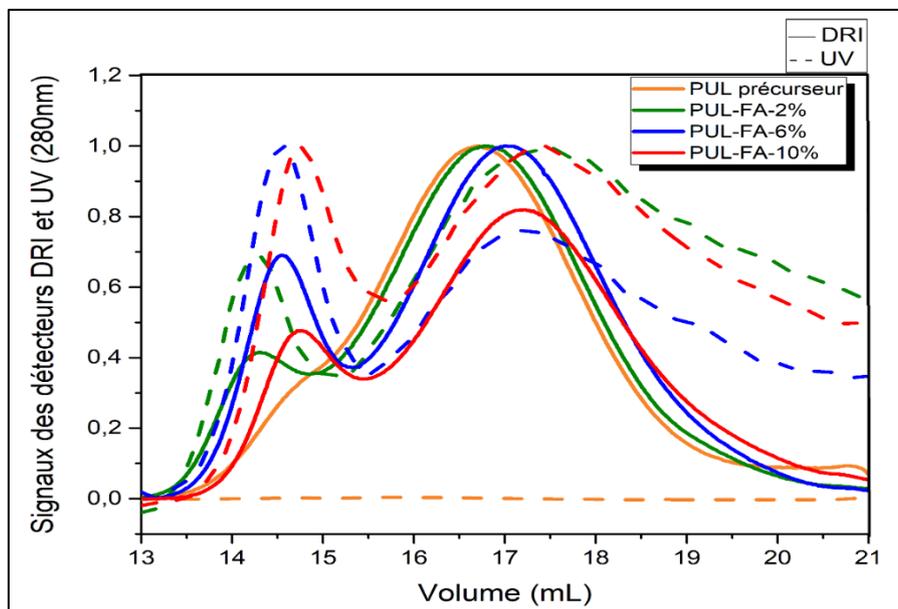
En outre, cette compaction de la chaîne en raison d'associations intramoléculaires prédominantes est assez visible sur l'évolution des viscosités intrinsèques ( $[\eta]$ ) surtout entre 13 et 15 mL (Figure C-12). Par contre le résultat est moins évident sur les rayons hydrodynamiques ( $R_h$ ) puisque ceux-ci sont obtenus par calcul faisant intervenir la masse molaire (voir Chapitre B II-1) qui traduit également la présence d'agrégats (associations intermoléculaires) même s'ils sont minoritaires.



**Figure C-12 :** Profils d'élution dans  $\text{LiNO}_3$  (0,1 mol/L) à  $25^\circ\text{C}$  de l'indice de réfraction (trait plein) et de la viscosité (tirets) avec la distribution des viscosités intrinsèques (points) de pullulane précurseur (orange), PUL-FA-2% (vert), PUL-FA-6% (bleu) et PUL-FA-10% (rouge).

La conformation plus compacte des PUL-FA peut être également mise en évidence via la relation de Mark Houwink Sakurada (Eq. B20, Chapitre B-II.1). Le coefficient « a » de Mark Houwink Sakurada obtenu par cette relation est très faible pour les 3 dérivés PUL-FA avec des valeurs comprises entre 0,39 et 0,43 en accord avec une conformation très compacte et dense de la chaîne polymère (et/ou des agrégats) en solution. Ceci renforce nos conclusions précédentes sur la présence d'associations hydrophobes majoritairement intramoléculaires en régime dilué entre les groupements de FA.

L'utilisation d'un spectrophotomètre UV a permis la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 280 nm (longueur d'absorbance maximale de l'acide férulique dans le domaine ultra-violet) pendant l'éluion (Figure C-13).



**Figure C-13** : Profils d'éluion dans  $\text{LiNO}_3$  (0,1 mol/L) à 25°C de l'indice de réfraction (trait plein) et de l'absorbance à 280 nm (tirets) du pullulane précurseur (orange), PUL-FA-2% (vert), PUL-FA-6% (bleu) et PUL-FA-10% (rouge).

Deux informations importantes peuvent être retirées de cette figure. Tout d'abord, on observe que les réponses UV à 280 nm suivent l'allure des réponses réfractométriques (DRI) avec une augmentation logique d'absorbance globale avec le DS (FA) à l'exception du pullulane précurseur qui ne contient pas d'acide férulique et par conséquent ne montre pas d'absorbance à 280 nm. Ceci indique une distribution homogène des motifs d'acide férulique dans la dispersion des masses molaires. Pour les dérivés greffés, on détecte également des absorbances élevées à faible volume d'éluion dans la zone d'apparition des agrégats compacts (entre 13 et 15 mL). Cette évolution prouve que ces agrégats contiennent une quantité

considérable de greffons FA ce qui confirme que ces structures sont formées à partir d'associations hydrophobes entre ces composés phénoliques greffés.

Des résultats similaires ont été observés sur d'autres pullulanes modifiés hydrophobiquement indiquant l'existence de telles interactions intra et/ou intermoléculaires entre les molécules hydrophobes greffées comme par exemple des groupements alkyle perfluoré avec trois taux de substitution différents 1,1, 3,4 et 5%<sup>29</sup>. Des nanosphères hydrophobes de taille comprise entre 75 et 150 nm ont été également obtenus par *Jeong et al.* à partir des systèmes PUL greffés par l'acide poly(DL-lactide-*co*-glycolide) (PLGA) avec des taux de greffage compris entre 2 et 6,5%<sup>30</sup>. Le comportement auto-agrégatif peut même conduire à la formation de nanoparticules stables et monodisperses comme avec des dérivés de pullulane greffés cholestérol (CHP) avec des taux de substitution de 1,6 et 5,4%<sup>31</sup>.

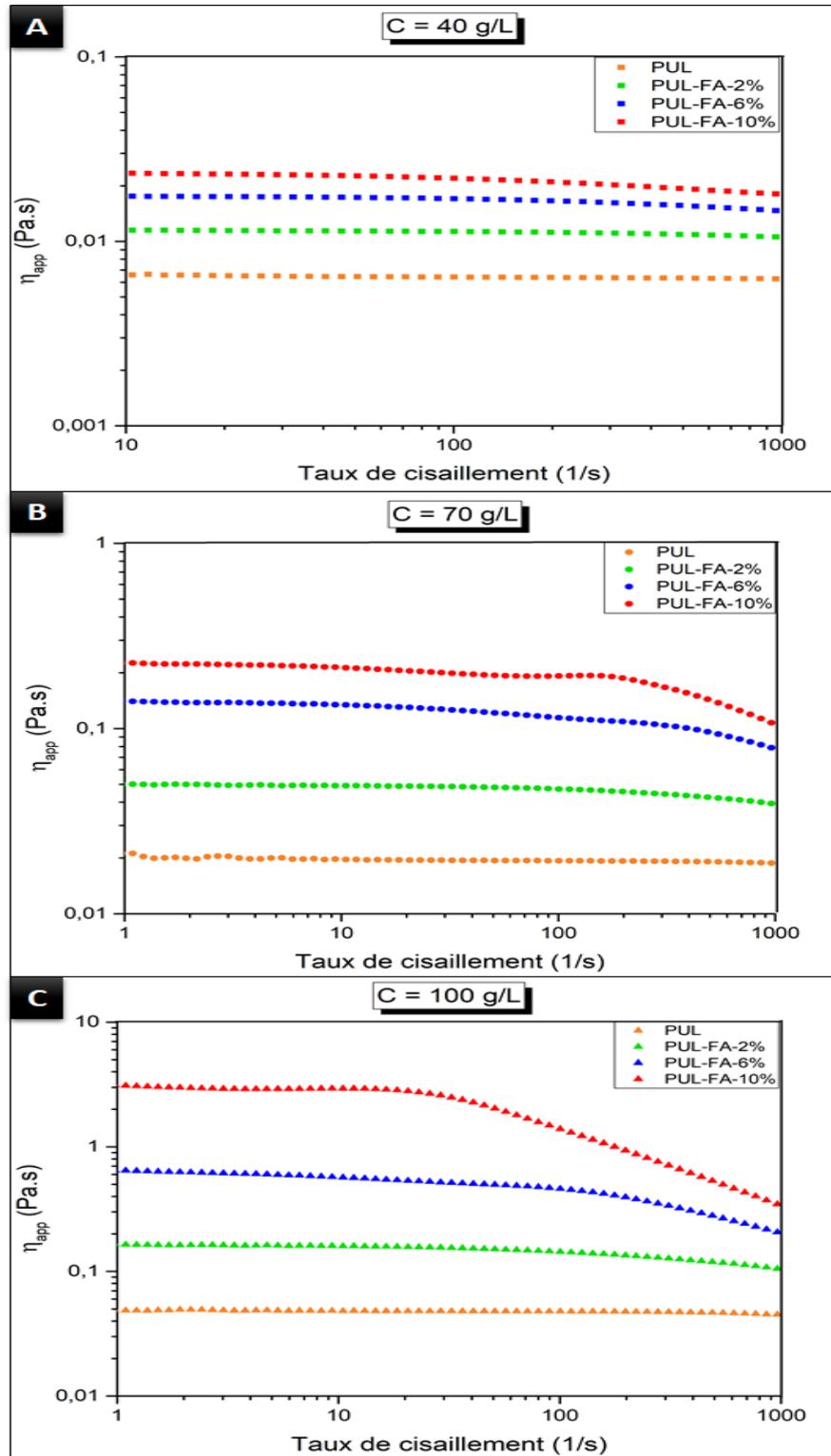
Le comportement auto-associatif de tous ces dérivés mentionnés en solution aqueuse en régime dilué a été attribué aux interactions intra et/ou intermoléculaires des motifs hydrophobes greffés capables de former des agrégats compacts. Il a été notamment démontré que ce comportement dépend fortement de la quantité et de la nature des greffons hydrophobes incorporés, deux paramètres clés du caractère amphiphile de ces dérivés greffés. En effet, le caractère amphiphile apportée par l'hydrophilie du squelette polysaccharide du pullulane et l'hydrophobie des molécules d'acide férulique, favorise les associations hydrophobes de ces dernières de façon à éviter au maximum leur contact avec l'eau. Ce comportement va induire la formation des zones ou de micro-domaines hydrophobes appelés « clusters » suite à ces associations qui peuvent être de nature intra et/ou intermoléculaire. Ces zones d'associations pourraient influencer l'accessibilité des greffons d'acide férulique lors des étapes futures de réticulation.

## II.2. Mesures rhéologiques

### II.2.1. Mesures en écoulement

L'étude des propriétés d'écoulement des différentes solutions des dérivés PUL-FA et de leur précurseur pullulane a été réalisée en régime permanent en utilisant la géométrie 'doubles-cylindres concentriques'. Les solutions des différents échantillons ont été préparées à des concentrations de 40, 70 et 100 g/L dans le tampon citrate/phosphate 0,1 mol/L (pH= 5,5) à TA. Ces concentrations ont été choisies sachant que le pullulane précurseur possède une concentration critique de recouvrement ( $C^*$ ) et une concentration critique d'enchevêtrement ( $C^{**}$ ) respectivement de 32 et 90 g/L<sup>32</sup>. Toutes les analyses ont été effectuées à une température

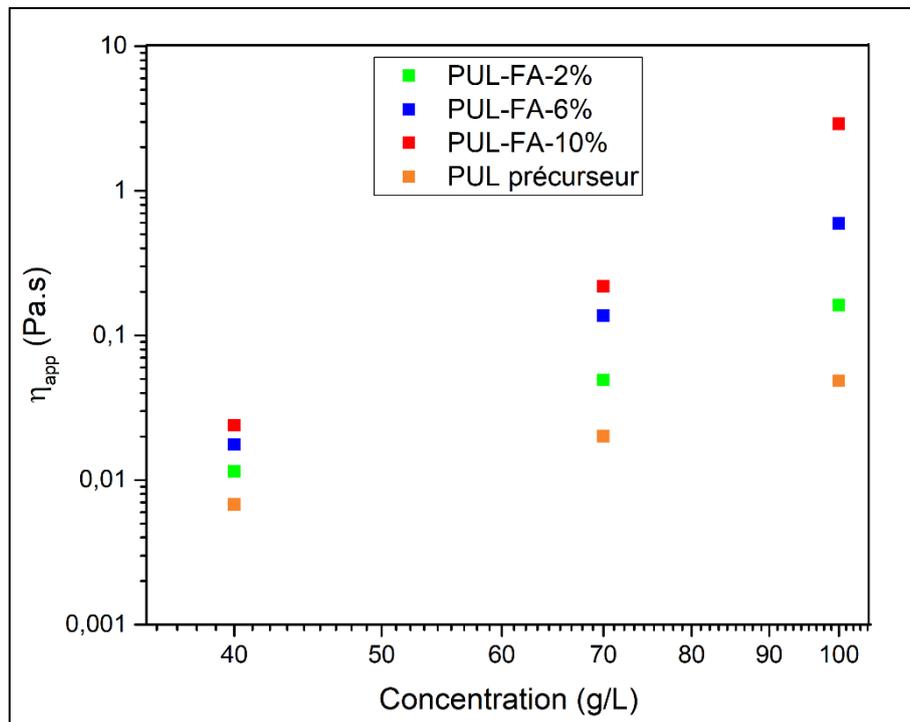
de 25°C sur une plage de cisaillement comprise entre 1 et 1000 s<sup>-1</sup>. Les courbes obtenues sont présentées dans la Figure C-14.



**Figure C-14 :** Courbes d'écoulement (rampe = 1 – 1000 s<sup>-1</sup>) à 25°C de PUL (orange), PUL-FA-2% (vert), PUL-FA-6% (bleu) et PUL-FA-10% (rouge) à une concentration de : **A)** 40 g/L. **B)** 70 g/L. **C)** 100 g/L

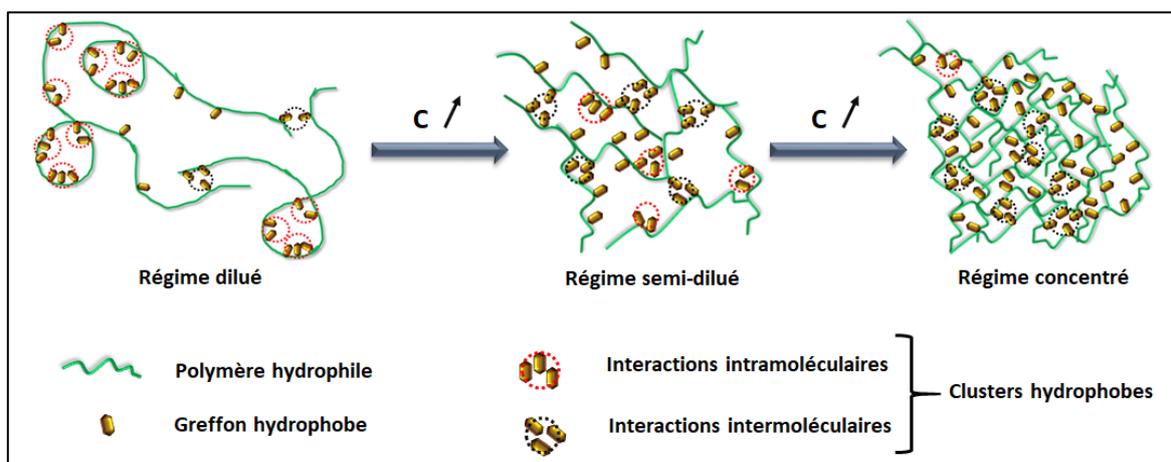
On remarque que les dérivés greffés présentent toujours des viscosités supérieures à celle du précurseur aux différentes concentrations et à chaque vitesse de cisaillement. Ceci est dû aux associations hydrophobes intermoléculaires créées entre les motifs greffés d'acide férulique. Si précédemment la caractérisation par SEC/MALS/DRI/Visco/UV a montré que les interactions hydrophobes intramoléculaires sont favorisées en régime dilué, les interactions intermoléculaires semblent être plus favorables en régime semi-dilué ce qui induit cette augmentation de viscosité. Il faut noter également qu'en analyse chromatographique, on a une étape de filtration préalable à 0,45  $\mu\text{m}$  des différentes solutions avant de les injecter dans les colonnes ce qui élimine les objets de très grandes tailles qui sont issus d'associations intermoléculaires. En mesures rhéologiques, aucune filtration n'est faite.

Les profils d'écoulement sont globalement newtoniens à 40g/L pour tous les systèmes. Un léger caractère rhéofluidifiant apparait pour PUL-FA-6% et PUL-FA-10% aux forts gradients à 70 et 100g/L. Nous avons représenté la variation de la viscosité apparente prise sur le plateau newtonien des différents systèmes en fonction de la concentration en polymère (Figure C-15).



**Figure C-15 :** Variation de la viscosité au plateau newtonien (cisaillement =  $5 \text{ s}^{-1}$ ) en fonction de la concentration C de PUL (orange), PUL-FA-2% (vert), PUL-FA-6% (bleu) et PUL-FA-10% (rouge) à 25°C

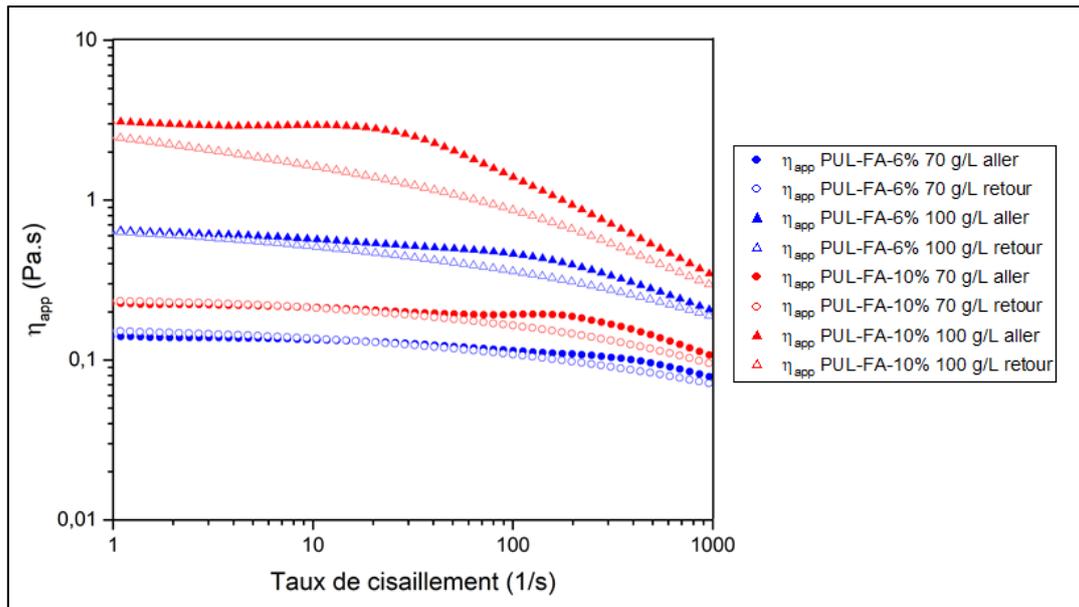
On observe bien que la viscosité augmente avec la concentration en polymère et le degré de substitution en FA. Ce résultat traduit bien l'augmentation des associations intermoléculaires quand la concentration et le DS en FA augmentent. Il y a donc bien une transition des associations intra vers des associations intermoléculaires lorsque la concentration en polymère augmente (Figure C-16). Ce comportement a souvent été observé dans le domaine des polysaccharides associatifs<sup>33</sup>. Par contre, des études menées sur des dérivés anioniques du pullulane greffé avec des dérivés du gaïacol indiquaient plutôt un comportement de type polysavon pour lequel les associations intramoléculaires demeurent même à forte concentration<sup>28</sup>.



**Figure C-16 :** Schéma représentatif du comportement d'un polymère hydrophile greffé d'une molécule hydrophobe en régime de concentration dilué et semi-dilué

Le comportement rhéofluidifiant des produits PUL-FA-6% et PUL-FA-10% est le résultat de réarrangements au niveau macromoléculaire. A faible taux de cisaillement, l'organisation résultant d'interactions hydrophobes essentiellement intermoléculaires voire intramoléculaires (non favorisées mais pouvant exister) entre les motifs d'acide férulique n'est pas perturbée. Ces interactions vont entraîner la formation d'un réseau physique réduisant ainsi la mobilité des chaînes macromoléculaires. A un taux de cisaillement suffisamment élevé, ces interactions vont être rompues conduisant à la déstructuration du réseau physique formé antérieurement. Le comportement rhéologique des PUL-FA rejoindra celui du précurseur aux forts gradients de cisaillement (non atteints sur les écoulements présentés).

La thixotropie des solutions avec le comportement rhéofluidifiant a été notamment examinée en traçant l'aller et le retour de leur viscosité apparente en fonction du taux de cisaillement (Figure C-17).

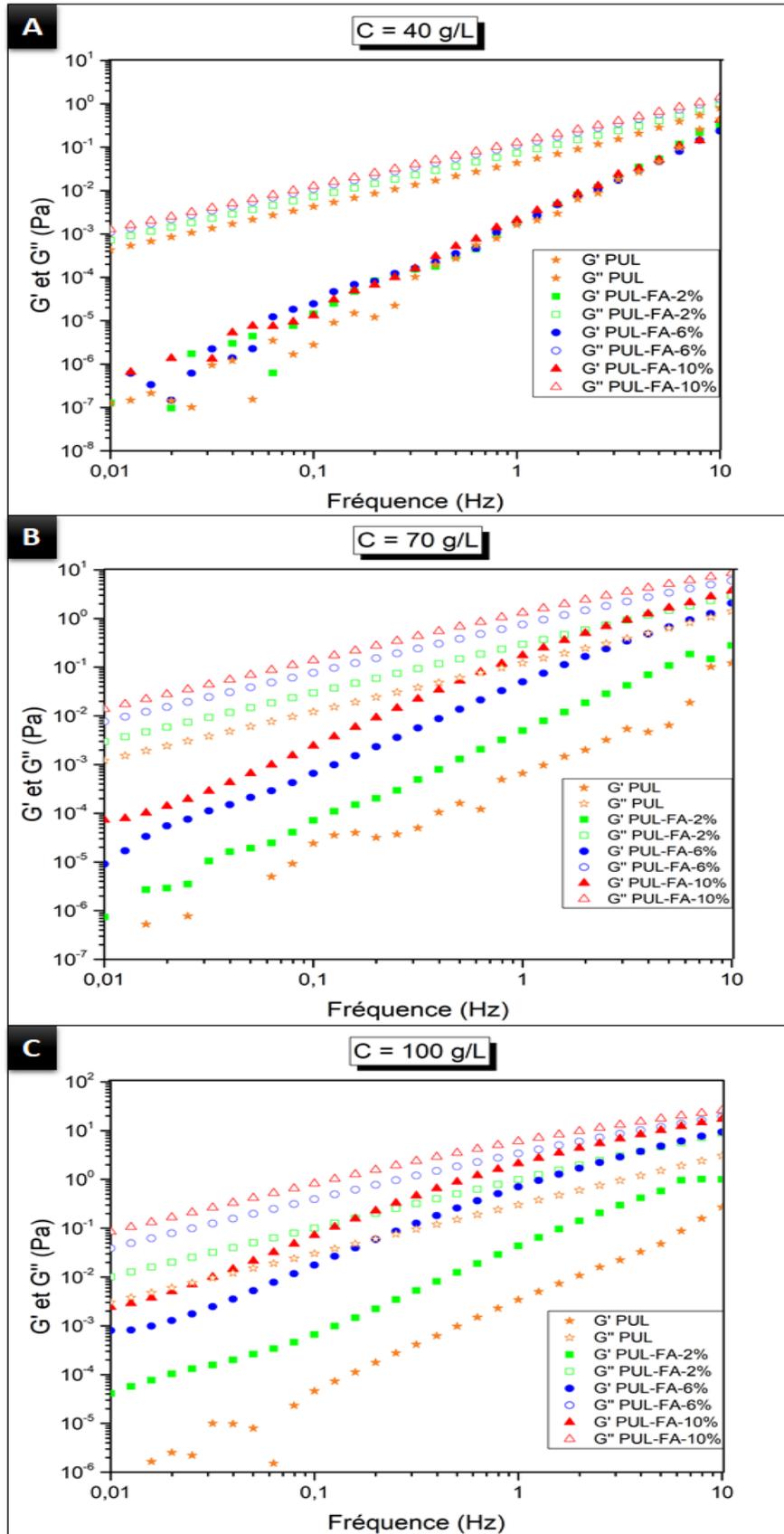


**Figure C-17 :** Courbes d'écoulement (rampe = 1 – 1000 s<sup>-1</sup>) à 25°C en aller (symbole plein) et retour (symbole vide) de PUL-FA-6% (bleu) et de PUL-FA-10% (rouge) à 70 g/L (triangle) et 100 g/L (cercle)

Un phénomène de thixotropie est effectivement observé avec une hystérèse entre les courbes aller et retour de la viscosité en fonction du gradient de cisaillement. Cette thixotropie qui s'accroît quand la concentration en polymère et le DS en FA augmentent, traduit bien un retard au retour à la viscosité initiale due au temps nécessaire à la reformation des associations hydrophobes intermoléculaires rompues par le cisaillement entre les greffons de FA. Par conséquent, les réarrangements macromoléculaires ne sont pas instantanés.

### II.2.2. Mesures dynamiques

Pour mettre en évidence les propriétés viscoélastiques des différentes solutions, des mesures en régime dynamique ont été réalisées dans une gamme de fréquence s'étalant de 0,01 à 10 Hz. Des tests préliminaires ont permis de déterminer le domaine de viscoélasticité linéaire de chaque solution où les contraintes appliquées sont suffisamment faibles pour éviter la déstructuration de l'échantillon. Les analyses ont été donc effectuées sous des contraintes comprises entre 0,1 et 0,5 Pa. Les modules élastiques ou de conservation ( $G'$ ) et visqueux ou de perte ( $G''$ ) en fonction de la fréquence des solutions du PUL et des produits greffés PUL-FA à des concentrations de 40, 70 et 100 g/L sont représentés dans la Figure C-18.



**Figure C-18 :** Variations de  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) du PUL (orange), PUL-FA-2% (vert), PUL-FA-6% (bleu) et PUL-FA-10% (rouge) en fonction de la fréquence, à 25°C à des concentrations de : **A)** 40 g/L. **B)** 70 g/L. **C)** 100 g/L

À 40g/L, on n'observe quasiment aucune différence de comportement pour les 4 solutions analysées. Cela montre la très faible importance des interactions intermoléculaires dans ce domaine de concentration. Le comportement est principalement visqueux ( $G'' \gg G'$ ).

À 70 et 100g/L, le comportement est toujours majoritairement visqueux puisque aucun point de croisement entre les modules  $G'$  et  $G''$  n'est visible mais cette fois, la présence des greffons FA modifie les propriétés de la solution en réduisant fortement l'écart entre  $G'$  et  $G''$ .

Les interactions hydrophobes intermoléculaires sont alors plus présentes entre les motifs greffés d'acide férulique et plus prononcés pour le dérivé le plus greffé (PUL-FA-10%) à la concentration la plus élevée (100 g/L). De ce fait, ce dernier possède les valeurs de  $G'$  et de  $G''$  les plus élevées sur tout le domaine de fréquence.

Les interactions intermoléculaires créées entre les greffons d'acide férulique PUL-FA obtenus ne sont pas suffisamment intenses au point d'avoir la formation d'un hydrogel physique via des associations hydrophobes même à haute fréquence. On obtient uniquement un probable et faible ralentissement de la dynamique des chaînes, même si l'absence de point de croisement des modules ne permet pas d'obtenir la fréquence critique et donc le temps de relaxation. Il semble donc que toutes les associations ne soient pas nécessairement intermoléculaires et qu'une partie des associations intramoléculaires demeurent avec un comportement mixte entre polymère associatif et polysavon.

### **II.2.3. Conclusion sur les propriétés physico-chimiques**

Les caractérisations physico-chimiques ont permis de mettre en évidence un caractère auto-associatif des pullulanes porteur de greffon acide férulique en raison d'interactions hydrophobes intra et intermoléculaires entre les motifs greffés d'acide férulique induisant la formation de microdomaines hydrophobes appelés clusters. Selon le domaine de concentration, ces interactions sont plutôt intramoléculaires en régime dilué et intermoléculaires en régimes semi-dilué et concentré.

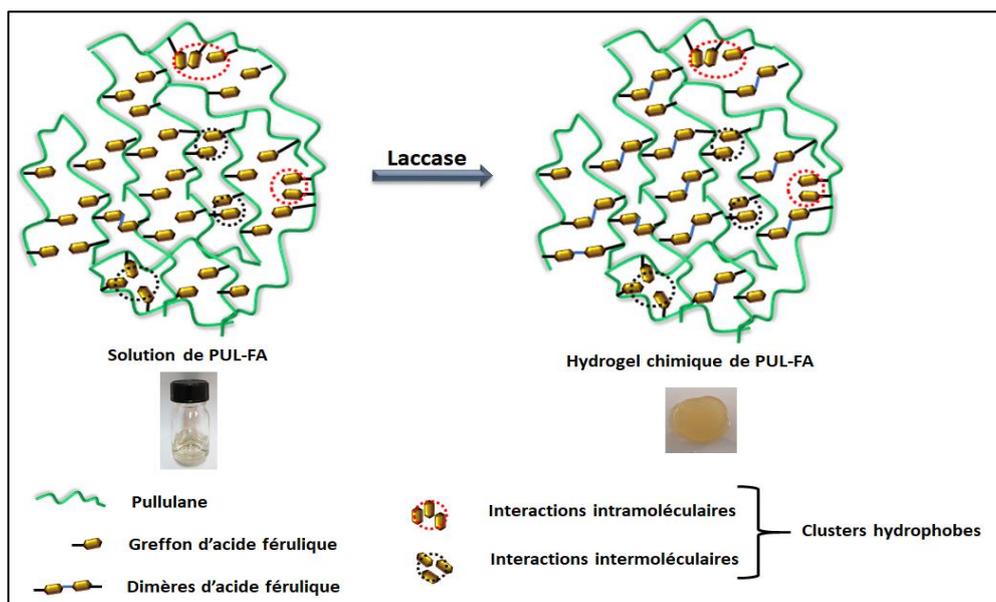
Les mesures rhéologiques en régime permanent et dynamique nous ont permis également de définir les conditions expérimentales à utiliser pour l'élaboration d'hydrogels chimiques.

### III. Gélification

#### III.1. Mode d'obtention des hydrogels PUL-FA

Comme mentionné précédemment, les hydrogels à base de PUL-FA sont obtenus par voie enzymatique, voie douce et respectueuse de l'environnement. En effet, les motifs d'acide férulique greffés sur le pullulane sont capables de se dimériser via une réaction radicalaire en présence d'une enzyme oxydase comme la laccase. En présence de la laccase, les greffons de FA vont être oxydés et transformés en des radicaux très réactifs appelés quinones qui peuvent se condenser formant ainsi des dimères d'acide férulique. Différentes formes de radicaux peuvent être créés suite à l'action de l'enzyme et par conséquent cinq formes de dimères sont possibles dont deux sont les plus abondantes (voir Chapitre A-III.2.1.2). Par conséquent, la gélification devrait se produire par la création de points de réticulation covalents (dimère) entre deux greffons d'acide férulique appartenant à deux chaînes polymères différentes (Figure C-19). Si la réticulation menant à l'hydrogel sera la conséquence de dimères intermoléculaires, l'établissement de dimères intramoléculaires reste toujours envisageable (voir conclusion de la partie II-2-2).

Le bon déroulement de la réaction de réticulation nécessite donc une concentration en produits greffés PUL-FA supérieure à  $C^*$  pour favoriser la réticulation intermoléculaire, un tampon citrate/phosphate 0,1 mol/L (pH= 5,5) et une température de 25°C pour une réactivité optimale de la laccase de *Trametes versicolor*. Ces paramètres ont été pris en compte pour la conception des hydrogels.

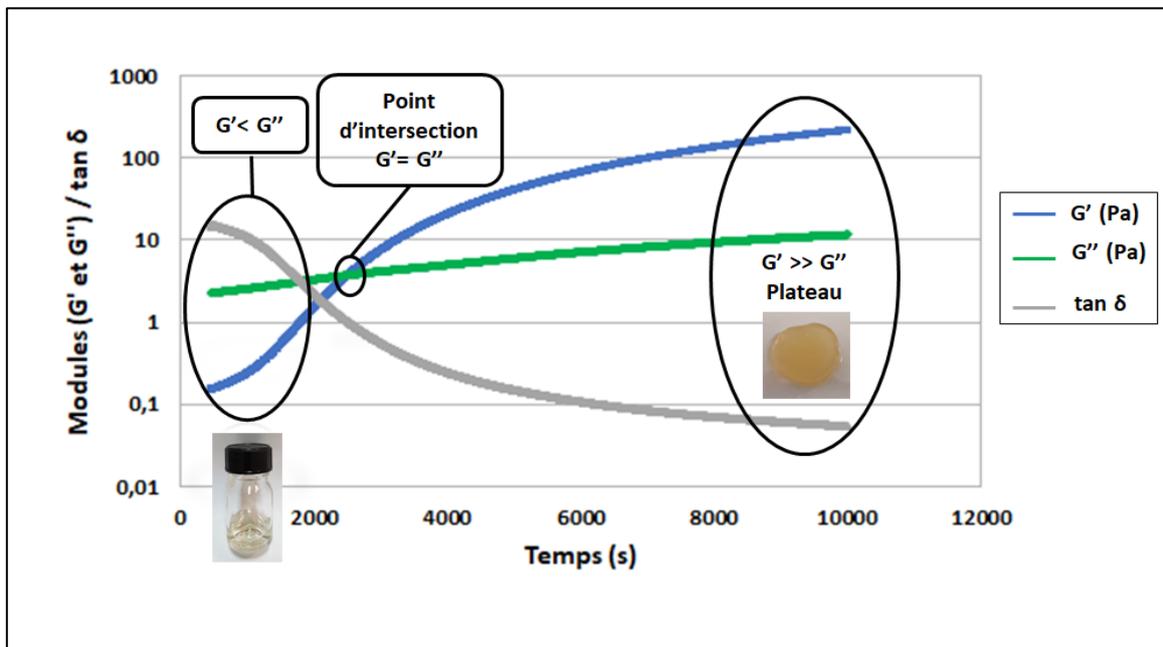


**Figure C-19** : Schéma représentatif de la formation d'un hydrogel de PUL-FA

### III.2. Étude rhéologique

La réaction de réticulation des dérivés greffés PUL-FA par la laccase en régimes semi-dilué et concentré a été suivie par rhéologie en mode dynamique à une température de 25°C en utilisant la géométrie doubles-cylindres concentriques en raison des faibles viscosités initiales ( $\leq 3$  Pa.s) des solutions PUL-FA mesurées précédemment. La mesure des valeurs de  $G'$  et de  $G''$  en fonction du temps nous a permis de suivre la cinétique de formation des hydrogels de PUL-FA et d'évaluer leurs propriétés viscoélastiques à élastiques. Toutes les mesures ont été effectuées à une faible déformation (2%) et à une fréquence de 1 Hz pour assurer la linéarité des propriétés viscoélastiques lors de la réaction (passage d'un état liquide à un gel). Le tampon citrate/phosphate a été utilisé pour dissoudre la laccase à une concentration de 1 g/L et les produits obtenus PUL-FA à trois concentrations différentes 40, 70 et 100 g/L. Une petite quantité de la solution d'enzyme (ne modifiant pas sensiblement la concentration en polymère) a été ajoutée pour se placer à une valeur désirée d'activité enzymatique.

La Figure C-20 représente un exemple des courbes suite au suivi cinétique d'une réaction de formation d'un hydrogel à partir de la solution du dérivé greffé PUL-FA-6% à 70 g/L à 25°C avec une activité de 1 nkat en laccase.



**Figure C-20** : Variations de  $G'$  (module de conservation : bleu), de  $G''$  (module de perte : vert) et de  $\tan \delta$  ( $= G''/G'$  : gris) à 1Hz en fonction du temps d'une solution de PUL-FA-6% à 70 g/L dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) lors de la réaction de réticulation à 25°C par la laccase (1 nkat)

Toutes les courbes obtenues lors des analyses rhéologiques ont montré un profil similaire à celui de la Figure C-20.

Des études antérieures ont rapporté des courbes similaires lors de gélification de polysaccharides en utilisant le même processus de réticulation<sup>34,35</sup>. Ce profil de gélification est également similaire à celui d'autres hydrogels formés par réticulation physique ou chimique<sup>1,36</sup>.

Au début, on part d'une solution majoritairement visqueuse ( $G'' \gg G'$ ) avec des valeurs très faibles de  $G'$  et  $G''$ . Ensuite, on observe rapidement une forte augmentation de  $G'$  qui devient supérieur au  $G''$ . À la fin, les deux modules tendent à atteindre un plateau ou un pseudo-plateau avec des valeurs de  $G'$  qui ont augmenté de trois décades par rapport à la solution initiale, signe de la création d'un hydrogel élastique ( $G' \gg G''$ ). L'allure de ces courbes est caractéristique d'une gélification induite par la réticulation par dimérisation des motifs greffés d'acide férulique par la laccase. Un point caractéristique de ces courbes est le temps où les deux modules  $G'$  et  $G''$  sont égaux. Ce point d'intersection ( $\tan \delta = 1$ ) a fait l'objet d'un important débat scientifique dans la littérature. Certains chercheurs le considèrent comme étant le point de gélification tandis que d'autres le définissent comme étant un point caractéristique de gélification indiquant le début de formation du gel par une transition de la phase purement liquide à la phase solide (gel) dominée par un comportement viscoélastique<sup>37</sup>.

Nous considérons que ce point est difficilement corrélable à une notion de percolation par exemple mais il demeure un point tout à fait caractéristique de la gélification observée. Dans la suite de ce mémoire, nous utiliserons donc le temps correspondant au point de croisement  $G' = G''$  que nous appellerons  $t_{gel}$  pour temps de transition sol/gel.

Pour obtenir une série d'hydrogels aux propriétés mécaniques différentes, plusieurs réactions de réticulation ont été réalisées sur les différents PUL-FA (2 ; 6 et 10%) en variant l'activité enzymatique (0,5, 1 et 2 nkat) et la concentration en PUL-FA (40, 70 et 100 g/L). Les valeurs des temps de point d'intersection  $G' = G''$  ( $t_{gel}$ ), des modules notamment élastiques ( $G'$ ) pris au plateau ou du moins en fin de réticulation et renseignant sur les propriétés mécaniques finales des hydrogels obtenus, ainsi que  $\tan \delta$  sont regroupées dans le Tableau C-6.

**Tableau C-6 : Données rhéologiques des réactions de réticulation des solutions PUL-FA dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) à 25°C**

Produit	[C] (g/L)	AE (nkat)	t <sub>gel</sub> (min)	G' <sup>a</sup> (Pa)	G'' <sup>a</sup> (Pa)	tan δ <sup>a</sup>
PUL-FA-2%	70	0.5	55	170	2	0.01
PUL-FA-6%	40	1	13	260	4	0.02
PUL-FA-6%	70	0.5	33	340	9	0.03
PUL-FA-6%	70	1	17	380	13	0.03
PUL-FA-6%	70	2	8	410	17	0.04
PUL-FA-6%	100	1	20	570	25	0.03
PUL-FA-10%	70	0.5	24	440	19	0.03

<sup>a</sup> Valeurs prises au 'plateau' en fin de réticulation

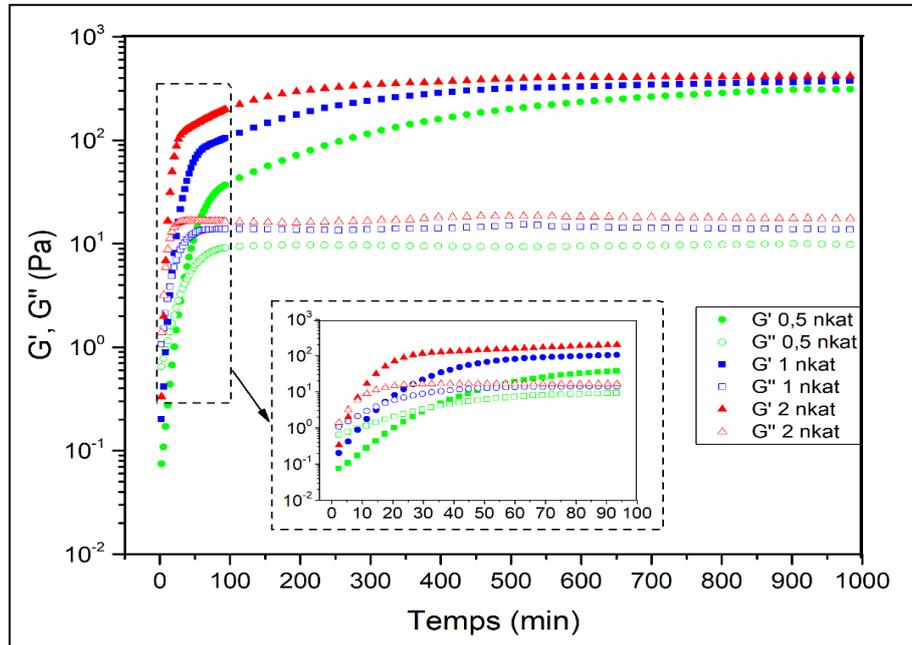
Les valeurs de tan δ obtenues varient entre 0,01 à 0,04 (< 1) et sont bien caractéristiques d'un hydrogel élastique covalent<sup>38</sup>. L'hydrogel possédant les propriétés mécaniques les plus faibles présente un module d'élasticité de 170 Pa au plateau alors que celui aux propriétés les plus élevées atteint une valeur de 570 Pa. Tous les hydrogels obtenus ont démontré des propriétés mécaniques plus importantes que ceux obtenus par *Carvajal et al.* à partir des WEAX, arabinoxylanes naturellement porteur de FA et extraits à l'eau de graines de blé (G' compris entre 5 et 41 Pa)<sup>27</sup>. Ce résultat montre donc que l'on est capable de 'mimer' avec succès les systèmes observés dans la nature mais nous avons également réussi à améliorer les propriétés mécaniques des hydrogels grâce à des taux de FA sur la chaîne polysaccharide plus importants.

Pour mieux comprendre le comportement de ces hydrogels et la cinétique de la réaction de gélification (Tableau C-6), les influences de l'activité enzymatique, du degré de substitution en acide férulique (DS<sub>FA</sub>) et de la concentration en PUL-FA ont été examinées séparément dans la suite de l'étude.

### III.2.1. Influence de la quantité d'enzyme

L'étude de l'effet de l'activité enzymatique sur la cinétique de la gélification et les propriétés physico-chimiques a été réalisée sur les hydrogels formés à partir des solutions de PUL-FA-6% en fixant la concentration à 70 g/L et en faisant varier la quantité d'enzyme

introduite (0,5, 1 et 2 nkat). La Figure C-21 présente les courbes obtenues de  $G'$  et  $G''$  en fonction du temps.



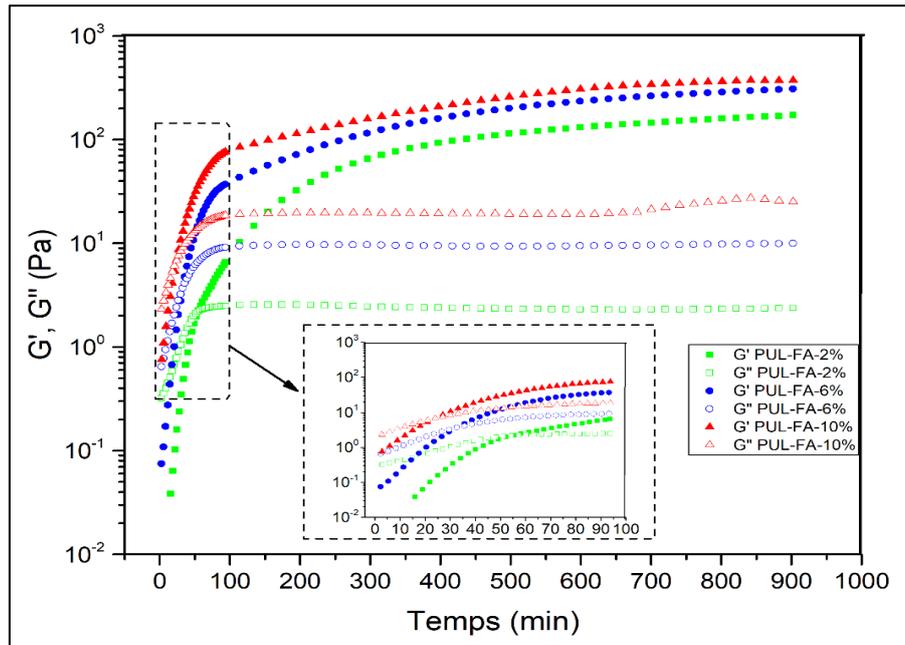
**Figure C-21** : Influence de l'activité enzymatique sur la réaction de gélification et les propriétés des hydrogels : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1Hz en fonction du temps de la réaction de gélification à 25°C de solution PUL-FA-6% à 70 g/L dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) en utilisant une activité de laccase de 0,5 nkat (vert), 1 nkat (bleu) et 2 nkat (rouge)

Sur la Figure C-21, on constate que les courbes de  $G'$  et  $G''$  des différents échantillons analysés ont tendance à atteindre des plateaux de même niveau de  $G'$  à la fin de la mesure rhéologique et par conséquent on obtient des hydrogels aux propriétés mécaniques quasi identiques. Cependant, on remarque que ces plateaux ne sont pas atteints au même moment et si on regarde le point de croisement des deux modules  $G'$  et  $G''$ , on observe que  $t_{gel}$  diminue quand la quantité d'enzyme (AE) augmente. Le plateau est atteint plus rapidement par une activité enzymatique plus élevée. Les valeurs numériques du Tableau C-6 confirment cette impression :  $G'$  quasi constant des hydrogels de PUL-FA-2% de 340, 380 et 410 Pa pour les trois activités enzymatiques testées avec des temps de gel décroissants (33, 17 et 8 min) avec l'augmentation de l'activité enzymatique variant de 0,5 à 2 nkat.

De ce fait, la laccase n'a qu'un effet sur la cinétique de la gélification et n'a aucun effet sur les propriétés mécaniques finales des hydrogels (même nombre de liens formés) ce qui est en accord avec le rôle catalytique de cette enzyme dans la réaction de réticulation.

### III.2.2. Influence du degré de substitution

Pour comparer l'effet du degré de substitution en acide férulique sur la cinétique de la réaction de réticulation et sur les propriétés mécaniques des hydrogels, nous avons choisi de travailler à concentration en polymère et à activité enzymatique fixes de 70 g/L et 1 nkat, respectivement. Les mesures rhéologiques ont été effectuées sur les produits greffés PUL-FA-2%, PUL-FA-6% et PUL-FA-10% (Figure C-22).



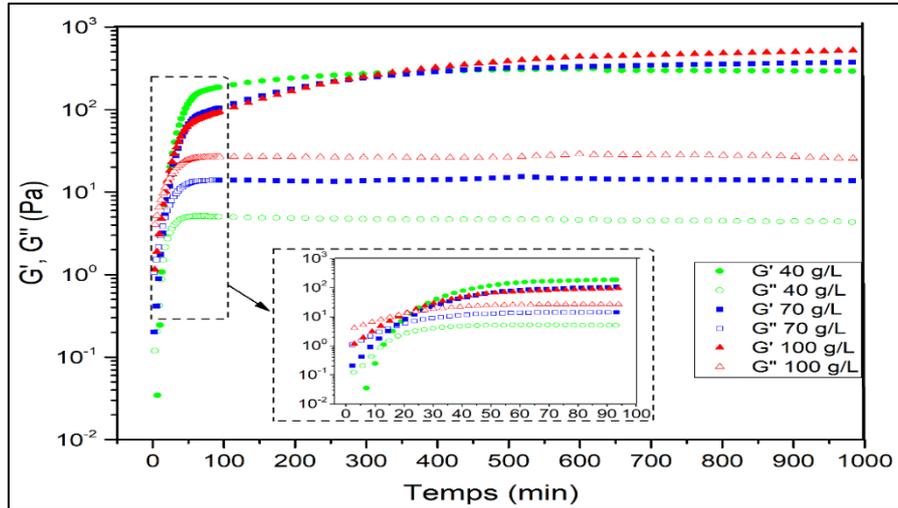
**Figure C-22** : Influence du degré de substitution sur la réaction de gélification et les propriétés des hydrogels : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de gélification à 25°C par la laccase (1nkat) de solutions de PUL-FA-2% (vert), PUL-FA-6% (bleu) et de PUL-FA-10% (rouge) à 70 g/L dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5)

La Figure C-22 montre cette fois des différences tant au niveau des propriétés mécaniques finales que de la cinétique. En effet, lorsque le  $DS_{FA}$  varie de 2 à 10%,  $G'$  et  $G''$  au plateau augmentent respectivement de 170 à 440 Pa et de 2 à 19 Pa tandis que temps de gel diminue de 55 à 24 min (Tableau C-6). Ainsi, le degré de substitution en acide férulique affecte non seulement les caractéristiques des hydrogels obtenus mais aussi la cinétique de la réaction de réticulation. Le réseau 3D se forme plus rapidement avec des propriétés mécaniques plus importantes lorsque le  $DS_{FA}$  est plus important.

Cela s'explique assez logiquement, en effet plus le DS en FA augmente, plus le nombre de liens potentiels de réticulation augmente (i.e. valeur du module au plateau). La présence d'un grand nombre de greffons dans le milieu quand le DS en FA augmente permet aussi d'établir les liens plus rapidement et explique ainsi également l'amélioration de la cinétique.

### III.2.3. Influence de la concentration

Nous avons finalement investigué l'influence de la concentration en PUL-FA sur la vitesse de formation des hydrogels et sur leurs propriétés mécaniques finales. Pour cela, les analyses rhéologiques ont été menées sur le dérivé PUL-FA-6% en utilisant une quantité d'enzyme de 1 nkat et en faisant varier la concentration (40, 70 et 100 g/L) (Figure C-23).



**Figure C-23 :** Influence de la concentration sur la réaction de gélification et les propriétés des hydrogels : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1Hz en fonction du temps de la réaction de gélification à 25°C par la laccase (1 nkat) des solutions PUL-FA-6% dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) à 40 g/L (vert), 70 g/L (bleu) et 100 g/L (rouge)

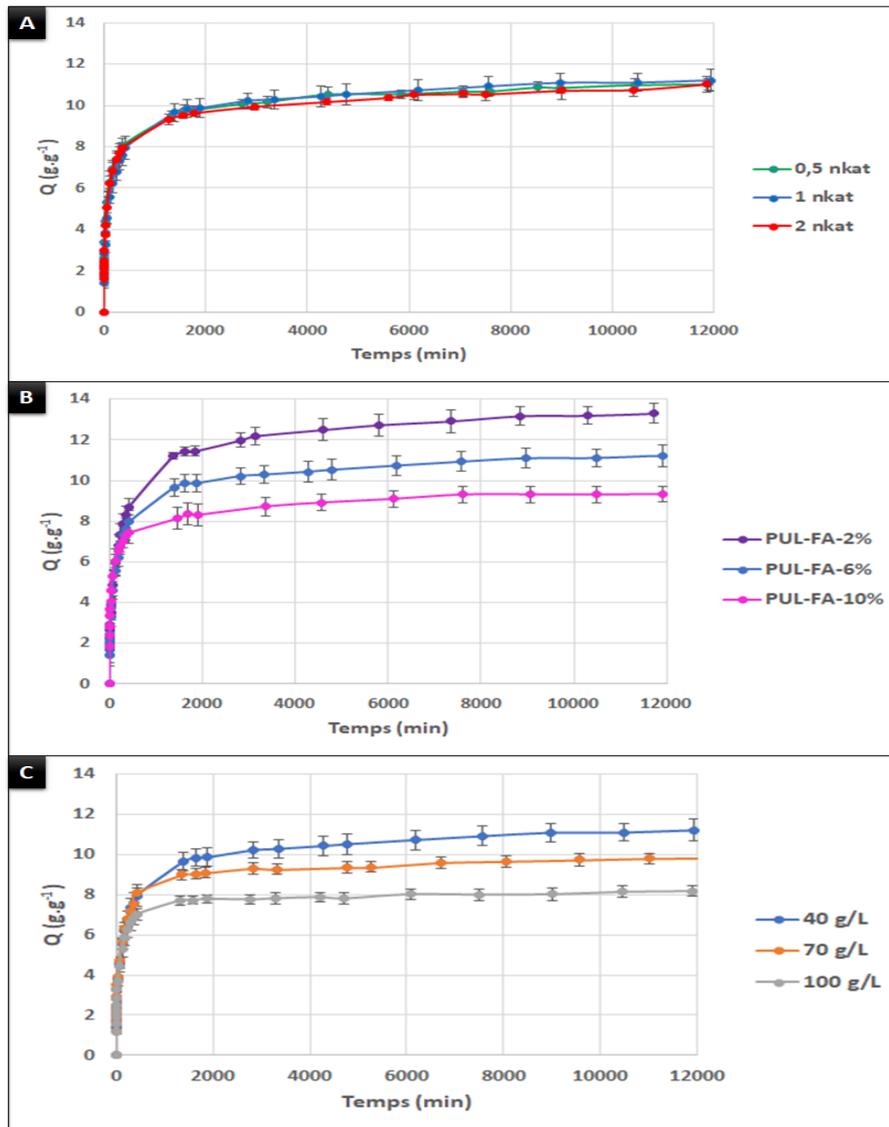
Assez logiquement, les modules élastiques au plateau augmentent avec la concentration (voir Tableau C-6). En effet, l'augmentation de la concentration se traduit par un enchevêtrement des chaînes polymères plus dense mais aussi à une probabilité de rencontre des FA greffés améliorée (i.e. liens de réticulation potentiels). Ce phénomène est en plus probablement accentué par la présence d'associations hydrophobes intermoléculaires mises en évidence dans la partie précédente permettant d'envisager une réactivité (réticulation) entre greffons acide férulique plus importante.

Sur l'aspect cinétique, les résultats peuvent apparaître plus surprenants puisque la cinétique diminue légèrement (entre 17 et 37 min) avec l'augmentation de la concentration en polymère. Une explication peut conduire à considérer un enchevêtrement plus important à forte concentration en polymère pouvant affecter la mobilité de l'enzyme et ralentissant la vitesse de réticulation.

Par conséquent, la concentration joue un rôle sur la cinétique de la réaction de réticulation ainsi que sur les propriétés physico-chimiques finales des hydrogels.

### III.3. Propriétés de gonflement

Dans le but de vérifier leur affinité avec l'eau, le gonflement des hydrogels de PUL-FA a été étudié dans l'eau pure (milli-Q). Généralement, la capacité de gonflement d'un hydrogel à l'équilibre dépend fortement de la structure moléculaire du réseau polymère, de la densité de réticulation et des interactions des composants de l'hydrogel. C'est pour cette raison que l'effet de la quantité d'enzyme, du degré de substitution en acide férulique et de la concentration sur la cinétique et sur les propriétés de gonflement a été étudié et représenté respectivement dans les Figures C-24-A, C-24-B et C-24-C.



**Figure C-24 :** Influence sur les propriétés de gonflement dans l'eau milli-Q de : **A)** l'activité enzymatique pour l'hydrogel obtenu à partir de PUL-FA-6% (40 g/L). **B)** le degré de substitution en acide férulique pour les hydrogels obtenus à partir de PUL-FA-2%, PUL-FA-6% et PUL-FA-10% à 40 g/L avec une activité enzymatique de 1 nkat. **C)** la concentration en polysaccharide pour les hydrogels obtenus à partir de PUL-FA-6% avec une activité enzymatique de 1 nkat

Les courbes obtenues montrent une cinétique de gonflement en deux temps. Pour débiter, sur les premières heures, l'absorption d'eau est rapide. Ensuite, l'équilibre est très long à atteindre avec une très lente et faible augmentation du gonflement sur une semaine. Le taux de gonflement maximal ( $13,3 \text{ g}\times\text{g}^{-1}$ ) a été mesuré avec l'hydrogel obtenu à partir du dérivé le moins greffé (PUL-FA-2%) à la concentration la moins élevée (40 g/L). Ce gonflement est relativement faible en raison du caractère neutre de la chaîne polymère.

Les courbes de gonflement des hydrogels formés à partir du PUL-FA-6% à 40 g/L en utilisant trois activités enzymatiques différentes 0,5, 1 et 2 nkat (Figure C-24-A) montrent un profil identique avec le même degré de gonflement à chaque point de mesure. Ainsi, en accord avec les résultats de l'étude rhéologique, la quantité d'enzyme n'a pas d'effet sur les propriétés de gonflement des hydrogels puisque la densité de réticulation est constante.

La Figure C-24-B représente le gonflement des hydrogels élaborés avec les échantillons PUL-FA-2%, PUL-FA-6% et PUL-FA-10% à 40 g/L et une quantité de laccase de 1 nkat. Cette figure prouve que la quantité d'acide férulique greffée a un impact sur les propriétés de gonflement des hydrogels PUL-FA. La réduction du  $DS_{FA}$  entraîne une augmentation de gonflement en raison d'une diminution de la densité de réticulation ce qui facilite la pénétration de l'eau entre le réseau de l'hydrogel. Ce résultat est également conforme avec les mesures rhéologiques précédentes. Une constatation identique a été obtenue en étudiant l'effet de la concentration sur la cinétique de gonflement de l'hydrogel de PUL-FA-6% à 40, 70 et 100 g/L en fixant une activité enzymatique à 1 nkat (Figure C-24-C).

Par conséquent, on peut conclure que les analyses des propriétés de gonflement ont montré des quantités d'absorption relativement faibles et lentes en raison du caractère non ionique des hydrogels. Tous les résultats sont en accord avec l'étude rhéologique précédente avec des tendances antagonistes entre gonflement et propriétés mécaniques.

### **III.4. Conclusion sur la gélification**

Nous avons montré la capacité de la laccase à catalyser la réaction de dimérisation (réticulation) des acides féruliques greffés préalablement sur le pullulane. Cette enzyme est en effet capable de les oxyder pour les transformer en radicaux appelés quinones. Ces derniers se condensent formant ainsi des dimères d'acide férulique permettant la réticulation des chaînes du pullulane via des liaisons covalentes.

L'étude rhéologique de la réaction de gélification nous a permis d'étudier les aspects cinétiques de la réaction de gélification ainsi que les propriétés mécaniques finales des hydrogels obtenus. L'étude de l'effet de la quantité d'enzyme, du degré de substitution en FA et de la concentration en PUL-FA a montré que l'enzyme influence uniquement la cinétique de la réaction de réticulation tandis que  $DS_{FA}$  et la concentration en polysaccharide ont des impacts à la fois sur la cinétique et les propriétés viscoélastiques des hydrogels de PUL-FA. De plus, en faisant varier ces paramètres, nous pouvons obtenir des hydrogels aux propriétés physico-chimiques variées et adaptées aux applications souhaitées.

Les propriétés de gonflement de ces réseaux 3D confirment bien les résultats rhéologiques. Par contre, l'équilibre de gonflement des différents hydrogels analysés n'a été atteint qu'après 8 jours avec un taux maximal très faible du fait du caractère neutre de l'hydrogel.

## **Conclusion**

Le but des travaux présentés dans ce chapitre était de synthétiser des hydrogels à base d'un polysaccharide neutre (pullulane) selon une voie douce et écologique inspirée d'un modèle naturel observé dans les graines de céréales et les parois cellulaires des plantes.

Pour aboutir à la formation de ces matériaux biomimétiques, la 1<sup>ère</sup> étape a consisté à greffer de l'acide férulique sur le pullulane. Différentes stratégies de greffage dans différents milieux organiques et aqueux ont été testées en partant de la chimie des carbodiimides jusqu'à la chimie des imidazoles en passant par la réaction de Mitsunobu et par la voie enzymatique. Les meilleures efficacités et reproductibilités ont été obtenues avec la chimie des imidazoles en utilisant le CDI comme agent de couplage et le DMSO anhydre comme solvant. Les conditions opératoires ont été adaptées afin d'obtenir trois taux de substitution différents d'acide férulique.

Le succès de la réaction de greffage a été tout d'abord prouvé qualitativement par l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption IR à  $1720\text{ cm}^{-1}$  caractéristique du groupement carbonyle (C=O) du lien ester établi entre les fonctions hydroxyle du pullulane et les fonctions acide carboxylique de l'acide férulique. Pour confirmer ce résultat et déterminer le taux de greffage en FA ( $DS_{FA}$ ), les dérivés PUL-FA ont été analysés par RMN-<sup>1</sup>H en milieu ( $D_2O$ , NaOD) qui a démontré l'apparition des protons aromatiques et éthyléniques caractéristiques du composé phénolique greffé ( $\delta = 6 - 7,2\text{ ppm}$ ) et qui a permis de déterminer des  $DS_{FA}$  de 2, 6 et 10% de FA/AGU correspondant à 23,5, 67,5 et 108,1 mg d'acide férulique / g de PUL-FA. La méthode de Folin-Ciocalteu, une deuxième technique de quantification, a été également utilisée.

Cependant, cette dernière n'était pas fiable dans le cas des systèmes PUL-FA en raison de leur caractère auto-associatif et de leur légère turbidité en solution aqueuse. Il faut noter qu'au-delà de 10%, les systèmes obtenus ne sont plus solubles dans l'eau.

Ce caractère auto-associatif a été ensuite confirmé par les caractérisations physico-chimiques des dérivés greffés obtenus. En régime dilué, la SEC/MALS/DRI/Visco/UV a montré l'existence d'associations hydrophobes intramoléculaires entre les motifs greffés d'acide férulique qui prédominent sur les associations intermoléculaires (peu favorisées). L'ensemble présente ainsi la coexistence de molécules isolées associées en intramoléculaire et de structures agrégées compactes. La distribution homogène des greffons de FA le long du squelette du pullulane a été confirmée grâce au détecteur UV.

En régimes semi-dilué et concentré, ce sont les interactions intermoléculaires qui deviennent préférentielles devant les interactions intramoléculaires (qui n'ont sans doute pas complètement disparues) ce qui a conduit à l'augmentation des viscosités apparentes des solutions de PUL-FA comparées à celle du précurseur avec dans certains cas l'apparition de rhéofluidité et de thixotropie. En régime dynamique, l'étude en oscillation par balayage de fréquence nous a permis de mettre en évidence un caractère viscoélastique des solutions PUL-FA avec une prédominance des propriétés visqueuses dans la gamme de fréquence étudiée. Par conséquent, les interactions intermoléculaires en régimes semi-dilué et concentré sont de faible intensité ou partiellement majoritaires.

La réaction de réticulation pour l'obtention d'hydrogel est basée sur l'utilisation de la laccase de *Trametes vericolor* (enzyme oxydase) qui a pour rôle d'oxyder les motifs greffés d'acide férulique en radicaux (quinones) conduisant par condensation à la dimérisation de l'acide férulique. Ces dimères constituent les points de réticulation covalents entre les chaînes de polysaccharide.

La comparaison des propriétés mécaniques et du comportement rhéologique pendant la réaction de réticulation des dérivés de PUL-FA à 25°C dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5), a été étudiée en fonction de la quantité d'enzyme, du DS en FA et de la concentration en polymère.

Il a été démontré que l'augmentation de la quantité de laccase conduisait à accélérer la formation des hydrogels confirmant le rôle catalytique de l'enzyme sans modifier les propriétés mécaniques finales de l'hydrogel (même nombre de liens formés). Une augmentation des propriétés mécaniques a été logiquement observée en augmentant le DS<sub>FA</sub> et la concentration

du fait de l'augmentation de la densité de réticulation. Cependant, une diminution inattendue de la cinétique a été notée lorsque la concentration des dérivés PUL-FA augmente. Il semble que pour les concentrations les plus élevées, les greffons d'acide férulique sont plus impliqués dans les associations hydrophobes réduisant ainsi leur disponibilité et leur accessibilité ce qui ralentit la vitesse de la réaction de réticulation.

Enfin, les hydrogels présentent des taux de gonflement faibles ( $\leq 13,3 \text{ g}\times\text{g}^{-1}$ ) et en accord avec les résultats de rhéologie. Plus le module élastique est important (densité de réticulation élevée), plus le gonflement observé est faible. Les cinétiques de gonflement sont très lentes sur la fin (8 jours). Ceci peut être expliqué par les interactions hydrophobes intermoléculaires voire intramoléculaires des motifs greffés d'acide férulique et le caractère neutre du squelette pullulane.

Toutes les études réalisées nous ont permis de mieux comprendre et de bien contrôler le phénomène de réticulation biomimétique et les propriétés finales des hydrogels PUL-FA obtenus qui peuvent être adaptés aux applications futures.

Néanmoins, le caractère neutre du pullulane reste un inconvénient puisqu'il a une grande influence sur le taux de gonflement qui reste assez faible. De plus, ce polysaccharide est très flexible ce qui nécessite l'utilisation des concentrations très importantes pour l'étude rhéologique et la formation des hydrogels. Pour ces raisons, nous avons décidé dans la suite de travailler sur deux polysaccharides anioniques : un polysaccharide modèle qui est le carboxyméthylpullulane (CMP) et un second d'intérêt qui est l'acide hyaluronique, dont les applications potentielles sont nombreuses.

## Références bibliographiques

1. Dulong, V., Mocanu, G., Picton, L. & Le Cerf, D. Amphiphilic and thermosensitive copolymers based on pullulan and Jeffamine®: Synthesis, characterization and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1522–1531 (2012).
2. Vulpe, R., Le Cerf, D., Dulong, V., Popa, M., Peptu, C., Verestiuc, L. & Picton, L. Rheological study of in-situ crosslinkable hydrogels based on hyaluronic acid, collagen and sericin. *Mater. Sci. Eng. C* **69**, 388–397 (2016).
3. Souguir, Z., Roudesli, S., About-Jaudet, E., Le Cerf, D. & Picton, L. Synthesis and physicochemical characterization of a novel ampholytic pullulan derivative with amphiphilic behavior in alkaline media. *J. Colloid Interface Sci.* **313**, 108–116 (2007).
4. David, L., Dulong, V., Le Cerf, D., Cazin, L., Lamacz, M. & Vannier, J.-P. Hyaluronan hydrogel: An appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity. *Acta Biomater.* **4**, 256–263 (2008).
5. Colinet, I., Dulong, V., Hamaide, T., Le Cerf, D. & Picton, L. New amphiphilic modified polysaccharides with original solution behaviour in salt media. *Carbohydr. Polym.* **75**, 454–462 (2009).
6. Hu, W., Li, J., Hou, H., Yan, H. & Feng, Y., Mi, X. & Lin, Q. Preparation and Characterization of Hydrophobic Alginate Derivative Nanocapsules Entrapping I-Cyhalothrin. *Asian J. Chem.* **25**, 9904–9908 (2013).
7. Woranuch, S. & Yoksan, R. Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. *Carbohydr. Polym.* **96**, 495–502 (2013).
8. Bulpitt, P. & Aeschlimann, D. 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.* **47**, 152–169 (1999).
9. J., R. & M., K. Recent Advances in the Mitsunobu Reaction: Modifications and Applications to Biologically Active Molecules. *Curr. Org. Chem.* **13**, 1610–1632 (2009).
10. Camp, D., Harvey, P. J. & Jenkins, I. D. The effect of solvent polarity on the rate of the Mitsunobu esterification reaction. *Tetrahedron* **71**, 3932–3938 (2015).
11. Božič, M., Gorgieva, S. & Kokol, V. Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydr. Polym.* **87**, 2388–2398 (2012).
12. Sousa, F., Guebitz, G. M. & Kokol, V. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. *Process Biochem.* **44**, 749–756 (2009).
13. Yang, J., Sun, J., An, X. & Zheng, M., Lu, Z., Lu, F. & Zhang, C. Preparation of ferulic acid-grafted chitosan using recombinant bacterial laccase and its application in mango preservation. *RSC Adv.* **8**, 6759–6767 (2018).

14. Aljawish, A., Chevalot, I., Madad, N., Paris, C. & Muniglia, L. Laccase mediated-synthesis of hydroxycinnamoyl-peptide from ferulic acid and carnosine. *J. Biotechnol.* **227**, 83–93 (2016).
15. Fras-Zemljič, L., Kokol, V. & Čakara, D. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan-based viscose fibres enzymatically functionalized with flavonoids. *Text. Res. J.* **81**, 1532–1540 (2011).
16. Vartiainen, J., Rättö, M., Lantto, R., Nättinen, K. & Hurme, E. Tyrosinase-catalysed grafting of food-grade gallates to chitosan: surface properties of novel functional coatings. *Packag. Technol. Sci.* **21**, 317–328 (2008).
17. Vachoud, L., Chen, T., Payne, G. F. & Vazquez-Duhalt, R. Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan. *Enzyme Microb. Technol.* **29**, 380–385 (2001).
18. Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Rondeau-Mouro, C., Girardin, M., Jasniewski, J., Scher, J. & Muniglia, L. Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydr. Polym.* **87**, 537–544 (2012).
19. Schär, A. & Nyström, L. High yielding and direct enzymatic lipophilization of ferulic acid using lipase from *Rhizomucor miehei*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **118**, 29–35 (2015).
20. Valacchi, G., Grisci, G., Sticozzi, C., Lim, Y., Paolino, M. & Giuliani, G., Mendichi, R., Belmonte, G., Artusi, R., Zanardi, A., Garofalo, P., Giorgi, G., Cappelli, A. & Rovati, L. Wound healing properties of hyaluronan derivatives bearing ferulate residues. *J. Mater. Chem. B* **3**, 7037–7045 (2015).
21. Wen, Y., Ye, F., Zhu, J. & Zhao, G. Corn starch ferulates with antioxidant properties prepared by N,N'-carbonyldiimidazole-mediated grafting procedure. *Food Chem.* **208**, 1–9 (2016).
22. Grote, C. & Heinze, T. Starch Derivatives of High Degree of Functionalization 11: Studies on Alternative Acylation of Starch with Long-chain Fatty Acids Homogeneously in N,N-dimethyl acetamide/LiCl. *Cellulose* **12**, 435–444 (2005).
23. Bamford, C. H., Middleton, I. P. & Al-Lamee, K. G. Studies of the esterification of dextran: routes to bioactive polymers and graft copolymers. *Polymer (Guildf)*. **27**, 1981–1985 (1986).
24. Wang, J., Cao, Y., Sun, B. & Wang, C. Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic acid and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chem.* **124**, 1069–1075 (2011).
25. Cozzolino, C. A., Cerri, G., Brundu, A. & Farris, S. Microfibrillated cellulose (MFC): pullulan bionanocomposite films. *Cellulose* **21**, 4323–4335 (2014).
26. Shingel, K. I. Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and gamma-irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **337**, 1445–1451 (2002).
27. Carvajal-Millan, E., Guilbert, S., Morel, M.-H. & Micard, V. Impact of the structure of arabinoxylan gels on their rheological and protein transport properties. *Carbohydr. Polym.* **60**, 431–438 (2005).
28. Kouassi, M.C., Thébault, P., Rihouey, C., Dé, E., Labat, B., Picton, L. & Dulong, V. Carboxymethylpullulan Grafted with Aminoguaiacol: Synthesis, Characterization, and Assessment of

- Antibacterial and Antioxidant Properties. *Biomacromolecules* **18**, 3238–3251 (2017).
29. Glinel, K., Huguët, J. & Muller, G. Comparison of the associating behaviour between neutral and anionic alkylperfluorinated pullulan derivatives. *Polymer (Guildf)*. **40**, 7071–7081 (1999).
  30. Jeong, Young-Il, Na, H.-S., Oh, J.-S., Choi, K.-C., Song, C.-E. & Lee, H.-C. Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly(dl-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan. *Int. J. Pharm.* **322**, 154–160 (2006).
  31. Akiyoshi, K., Deguchi, S., Moriguchi, N., Yamaguchi, S. & Sunamoto, J. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. Formation and characteristics of nanoparticles. *Macromolecules* **26**, 3062–3068 (1993).
  32. LACK, S. Elaboration et caractérisation d'hydrogels à base de polysaccharides (pullulane): application à l'encapsulation et la libération contrôlée de principes actifs. Thèse de doctorat en Chimie. (Université de Rouen, 2004).
  33. Simon, S., Dugast, J. Y., Le Cerf, D., Picton, L. & Muller, G. Amphiphilic polysaccharides. Evidence for a competition between intra and intermolecular associations in dilute system. *Polymer (Guildf)*. **44**, 7917–7924 (2003).
  34. Carvajal-Millan, E., Guigliarelli, B., Belle, V., Rouau, X. & Micard, V. Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels. *Carbohydr. Polym.* **59**, 181–188 (2005).
  35. Vansteenkiste, E., Babot, C., Rouau, X. & Micard, V. Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocoll.* **18**, 557–564 (2004).
  36. Chambon, F., Petrovic, Z. S., MacKnight, W. J. & Winter, H. H. Rheology of model polyurethanes at the gel point. *Macromolecules* **19**, 2146–2149 (1986).
  37. Rodd, A. ., Cooper-White, J., Dunstan, D. . & Boger, D. . Gel point studies for chemically modified biopolymer networks using small amplitude oscillatory rheometry. *Polymer (Guildf)*. **42**, 185–198 (2001).
  38. Hadnađev-Dapčević, T. R., Hadnađev, M. S. & Torbica, A. M. Utilization of dynamic oscillatory measurements for agar threshold gel concentration and gel strength determination. *Food Process. Qual. Saf.* **36**, 69–73 (2009).

# **Chapitre D- Hydrogels biomimétiques à base de polysaccharides anioniques**

---



## Sommaire

Introduction.....	193
Chapitre D-I. Hydrogels biomimétiques à base du carboxyméthylpullulane .....	193
I. Article .....	193
II. Résultats et discussion .....	204
II.1. Réaction de greffage .....	204
II.2. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco.....	204
II.3. Etude rhéologique de la gélification.....	205
II.4. Propriétés de gonflement.....	206
Conclusion .....	207
Chapitre D-II. Transfert sur un polysaccharide d'intérêt, l'acide hyaluronique .....	208
I. Greffage de l'acide férulique sur l'acide hyaluronique.....	208
I.1. Méthode de synthèse .....	208
I.2. Synthèse de référence .....	209
I.2.1. Protocole de synthèse .....	209
I.2.2 Caractérisation du greffage.....	210
I.2.3 Détermination des masses molaires .....	215
I.3. Amélioration du protocole de synthèse et de purification .....	216
I.3.1. Purification.....	216
I.3.2. Teneur en acide férulique .....	218
I.3.3. Contrôle du pH.....	219
I.3.4. Effet de la longueur du bras espaceur .....	220
I.4. Conclusion sur le greffage de l'acide férulique sur l'acide hyaluronique .....	223
II. Mesures rhéologiques .....	224
II.1. Mesures en écoulement.....	224
II.2. Mesures dynamiques .....	226
III. Gélification.....	228
III.1. Mode d'obtention des hydrogels HA-FA .....	228
III.2. Etude rhéologique.....	228
III.2.1. Influence de la quantité d'enzyme .....	228
III.2.2. Influence du degré de substitution.....	230
III.2.3. Influence de la concentration .....	231
III.2.4. Influence du bras espaceur.....	232
III.2.5. Influence de la masse molaire .....	234

III.3. Propriétés de gonflement .....	235
III.3.1 Influence des paramètres intrinsèques .....	235
III.3.2. Influence des paramètres externes .....	237
III.4. Conclusion sur la gélification.....	239
Conclusion .....	240
Références bibliographiques .....	242

## **Introduction**

**A** fin d'étendre les possibilités d'hydrogels biomimétiques et aussi d'en améliorer les propriétés, nous avons choisi de travailler sur deux polysaccharides anioniques qui présentent les deux grandes parties de ce chapitre.

La première partie est consacrée aux hydrogels biomimétiques à base de CMP (polysaccharide anionique modèle) greffé acide férulique. Ce travail a fait l'objet d'une publication qui sera intégrée au manuscrit et qui présentera la méthode de greffage et de réticulation utilisées ainsi que les caractéristiques des hydrogels obtenus. Un bref résumé et une discussion de ces résultats seront ensuite proposés, notamment une comparaison de ces résultats avec ceux du chapitre précédent concernant les polysaccharides neutres (Chapitre C).

La seconde partie concerne les hydrogels à base d'acide hyaluronique (polysaccharide anionique d'intérêt) avec une répartition sur trois volets. Nous aborderons en premier lieu les réactions de greffage de l'acide férulique sur le HA en comparant nos résultats avec la chimie mise en œuvre pour le greffage du CMP. Dans un second volet, nous nous intéresserons au comportement physico-chimique de ces dérivés en solution aqueuse dans différents régimes de concentration. Finalement, la réaction de gélification et les propriétés des hydrogels élaborés seront décrites et discutées.

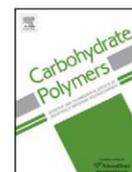
## **Chapitre D-I. Hydrogels biomimétiques à base du carboxyméthylpullulane**

### **I. Article**



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/carbpol](http://www.elsevier.com/locate/carbpol)

## Enzymatic cross-linking of carboxymethylpullulan grafted with ferulic acid



Virginie Dulong<sup>a,b,c,\*</sup>, Ahdi Hadrich<sup>a,b,c</sup>, Luc Picton<sup>a,b,c</sup>, Didier Le Cerf<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Normandie Université, France

<sup>b</sup> Université de Rouen, Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces, F-76821 Mont Saint Aignan, France

<sup>c</sup> CNRS UMR 6270 & FR3038, F-76821 Mont Saint Aignan, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 February 2016

Received in revised form 12 May 2016

Accepted 16 May 2016

Available online 18 May 2016

#### Keywords:

Pullulan

Laccase

Enzymatic cross-linking

Rheology

### ABSTRACT

Carboxymethylpullulan (CMP) has been modified in a two-step grafting reaction of ferulic acid (FA). Acid adipic dihydrazide (ADH) was first reacted with FA activated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC). Then the product of this first reaction was reacted with CMP (activated with EDC). Grafted polysaccharides structure was confirmed by FTIR and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Analyses by size-exclusion chromatography (SEC) coupling on-line with a multi-angle light scattering detector (MALS), a viscometer and a differential refractive index detector (DRI) (SEC/MALS/DRI/Visco) showed that associations between FA moieties occurred due to hydrophobic interactions. The grafting rates of FA were determined by the Folin-Ciocalteu method and were found between 1.0% and 11.2% (mol/mol anhydroglucose unit). The CMP-FA were then enzymatically cross-linked with laccase from *Pleurotus ostreatus*. The crosslinking reactions were followed by rheological measurements, demonstrating the influence of laccase concentration on kinetics. Elastic modulus and swelling rates of hydrogels depends on FA content only for low values.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Polysaccharides are natural polymers with interesting viscosifying and/or gelling properties for wide domains of application, including food or cosmetic industries. To broaden their applications, polysaccharides can be chemically modified to bring them new properties such as amphiphilic properties (Hassani, Hendra, & Bouchemal, 2012), thermosensitive properties (Dulong, Mocanu, Picton, & Le Cerf, 2012; Prabakaran and Mano, 2006) or photosensitive properties (Tsai, Lin, & Lin, 2006; Vázquez et al., 2009). Pullulan, a neutral water-soluble polysaccharide produced by *Aureobasidium pullulans*, has been chemically modified to adjust its biological activity and chemical properties (Shingel, 2004; Singh, Kaur, & Kennedy, 2015). Its linear flexible chains are formed from  $\alpha$ -1,4-linked glucose units, which are included in  $\alpha$ -1,6-linked maltotriose units. Carboxymethylation of pullulan (Duval-Terrié, Huguet, & Muller, 2003) brings carboxylate groups which are further used to graft various molecules or oligomers. In our laboratory, carboxymethylpullulan (CMP) has been widely studied

and used to obtain many grafted pullulan with various physico-chemical properties. For example, amphiphilic pullulan derivatives have been obtained by grafting of alkyl chains (Bataille, Huguet, Muller, Mocanu, & Carpov, 1997; Duval, Le Cerf, Picton, & Muller, 2001), perfluoroalkyl chains (Glinel, Huguet, & Muller, 1999) or polyether chains (Dulong et al., 2012; Mocanu, Mihai, Dulong, Picton, & Lecerf, 2011; Mocanu, Mihai, Dulong, Picton, & Le Cerf, 2012). These amphiphilic carboxymethylpullulans can be used to synthesize hydrogels for drug delivery systems. The cross-linking reaction is generally achieved by a chemical reaction. Classically, glutaraldehyde (Wu and Imai, 2011) or epichlorohydrin (Mocanu, Mihai, Le Cerf, Picton, & Muller, 2004) are used to obtain hydrogels but these cross-linking agents are toxic; hydrogels can also be obtained with a water soluble carbodiimide (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC) (Dulong, Le Cerf, Picton, & Muller, 2006), leading to by-products (urea). Sodium trimetaphosphate is also a good candidate to cross-link polysaccharides but the conditions of the cross-linking reaction are very hard (pH 13) (Lack et al., 2004).

A biomimetic approach is to use enzymes for cross-linking reactions of polysaccharides. Water extractable arabinoxylans (WEAX, residues of the main non-starch polysaccharides of cereal grains) are known to form viscous solutions or soft gels by enzymatic cross-linking reaction with laccase, an enzymatic free radical

\* Corresponding author at: Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces, Université de Rouen, F-76821 Mont Saint Aignan, France.

E-mail address: [virginie.dulong@univ-rouen.fr](mailto:virginie.dulong@univ-rouen.fr) (V. Dulong).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.057>

0144-8617/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

generating agent. WEAX naturally contains ferulic acid (FA) (3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid) substituents (Ishii, 1997; Smith and Hartley, 1983) which undergoes oxidation by reaction with laccase, leading to dimerization of two ferulic acid substituents, permitting the cross-linking of WEAX chains (Adelakun et al., 2012; Carvajalmillan, Guigliarelli, Belle, Rouau, & Micard, 2005; Carvajalmillan, Guilbert, Morel, & Micard, 2005; Carvajal-Millan et al., 2005; Carvajal-Millan, Guilbert, Doublier, & Micard, 2006; Figueroa-Espinoza and Rouau, 1998; Vansteenkiste, Babet, Rouau, & Micard, 2004). Ferulic acid, the most abundant hydroxycinnamic acid in the plant world (Mathew and Abraham, 2004), possesses antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, anti-thrombosis, and anti-cancer activities (Choi and Park, 2015; Lemos et al., 2014; Itagaki et al., 2009; Takahashi, Kashimura, Koiso, Kuda, & Kimura, 2013). Laccase belongs to the blue-copper family of oxidases (Thurston, 1994). Laccase is produced by fungi and is a biocatalyst already industrially used, for example, to decontaminate industrial wastewaters or in the textile, dye or printing industries (Riva, 2006).

Some other polysaccharides have been chemically grafted with FA moieties to obtain polysaccharide derivatives with antioxidant properties. Cellulose (Trombino et al., 2008; Trombino et al., 2009) or dextran (Cassano, Trombino, Muzzalupo, Tavano, & Picci, 2009) have been grafted with FA by acylation in organic solvent using dicyclohexylcarbodiimide as condensation agents. FA was grafted onto hyaluronic acid backbone through an ester bond with bisimidazolidine in formamide (Valacchi et al., 2015), and onto chitosan in acidic water using EDC as coupling agent (Woranuch and Yoksan, 2013). But these authors did not use laccase to cross-link the FA grafted polysaccharides and to our knowledge, laccase has never been used to enzymatically cross-link other polysaccharides than arabinoxylans. Indeed, the hydrogels obtained by enzymatic cross-linking of WEAX are soft with low values of elastic modulus ( $G' < 50$  Pa), mainly due to the very low content of FA substituents in WEAX, to our knowledge, 2.3 mg per g of AX is the maximum value found in literature (Carvajalmillan, Guilbert et al., 2005; Carvajal-Millan et al., 2005).

The aim of this work is to obtain natural hydrogels issued from polysaccharide chemically grafted with ferulic acid, with a controlled grafted degree, by a green cross-linking reaction. For this purpose, we have chosen to graft ferulic acid onto CMP, a model of anionic polysaccharide, to further obtain hydrogels with suitable and controlled mechanical properties, including good elastic properties, by enzymatic cross-linking reaction with laccase. This study is expected to be generalized to other anionic polysaccharides such as hyaluronic acid, alginate, etc.

These CMP hydrogels could find applications in food or cosmetic applications as texturizing or stabilizing agents.

In this work, we covalently graft FA onto CMP with different molar ratios, using a water soluble carbodiimide, via a two steps reaction. The CMP-FA derivatives have been characterized by different techniques (FTIR, NMR, size-exclusion chromatography (SEC) coupling on-line with a multi-angle light scattering system (MALS), a viscometer and a differential refractive index detector (DRI)) and cross-linked with laccase from *Pleurotus ostreatus* to obtain hydrogels. The cross-linking reaction has been followed by rheology to evaluate the gel point and to determine the viscoelastic properties of the hydrogels. The swelling properties of the hydrogels have been studied in citrate/phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5.5).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Pullulan was purchased from Hayashibara Biochemical Laboratory (Japan). Ferulic acid (FA), acid adipic dihydrazide (ADH),

1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDC), laccase (EC 1.10.3.2) from *Pleurotus ostreatus* were purchased from Sigma-Aldrich (France); sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl), citric acid, ethanol (96%), acetone, sodium hydrogenophosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Folin-Ciocalteu reactive and anhydrous sodium carbonate were purchased from VWR (France) and sodium chloroacetate from Acros Organics (France). Water was purified with the milli-Q water reagent system (Millipore, USA). All compounds were used without further purification.

Citrate/phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5.5) was prepared by adding 44.6 mL of 0.5 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 17.7 mL of 0.5 mol L<sup>-1</sup> citric acid into a 200 mL gauged flask, adjusted with milli-Q water (ionic strength 0.1 mol L<sup>-1</sup>).

### 2.2. Synthesis of carboxymethylpullulan (CMP)

CMP was synthesized beforehand by the reaction of pullulan with sodium chloroacetate in the presence of NaOH by a method previously described (Duval-Terrié et al., 2003). CMP was synthesized with a substitution degree in carboxylate groups of 0.80 (DS<sub>COONa</sub> = 0.80, the number of carboxylate groups by anhydroglucose unit (AGU) was determined by conductimetric titration).

### 2.3. Synthesis of CMP-FA

For example, ferulic acid (5.1 mmol) was dissolved in ethanol (50 mL) and ADH (5.1 mmol) was dissolved in a mixture of ethanol and acidified (50 μL of HCl 1 mol L<sup>-1</sup>) milli-Q water (80/20 V/V). The coupling reaction of ADH on FA was activated by EDC (0.52 mM in ethanol) and the reaction was let under stirring at ambient temperature during 24 h. At the end of the reaction and after evaporation of the solvent, a volume of milli-Q water was added to the solid derivative FA-ADH to remove unreacted ADH and EDC urea. After filtration and washing with milli-Q water, the FA-ADH derivative was dried and then dissolved in 40 mL of a mixture of ethanol and milli-Q water (50/50 V/V) and slowly added to a solution of CMP (1 g) in milli-Q water (100 mL) adjusted to pH 4.75 (with HCl 1 mol L<sup>-1</sup>) beforehand. The coupling reaction of FA-ADH with carboxylate groups of CMP was activated by EDC (at a molar ratio of EDC over AGU of CMP equal to 1) and the reaction was conducted at ambient temperature during 24 h. During the reaction, the volume ratio ethanol/milli-Q water was 20/80.

At the end of the reaction, the pH was checked and adjusted to 7 if necessary. Then, the CMP-FA derivative was precipitated in acetone, washed three times with acetone, dissolved in milli-Q water and dialysed against NaOH (0.1 mol L<sup>-1</sup>) during 2 h to eliminate unreacted FA and by products (EDC urea), then against milli-Q water until low conductivity of dialysis water (equivalent to milli-Q water one). The CMP-FA derivatives were then lyophilised.

### 2.4. FTIR spectroscopy

The infrared spectroscopy was performed on a spectrometer Nicolet IS50 FT-IR (Thermo Scientific, USA). The samples were analysed by transmission from 500 to 4000 cm<sup>-1</sup> (128 scan resolution 4) using the OMNIC software.

### 2.5. NMR spectroscopy

<sup>1</sup>H NMR spectra of the CMP-FA derivatives were performed with a Bruker Advance AC-P 300 MHz spectrometer (USA). Chemical shifts are reported in ppm relative to the deuterated solvent resonances. Dimethyl sulfoxide-d<sub>6</sub> (DMSO-d<sub>6</sub>, 99.9 atom % D) and deuterium oxide (D<sub>2</sub>O, 99.9 atom % D) were used as NMR solvents and purchased from Sigma-Aldrich (France). The spectra were

analysed with Topsis software. The degree of substitution of FA ( $DS_{FA(NMR)}$ ) was calculated via Eq. (1) by integration of methylene peaks of ADH (8 protons) and integration of anomeric protons of CMP. It corresponds to the mole number of FA by mole number of AGU of CMP-FA.

$$DS_{FA(NMR)} = \frac{I_{CH2}/8}{I_{Hanom.}} \quad (1)$$

#### 2.6. Determination of substitution degree of FA by the Folin-Ciocalteu method

The DS of FA grafted onto CMP was also determined by the Folin-Ciocalteu method as described elsewhere (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999; Trombino et al., 2009; Wildenradt and Singleton, 1974). For these assays 1 mL of a commercial Folin-Ciocalteu reagent was mixed with 0.2 mL of CMP-FA samples (at 1 g L<sup>-1</sup>) and 18.8 mL of anhydrous sodium carbonate (4.25% m/V) then heated to 70 °C during 20 min. The absorbance at 750 nm of the cooled solutions was measured with a Cary 100 Bio (Varian) spectrometer. The calibration curve was obtained with ferulic acid solutions ranging from 2.6 10<sup>-6</sup> to 2.1 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> ( $A = 81.38C_{FA} + 0.01$  with  $r^2 = 0.998$ ).  $DS_{FA(FOLIN)}$  was calculated according to Eq. (2).

$$DS_{FA(FOLIN)} = \frac{n_{FA}}{n_{CMP-FA}} = \frac{C_{FA}}{C_{CMP-FA}}$$

And  $C_{CMP-FA} = \frac{C_s}{M_{CMP-FA}}$  with  $M_{CMP-FA} = 162 + 80DS_{COONa} + 310DS_{FA(FOLIN)}$  (2)

$$So DS_{FA(FOLIN)} = \frac{C_{FA}(162 + 80DS_{COONa})}{C_s - 310C_{FA}}$$

With  $C_{FA}$ , the FA concentration of samples determined with the calibration curve (in mol L<sup>-1</sup>) and  $C_s$ , the concentration in g L<sup>-1</sup> of analysed samples.

FA content can be calculated in mg per g of CMP-FA derivative according to Eq. (3), with  $M_{FA}$ , the molar mass of FA and  $M_{CMP-FA}$ , the molar mass of repeated unit of CMP-FA derivative.

$$FA_{content} = \frac{M_{FA} DS_{FA}}{M_{CMP-FA}} \times 10^3 \quad (3)$$

$$\text{With } M_{CMP-FA} = 162 + 80DS_{COONa} + 310DS_{FA}$$

#### 2.7. SEC/MALS/DRI/Viscometer

The absolute average molecular weights and molecular weight distribution and the intrinsic viscosities were determined at 25 °C by size-exclusion chromatography (SEC) coupling on-line with a multi-angle light scattering detector (MALS), a viscometer and a differential refractive index detector (DRI) with an uncertainty of 3%. The eluent LiNO<sub>3</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup>, used as carrier, was filtered through a 0.1 μm filter unit (Millipore, USA), on-line degassed (DGU-20A3 Shimadzu, Japan), and eluted at a 0.5 mL min<sup>-1</sup> flow rate (LC10Ai Shimadzu, Japan). The solutions for analysis were prepared from lyophilised products at 1 g L<sup>-1</sup> in LiNO<sub>3</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup>. 100 μL of the sample solution were injected with an automatic injector (SIL-20A, Shimadzu, Japan). The SEC line consisted of an OHPAK SB-G guard column for protection and two OHPAK SB 804 and 806 HQ columns (Shodex Showa Denko K.K., Japan) in series. The column packing was a polyhydroxymethylmetacrylate gel. The MALS detector is a DAWN Heleos-II (Wyatt technology Inc, USA) fitted with a K5 cell of 50 μL and 18 photodiodes (normalized relative to the 90° detector using bovine serum albumin). The viscometer was a ViscoStar II (Wyatt Technology, Inc, USA). The collected data were analysed using the Astra 6.1.1.17 software package. The concentration of each eluted fraction was determined with DRI (RID-10A Shimadzu, Japan) according to the known values of dn/dc (0.140 mL g<sup>-1</sup> for

CMP and derivatives) (Simon, Dugast, Le Cerf, Picton, & Muller, 2003). All the samples were analysed between 13 and 17 mL of elution volume.

#### 2.8. Laccase activity

Laccase activity was measured at 25 °C by the oxidation reaction of syringaldazine (SGZ) in a citrate/phosphate buffer solution (0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 5.5) by monitoring the absorbance at 530 nm during 2 min with a Cary 100 Bio (Varian, USA) spectrometer (Mustafa, Muniglia, Rovel, & Girardin, 2005; Stoilova, Krastanov, & Stanchev, 2010; Xu et al., 1996). The activity was determined as the tangent at the origin of the curve of concentration vs time. An extinction coefficient of 65,000 mol L<sup>-1</sup> was used to determine the oxidized SGZ concentrations (Bauer and Rupe, 1971). One unit of enzyme (U) was defined as the amount of laccase required to oxidize 1 μmol of SGZ per minute. An activity of 6 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, i.e 6 U mg<sup>-1</sup> or 100 nkat mg<sup>-1</sup>, was found for laccase from *Pleurotus ostreatus*.

#### 2.9. Cross-linking with laccase for rheological measurements

Laccase and CMP-FA derivative were dissolved in citrate/phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5.5) at a controlled activity and maintained at 25 °C in a thermostatic bath. Then a known volume of laccase solution adjusted to a desired activity (2, 1 or 0.2 nkat) was added to the CMP-FA solution and the mixture was quickly introduced in the geometry of the rheometer to follow the cross-linking reaction by rheology (t=0 corresponds to the addition of laccase). The first point recorded by the rheometer was delayed (about 2–3 min depending on samples) and the delayed time was taken into account for plotting graphs of G' and G'' versus time.

#### 2.10. Rheological measurements

Rheological measurements were performed in citrate/phosphate buffer solution (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5.5) at a concentration of 20 g L<sup>-1</sup> in CMP-FA derivative in the semi-dilute domain (for CMP, the critical concentration C\* was found at 16 g L<sup>-1</sup> (Simon et al., 2003)). AR2000 Rheometer from TA Instrument (U.K.), using a standard-size double concentric cylinder geometry (aluminium – gap 500 μm) was used to follow the cross-linking reactions by a time sweep oscillation procedure performed at 1 Hz and at 2% of strain (linearity range of polymer solutions). The analyses were performed with Rheology Advantage Instrument Control AR V3.0.0 software. We have chosen to determine the gel point as the time of crossing point where G'' = G' or which is equivalent with tan(delta) equal to one (tan(delta) = G''/G') (Lack et al., 2004; Matricardi, Dentini, & Crescenzi, 1993). The elastic modulus at the plateau (G' plateau) was the constant value of G' at the end of the reaction. Measurements have been conducted with a double cylinder geometry suitable for viscous solutions in order to follow the gelation point even if this geometry does not appear totally suitable for the characterization of strong gel leading to a weaker accuracy of the G' plateau measurement.

#### 2.11. Swelling degree measurements

Hydrogels were prepared as follow: 40 mg of CMP-FA samples were dissolved in 2 mL of citrate/phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 5.5) then laccase was added (at an activity of 2 nkat). The cross-linking reaction was let at 25 °C during 24 h, then washed with milli-Q water until conductivity of water was low. After washing, hydrogels were frozen, freeze-dried during 3 days and weighted to assess the mass loss after purification.

For swelling degree experiments, a known amount of dried hydrogel was immersed in citrate/phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup> pH

5.5). The swollen gel was then weight and the swelling degree (SD) was calculated according to Eq. (4) where  $m$  is the weight of the swollen hydrogels and  $m_0$ , the weight of the dried hydrogels.

$$SD = \frac{m - m_0}{m_0} \quad (4)$$

SD is the mean result of 3 different swelling experiments.

### 3. Result and discussion

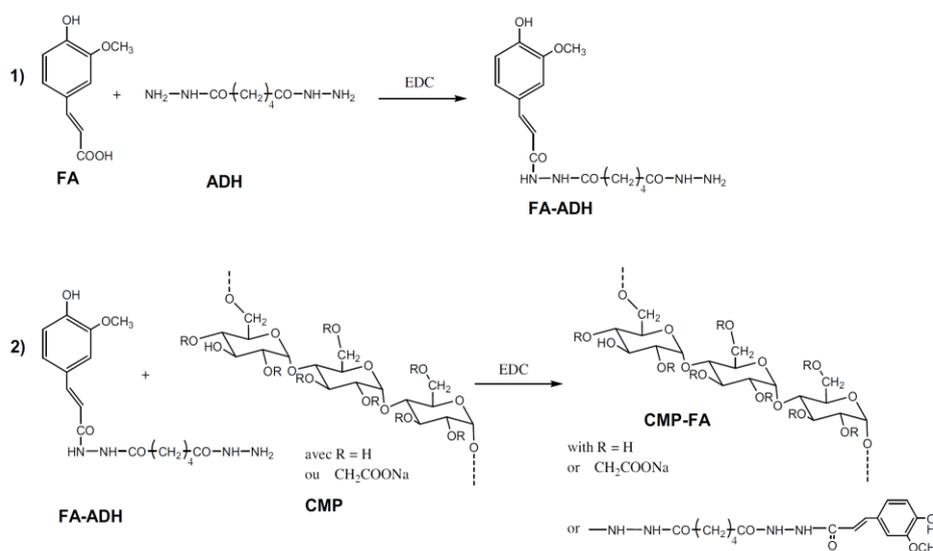
#### 3.1. Synthesis of CMP-FA derivatives

Ferulic acid (FA) was grafted onto CMP through a carbodiimide mediated coupling reaction in an ethanol/water medium (20/80 V/V) with 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) (Nakajima and Ikada, 1995) using different molar ratios of FA over CMP in a two steps reaction (Scheme 1). By this method, FA was linked to CMP via amide bonds with a spacer between the polysaccharide and FA to improve its accessibility for further cross-linking.

The first step consists in reacting FA with acid adipic dihydrazide (ADH) using ethanol/water as co-solvents and EDC as activator to form the FA-ADH derivative bearing a spacer (tetramethylene chain) and one hydrazide function which can further easily reacts with carboxylate groups of CMP with always EDC as coupling agent. Gomez, Chambat, Heyraud, Villar, and Auzély-Velty (2006) and Tan et al. (2012) also used ADH to obtain aminated alginate for further reaction with  $\beta$ -cyclodextrin and poly(*N*-isopropylacrylamide) respectively. For this first step, the molar ratios of FA over ADH and EDC over FA were equal to 1. The use of co-solvents was inevitable because of the difference of solubility of FA (soluble in ethanol, insoluble in water) and ADH (soluble in water, insoluble in ethanol). Acidified water was used for all the experiments except for the experiment number 3 in Table 1 (CMP<sub>0.80</sub>-FA3.2). The presence of ethanol as co-solvent in an EDC-mediated coupling reaction can affect the efficiency of the reaction if the ethanol/water ratio is high. Indeed, the carboxylate form becomes protonated with increasing the percentage of ethanol and an increase of  $pK_a$  is observed while EDC reacts with carboxylate anions (Doğan and Kiliç, 2007; Nam, Kimura, & Kishida,

2008; Sarmini and Kenndler, 1998). In contrast, ethanol can prevent the hydrolysis of EDC. In our case, the ethanol content was high and equal to 80% for the first step of the reaction suggesting that the efficiency of this first step was low. FA-ADH derivative was purified by addition of a large volume of water to remove unreacted ADH and EDC urea by-product. After this purification, many species can coexist: the desired FA-ADH derivative, unreacted FA, and a third specie FA-ADH-FA. Indeed, the possible reaction of FA with the two hydrazide functions of ADH cannot be avoided leading to FA-ADH-FA derivative which cannot further react with the carboxylate functions of CMP. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of FA-ADH derivative at the end of the purification (Fig. S1 in supplementary data in the online version at DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.05.057) exhibits the expected chemical shifts of FA and ADH. The peaks of FA aromatic protons were duplicated, indicating the presence of almost two species of FA. The presence of two peaks at 1.75 ppm and 2.36 ppm corresponding to the methylene protons of ADH and of a third peak at 2.67 ppm indicates the presence of almost two species of ADH (FA-ADH and FA-ADH-FA) but these two species cannot be quantified. Thus, FA, FA-ADH and FA-ADH-FA derivatives are present at the end of the purification. Integration of the peaks showed that FA represents 70% of the mixture, so only 30% of FA-ADH and FA-ADH-FA derivatives was obtained. The different species were not separated and the mixture was used for the second step of the grafting reaction onto CMP, knowing that only the FA-ADH derivative can react with carboxylate groups of CMP.

For this second step, FA-ADH derivative (or more exactly a mixture of FA, FA-ADH-FA and FA-ADH) was dissolved in ethanol/water (50/50) and then added to an aqueous solution of CMP (pH beforehand adjusted to 4.75) to react with carboxylate groups of CMP with EDC as coupling agent. The molar ratio of FA over CMP (i.e. the mole number of FA introduced in the first step of the reaction over the mole number of AGU introduced in the second step) was varied from 0.07 to 2.3 and the molar ratio of EDC over carboxylate groups was equal to one. During this second step, the ethanol/water volume ratio was largely lower than in the first step and equal to 20/80 (V/V). In these conditions, ethanol has less influence on the protonation of carboxylate anions moreover it can prevent the hydrolysis of EDC (Nam et al., 2008).



**Scheme 1.** (1) Chemical reaction of ferulic acid with ADH at room temperature activated by EDC in ethanol/acidified milli-Q water (80/20 V/V). (2) Grafting reaction of FA-ADH derivative onto CMP at room temperature activated by EDC in ethanol/milli-Q water (20/80 V/V).

### 3.2. Characterization of CMP-FA

FTIR spectroscopy (Fig. S2 in supplementary data in the online version at DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.05.057) and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy (Fig. 1) were performed after recovering of CMP-FA derivatives by dialysis and lyophilisation to prove the grafting of FA-ADH onto CMP.

#### 3.2.1. FTIR spectroscopy

The FTIR spectrum of FA exhibits characteristic peaks at  $3430\text{ cm}^{-1}$  (O–H stretching),  $1510\text{ cm}^{-1}$  (C=C stretching) and  $1265\text{ cm}^{-1}$  (C–O stretching of Ar–OH band). The FTIR spectrum of CMP possesses characteristic peaks at  $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  (O–H stretching),  $1585\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching of carboxylate groups), and  $1002\text{ cm}^{-1}$  (C–O–C stretching of ether function). In the CMP<sub>0.80</sub>-FA11.2 derivative spectrum, new peaks appear at  $1276\text{ cm}^{-1}$  and  $1515\text{ cm}^{-1}$  corresponding to C–O stretching of Ar–OH band and to C=C stretching of aromatic ring respectively. These new peaks have very low intensity because the DS of FA in the CMP-FA derivative is also very low. Shoulders at  $1695\text{ cm}^{-1}$  and  $1650\text{ cm}^{-1}$  are also visible corresponding to amide bonds (respectively C=O stretching and N–H bending) demonstrating the grafting of FA-ADH onto CMP.

#### 3.2.2. $^1\text{H}$ NMR spectroscopy

$^1\text{H}$  NMR spectroscopy of CMP-FA derivatives also shows the efficiency of the grafting reaction. Fig. 1 exhibits the spectra of CMP, FA and CMP-FA11.2 derivative. The spectrum of CMP (Fig. 1A) exhibits characteristic signals in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $\delta_c = 3.43\text{--}4.45\text{ ppm}$  (CH and  $\text{CH}_2$ , except anomeric protons) and  $\delta_d = 4.92\text{--}5.68\text{ ppm}$  (CH anomeric protons). Ferulic acid (Fig. 1B) shows characteristic signals in  $\text{DMSO-}d_6$  at  $\delta_k = 3.81\text{ ppm}$  (3H:  $\text{CH}_3\text{O}$ –),  $\delta_j = 6.4\text{ ppm}$  (1H:  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ ),  $\delta_e = 6.80\text{ ppm}$  (1H Ar),  $\delta_f = 7.10\text{ ppm}$  (1H Ar),  $\delta_g = 7.27\text{ ppm}$  (1H Ar),  $\delta_h = 7.5\text{ ppm}$  ( $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ ),  $\delta = 9.56\text{ ppm}$  (1H: Ar–OH) and  $\delta = 12.12\text{ ppm}$  (1H:  $\text{COOH}$ ). In the CMP-FA11.2 derivative spectrum (Fig. 1C) the two peaks at 1.66 ppm and 2.36 ppm correspond to the methylene chain of ADH:  $\delta_a = 1.66\text{ ppm}$  ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ) and  $\delta_b = 2.36\text{ ppm}$  ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ). The peaks between 3.42 and 4.15 ppm (noted c in Fig. 1C) correspond to the protons of CMP excepted anomeric protons which give signals between 4.92 and 5.68 ppm (noted d in Fig. 1C). The protons corresponding to FA in CMP-FA derivative are also present in Fig. 1C but with lower intensities. The peaks corresponding to the aromatic ring of FA exhibit signals at 6.86, 7.00 and 7.25 ppm (noted e, f and g respectively) and those corresponding to the alkene function at 6.5 and 7.5 ppm (noted i and h respectively). The resolution and the intensity of these signals are very low due to the poor signal-to-noise ratios of  $^1\text{H}$  signals of FA groups in the solvent used for NMR analysis of CMP-FA derivative ( $\text{D}_2\text{O}$ , while FA is not soluble in water). Nevertheless, the substitution degrees of FA ( $\text{DS}_{\text{FA(NMR)}}$ ) given in Table 1) was determined by integration of the methylene signals of ADH (8 protons) and integration of anomeric protons of CMP according to Eq. (1). The values obtained were lower than the theoretical ones. These results were expected-being of the low efficiency of the first reaction (less than 30% with a possible mixture of FA-ADH and unreactive FA-ADH-FA).

#### 3.2.3. Determination of FA substitution degree by the Folin-Ciocalteu method

The degree of substitution of FA onto CMP was also determined by the Folin-Ciocalteu method, a colorimetric method used to determine the quantity of phenolic compounds in wines (Singleton et al., 1999; Wildenradt and Singleton, 1974). This method has also been used by Trombino et al. (2008) on cellulose grafted with ferulic acid moieties or by Aljawish et al. (2014) on FA-chitosan. Trombino et al. (2009) used *trans*-ferulic acid to get the calibration curve and

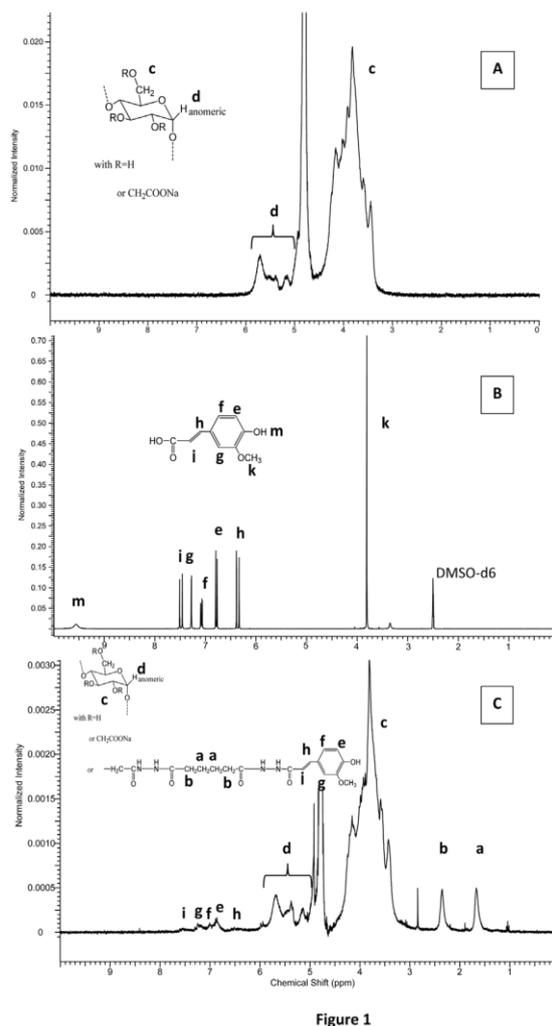


Figure 1

Fig. 1.  $^1\text{H}$  NMR spectra of CMP (A); Ferulic acid (B); CMP-FA derivative (C) in  $\text{DMSO-}d_6$  for ferulic acid and  $\text{D}_2\text{O}$  for CMP and CMP-FA11.2 derivative.

they obtained  $2.36 \cdot 10^{-5}$  mol of ferulic moieties (or 4.6 mg) per gram of dried hydrogel but they did not discuss this data compared to the theoretical one. By this method, we obtained experimental  $\text{DS}_{\text{FA(FOLIN)}}$  between 0.010 and 0.112 (with an uncertainty of 0.003), depending on the initial molar ratio of FA over CMP. A comparison of the two methods of DS determination shows that for higher values, the two methods give approaching values but for lower values, the Folin-Ciocalteu method seems to give reliable results because of the good reproducibility of the three assays, while NMR exhibits peaks with low intensity when DS is low (increasing the uncertainty of the results). The difference between exp. 3 and exp. 4 in Table 1 was the presence of acidified water during the first step of the reaction to obtain FA-ADH derivative. The results show that a higher DS is obtained when the first step of the reaction is carried out in the presence of acidified water.

As shown in Table 1, the experimental  $\text{DS}_{\text{FA}}$  were always lower than the theoretical ones. This can be explained by the low efficiency (lower than 30%) of the first step of the reaction which lead to a mixture of unreacted FA, FA-ADH and FA-ADH-FA derivatives as seen before. These  $\text{DS}_{\text{FA}}$  correspond to FA contents from

**Table 1**  
 Substitution degrees of FA-ADH groups onto CMP.

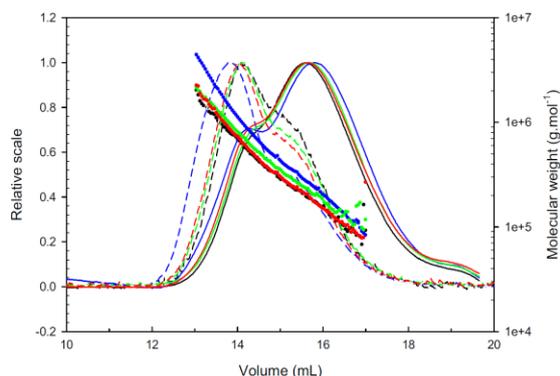
Exp.	Sample	DS <sub>COONa</sub>	π <sub>FA</sub> /π <sub>CMP</sub> <sup>a</sup>	DS <sub>FAttheo</sub>	DS <sub>FA(FOLIN)</sub> <sup>b</sup>	DS <sub>FA(NMR)</sub> <sup>c</sup>	FA content <sup>d</sup> mg/g of CMP-FA
1	CMP-FA1.0	0.80	0.07	0.07	0.010	0.005	8.5
2	CMP-FA1.2	0.80	0.14	0.14	0.012	0.006	10
3 <sup>e</sup>	CMP-FA3.2	0.80	1.2	0.80	0.032	0.02	26
4	CMP-FA8.5	0.80	1.2	0.80	0.085	0.07	65
5	CMP-FA11.2	0.80	2.3	0.80	0.112	0.12	83

<sup>a</sup> Molar ratio of FA (introduced in the first step of the reaction) over CMP AGU.

<sup>b</sup> Determined according to Eq. (2) by the Folin-Ciocalteu method; DS is the average result of 3 measurements (standard deviation 2%).

<sup>c</sup> Determined according to Eq. (1) by integration of methylene peaks of ADH (standard deviation 10%).

<sup>d</sup> FA content determined according to Eq. (3) from DS<sub>FA</sub>.

<sup>e</sup> Milli-Q water was not acidified during the first step of the reaction.

**Fig. 2.** Molecular weight distribution of CMP-FA derivatives (LiNO<sub>3</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup>); Light scattering signal (LS): dash line curves; Differential refractive index: full line curves; Molecular weights: circles for CMP DS 0.80 (black); CMP-FA3.2 (red); CMP-FA8.5 (green); CMP-FA11.2 (blue). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

8.53 to 83 mg g<sup>-1</sup> of CMP-FA derivative. If we compare our values with those of natural polysaccharide containing FA moieties, i.e. arabinoxylan, which FA content is ranging from 1.4 to 2.3 mg g<sup>-1</sup> of arabinoxylan (Carvajalmillan, Guigliarelli et al., 2005; Carvajal-Millan et al., 2005), the CMP-FA derivatives contain higher amounts of FA moieties. So, the low efficiency and low DS<sub>FA</sub> obtained should not be an inconvenient for the desired study consisting in crosslinking the CMP-FA derivatives with an enzyme possessing a high activity.

### 3.2.4. Molecular weights by SEC/MALS/DRI/Visco

The impact of the grafted groups on the molecular weights and on the possible aggregation of the macromolecular chains due to the hydrophobic character of the aromatic group of FA was studied by size exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering, differential refractive index and viscometer detectors. The grafted polysaccharides have been characterized at 25 °C in LiNO<sub>3</sub> (0.1 mol L<sup>-1</sup>) at 1.0 g L<sup>-1</sup> by SEC/MALS/DRI/Visco. Table 2 shows the results obtained for all samples and Fig. 2 shows the

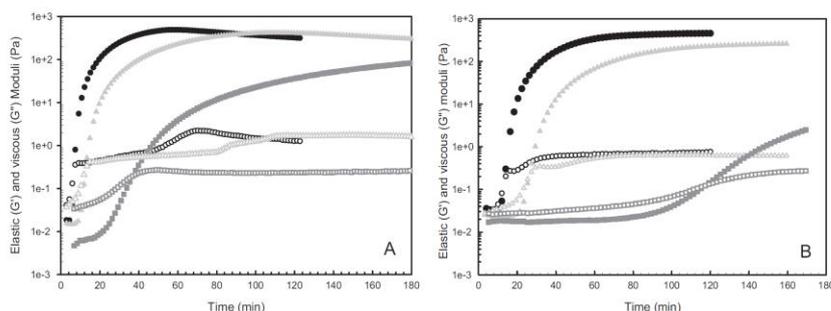
curves of molecular weight distributions with both Light Scattering (LS at 90°) and DRI profiles for CMP precursor with DS<sub>COONa</sub> of 0.80 and three CMP-FA derivatives (CMP-FA3.2, CMP-FA8.5 and CMP-FA11.2).

The mass recoveries of analysed samples, regarding to integration peak and injected quantity thanks to the known value of dn/dc = 0.140 mL g<sup>-1</sup> (Simon et al., 2003) appear good, indicating that the sample is almost totally eluted through the columns and consequently the results can be considered as representative of all the samples. When the DS<sub>FA</sub> increases, an increase in molecular weights is observed compared to those of the CMP precursors, respectively. This is partly due to the increase of the repetition unit molar mass (M<sub>0</sub>) with increasing the grafting rate but the calculated apparent DP<sub>n</sub> (i.e. M<sub>n</sub>/M<sub>0</sub>) increases when DS<sub>FA</sub> increases. This firstly proves that no degradation occurs during the grafting reaction and secondly that some polysaccharide chains are partly aggregated by hydrophobic intermolecular associations due to the ferulic acid moieties. The most grafted sample (CMP-FA11.2) exhibits the higher weight average molecular weight (M<sub>w</sub>), indicating the presence of aggregates in greater numbers than in the other samples. A decrease of intrinsic viscosity [η]<sub>w</sub> with increasing the degree of substitution of FA, indicates a possible densification of the polymer coils due to intramolecular associations (Dulong et al., 2012; Simon et al., 2003) between FA moieties. This is confirmed by the chromatograms (Fig. 2), which show that for a same elution volume (and thus, for a same hydrodynamic volume) the molecular weights of CMP-FA derivatives are slightly higher than the CMP precursor, this effect is more pronounced for the most grafted sample (CMP-FA11.2). Thus, CMP-FA derivatives evidence a slight amphiphilic character at 25 °C for polymer concentration of 1 g L<sup>-1</sup> in salt media (i.e. LiNO<sub>3</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup>). This amphiphilic behaviour is well known for grafted polysaccharides as carboxymethylpullulan grafted with alkyl chains (Bataille et al., 1997; Duval et al., 2001; Duval-Terrié et al., 2003) or with polyether chains (Dulong et al., 2012), or as cholesteryl-modified polysaccharides (Akiyama et al., 2007). So, associations between ferulic acid moieties occurred leading to hydrophobic clusters, with a more pronounced effect for the most grafted samples. Intramolecular associations are thus evidenced for all of the studied CMP-FA and some intermolecular associations can also occur mainly when DS<sub>FA</sub> is increased.

**Table 2**  
 Results of SEC/MALS/DRI/Visco analyses of CMP-FA derivatives and precursors (at 25 °C, in LiNO<sub>3</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup> and at 1.0 g L<sup>-1</sup> for polymer concentration).

Samples	M <sub>n</sub> (g mol <sup>-1</sup> )	M <sub>w</sub> (g mol <sup>-1</sup> )	D (M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> )	Mass recovery (%)	M <sub>0</sub> <sup>a</sup> (g mol <sup>-1</sup> )	DP <sub>n</sub> apparent	[η] <sub>w</sub> (mL g <sup>-1</sup> )
CMP DS 0.80	201,800	327,800	1.6	81	226	893	235
CMP-FA1.0	210,100	335,800	1.6	80	229	917	226
CMP-FA1.2	195,000	343,200	1.8	82	230	848	228
CMP-FA3.2	210,000	368,200	1.7	90	236	890	211
CMP-FA8.5	244,300	398,600	1.6	96	252	969	177
CMP-FA11.2	269,700	597,100	2.2	81	261	1033	179

<sup>a</sup> M<sub>0</sub> is the molar mass of repeating unit calculated as 162 + 80DS<sub>COONa</sub> + 310DS<sub>FA</sub>.



**Fig. 3.** Elastic modulus ( $G'$ : full symbol) and storage modulus ( $G''$ : empty symbol) versus time during the cross-linking reaction of (A) CMP-FA3.2 at  $20\text{ g L}^{-1}$  (B) CMP-FA11.2 by laccase at 2 nkat (black circles), 1 nkat (light grey triangles) and 0.2 nkat (dark grey squares) in citrate/phosphate buffer ( $0.1\text{ M pH } 5.5$ ) at  $25^\circ\text{C}$ .

### 3.3. Enzymatic cross-linking of CMP-FA derivatives

The cross-linking reaction takes place with the dimerization of ferulic acid moieties by laccase (Adelakun et al., 2012; Carvajalmillan, Guilbert et al., 2005; Carvajal-Millan et al., 2006, 2005; Figueroa-Espinoza and Rouau, 1998; Vansteenkiste et al., 2004), an enzymatic free radical generating agent. The action of laccase on FA beared on water extractable arabinoxylan (WEAX) results in the formation of five diferulic acids (di-FA) (5-5', 8-5' benzo, 8-O-4', 8-5' and 8-8' di-FA) with a preponderance of 8-5' and 8-O-4' forms (Scheme 2) (Carvajal-Millan et al., 2005). The steric hindrance by arabinoxylans chains probably limits the coupling products to the dimer form. Being given that ferulic acid is grafted as the same manner on WEAX than on CMP, i.e. onto carboxylate functions of FA, we can suppose that the preponderant form of di-FA in the cross-linked CMP-FA derivatives are also the 8-5' and 8-O-4' forms shown in Scheme 2.

The formation of trimers has also been reported (Carvajal-Millan et al., 2005) in very smaller proportion with no impact on the gels properties (i.e. elastic modulus  $G'$ ).

#### 3.3.1. Enzymatic kinetics and mechanical properties of CMP-FA hydrogels

Rheology is an adapted method to determine the gel point of a cross-linking reaction and the viscoelastic properties of a hydrogel. The gel point corresponds to a transition between a viscous liquid (with a viscous modulus  $G''$  higher than an elastic modulus  $G'$ ) and an elastic solid (with  $G' \gg G''$ ). The gel time transition is often characterized by the viscous and elastic moduli crossing point (i.e.  $G' = G''$ ) (Tung and Dynes, 1982).

The cross-linking reaction of CMP-FA derivatives by laccase has been followed by rheological measurements (Lack et al., 2004) in semi-dilute regime using standard-size double concentric cylinder geometry regarding to the low viscosity of polymer solutions at initial time ( $<10^{-2}\text{ Pa s}$ ). Time sweep ramps in oscillation procedures have been carried out during the cross-linking reaction to study the viscoelastic properties of the grafted polymers. To ensure the linearity of viscoelastic properties during the reaction (from a liquid to a gel), we have chosen to work at a constant low strain (i.e. 2%).

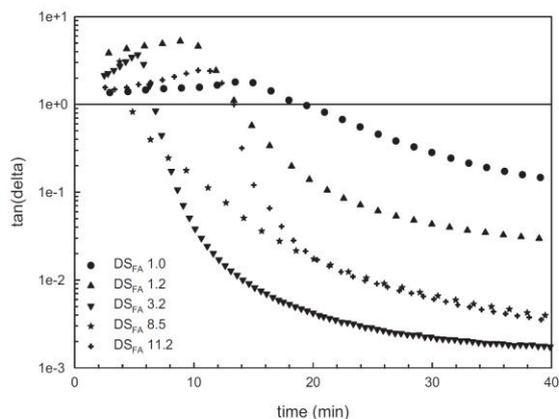
The effect of laccase concentration (2, 1 and 0.1 nkat) during the cross-linking reaction was studied on CMP-FA3.2 and CMP-FA11.2 in citrate/phosphate buffer ( $0.1\text{ mol L}^{-1}\text{ pH } 5.5$ ) at  $20\text{ g L}^{-1}$  in polymer and  $25^\circ\text{C}$  (Fig. 3). The times of crossing points at  $G' = G''$  are given in Table 3. Initially viscous, the studied systems show a strong increase of elastic modulus ( $G'$ ) which becomes drastically higher than the viscous modulus ( $G''$ ) and reaches or tends to reach a plateau according to the amount of laccase. For the two studied systems presented in Fig. 3, it appears that increasing the laccase

**Table 3**

Rheological data for cross-linking reactions of CMP-FA derivatives at  $20\text{ g L}^{-1}$  with laccase at 2, 1 or 0.2 nkat in citrate/phosphate buffer ( $0.1\text{ mol L}^{-1}\text{ pH } 5.5$ ) at  $25^\circ\text{C}$ .

Entry	Samples	Laccase (nkat)	$t_{\text{at } G' = G''}$ (min)	$G'_{\text{plateau}}$ (Pa)
1	CMP-FA11.2	2	13.4	450
2	CMP-FA11.2	1	26.0	260
3	CMP-FA11.2	0.2	67.6	-
4	CMP-FA8.5	2	4.6	355
5	CMP-FA3.2	2	6.7	310
6	CMP-FA3.2	1	12.6	295
7	CMP-FA3.2	0.2	36.8	-
8	CMP-FA1.2	2	13.6	20
9	CMP-FA1.0	2	19.1	5.5

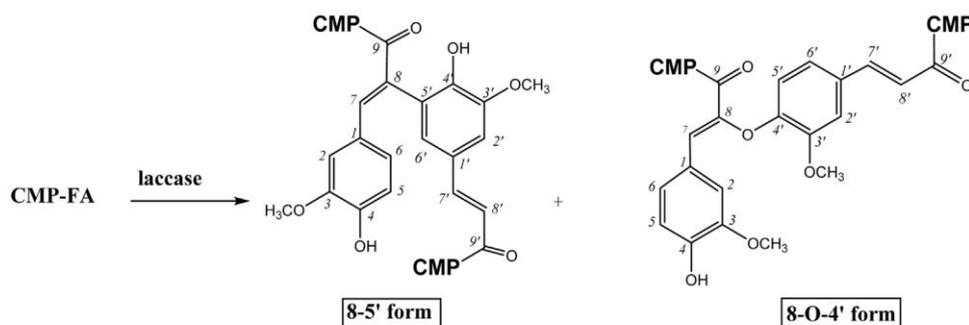
- Data not available, because the plateau was not reached.



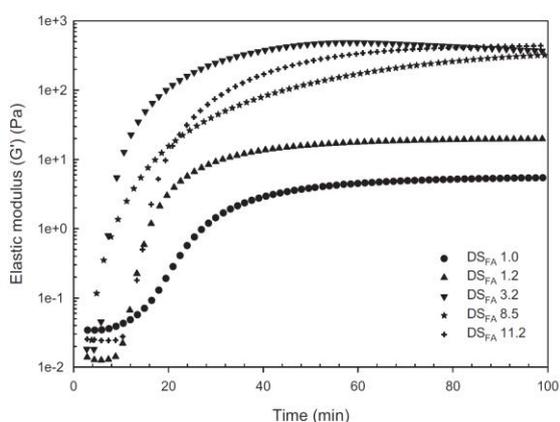
**Fig. 4.**  $\tan(\delta) = G''/G'$  versus time for CMP-FA1.0 (black circle) CMP-FA1.2 (black triangle up) CMP-FA3.2 (black triangle down) CMP-FA8.5 (black star) CMP-FA11.2 (black plus) with laccase at 2 nkat,  $20\text{ g L}^{-1}$  in polymer,  $25^\circ\text{C}$  in citrate/phosphate buffer ( $0.1\text{ mol L}^{-1}\text{ pH } 5.5$ ).

amount leads to accelerate the cross-linking kinetics. This agrees with the catalytic role of the laccase in the reaction.

The kinetics of the cross-linking reaction seems to be slightly dependent on the  $DS_{\text{FA}}$ . To examine the effect of  $DS_{\text{FA}}$  on kinetics of cross-linking and on the values of  $G'_{\text{plateau}}$ , we have plotted  $\tan(\delta)$  (equal to  $G''/G'$ ) as a function of time in Fig. 4 and  $G'$  as a function of time in Fig. 5 during the cross-linking reactions by laccase at 2 nkat and  $20\text{ g L}^{-1}$  for all the CMP-FA derivatives. Fig. 4 shows that for a same laccase concentration (2 nkat) and a same polymer concentration ( $20\text{ g L}^{-1}$ ), the times for the gel crossing point corresponding to  $\tan(\delta) = 1$  increase when  $DS_{\text{FA}}$  decreases (see also Table 3):  $t_{\text{at } G' = G''}$  varies from 4.6 min to 19.1 min when  $DS_{\text{FA}}$  decreases from 8.5% to 1.0%. We can notice an excep-



Scheme 2. Possible forms of cross-linked CMP-FA derivatives.


 Fig. 5.  $G'$  versus time for CMP-FA1.0 (black circle) CMP-FA1.2 (black triangle up) CMP-FA3.2 (black triangle down) CMP-FA8.5 (black star) CMP-FA11.2 (black plus) with laccase at 2 nkat,  $20 \text{ g L}^{-1}$  in polymer,  $25^\circ \text{C}$  in citrate/phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5.5).

tion for the most grafted derivative (i.e. CMP-FA11.2), for which a slightly longer time for the gel crossing point is observed (13.4 min). This slow-down could be explained by the associative behaviour of the polymer in aqueous solution due to hydrophobic interactions between the FA grafted groups which increase as  $DS_{FA}$  increases, in agreement with the results of SEC/MALS/DRI/visco analyses explained before. Due to the associative behaviour of CMP-FA11.2 derivative, laccase could have more difficulties to reach the FA groups which are involved in hydrophobic (inter or intramolecular) interactions. For all cross-linked samples,  $G'$  reaches a plateau which is dependent on the content of FA for low values of  $DS_{FA}$  ( $G'_{\text{plateau}} = 5.5 \text{ Pa}$  for  $DS_{FA} = 1.0\%$  and  $G'_{\text{plateau}} = 20 \text{ Pa}$  for  $DS_{FA} = 1.2\%$ ) but  $G'$  seems to be of the same order of magnitude (between 295 and 450 Pa) whatever the  $DS_{FA}$  for higher values of  $DS_{FA}$  (3.2–11.2%). Carvajal-Millan et al. (2005) have shown that the final  $G'$  linearly increases with the amount of ferulic acid for arabinosyloxylan bearing various FA contents. In their study, the amount of FA were very low (from 0.1 to  $2.3 \text{ mg g}^{-1}$ ). In our case, the FA contents are higher, from 8.5 to  $83 \text{ mg g}^{-1}$  (see Table 1), and we can consider that the FA groups are not all involved in the cross-linking reaction when the  $DS_{FA}$  reaches a value higher than 1.2% (corresponding to  $10 \text{ mg g}^{-1}$  of FA group in CMP-FA derivative). This could explain that no clear differences can be evidenced when comparing the elastic moduli at the plateau for the most grafted derivatives CMP-FA3.2, CMP-FA8.5 and CMP-FA11.2 derivatives.

### 3.3.2. Swelling degree

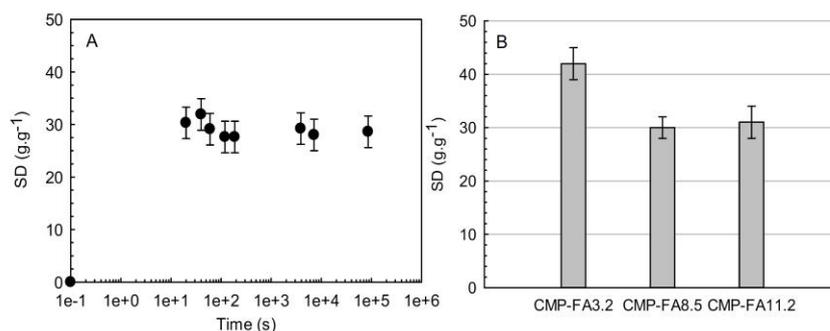
Hydrogels were prepared from three CMP-FA derivatives as follows: 0.04 g of CMP-FA samples were dissolved in 2 mL of citrate/phosphate buffer then laccase solution (in citrate/phosphate buffer) was added at an activity of 2 nkat and the cross-linking reaction was let at  $25^\circ \text{C}$  during 24 h. After the different steps of washing and freeze-drying, the hydrogels were weighted to evaluate the mass loss. For CMP-FA11.2, CMP-FA8.5 and CMP-FA3.2 samples, the mass loss was respectively 24%, 16% and 18% and was attributed to the washing steps during which, hydrogels were broken in several pieces with a consequence on the precision of the weighing. For CMP-FA1.2 and CMP-FA1.0 samples, the mass loss was respectively 69% and almost 100%. Indeed, the least grafted polysaccharide (close to a gel), but the percolation threshold was not reached to give a three dimensional network resistant to washing steps. For CMP-FA1.2 sample, the mass loss was high, also indicating that the number of cross-linking nodes was not high enough to lead to a hard three-dimensional network. This result supposes that the degree of substitution of ferulic acid should be higher than 1.2% to obtain useful hydrogels. Consequently, the swelling degree of these two derivatives (CMP-FA1.2 and CMP-FA1.0) was not studied as was the case for the hydrogels of arabinosyloxylan developed by Carvajal-Millan et al. (2005).

### 3.3.3. Kinetics of swelling

The swelling degree (SD) was followed in citrate/phosphate buffer (pH 5.5  $0.1 \text{ M}$ ) from dried hydrogels, as a function of time. The study of swelling rate on the most grafted sample (CMP-FA11.2) is shown in Fig. 6A. The maximum SD is reached very fast (in 20 s) and is almost stable during 24 h. The fluctuations can be attributed to the weighing stage which became more difficult with time: the hydrogels break in several pieces after a long time of immersion.

### 3.3.4. Swelling of hydrogels

The swelling of CMP-FA3.2, CMP-FA8.5 and CMP-FA11.2 samples was studied in citrate/phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 5.5). As shown in Fig. 6B, the swelling degree is substantially the same for CMP-FA8.5 and CMP-FA11.2 derivatives. The swelling of CMP-FA3.2 derivative is slightly higher. This could be attributed to two phenomena: (1) the number of cross-link nodes is higher for the two most grafted samples leading to denser hydrogels which swell less (2) the presence of hydrophobic associations in the hydrogels prevents the swelling of the hydrogels, whatever the number of cross-link nodes. According to the rheological study, it seems that the hydrogels have the same viscoelastic characteristics (with approximately the same  $G'$ ) but the two most grafted samples exhibit an amphiphilic character more pronounced than CMP-FA3.2 (as shown by the SEC/MALS/DRI/visco analyses).



**Fig. 6.** A) Swelling kinetics of CMP-FA11.2 (black circle) in citrate/phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5.5) at 25 °C. B) Swelling degree of CMP-FA3.2, CMP-FA8.5, CMP-FA11.2 samples in citrate/phosphate buffer (0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5.5) at 25 °C after 24 h of immersion.

#### 4. Conclusion

Carboxymethylpullulan was grafted with various amount of ferulic acid moieties via a two steps reaction in an ethanol/water mixture. The grafting efficiency was low, leading to substitution degrees comprised between 1.0 and 11.2%, (corresponding to 8.5–83 mg of FA per g of CMP-FA derivative). The most grafted CMP-FA derivative (CMP-FA11.2) showed an aggregative character evidenced in dilute regime thanks to SEC/MALS/DRI/Visco analyses due to the hydrophobic character of ferulic acid moieties leading to inter- and intramolecular associations. Thus CMP-FA derivatives possess an amphiphilic behaviour in aqueous solution. The CMP-FA derivatives were then enzymatically cross-linked with laccase from *Pleurotus ostreatus* at 25 °C to give hydrogels. The rheological measurements during enzymatic reaction showed that the decrease in laccase concentration logically led to slower kinetics in agreement with the catalytic role of the enzyme. An effect of FA content (or DS<sub>FA</sub>) has been observed on kinetics with a slow-down of the cross-linking reaction when the FA content decreases. The FA content also influenced the viscoelastic characteristics of hydrogels: the elastic modulus depends on the content of FA for low values (DS<sub>FA</sub> = 1.0% or 1.2%), but for higher values, the hydrogels exhibited approximately the same elastic moduli. It seems that for higher FA contents, the FA groups are not all involved in the crosslinking reaction (due to the associative character of CMP-FA). The hydrophobic associations contribute to modify both the dynamic of the polymer solution and the accessibility of the FA groups, thus influence the cross-linking reaction and its kinetics. Finally, the hydrogels exhibited very fast swellings in citrate/phosphate buffer (0.1 M pH 5.5) with an effect of FA content on swelling. The two less grafted derivatives (CMP-FA1.0 and CMP-FA1.2) had a number of cross-linking nodes not high enough to lead to a hard three-dimensional network and their swelling could not be studied. The other derivatives showed a swelling of the same order of magnitude, with a slight effect of DS<sub>FA</sub> possibly due to the hydrophobic interactions.

#### Acknowledgments

We are grateful to Tony Varacavoudin and Matthias Bibombe for technical assistance for synthesis and Christophe Rihouey for SEC/MALS/DRI/Visco analyses.

#### References

- Adelakun, O. E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I. R., le Roes-Hill, M., & Burton, S. G. (2012). Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1–2), 29–35.
- Akiyama, E., Morimoto, N., Kujawa, P., Ozawa, Y., Winnik, F. M., & Akiyoshi, K. (2007). Self-assembled nanogels of cholesterol-modified polysaccharides:

- effect of the polysaccharide structure on their association characteristics in the dilute and semidilute regimes. *Biomacromolecules*, 8(8), 2366–2373.
- Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniowski, J., Revol-Junelles, A.-M., Scher, J., & Muniglia, L. (2014). Laccase-catalysed functionalisation of chitosan by ferulic acid and ethyl ferulate: evaluation of physicochemical and biofunctional properties. *Food Chemistry*, 161, 279–287.
- Bataille, I., Huguët, J., Muller, G., Mocanu, G., & Carпов, A. (1997). Associative behaviour of hydrophobically modified carboxymethylpullulan derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20(3), 179–191.
- Bauer, R., & Rupe, C. O. (1971). Use of syringaldazine in a photometric method for estimating free chlorine in water. *Analytical Chemistry*, 43(3), 421–425.
- Carvajal-Millan, E., Landillon, V., Morel, M.-H., Rouau, X., Doublier, J.-L., & Micard, V. (2005). Arabinoxylan gels: impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules*, 6(1), 309–317.
- Carvajal-Millan, E., Guilbert, S., Doublier, J.-L., & Micard, V. (2006). Arabinoxylan/protein gels: structural, rheological and controlled release properties. *Food Hydrocolloids*, 20(1), 53–61.
- Carvajal-Millan, E., Guigliarelli, B., Belle, V., Rouau, X., & Micard, V. (2005). Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels. *Carbohydrate Polymers*, 59(2), 181–188.
- Carvajal-Millan, E., Guilbert, S., Morel, M., & Micard, V. (2005). Impact of the structure of arabinoxylan gels on their rheological and protein transport properties. *Carbohydrate Polymers*, 60(4), 431–438.
- Cassano, R., Trombino, S., Muzzalupo, R., Tavano, L., & Picci, N. (2009). A novel dextran hydrogel linking trans-ferulic acid for the stabilization and transdermal delivery of vitamin E. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 72(1), 232–238.
- Choi, Y. E., & Park, E. (2015). Ferulic acid in combination with PARP inhibitor sensitizes breast cancer cells as chemotherapeutic strategy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(3), 520–524.
- Doğan, A., & Kiliç, E. (2007). Tautomeric and microscopic protonation equilibria of some alpha-amino acids. *Analytical Biochemistry*, 365(1), 7–13.
- Dulong, V., Cerf, D., Le Picton, L., & Muller, G. (2006). Carboxymethylpullulan hydrogels with a ionic and/or amphiphilic behavior: swelling properties and entrapment of cationic and/or hydrophobic molecules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 274(1–3), 163–169.
- Dulong, V., Mocanu, G., Picton, L., & Le Cerf, D. (2012). Amphiphilic and thermosensitive copolymers based on pullulan and Jeffamine®: synthesis, characterization and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1522–1531.
- Duval, C., Le Cerf, D., Picton, L., & Muller, G. (2001). Aggregation of amphiphilic pullulan derivatives evidenced by on-line flow field flow fractionation/multi-angle laser light scattering. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 753(1), 115–122.
- Duval-Terrié, C., Huguët, J., & Muller, G. (2003). Self-assembly and hydrophobic clusters of amphiphilic polysaccharides. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 220(1–3), 105–115.
- Figuerola-Espinoza, M. C., & Rouau, X. (1998). Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans 1. *Cereal Chemistry*, 75(2), 259–265.
- Glinel, K., Huguët, J., & Muller, G. (1999). Comparison of the associating behaviour between neutral and anionic alkylperfluorinated pullulan derivatives. *Polymer*, 40(25), 7071–7081.
- Gomez, C. G., Chambat, G., Heyraud, A., Villar, M., & Auzély-Velty, R. (2006). Synthesis and characterization of a beta-CD-alginate conjugate. *Polymer*, 47(26), 8509–8516.
- Hassani, L. N., Hendra, F., & Bouchemal, K. (2012). Auto-associative amphiphilic polysaccharides as drug delivery systems. *Drug Discovery Today*, 17(11–12), 608–614.
- Ishii, T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 127(2), 111–127.

- Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., ... & Iseki, K. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: a comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chemistry*, 114(2), 466–471.
- Lack, S., Dulong, V., Le Cerf, D., Picton, L., Argillier, J. F., & Muller, G. (2004). Hydrogels based on pullulan crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): rheological study. *Polymer Bulletin*, 52(6), 429–436.
- Lemos, M., Borges, A., Teodósio, J., Araújo, P., Mergulhão, F., Melo, L., & Simões, M. (2014). The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 42–51.
- Mathew, S., & Abraham, T. E. (2004). Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(2–3), 59–83.
- Matricardi, P., Dentini, M., & Crescenzi, V. (1993). Rheological gel-point determination for a polysaccharide system undergoing chemical cross-linking. *Macromolecules*, 26(16), 4386–4387.
- Mocanu, G., Mihai, D., LeCerf, D., Picton, L., & Muller, G. (2004). Synthesis of new associative gel microspheres from carboxymethyl pullulan and their interactions with lysozyme. *European Polymer Journal*, 40(2), 283–289.
- Mocanu, G., Mihai, D., Dulong, V., Picton, L., & LeCerf, D. (2011). New anionic amphiphilic thermosensitive pullulan derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 276–281.
- Mocanu, G., Mihai, D., Dulong, V., Picton, L., & Le Cerf, D. (2012). New anionic crosslinked multi-responsive pullulan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1440–1446.
- Mustafa, R., Muniglia, L., Rovel, B., & Girardin, M. (2005). Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International*, 38(8–9), 995–1000.
- Nakajima, N., & Ikada, Y. (1995). Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chemistry*, 6(1), 123–130.
- Nam, K., Kimura, T., & Kishida, A. (2008). Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using ethanol/water co-solvents. *Macromolecular Bioscience*, 8(1), 32–37.
- Prabakaran, M., & Mano, J. F. (2006). Stimuli-responsive hydrogels based on polysaccharides incorporated with thermo-responsive polymers as novel biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6(12), 991–1008.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5), 219–226.
- Sarmini, K., & Kennndler, E. (1998). Capillary zone electrophoresis in mixed aqueous-organic media: effect of organic solvents on actual ionic mobilities, acidity constants and separation selectivity of substituted aromatic acids. *Journal of Chromatography A*, 811(1–2), 201–209.
- Shingel, K. I. (2004). Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research*, 339(3), 447–460.
- Simon, S., Dugast, J., Le Cerf, D., Picton, L., & Muller, G. (2003). Amphiphilic polysaccharides. Evidence for a competition between intra and intermolecular associations in dilute system. *Polymer*, 44(26), 7917–7924.
- Singh, R. S., Kaur, N., & Kennedy, J. F. (2015). Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting. *Carbohydrate Polymers*, 123, 190–207.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). *Oxidants and antioxidants part a methods in enzymology* (Vol. 299) Elsevier.
- Smith, M. M., & Hartley, R. D. (1983). Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydrate Research*, 118, 65–80.
- Stoilova, I., Krastanov, A., & Stanchev, V. (2010). Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 01(03), 208–215.
- Takahashi, H., Kashimura, M., Koiso, H., Kuda, T., & Kimura, B. (2013). Use of ferulic acid as a novel candidate of growth inhibiting agent against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food. *Food Control*, 33(1), 244–248.
- Tan, R., She, Z., Wang, M., Fang, Z., Liu, Y., & Feng, Q. (2012). Thermo-sensitive alginate-based injectable hydrogel for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1515–1521.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1), 19–26.
- Trombino, S., Cassano, R., Bloise, E., Muzzalupo, R., Leta, S., Puoci, F., & Picci, N. (2008). Design and synthesis of cellulose derivatives with antioxidant activity. *Macromolecular Bioscience*, 8(1), 86–95.
- Trombino, S., Cassano, R., Bloise, E., Muzzalupo, R., Tavano, L., & Picci, N. (2009). Synthesis and antioxidant activity evaluation of a novel cellulose hydrogel containing trans-ferulic acid. *Carbohydrate Polymers*, 75(1), 184–188.
- Tsai, B.-H., Lin, C.-H., & Lin, J.-C. (2006). Synthesis and property evaluations of photocrosslinkable chitosan derivative and its photocopolymerization with poly(ethylene glycol). *Journal of Applied Polymer Science*, 100(3), 1794–1801.
- Tung, C.-Y. M., & Dynes, P. J. (1982). Relationship between viscoelastic properties and gelation in thermosetting systems. *Journal of Applied Polymer Science*, 27(2), 569–574.
- Vázquez, C. P., Boudou, T., Dulong, V., Nicolas, C., Picart, C., & Glinel, K. (2009). Variation of polyelectrolyte film stiffness by photo-cross-linking: a new way to control cell adhesion. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 25(6), 3556–3563.
- Valacchi, G., Grisci, G., Sticozzi, C., Lim, Y., Paolino, M., Giuliani, G., ... & Rovati, L. (2015). Wound healing properties of hyaluronan derivatives bearing ferulate residues. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(35), 7037–7045.
- Vansteenkiste, E., Babot, C., Rouau, X., & Micard, V. (2004). Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 557–564.
- Wildenradt, H. L., & Singleton, V. L. (1974). The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25(2), 119–126.
- Woranuch, S., & Yoksan, R. (2013). Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 96(2), 495–502.
- Wu, P., & Imai, M. (2011). Food polymer pullulan-κ-carrageenan composite membrane performed smart function both on mass transfer and molecular size recognition. *Desalination and Water Treatment*, 34, 239–245. Retrieved from: [http://www.tandfonline.com.chimie.gate.inist.fr/abs/10.5004/dwt.2011.2872](http://www.tandfonline.com/chimie.gate.inist.fr/abs/10.5004/dwt.2011.2872)
- Xu, F., Shin, W., Brown, S. H., Wahleithner, J. A., Sundaram, U. M., & Solomon, E. I. (1996). A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1292(2), 303–311.

## **II. Résultats et discussion**

### **II.1. Réaction de greffage**

Nous nous sommes basés sur la chimie des carbodiimides pour greffer l'acide férulique (FA) sur le CMP (degré de carboxyméthylation  $DS_{COONa} = 0,8$ ). Selon cette approche, il est donc nécessaire d'apporter une fonction amine (ici par le biais de l'acide adipique dihydrazide (ADH)) sur FA pour ensuite condenser cet intermédiaire sur les fonctions acide carboxylique du polysaccharide. Ce greffage se fait donc en deux temps : tout d'abord, modification du FA par l'ADH (réaction non optimisée) puis réaction du dérivé intermédiaire sur le CMP. Nous avons ainsi réussi à coupler le FA au CMP via des liens amide. Les conditions opératoires ont été adaptées de façon à obtenir des degrés de substitution en FA différents. Le succès du greffage a été confirmé qualitativement par FT-IR et quantitativement par RMN- $^1H$  et dosage de Folin-Ciocalteu. Cette dernière méthode, pour quantifier le degré de substitution expérimental en FA ( $DS_{FA}$ ) s'est révélée plus précise que la RMN- $^1H$  en raison d'une très bonne solubilité dans l'eau des CMP-FA contrairement aux PUL-FA. Cette différence d'hydrosolubilité provient de la présence des charges négatives le long du squelette du polysaccharide du CMP qui entraîne de surcroît des répulsions électrostatiques permettant un état moins agrégatif.

Malgré des différences au niveau de la chimie utilisée et de la présence ou non d'un bras espaceur (ADH), nous obtenons pour les deux polysaccharides (PUL et CMP) des valeurs de  $DS_{FA}$  du même ordre de grandeur ce qui nous permet d'envisager une comparaison des propriétés physico-chimiques en solution de ces systèmes et des hydrogels obtenus.

### **II.2. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco**

Les propriétés physico-chimiques des solutions aqueuses des dérivés CMP-FA en régime dilué ont été mises en évidence par SEC/MALS/DRI/Visco dans les mêmes conditions utilisées que pour les dérivés PUL-FA (1g/L dans  $LiNO_3$  0,1 mol/L). Pour évaluer le caractère associatif de ces différents échantillons, nous avons regroupé leurs grandeurs physico-chimiques intrinsèques et caractéristiques ( $M_n$  et  $M_w$ ) et calculé les degrés de polymérisation apparents moyens en nombre ( $DP_n$ ) dans le Tableau D-1.

**Tableau D-1 : Grandeurs caractéristiques moyennes des dérivés CMP-FA et PUL-FA obtenues par couplage SEC/MALS/DRI/Visco à une concentration de 1 g/L dans LiNO<sub>3</sub> 0,1 mol/L à 25°C**

Produit	M <sub>n</sub> (g/mol)	M <sub>w</sub> (g/mol)	Ecart M <sub>w</sub> <sup>a</sup> (%)	M <sub>0</sub> <sup>b</sup> (g/mol)	DP <sub>n</sub> <sup>c</sup>	Ecart DP <sub>n</sub> <sup>d</sup> (%)
<b>CMP</b>	201 800	327 800	-	226	893	-
<b>CMP-FA-3,2%</b>	210 000	368 200	12	236	890	-
<b>CMP-FA-8,5%</b>	244 300	398 600	22	252	969	9
<b>CMP-FA-11,2%</b>	269 700	597 100	82	261	1033	16
<b>PUL</b>	144 000	265 000	-	162	889	-
<b>PUL-FA-2%</b>	231 000	670 000	153	165,5	1400	57
<b>PUL-FA-6%</b>	257 000	804 000	203	172,6	1489	67
<b>PUL-FA-10%</b>	334 000	815 000	207	179,6	1859	109

<sup>a</sup> L'écart sur M<sub>w</sub> est calculé comme suit :  $Ecart M_w = \frac{M_w \text{ dérivé greffé} - M_w \text{ précurseur}}{M_w \text{ précurseur}} \times 100$

<sup>b</sup> Masse molaire de l'unité de répétition calculée selon l'équation  $M_0 = 162 + (80 \times DS_{COONa^+}) + (310 \times DS_{FAexp})$  dans le cas des produits à base de CMP et selon l'équation :  $M_0 = 162 + (176,18 \times DS_{FAexp})$  dans le cas des produits à base de PUL.

<sup>c</sup> Degré de polymérisation apparent déterminé par la relation :  $DP_n = M_n / M_0$

<sup>d</sup> L'écart sur DP<sub>n</sub> est calculé par l'équation :  $Ecart DP_n = \frac{DP_n \text{ dérivé greffé} - DP_n \text{ précurseur}}{DP_n \text{ précurseur}} \times 100$

Le Tableau D-1 montre un écart sur M<sub>w</sub> et sur DP<sub>n</sub> beaucoup plus faible dans le cas des dérivés CMP-FA ce qui prouve que la tendance à l'agrégation est beaucoup moins marquée en présence de fonctions carboxylate. En effet, celles-ci facilitent l'hydratation du polymère et favorisent les répulsions électrostatiques s'opposant à l'effet agrégatif hydrophobe induit par l'association entre motifs d'acide férulique, même en présence de sel.

### II.3. Etude rhéologique de la gélification

La gélification des CMP-FA a été étudiée en régime semi-dilué dans les mêmes conditions que pour les systèmes PUL-FA exceptées pour la concentration qui a été fixée à 20 g/L pour les CMP-FA car le CMP possède une concentration de recouvrement C\* = 16 g/L (dans NaCl)<sup>1</sup> plus faible que le pullulane.

Toutes les courbes obtenues (G' et G'' en fonction du temps) ont montré un profil typique de réticulation chimique similaire à celui des solutions PUL-FA avec un effet de la quantité d'enzyme et du degré de substitution en FA comparable. En rappel, l'augmentation de

l'activité en enzyme accélère la cinétique confirmant le rôle catalytique de l'enzyme mais ne modifie quasiment pas la structure du gel formé (i.e. même module  $G'$  au plateau). L'augmentation du  $DS_{FA}$  augmente logiquement le module  $G'$  au plateau (augmentation d'un nombre de liens de réticulation) et accélère aussi la cinétique jusqu'à concurrence d'un caractère associatif trop marqué. Toutefois, des petites différences peuvent être détectées entre le comportement du pullulane et celui du CMP au niveau des données rhéologiques collectées dans le Tableau D-2.

**Tableau D-2 : Données rhéologiques des réactions de réticulation des solutions CMP-FA et PUL-FA dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) à 25°C**

<b>Produit</b>	<b>FA<sub>éq</sub><sup>a</sup> (mg/g)</b>	<b>[C] (g/L)</b>	<b>FA<sub>éq</sub> solution<sup>b</sup> (mg)</b>	<b>AE (nkat)</b>	<b>t<sub>gel</sub><sup>c</sup> (min)</b>	<b>G'<sub>plateau</sub> (Pa)</b>
<b>CMP-FA-3,2%</b>	26	20	4,2	1	12,6	295
				2	6,7	310
<b>PUL-FA-2%</b>	23,5	40	7,5	1	30	200
				2	16	210
<b>CMP-FA-8,5%</b>	65	20	10,4	2	4,6	355
<b>PUL-FA-6%</b>	67,5	40	21,6	2	6	300

<sup>a</sup> Équivalent d'acide férulique contenu dans le dérivé d'étude calculé par l'Eq B8 (Chapitre B-I.3) dans le cas des systèmes CMP-FA et par l'Eq. B6 (Chapitre B-I.3) dans le cas des systèmes PUL-FA

<sup>b</sup> Équivalent d'acide férulique contenu dans la solution du produit analysé calculé par la relation :

$$FA_{eq\ solution} = [C] \times V_{solution} \times FA_{éq} \text{ avec } V_{solution} = 8 \times 10^{-3} \text{ L (volume de la solution analysée)}$$

<sup>c</sup> Temps au point d'intersection  $G' = G''$

Concernant les CMP-FA, les cinétiques de gélification apparaissent légèrement plus rapides et les modules élastiques obtenus au plateau sont plus élevés qu'avec les dérivés PUL-FA. Cette différence est surtout visible lorsque le  $DS_{FA}$  est faible. Cela peut s'expliquer par le comportement moins agrégatif des dérivés CMP-FA (balance HLB plus élevée et rigidité plus importante de la chaîne) comparés aux dérivés PUL-FA facilitant l'accessibilité des motifs greffés de FA à l'enzyme.

## **II.4. Propriétés de gonflement**

Le gonflement des hydrogels de CMP-FA dans l'eau pure a également été mesuré<sup>2</sup> (Tableau D-3).

**Tableau D-3 : Propriétés de gonflement des hydrogels de CMP-FA et PUL-FA dans l'eau milli-Q à 25°C**

Produit	[C] (g/L) <sup>a</sup>	AE (nkat) <sup>b</sup>	G' plateau (Pa)	Q (g/g) <sup>c</sup>
<b>CMP-FA-3,2%</b>	20	2	310	97
<b>CMP-FA-11,2%</b>	20	2	450	61
<b>PUL-FA-2%</b>	40	2	210	13,3
<b>PUL-FA-10%</b>	40	2	370	9,6

<sup>a</sup> Concentration de la solution à partir de laquelle l'hydrogel a été obtenue

<sup>b</sup> Activité enzymatique utilisée pour la réticulation des solutions des dérivés greffés

<sup>c</sup> Taux de gonflement déterminé par l'Eq. B30 (voir Chapitre B-III.3)

Logiquement, la présence de charge négative au niveau des CMP donne des gonflements dans l'eau pure beaucoup plus importants. Un taux de gonflement maximal de 97 g/g a été atteint pour le CMP le moins substitué, soit environ 7 fois le taux de gonflement maximal de son équivalent en PUL (13,3 g/g).

L'établissement de répulsions électrostatiques au sein de l'hydrogel facilite la pénétration de l'eau et entraîne des gonflements plus importants. Le même effet a été observé par *Sannino & Nicolais* sur le gonflement d'hydrogels à base de cellulose en comparant des matrices de nature carboxyméthylcellulose et hydroxyéthylcellulose<sup>3</sup>.

## Conclusion

La chimie des carbodiimides, via l'utilisation d'un bras espaceur diamine, a démontré une efficacité notable dans le greffage de l'acide férulique sur le CMP, polysaccharide anionique modèle choisi pour cette étude.

En régime dilué, les dérivés greffés sont faiblement associatifs en raison de leur caractère polyélectrolyte.

Des hydrogels de CMP-FA ont été obtenus avec succès par réticulation enzymatique en utilisant la laccase de *Pleurotus ostreatus*. Les gonflements mesurés dans l'eau pure sont importants (60 à 100g/g) par la présence des charges dans le réseau des hydrogels CMP.

Ces résultats nous ont encouragé à transférer cette chimie sur l'acide hyaluronique, un polysaccharide anionique d'intérêt.

## **Chapitre D-II. Transfert sur un polysaccharide d'intérêt, l'acide hyaluronique**

### **I. Greffage de l'acide férulique sur l'acide hyaluronique**

#### **I.1. Méthode de synthèse**

À la vue des résultats intéressants obtenus pour le greffage de FA sur le CMP, nous avons repris la même voie de synthèse pour le HA avec aucune modification dans un premier temps. Cette voie de synthèse repose sur l'utilisation de l'acide adipique dihydrazide (ADH) comme bras espaceur et le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) comme agent de couplage. La nécessité de l'utilisation d'un bras espaceur provient des fonctions réactives communes (acide carboxylique et hydroxyle) présentes sur le FA et le HA. Un greffage direct de FA sur le HA par la création d'un lien ester (comme dans le cas des systèmes PUL-FA) n'était pas judicieux du fait de la compétitivité possible entre le couplage de la fonction acide carboxylique du FA avec les fonctions hydroxyle du HA et le couplage des fonctions carboxylate du HA avec l'hydroxyle du FA. De plus, ce dernier couplage doit être évité car les fonctions hydroxyle du FA sont utilisées ultérieurement lors de la réticulation par la laccase (voir Chapitre A-III.2.1.2). De ce fait, la fonction hydroxyle du FA ne doit pas être engagée pendant la réaction du greffage du FA sur le HA.

Le bras espaceur contient dans sa structure une fonction amine à ces deux extrémités ce qui nous permettra de modifier l'acide hyaluronique par l'acide férulique via la création de liens amide en deux étapes (Figure D-1). La première consiste à fonctionnaliser l'acide férulique en le greffant sur une extrémité du bras espaceur selon des proportions molaires appropriées de façon à éviter au maximum le greffage de FA sur les deux extrémités amine de l'ADH. Cependant, après une purification par l'ajout d'un grand volume d'eau pour éliminer le bras espaceur et l'EDC qui n'ont pas réagi, un mélange du bras espaceur monofonctionnalisé (produit désiré) et bifonctionnalisé ainsi que du FA qui n'a pas réagi peuvent coexister. Nous avons également prouvé par RMN que seul 30% molaire de l'ADH initial est modifié soit monosubstitué, soit disubstitué. Par contre, il n'était pas possible de déterminer leur proportion respective (voir Chapitre D-I-I.3.1).

Compte tenu de cette impossibilité de quantification, nous avons décidé de ne pas essayer d'améliorer la réactivité du bras espaceur diamine vis-à-vis du FA. La 2<sup>ème</sup> étape de la réaction est déclenchée par l'ajout de ce mélange dans une solution de HA préalablement activé

par EDC pour créer des liens amide entre l'extrémité amine libre du bras espaceur monofonctionnalisé par FA et des fonctions carboxylate du HA.

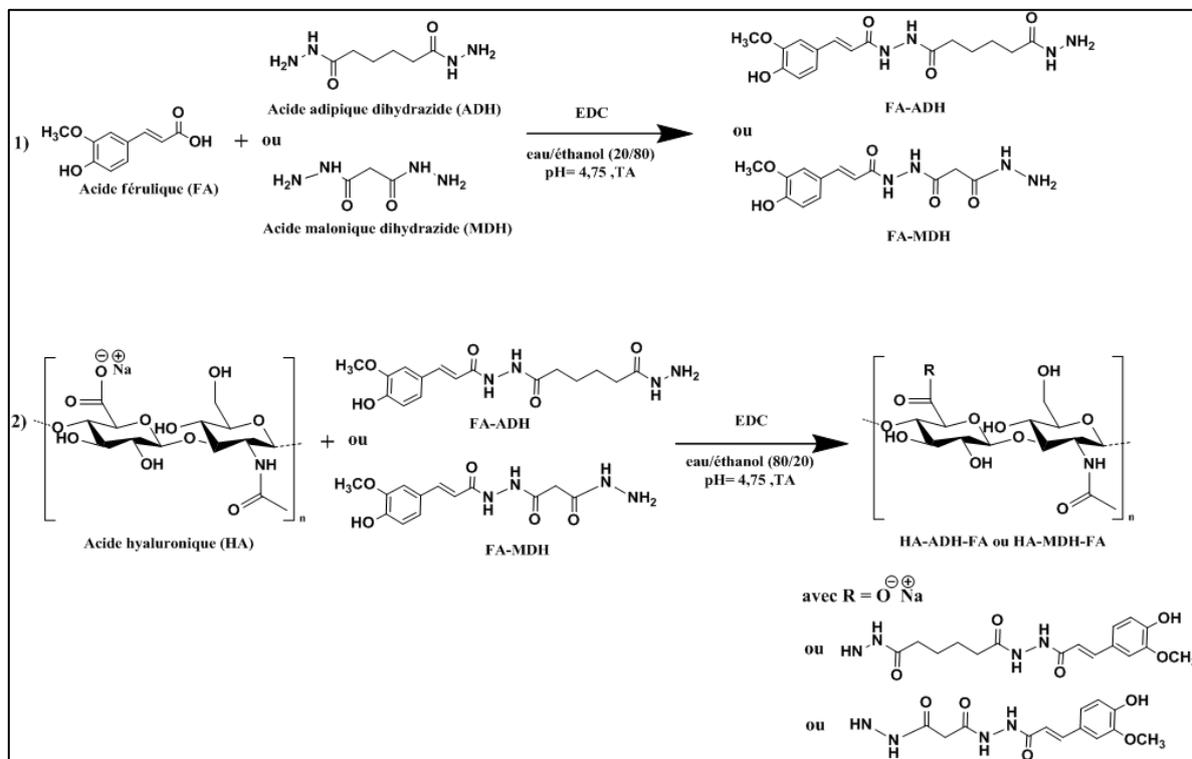


Figure D-1 : Réaction de greffage de l'acide férulique sur l'acide hyaluronique

## I.2. Synthèse de référence

### I.2.1. Protocole de synthèse

Tout d'abord, en 1<sup>ère</sup> étape, dans un ballon monocol de 250 mL, on introduit 4 g de FA (20,6 mmol) qu'on solubilise dans 80 mL d'éthanol. En même temps, dans un bécher de 100 mL, on introduit 3,6 g d'ADH (20,6 mmol) qu'on solubilise dans 30 mL d'eau milli-Q puis dans 30 mL d'éthanol.

Après environ 30 min d'agitation magnétique (400 tr/min), la solution d'ADH est ajoutée goutte à goutte à celle de l'acide férulique et le pH est ajusté à 4,75 en ajoutant une très faible quantité d'une solution aqueuse de HCl (1 mol/L). Ensuite, une solution d'EDC est ajoutée goutte à goutte (4 g dans 10 mL d'éthanol, soit 20,8 mmol) puis on laisse réagir pendant 24h à température ambiante sous une agitation de 400 tr/min. Parallèlement, 1 g de HA (2,5 mmol) est solubilisé dans 400 mL d'eau milli-Q à température ambiante sous une agitation de 500 tr/min.

A la fin de la réaction de cette 1<sup>ère</sup> étape, la solution (FA+ADH+EDC) est évaporée totalement jusqu'à l'apparition d'une poudre jaune dans le ballon. Puis, cette poudre est lavée 3 fois avec 50 mL d'eau milli-Q (pour éliminer l'ADH et l'EDC qui n'ont pas réagi) et est solubilisée ensuite dans un mélange d'eau milli-Q/éthanol 95 mL /125 mL.

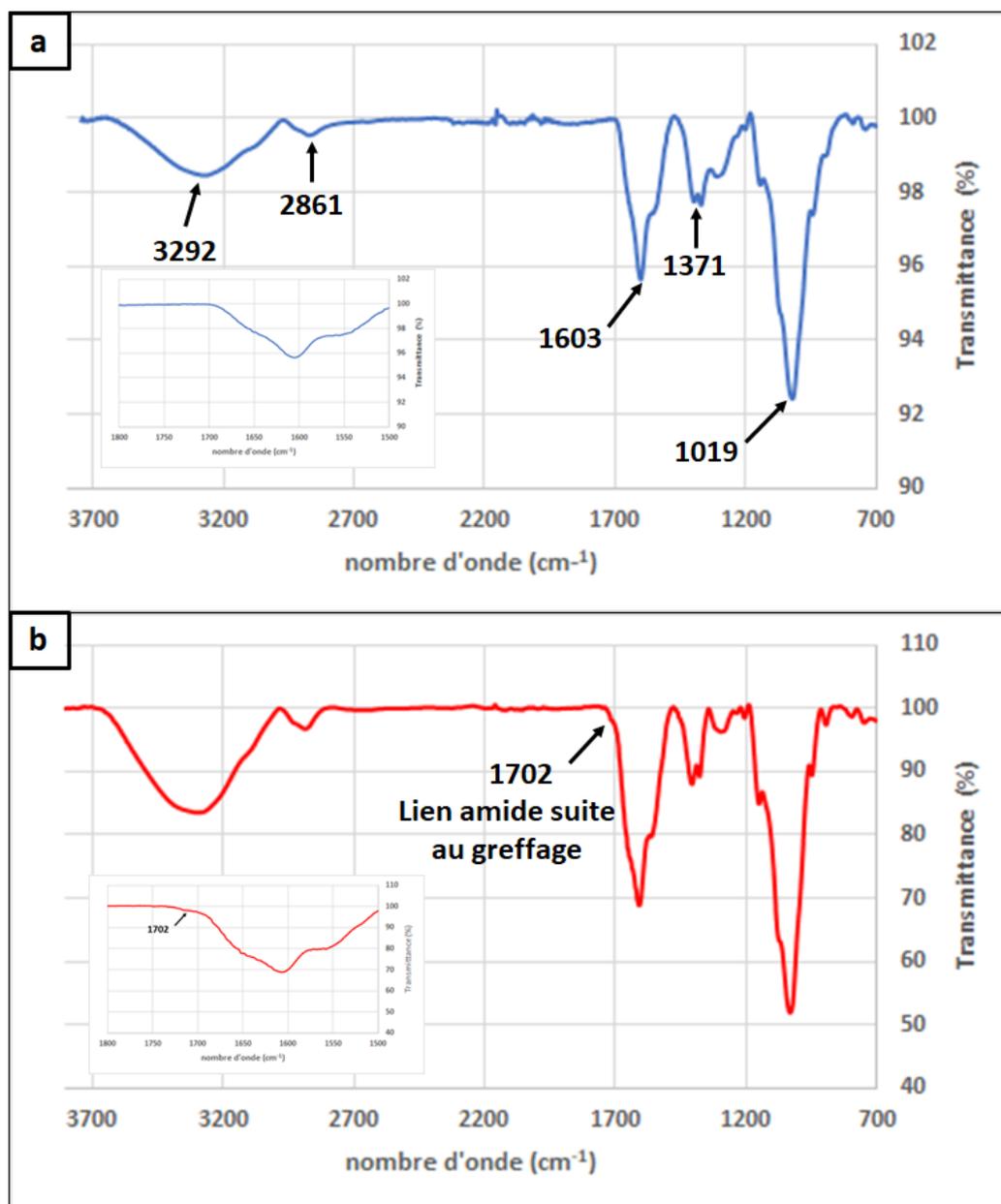
La seconde étape consiste à ajouter (goutte à goutte) cette dernière solution contenant un mélange de FA-ADH, FA-ADH-FA et FA à celle du HA (1 g dans 400 mL) dont le pH a été préalablement ajusté à 4,75 en utilisant une solution aqueuse de HCl (1 mol/L). Finalement, une solution d'EDC (0,5 g dans 10 mL d'eau milli-Q, soit 2,6 mmol) est ajoutée goutte à goutte puis on laisse réagir pendant 24h à température ambiante sous une agitation de 500 tr/min. La solution récupérée à la fin de la réaction est ensuite dialysée (membrane de dialyse Spectra-Pro  $12 \times 10^3$  -  $14 \times 10^3$  g/mol) contre NaOH 0,1 mol/L pendant 2h puis contre l'eau milli-Q jusqu'à atteindre une conductivité voisine de celle de l'eau milli-Q. Après dialyse, les solutions sont congelées et lyophilisées. On obtient un 'coton' blanc correspondant à l'échantillon HA-ADH-FA1 avec un rendement massique de 90% que l'on stocke à 4°C.

## **I.2.2 Caractérisation du greffage**

La présence du FA greffé a tout d'abord été visualisée de manière qualitative par IR puis de manière quantitative par RMN-<sup>1</sup>H et par dosage de Folin-Ciocalteu.

### **I.2.2.1. Spectroscopie IR**

La Figure D-2 représente les spectres IR (transmittance = f (nombre d'onde)) du HA précurseur et du dérivé précédemment décrit HA-ADH-FA1.



**Figure D-2 :** Spectres IR de : **a)** Acide hyaluronique (bleu). **b)** HA-ADH-FA1 (rouge)

Le spectre IR de l'acide hyaluronique (Figure D-2-a) présente une forte absorption à  $3292\text{ cm}^{-1}$  caractéristique de la vibration d'élongation des groupements OH et de la liaison N-H. La bande d'absorption observée à  $2861\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à la région d'élongation des liaisons C-H  $\text{sp}^3$ . La bande à  $1603\text{ cm}^{-1}$  correspond à l'amine liée à la fonction acétyle du HA tandis que celle à  $1371\text{ cm}^{-1}$  peut être attribuée à la vibration d'élongation de  $\text{COO}^-$  (fonction carboxylate du HA). Le pic intense à  $1019\text{ cm}^{-1}$  correspond à l'élongation des liaisons C-OH. Un spectre similaire a été rapporté par *De Oliveira et al.*<sup>4</sup>

Un très léger élargissement de la bande correspondant des amines est visible à  $1700\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre IR du dérivé HA-ADH-FA (Figure D-2-b). Cette bande d'absorption

provient certainement de la vibration d'élongation du C=O du groupement carboxyle de lien amide établi entre l'acide hyaluronique et l'acide férulique fonctionnalisé par l'ADH.

### **I.2.2.2. Spectroscopie RMN**

La Figure D-3 représente les spectres RMN-<sup>1</sup>H de l'acide férulique, de l'acide hyaluronique, de l'ADH et du dérivé HA-ADH-FA1.

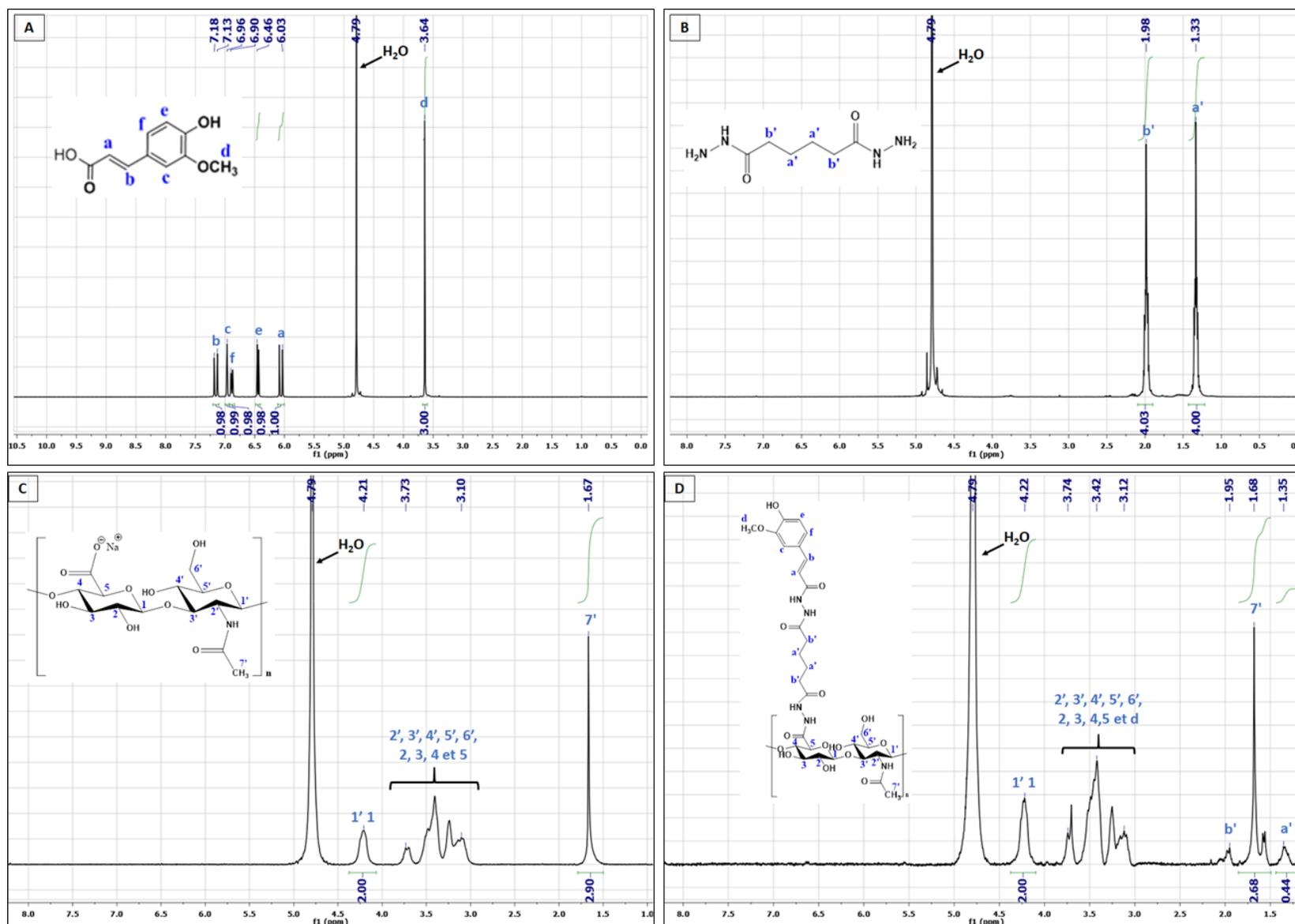


Figure D-3 : Spectres RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v) de : **A)** Acide férulique. **B)** ADH. **C)** Acide hyaluronique. **D)** HA-ADH-FA1

Les pics observés dans le spectre RMN-<sup>1</sup>H de l'acide férulique (Figure D-3-A) ont été attribués précédemment aux protons correspondants (voir Chapitre C-I.2.2.2).

La Figure D-3-B présente le spectre de l'ADH. Ce dernier montre deux signaux à 1,33 et 1,98 ppm attribués respectivement aux 4 protons en β (2×2H<sub>a'</sub>) et aux 4 protons en α (2×2H<sub>b'</sub>) du groupement carbonyle de chaque extrémité.

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H typique de l'acide hyaluronique (Figure D-3-C) permet l'attribution du signal à 1,67 ppm aux 3 protons de la fonction acétyle du HA (3H<sub>7'</sub>). Le massif de pics observé entre 3,1 – 3,8 ppm correspond aux protons cycliques non anomères du squelette de l'acide hyaluronique (H<sub>2', 3', 4', 5', 6', 2 3, 4 et 5</sub>). Les protons anomères (H<sub>1', et 1</sub>) sont détectés à 4,21 ppm

Comparé au spectre du HA, le spectre du dérivé HA-ADH-FA1 (Figure D-3-D) montre logiquement la présence des pics caractéristiques du HA (δ = 1,68 ppm, δ = 3,1-3,8 ppm et δ = 4,22 ppm). On remarque aussi l'apparition de deux nouveaux signaux à 1,35 et 1,95 ppm qui correspondent respectivement aux protons en α et β du carbonyle de l'ADH. Cependant, on note l'absence des pics aromatiques et éthyléniques caractéristiques de l'acide férulique. Quant aux protons méthoxy de FA (δ = 3,64 ppm), il est possible qu'ils soient confondus avec les pics des protons non anomères du HA ou non observables comme le reste des protons de FA.

Par conséquent, nous nous sommes basés sur l'intégration du pic à 4,22 ppm référé à 2 (H<sub>1', et 1</sub> anomères du HA) et du pic à 1,35 (4 protons en β du carbonyle de l'ADH) pour déterminer le degré de substitution de FA/GAG (DS<sub>FA RMN</sub>) selon l'équation suivante :

$$\%DS_{FA RMN} = \frac{I(H_{a'})}{4} \times 100 \quad (\text{Eq. D1})$$

Dans le cas de ce dérivé HA-ADH-FA1, nous obtenons un DS de 11%.

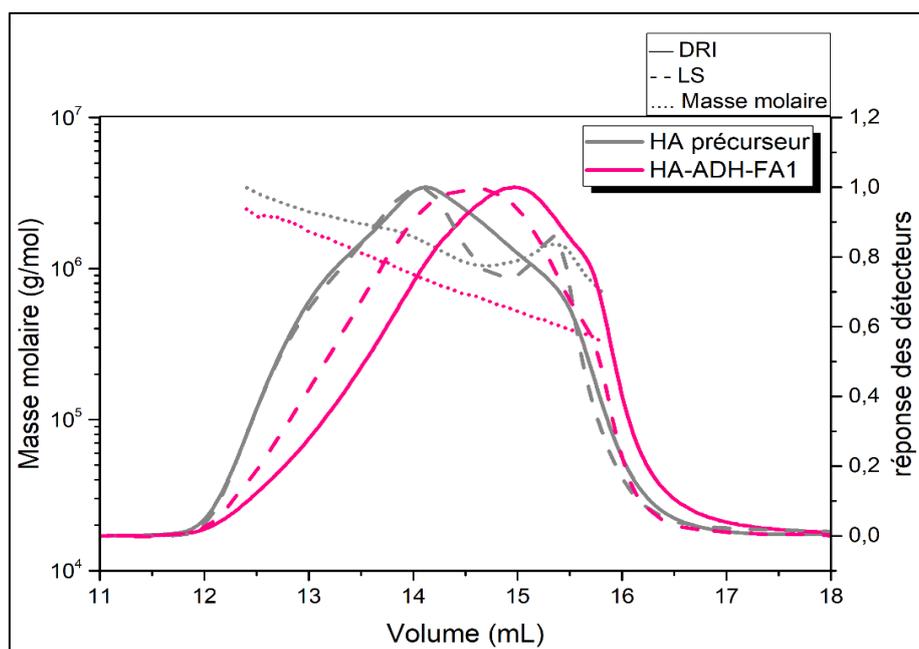
### I.2.2.3. Dosage de Folin-Ciocalteu

L'analyse réalisée sur cet échantillon donne une valeur proche, légèrement inférieure égale à 10%. Dans le cas du HA-ADH-FA1, les deux méthodes semblent complémentaires.

L'efficacité du greffage est donc de 11%.

### I.2.3 Détermination des masses molaires

L'échantillon a été injecté dans les mêmes conditions que le HA précurseur (chapitre B-II.1). Le taux de récupération en sortie de colonnes est dans ce cas beaucoup plus faible (40% contre 83%). Une grande partie de l'échantillon HA-ADH-FA1 a donc été éliminée pendant la phase de filtration avant l'injection. Il s'agit probablement d'agrégats de grandes tailles indiquant ici un caractère associatif marqué. N'ayant pas constaté d'augmentation de pression au niveau de la pompe HPLC après de nombreuses injections, nous avons exclu la possibilité d'adsorption dans les colonnes. Nous constatons, de plus, un décalage du pic vers les plus faibles volumes d'élution (Figure D-4) qui traduit soit une compaction du volume hydrodynamique due à l'apparition d'associations hydrophobes intramoléculaires ou bien une diminution des masses molaires moyennes due à une dégradation durant la réaction. Les résultats des masses molaires obtenus lors de l'intégration sur l'ensemble du pic (Tableau D-4) semblent bien indiquer une dégradation des chaînes. Une telle dégradation n'avait pas été observée sur les dérivés CMP-FA.



**Figure D-4** : Profils d'élution dans  $\text{LiNO}_3$  (0,1 mol/L) à  $25^\circ\text{C}$  de l'indice de réfraction (trait plein) et de la diffusion de la lumière à  $90^\circ$  (tirets) avec la distribution des masses molaires (points) du HA précurseur (gris) et du HA-ADH-FA1 (rose)

**Tableau D-4 : Grandeurs caractéristiques moyennes du HA et du HA-ADH-FA1 obtenues par couplage SEC/MALS/DRI/Visco à une concentration de 1 g/L dans LiNO<sub>3</sub> 0,1 mol/L à 25°C**

Échantillon	M <sub>n</sub> (g/mol)	M <sub>w</sub> (g/mol)	M <sub>0</sub> <sup>a</sup> (g/mol)	DP <sub>n</sub> <sup>b</sup>	Rh <sub>(w)</sub> (nm)	[η] <sub>w</sub> (ml/g)	Masse récupérée
<b>HA précurseur</b>	1 480 000	1 680 000	402,3	3 679	82	2 270	83 %
<b>HA-ADH-FA1</b>	639 000	800 000	436,3	1465	51	1 100	40 %

<sup>a</sup> Masse molaire de l'unité de répétition déterminée par l'équation :  $M_0 = 402,3 + (309,38 \times DS_{FA})$

<sup>b</sup> Degré de polymérisation apparent déterminé par la relation :  $DP_n = M_n / M_0$

L'aspect associatif des HA-FA est donc visible sur le calcul de la quantité analysée par le détecteur réfractométrique. Environ 50% de l'échantillon est donc sous forme d'agrégats créés par la coexistence d'interactions hydrophobes inter et intramoléculaires. Sur les chaînes analysées, la diminution des masses molaires due à la dégradation rend difficile la mise en évidence possible d'associations intramoléculaires (i.e. diminution du  $V_h$ ). Nous pouvons cependant déterminer l'exposant de la relation de Mark Houwink Sakurada du dérivé modifié. Celui-ci est de 0,5 ce qui est faible comparé à l'acide hyaluronique de forte masse molaire qui est habituellement proche de 0,65<sup>5</sup>. Ce résultat semble bien confirmer le caractère associatif (intramoléculaire cette fois) observé avec les pertes à la filtration.

### I.3. Amélioration du protocole de synthèse et de purification

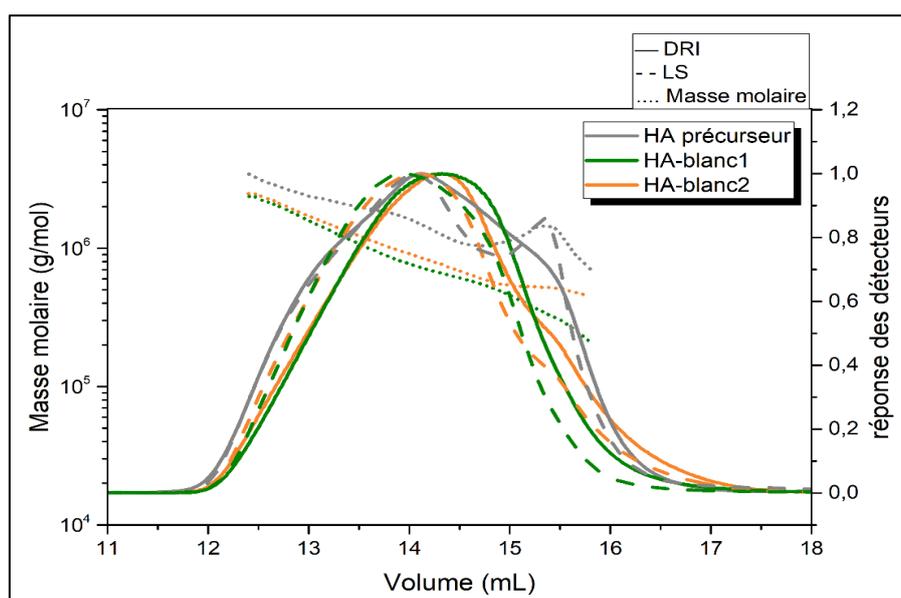
La dégradation mise en évidence peut avoir deux origines, soit pendant la synthèse soit pendant la purification.

#### I.3.1. Purification

La purification a été conduite en suivant le protocole classique utilisé précédemment pour le CMP, c'est-à-dire une dialyse contre NaOH 0,1 mol/L pendant 2h suivie d'une dialyse contre de l'eau. Ce milieu, non dégradant pour le CMP, peut s'avérer dégradant pour un autre polysaccharide comme le HA. Pour répondre à cette question, nous avons décidé de réaliser des tests « blancs » qui consistent à placer le HA dans les mêmes conditions de synthèse mais sans FA ni d'ADH dans le milieu réactionnel. Deux blancs ont été suivis en modifiant le type de dialyse:

- le premier est réalisé avec une dialyse contre NaOH 0,1 mol/L pendant 2h puis contre l'eau milli-Q (HA-blanc1)
- le deuxième subit trois dialyses contre NaOH 0,01 mol/L d'une heure alternée avec une dialyse contre de l'eau milli-Q pendant deux jours suivie d'une dernière dialyse contre de l'eau milli-Q (HA-blanc2).

Ces deux blancs ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique (Figure D-5) pour obtenir leurs caractéristiques macromoléculaires moyennes (Tableau D-5).



**Figure D-5** : Profils d'élution dans LiNO<sub>3</sub> (0,1 mol/L) à 25°C de l'indice de réfraction (trait plein) et de la diffusion de la lumière à 90° (tirets) avec la distribution des masses molaires (points) du HA précurseur (gris), du HA-blanc1 (vert) et du HA-blanc2 (orange)

**Tableau D-5** : Grandeurs caractéristiques moyennes intrinsèques du HA, du HA-blanc1 et du HA-blanc2 obtenues par couplage SEC/MALS/DRI/Visco à une concentration de 1 g/L dans LiNO<sub>3</sub> 0,1 mol/L à 25°C

Échantillon	M <sub>n</sub> (g/mol)	M <sub>w</sub> (g/mol)	M <sub>0</sub> <sup>a</sup> (g/mol)	DP <sub>n</sub> <sup>b</sup>	Rh <sub>(w)</sub> (nm)	[η] <sub>w</sub> (ml/g)	Masse récupérée
HA précurseur	1 480 000	1 680 000	402,3	3 679	82,8	2 252	83 %
HA-blanc1	651 000	835 000	402,3	1 618	57,7	1 547	85 %
HA-blanc2	800 000	966 000	402,3	1 989	63	1 717	88 %

<sup>a</sup> Masse molaire de l'unité de répétition du HA (GAG)

<sup>b</sup> Degré de polymérisation apparent déterminé par la relation : DP<sub>n</sub> = M<sub>n</sub> / M<sub>0</sub>

Nos résultats indiquent clairement une dégradation induite par les étapes de purification, abstraction faite de la réaction de greffage. Nous constatons par ailleurs que la deuxième méthode de dialyse (soude moins concentrée), beaucoup plus douce mais aussi beaucoup plus longue, conduit à une dégradation moins importante du HA. Il semble donc que la solution alcaline entraîne une dégradation via une  $\beta$ -élimination c'est à dire une hydrolyse des enchaînements de sucres en position  $\beta^6$ . Cette dernière, impossible pour le CMP car l'enchaînement des oses est en position  $\alpha$ , expliquerait l'aspect non dégradant de la purification pour les dérivés CMP-FA. Une dégradation due aux réactifs utilisés, présent ici même en absence de FA n'est toutefois pas à exclure.

Ce type de dialyse plus doux au niveau du pH mais malheureusement plus long a été retenu pour la suite de l'étude sur le HA.

### **I.3.2. Teneur en acide férulique**

Souhaitant obtenir des HA avec différents taux de greffage, nous avons utilisé des quantités variables d'acide férulique en maintenant constants les ratios molaires EDC/FA = 1 et EDC/GAG = 1,05 (Tableau D-6). Une étude de répétabilité sur la synthèse a été réalisée pour un taux fixé en FA (HA-ADH-FA3 et HA-ADH-FA4, lignes 2-3).

Ces 5 échantillons ont ensuite été caractérisés (Tableau D-6) d'un point de vue structural par détermination du  $DS_{FA}$  avec les deux méthodes précédemment décrites et d'un point de vue physicochimique par la détermination des distributions de masses molaires.

Les DS obtenus par RMN- $^1H$  ont montré de faibles écarts avec les DS obtenus par le dosage de Folin-Ciocalteu, toujours inférieurs. Cette légère différence peut être attribuée à la viscosité importante des solutions des dérivés les plus greffés qui rend difficile les prises d'essai dans le cas de l'analyse de Folin-Ciocalteu mais également à une possible agrégation des chaînes comme obtenue avec les dérivés PUL-FA. Nous avons donc retenu les valeurs obtenues par RMN- $^1H$ .

**Tableau D-6 : Conditions de synthèse et caractéristiques des dérivés HA-ADH-FA obtenus**

Produit	$\frac{n_{FA}^a}{n_{GAG}}$	Rendement massique	$M_n$ (g/mol) <sup>b</sup>	$DP_n$ <sup>c</sup>	$DS_{FA}$ <sup>d</sup>	pH fin de réaction
<b>HA-ADH-FA2</b>	8,24	87 %	1 002 000	2 355	7,5	4,8
<b>HA-ADH-FA3</b>	4,12	92 %	883 000	2 038	10	5,2
<b>HA-ADH-FA4</b>	4,12	83 %	916 000	2 085	12	5,5
<b>HA-ADH-FA5</b>	2,06	73 %	210 000	485	10	7,7
<b>HA-ADH-FA6</b>	1,03	56 %	51 000	123	4	7,8

<sup>a</sup> Ratio molaire de l'acide férulique (introduit dans la 1<sup>ère</sup> étape) par rapport à l'unité GAG (unité de répétition du HA)

<sup>b</sup> Masse molaire moyenne en nombre déterminée par SEC/MALS/DRI/Visco/UV

<sup>c</sup> Degré de polymérisation apparent déterminé par la relation :  $DP_n = M_n / M_0$  avec  $M_0 = 402,3 + (309,38 \times DS_{FA})$

<sup>d</sup> Degré de substitution expérimental d'acide férulique déterminé par RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15)

La comparaison des résultats obtenus pour HA-ADH-FA3 et HA-ADH-FA4 correspondant à des synthèses identiques indique une bonne répétabilité. Par contre, de façon surprenante, une modification des quantités de FA entraîne une forte variation des masses molaires ainsi que des  $DP_n$ . Abstraction faite de la purification (identique ici pour tous les échantillons), il semble donc que la dégradation puisse être aussi fonction de la quantité de FA présente lors de la synthèse. Plus précisément la dégradation semble être limitée pour les fortes teneurs en FA (i.e. pour HA-ADH-FA2 par exemple comparé à HA-ADH-FA6). La dégradation pouvant être liée à une variation du pH, une mesure du pH en fin de réaction a été réalisée montrant que celui-ci augmentait effectivement pendant la synthèse permettant probablement des  $\beta$ -éliminations. Nos résultats ont aussi indiqué que l'augmentation de pH était limitée pour les fortes teneurs en FA expliquant ainsi les plus faibles dégradations observées. L'excès de FA pourrait alors jouer un rôle de 'tampon' minimisant ainsi l'augmentation du pH.

### I.3.3. Contrôle du pH

Pour confirmer cet effet, nous avons reproduit quelques synthèses fortement dégradantes en réajustant régulièrement le pH à 4,75 par ajout d'HCl pendant environ 6h après l'ajout de l'EDC dans la 2<sup>ème</sup> étape de la synthèse (Tableau D-7). Une augmentation du pH a été détectée avant chaque réajustement.

**Tableau D-7 : Conditions de synthèse et caractéristiques des dérivés HA-ADH-FA obtenus**

Produit	$\frac{n_{FA}^a}{n_{GAG}}$	Ajustement du pH	pH fin de réaction	Rendement massique	$M_n$ (g/mol) <sup>b</sup>	$DP_n^c$	$DS_{FA}^d$
HA-ADH-FA5	2,06	non	7,8	73 %	210 000	485	10
HA-ADH-FA7	2,06	oui	5,8	78 %	200 000	465	9
HA-ADH-FA6	1,03	non	7,8	56 %	51 000	123	4
HA-ADH-FA8	1,03	oui	5,9	58 %	70 000	171	2,5

<sup>a</sup> Ratio molaire de l'acide férulique (introduit dans la 1<sup>ère</sup> étape) par rapport à l'unité GAG (unité de répétition du HA)

<sup>b</sup> Masse molaire moyenne en nombre déterminée par SEC/MALS/DRI/Visco/UV

<sup>c</sup> Degré de polymérisation apparent déterminé par la relation :  $DP_n = M_n / M_0$  avec  $M_0 = 402,3 + (309,38 \times DS_{FA})$

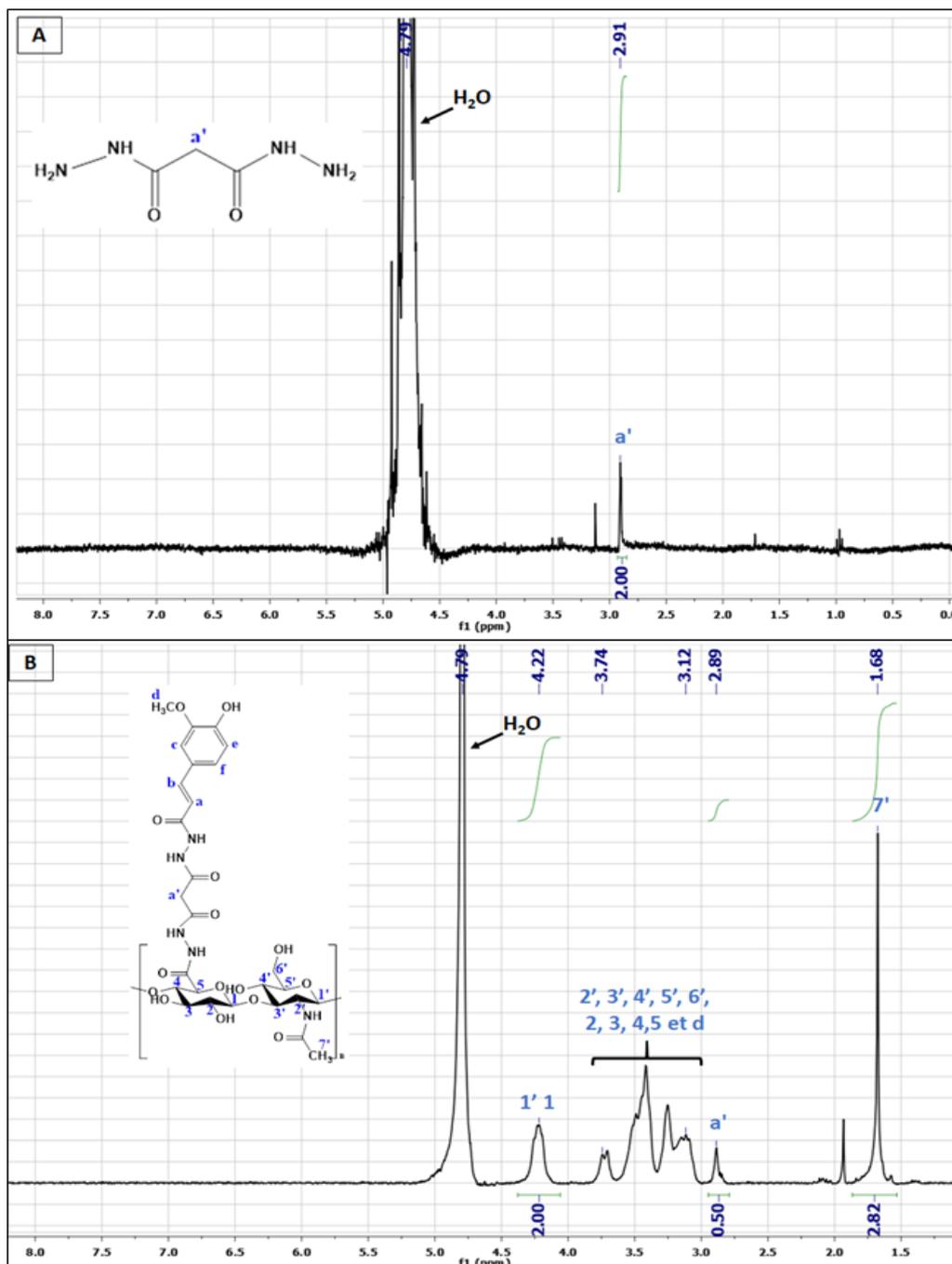
<sup>d</sup> Degré de substitution expérimental d'acide férulique déterminé par RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15)

L'ajustement de ce pH, lorsque la teneur en FA est faible, réduit légèrement la dégradation mais celle-ci reste tout de même très importante.

### I.3.4. Effet de la longueur du bras espaceur

Pour terminer cette partie sur la synthèse des HA-FA, nous avons utilisé un autre bras espaceur l'acide malonique dihydrazide (MDH) qui ne présente qu'un seul groupe CH<sub>2</sub> espaceur contre 4 pour l'ADH, avec toujours les mêmes ratios molaires EDC/FA = 1 et EDC/GAG = 1,05. Comme variable, nous avons modifié la teneur en FA dans le milieu et ajusté ou non le pH. 8 systèmes différents ont été réalisés.

Les DS en FA ont été déterminés par RMN-<sup>1</sup>H et par le dosage de Folin-Ciocalteu. La Figure D-6 représente les spectres RMN-<sup>1</sup>H du MDH et d'un dérivé HA-MDH-FA1.



**Figure D-6 :** Spectres RMN- $^1\text{H}$  dans  $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$  (85/15, v/v) de : **A)** MDH. **B)** HA-MDH-FA1

Le spectre du MDH (Figure D-6-A) présente uniquement un pic à 2,91 ppm qui correspond aux 2 protons en  $\alpha$  des deux groupements carbonyle ( $2\text{H}_{\text{a}'}$ ) tandis que celui du HA-MDH-FA (Figure D-6-B) montre la présence des pics caractéristiques du HA avec l'apparition d'un nouveau pic à 2,89 ppm attribué aux 2 protons du MDH ( $2\text{H}_{\text{a}'}$ ). Comme pour le spectre du HA-ADH-FA1 présenté plus haut, les protons caractéristiques de l'acide férulique ne sont pas détectables.

En ce qui concerne la détermination du  $DS_{FA\ RMN}$ , nous nous sommes référés aux 2 protons anomères du HA ( $\delta = 4,22$  ppm) et aux 2 protons du MDH ( $\delta = 2,89$  ppm) et nous avons appliqué l'équation suivante :

$$\%DS_{FA\ RMN} = \frac{I(H_{a'})}{2} \times 100 \quad (\text{Eq. D2})$$

La méthode de Folin-Ciocalteu donne toujours des valeurs légèrement plus faibles.

Les différentes synthèses sont rassemblées dans le Tableau D-8 avec le rendement massique, la masse molaire moyenne en nombre et le DS en FA du composé obtenu.

**Tableau D-8 : Conditions de synthèse et caractéristiques des dérivés HA-MDH-FA obtenus**

Dérivé	$\frac{n_{FA}^a}{n_{GAG}}$	Ajustement du pH	pH fin de réaction	Rendement massique	Mn (g/mol) <sup>b</sup>	DP <sub>n</sub> <sup>c</sup>	DS <sub>FA</sub> <sup>d</sup>
HA-MDH-FA1	8,24	non	4,9	81%	775 000	1 652	25
HA-MDH-FA2	8,24	non	5	83%	741 000	1 571	26
HA-MDH-FA3	4,12	non	5,4	85%	873 000	1 961	16
HA-MDH-FA4	4,12	non	5,2	93%	793 000	1 761	18
HA-MDH-FA5	2,06	non	7,9	83%	262 000	611	10
HA-MDH-FA6	2,06	oui	5,6	77%	294 000	681	11
HA-MDH-FA7	1,03	non	7,8	53%	28 000	66	8
HA-MDH-FA8	1,03	oui	6,2	62%	42 000	100	6,5

<sup>a</sup> Ratio molaire de l'acide férulique (introduit dans la 1<sup>ère</sup> étape) par rapport à l'unité GAG (unité de répétition du HA)

<sup>b</sup> Masse molaire moyenne en nombre déterminée par SEC/MALS/DRI/Visco/UV

<sup>c</sup> Degré de polymérisation apparent déterminé par la relation :  $DP_n = M_n / M_0$  avec  $M_0 = 402,3 + (267,3 \times DS_{FA})$

<sup>d</sup> Degré de substitution expérimental d'acide férulique déterminé par RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15)

Le MDH présente une plus grande réactivité vis-à-vis du FA et/ou du HA ce qui donne des taux d'incorporation en FA plus importants. En effet HA-MDH-FA1 et HA-ADH-FA3 (Tableau D-6) dans les mêmes conditions, présentent des DS<sub>FA</sub> de 25 et 16% respectivement. Les synthèses avec MDH sont également reproductibles (HA-MDH-FA3 et HA-MDH-FA4) avec toujours une dégradation visible lorsque le FA n'est pas présent en large excès (HA-MDH-FA7 contre HA-MDH-FA1 par exemple). Comme avec ADH, l'ajustement du pH a ici peu d'effet.

## I.4. Conclusion sur le greffage de l'acide férulique sur l'acide hyaluronique

Nous avons réussi à modifier l'acide hyaluronique par l'acide férulique dans des conditions de synthèse similaires à celles utilisées dans le cas des systèmes CMP-FA et en utilisant deux bras espaceurs, l'ADH et le MDH. Dans le cas de l'utilisation de l'ADH, l'efficacité de la réaction de greffage (6-12%) est proche à celle obtenue avec le CMP (9-14%). Une efficacité plus élevée est obtenue lors de l'utilisation du MDH comme bras espaceur (9-25%). Les faibles valeurs d'efficacité sont causées par le rendement limité de la première étape en FA monofonctionnalisé par le bras espaceur.

Contrairement au CMP-ADH-FA, une dégradation sensible des HA-ADH (ou MDH)-FA a été observée due à une augmentation de la basicité du milieu réactionnel détectée lors de la deuxième étape du greffage qui induit l'hydrolyse des chaînes via une  $\beta$ -élimination. Cette dégradation est également effective lors des étapes de purification et notamment de dialyse contre la soude. Après optimisation de l'étape de purification et en particulier la baisse du pH, nous avons réussi à réduire la dégradation des chaînes des dérivés obtenus mais sans pouvoir l'éviter complètement. Une dégradation moins importante est aussi constatée en présence d'un fort taux de FA pendant la première étape de la réaction de greffage en raison du probable rôle tampon du FA qui limite l'augmentation du pH pendant la synthèse de la deuxième étape.

Le HA-blanc2 sera désigné par HA<sub>HM</sub>-ctrl tandis que les différents échantillons de HA-FA seront maintenant codifiés par « HA<sub>x</sub>-bras espaceur-FA-DS<sub>FA RMN</sub> » avec x correspondant à la masse molaire (HM pour forte masse molaire, MM pour moyenne masse molaire), bras espaceur ADH ou MDH et DS<sub>FA RMN</sub> le degré de substitution de FA/GAG déterminé par RMN-<sup>1</sup>H.

Dans la suite de l'étude, nous avons sélectionné sept produits qui nous permet de réaliser une comparaison la plus adéquate : HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-7,5%, HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10%, HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-12%, HA<sub>MM</sub>-ADH-FA-10%, HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-16%, HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-25%, et HA<sub>MM</sub>-MDH-FA-10%. Les caractéristiques de ces dérivés sont regroupées dans le Tableau D-9.

**Tableau D-9 : Caractéristiques des dérivés sélectionnés pour la suite de l'étude**

Dérivé	DS <sub>FA RMN</sub> (%) <sup>a</sup>	Mn (g/mol) <sup>b</sup>
HA <sub>HM</sub> -ADH-FA-7,5%	7,5	1 002 000
HA <sub>HM</sub> -ADH-FA-10%	10	883 000
HA <sub>HM</sub> -ADH-FA-12%	12	916 000
HA <sub>MM</sub> -ADH-FA-10%	10	210 000
HA <sub>HM</sub> -MDH-FA-16%	16	873 000
HA <sub>HM</sub> -MDH-FA-25%	25	775 000
HA <sub>MM</sub> -MDH-FA-10%	10	262 000

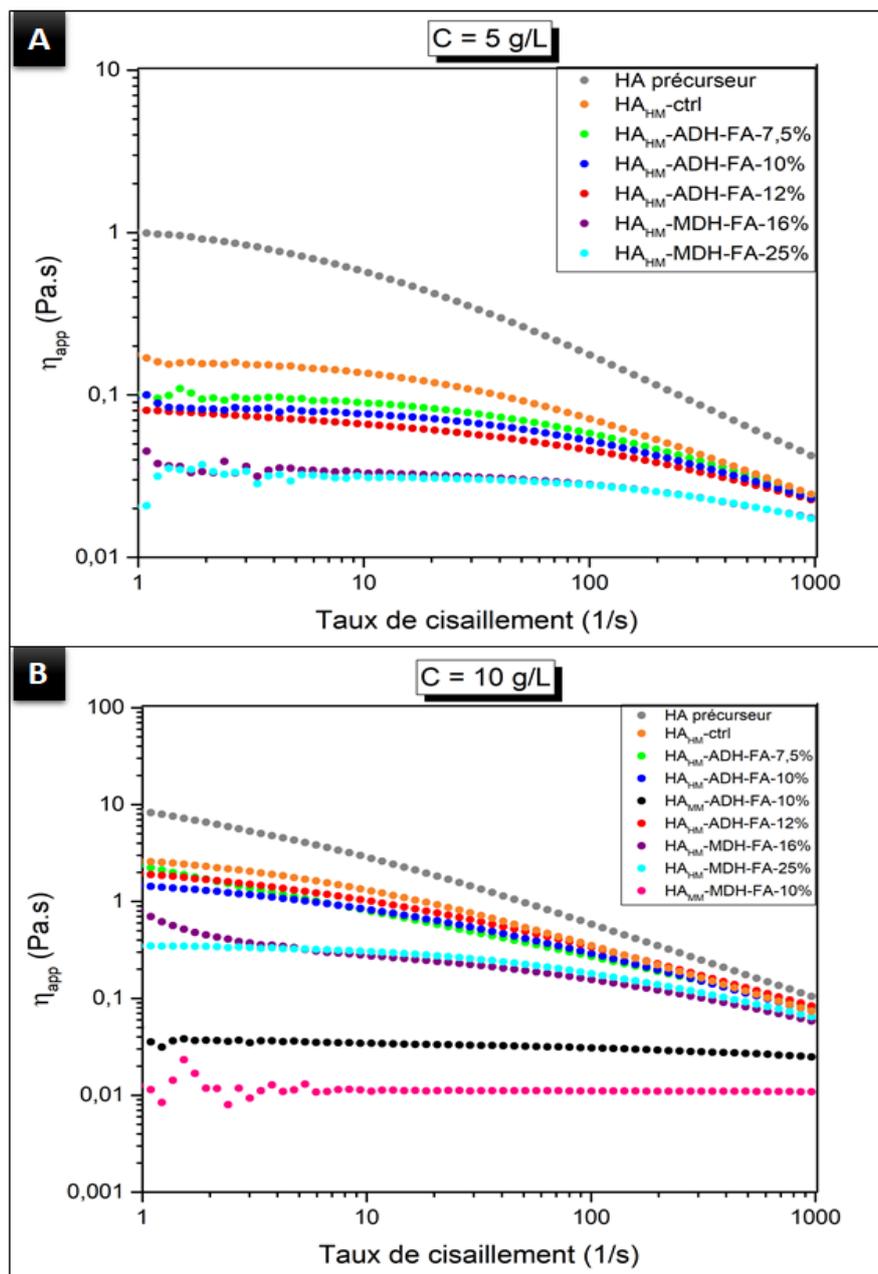
<sup>a</sup> Degré de substitution expérimental d'acide férulique déterminé par RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15)

<sup>b</sup> Masse molaire moyenne en nombre déterminée par SEC/MALS/DRI/Visco/UV

## II. Mesures rhéologiques

### II.1. Mesures en écoulement

Les propriétés d'écoulement des solutions des différents dérivés HA-FA ont été étudiées par des mesures rhéologique en régime permanent (cisaillement entre 1 et 100 s<sup>-1</sup>) dans le tampon citrate/phosphate 0,1 mol/L (pH=5,5) à des concentrations de 5 et 10 g/L. Nous avons reporté les comportements du HA précurseur, du HA<sub>HM</sub>-ctrl et des dérivés HA-FA à des concentrations de 5 et 10 g/L (Figure D-7-A et B).



**Figure D-7 :** Courbes d'écoulement (rampe = 1 – 1000 s<sup>-1</sup>) à 25°C du HA précurseur (gris), HA<sub>HM</sub>-ctrl (orange), HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-7,5% (vert), HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10% (bleu), HA<sub>MM</sub>-ADH-FA-10% (noir), HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-12% (rouge), HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-16% (violet), HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-16% (bleu ciel) et HA<sub>MM</sub>-MDH-FA-10% (rose) à une concentration de : **A)** 5 g/L. **B)** 10 g/L

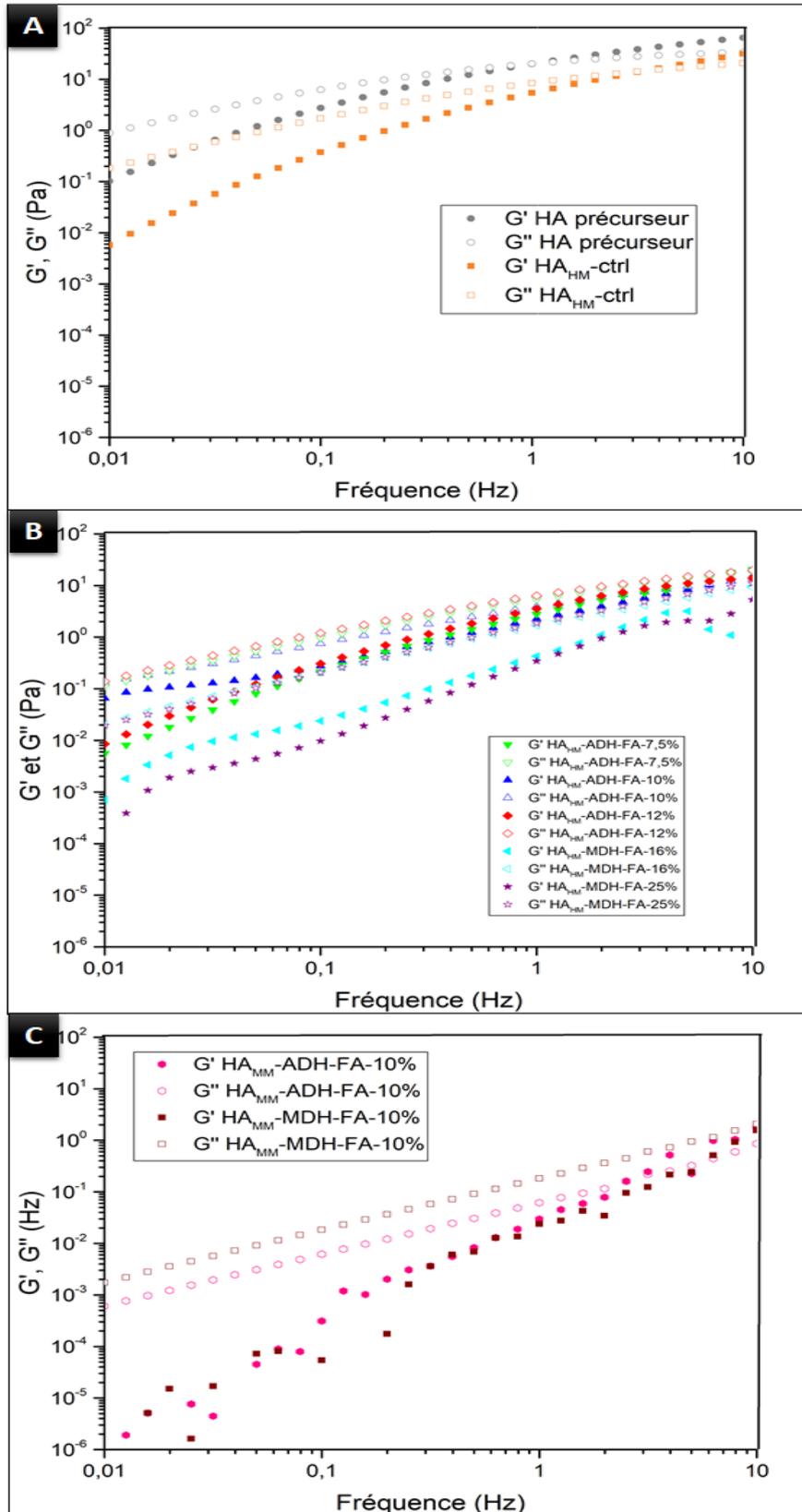
À 5g/L, les échantillons MM (masses molaires moyennes 210 et 262kDa) sont encore dans le régime dilué, c'est la raison pour laquelle nous n'avons reporté que les échantillons HM (fortes masses molaires) et le précurseur pour lesquels la concentration critique d'enchevêtrement est dépassée ( $C^*$  de 1 à 3g/L selon la masse molaire moyenne). Le précurseur HA présente la plus forte viscosité avec un comportement rhéofluidifiant marqué. HA<sub>HM</sub>-ctrl présente une viscosité largement diminuée comparé au précurseur en raison de la dégradation

des masses molaires mise en évidence pendant la purification. Le caractère rhéofluidifiant est toujours présent mais logiquement moins marqué en rapport avec un temps de relaxation plus rapide. Les dérivés HA<sub>HM</sub>-ADH-FA possèdent des viscosités sensiblement inférieures à celle du HA<sub>HM</sub>-ctrl et en particulier d'autant plus faibles que le DS en FA est élevé avec un comportement faiblement rhéofluidifiant. Avec des masses molaires ayant le même ordre de grandeur que celle HA<sub>HM</sub>-ctrl, ces résultats peuvent être attribués à l'établissement d'interactions hydrophobes intramoléculaires prédominantes même à une concentration à priori supérieure à C\*. Ce comportement pourrait être caractéristique des polysavons comme ceux obtenus avec des CMP greffés aminogaiacol par *Kouassi et al*<sup>7</sup>.

Les mêmes conclusions peuvent être apportées pour 10g/L (Figure D-7-B) si ce n'est que le comportement rhéofluidifiant n'apparaît même pas pour les échantillons MM pour lesquelles le C\* n'est peut-être pas encore atteint.

## **II.2. Mesures dynamiques**

L'étude des propriétés viscoélastiques des différentes solutions a été réalisée par des mesures rhéologiques en régime dynamique avec un balayage de fréquence entre 0,01 et 10 Hz sur le domaine de linéarité des propriétés viscoélastiques (à des contraintes comprises entre 0,2 et 0,5 Pa selon la concentration). Les Figures D-8 A, B et C représentent les courbes obtenues à 10g/L en gardant la même échelle pour les valeurs de modules facilitant la comparaison des comportements.



**Figure D-8** : Variations de  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 25°C d'une solution à 10 g/L de : **A**) HA précurseur (gris) et HA<sub>HM</sub>-ctrl (orange). **B**) HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-7,5% (vert), HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10% (bleu), HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-12% (rouge), HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-16% (bleu ciel) et HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-25% (violet). **C**) HA<sub>MM</sub>-ADH-FA-10% (rose) et HA<sub>MM</sub>-MDH-FA-10% (marron)

La Figure D-8-A permet de confirmer le caractère dégradant du milieu alcalin de purification. En effet, les spectres mécaniques des deux solutions de HA précurseur et HA<sub>HM-ctrl</sub> apparaissent dans le domaine viscoélastique. On remarque bien un déplacement des courbes se traduisant par une évolution du point de croisement des modules qui permet d'accéder à une fréquence critique ( $\omega_c$ ), de 1 Hz et 6 Hz respectivement pour HA précurseur et HA<sub>HM-ctrl</sub>. Ces résultats correspondent à des temps de relaxation ( $\tau_r=1/(\omega_c)$ ) de 1s et de 0,15s environ pour HA précurseur et HA<sub>HM-ctrl</sub> confirmant bien les comportements observés en écoulement (Figure D-7). Toutes les solutions obtenues à partir des HA<sub>HM-FA</sub> apparaissent dans le domaine visqueux ( $G'' \gg G'$ ) sur toute la gamme de fréquence étudiée. Les deux solutions HA<sub>MM-FA</sub> ont des valeurs de module encore plus faibles. Tous ces résultats confirment également les comportements discutés ci-dessus en mode permanent.

### **III. Gélification**

#### **III.1. Mode d'obtention des hydrogels HA-FA**

Les hydrogels HA-FA sont obtenus en utilisant la même procédure que les hydrogels de PUL-FA et de CMP-FA détaillée précédemment (voir Chapitre C-III.1.). Les concentrations utilisées (5, 10 et 15 g/L) sont plus faibles en raison des plus fortes masses molaires et d'une rigidité plus marquée pour le HA.

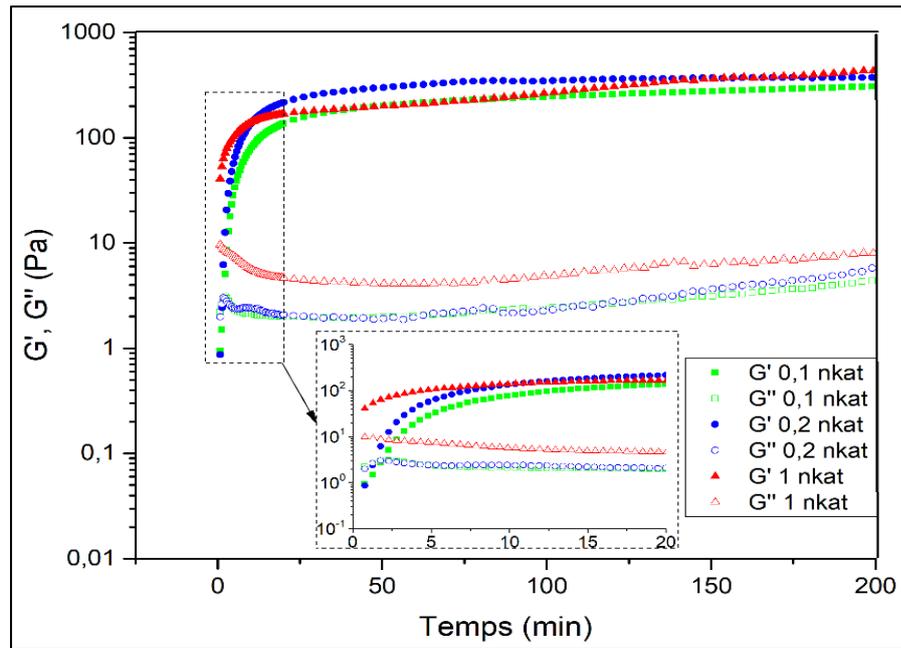
#### **III.2. Etude rhéologique**

Les viscosités importantes des solutions de HA-FA avant gélification permettent d'utiliser une géométrie cône-plan 4 cm à la place de la géométrie 'doubles-cylindres concentriques'. Cette géométrie permet de travailler avec un plus petit volume. La laccase est ajoutée directement à la solution de HA-FA déposée préalablement sur le plateau du rhéomètre.

Une étude rhéologique de la cinétique de formation des hydrogels de HA-FA a été menée afin d'évaluer séparément l'influence de l'activité enzymatique, du degré de substitution en acide férulique ( $DS_{FA}$ ), de la concentration en HA-FA, la longueur du bras espaceur et la masse molaire.

##### **III.2.1. Influence de la quantité d'enzyme**

L'effet de l'activité enzymatique sur la cinétique de la gélification et les propriétés viscoélastiques a été examiné sur les hydrogels formés à partir des solutions de HA<sub>HM-ADH-FA-10%</sub> en fixant la concentration à 10 g/L avec différentes quantités d'enzyme (0,1, 0,2 et 1 nkat). La Figure D-9 représente les courbes obtenues de  $G'$  et  $G''$  en fonction du temps.



**Figure D-9 :** Influence de l'activité enzymatique sur la réaction de gélification et les propriétés des hydrogels : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1Hz en fonction du temps de réaction de gélification à 25°C de solution  $HA_{HM}$ -ADH-FA-10% à 10 g/L dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) en utilisant une activité de laccase de 0,1 nkat (vert), 0,2 nkat (bleu) et 1 nkat (rouge)

Confirmant les tendances observées avec le CMP, la Figure D-9 et le Tableau D-10 montrent que la formation des hydrogels est très rapide (inférieure à 2 min) et logiquement plus rapide quand la quantité d'enzyme est importante. Les modules élastiques au temps long (plateau) sont quasiment identiques quelle que soit l'activité en enzyme. Ces résultats sont bien en accord avec le rôle catalytique de la laccase.

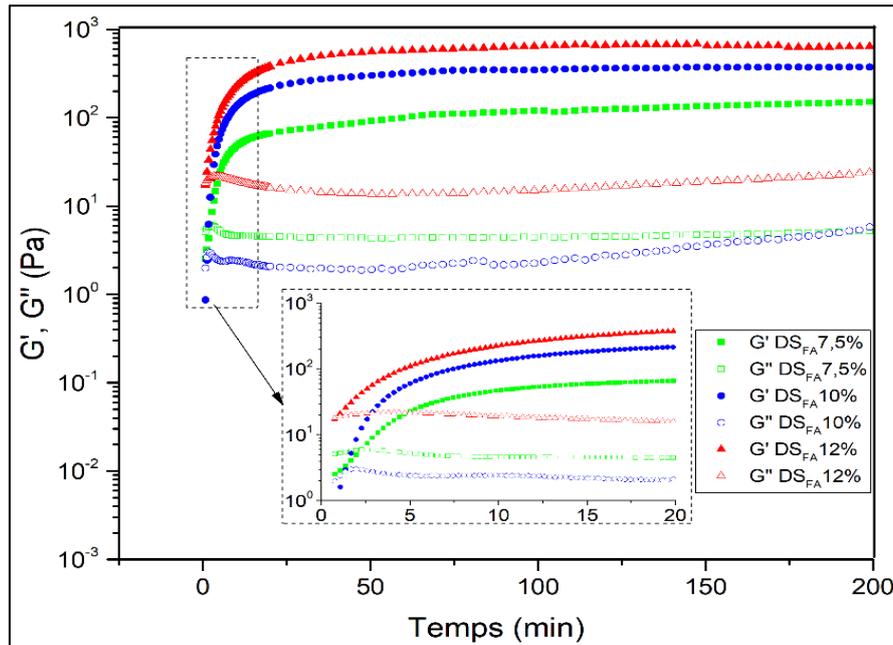
**Tableau D-10 :** Données rhéologiques des réactions de réticulation des solutions  $HA_{HM}$ -ADH-FA-10% à 10g/L dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) à 25°C

Produit	[C] (g/L)	AE (nkat)	$t_{gel}^a$ (min)	$G'_{plateau}$ (Pa)	$G''_{plateau}$ (Pa)	$\tan \delta$
$HA_{HM}$ -ADH-FA-10%	10	0,1	1,9	310	4	0.01
		0,2	1,4	350	6	0,02
		1	-	400	8	0.02

<sup>a</sup> Temps au point d'intersection  $G' = G''$

### III.2.2. Influence du degré de substitution

Pour évaluer l'effet du  $DS_{FA}$ , nous avons analysé par rhéologie trois échantillons obtenus avec le même espaceur (i.e. ADH), de masses molaires équivalentes, de concentration et d'activité enzymatique fixes 10 g/L et 0,2 nkat, respectivement. Les analyses sont réalisées sur les dérivés  $HA_{HM-ADH-FA-7,5\%}$ ,  $HA_{HM-ADH-FA-10\%}$  et  $HA_{HM-ADH-FA-12\%}$  (Figure D-10).



**Figure D-10 :** Influence du degré de substitution sur la réaction de gélification et les propriétés des hydrogels : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de gélification par la laccase (0,2 nkat) à 25°C de solution  $HA_{HM-ADH-FA-7,5\%}$  (vert),  $HA_{HM-ADH-FA-10\%}$  (bleu) et  $HA_{HM-ADH-FA-12\%}$  (rouge) à 10 g/L dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5)

**Tableau D-11 :** Données rhéologiques des réactions de réticulation des solutions  $HA_{HM-ADH-FA}$  avec différents  $DS_{FA}$  dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) à 25°C

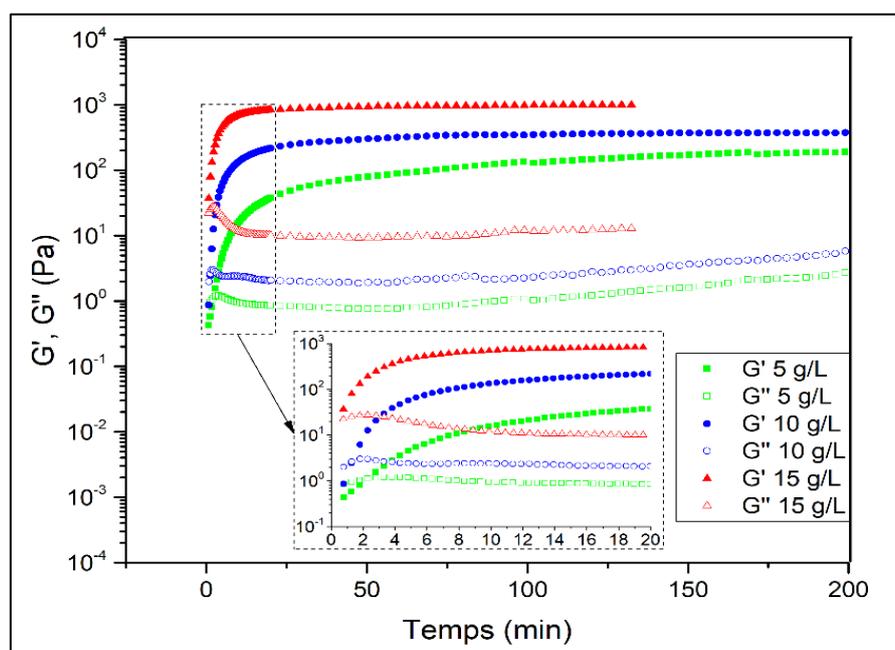
Produit	[C] (g/L)	AE (nkat)	$t_{gel}^a$ (min)	$G'_{plateau}$ (Pa)	$G''_{plateau}$ (Pa)	$\tan \delta$
$HA_{HM-ADH-FA-7,5\%}$	10	0,2	2,3	150	5	0,03
$HA_{HM-ADH-FA-10\%}$	10	0,2	1,4	350	6	0,02
$HA_{HM-ADH-FA-12\%}$	10	0,2	1	640	24	0,04

<sup>a</sup> Temps au point d'intersection  $G' = G''$

Nous remarquons une augmentation sensible des valeurs de module élastique ( $G'$ ) au plateau (i.e. en fin de réticulation) avec le degré de substitution (Figure D-10, Tableau D-11). L'augmentation du  $DS_{FA}$  conduit donc logiquement à une augmentation des points de réticulation entre les chaînes de HA. Nous observons également que la cinétique est accélérée ( $t_{gel}$  diminue) par l'augmentation du  $DS_{FA}$ . Ces résultats confirment globalement les tendances observées pour les dérivés CMP-FA.

### III.2.3. Influence de la concentration

L'influence de la concentration sur les propriétés mécaniques des hydrogels et sur la cinétique de la réaction de gélification a été également mise en évidence en réalisant des mesures rhéologiques sur le dérivé  $HA_{HM}$ -ADH-FA-10% en variant la concentration (5, 10 et 15 g/L) après avoir fixé la quantité d'enzyme à 0,2 nkat pour ne pas être trop rapide (Figure D-11 et Tableau D-11).



**Figure D-11 :** Influence du degré de substitution sur la réaction de gélification et les propriétés des hydrogels : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de gélification par la laccase (0,2 nkat) à 25°C de solution  $HA_{HM}$ -ADH-FA-10% à 5 g/L (vert), 10g/L (bleu) et 15 g/L (rouge) dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5)

**Tableau D-12 : Données rhéologiques des réactions de réticulation des solutions HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10% dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) à 25°C**

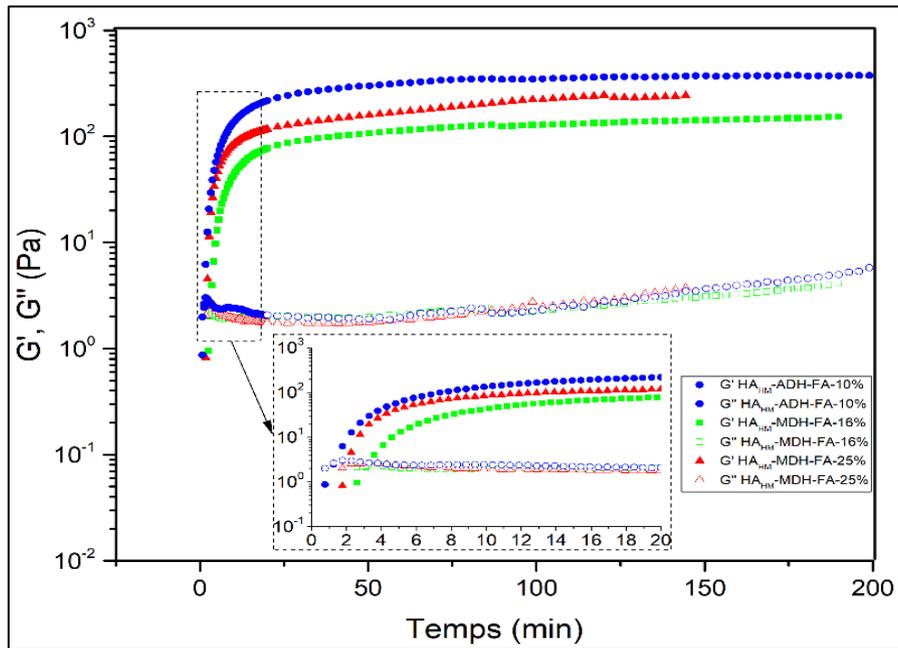
Produit	[C] (g/L)	AE (nkat)	t <sub>gel</sub> <sup>a</sup> (min)	G' <sub>plateau</sub> (Pa)	G'' <sub>plateau</sub> (Pa)	tan δ
HA <sub>HM</sub> -ADH-FA-10%	5	0,2	2,3	190	3	0.01
	10	0,2	1,4	350	6	0,02
	15	0,2	-	1000	13	0.01

<sup>a</sup> Temps au point d'intersection G' = G''

Ce paramètre n'avait pas été étudié avec les dérivés CMP-FA. La Figure D-11 et le Tableau D-12 montrent que l'augmentation de la concentration entraîne une très importante augmentation du module G' au plateau (G' passe de 190 à 1000 Pa en augmentant la concentration de 5 à 15 g/L). La cinétique est clairement accélérée avec l'augmentation de la concentration en HA modifié. Ces résultats apparaissent assez logiques compte tenu de l'enchevêtrement des chaînes de HA qui est évidemment directement corrélé à la concentration en polymères. L'augmentation de la concentration conduit bien à un enchevêtrement des chaînes macromoléculaires plus important formant ainsi un réseau plus dense avec un seuil de percolation des chaînes plus rapidement atteint.

### III.2.4. Influence du bras espaceur

Il est difficile de comparer l'influence du bras espaceur (ADH et MDH) sur la gélification car nous n'avons pas réussi à obtenir des HA-(ADH ou MDH)-FA avec à la fois le même DS<sub>FA</sub> et la même masse molaire. En effet avec le MDH, l'incorporation du FA est beaucoup plus favorable et les DS<sub>FA</sub> obtenus plus importants (HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-16% et HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-25%).



**Figure D-12** : Influence du bras espaceur sur la réaction de gélification et les propriétés des hydrogels : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de gélification par la laccase (0,2 nkat) à 25°C de solution  $HA_{HM}$ -ADH-FA-10% (bleu),  $HA_{HM}$ -MDH-FA-16% (vert) et  $HA_{HM}$ -MDH-FA-25% (rouge) à 10 g/L dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5)

**Tableau D-13** : Données rhéologiques des réactions de réticulation des solutions HA-FA avec les deux différents bras espaceurs dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) à 25°C

Produit	[C] (g/L)	AE (nkat)	$t_{gel}^a$ (min)	$G'_{plateau}$ (Pa)	$G''_{plateau}$ (Pa)	$\tan \delta$
$HA_{HM}$ -ADH-FA-10%	10	0,2	1,4	350	6	0,02
$HA_{HM}$ -MDH-FA-16%	10	0,2	3,7	150	4	0,03
$HA_{HM}$ -MDH-FA-25%	10	0,2	2,1	220	4	0,02

<sup>a</sup> Temps au point d'intersection  $G' = G''$

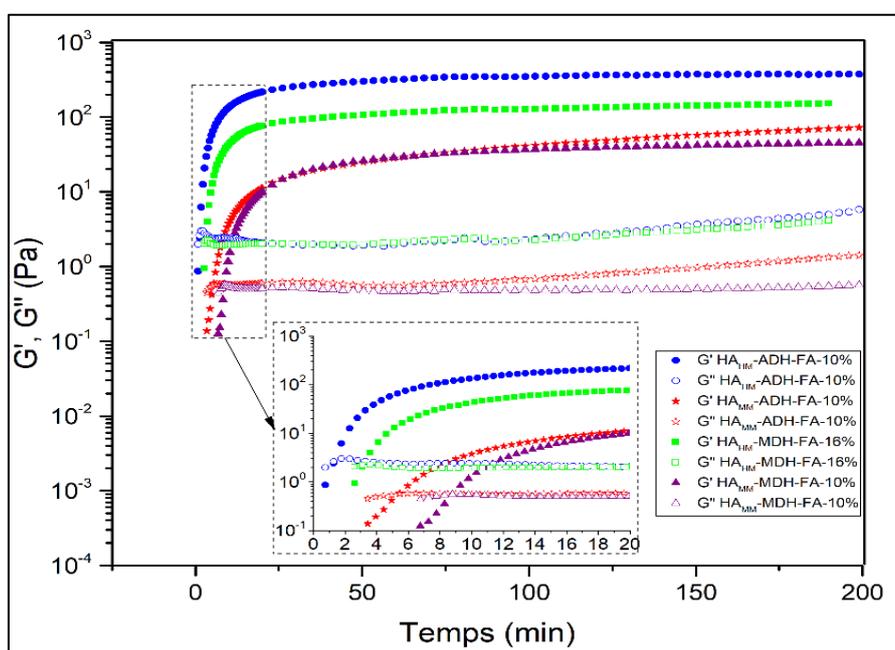
MDH constitue un bras espaceur plus court que ADH, en d'autres termes les FA sont plus proches de la chaîne de HA avec la rotule MDH. Si cette particularité semble favorable pour le greffage de FA sur HA, il semble que le bras espaceur plus court limite la réaction de réticulation entre les FA. En effet le nombre de liens de réticulation semble plus faible avec  $HA_{HM}$ -MDH-FA 25% ( $G'_{plateau}$  à 220Pa) qu'avec  $HA_{HM}$ -ADH-FA 10% ( $G'_{plateau}$  à 350) en dépit

d'un  $DS_{FA}$  plus fort. Les cinétiques sont également ralenties pour les dérivés MDH comparé aux dérivés ADH toujours en dépit d'un  $DS_{FA}$  plus élevé pour les dérivés MDH.

La réactivité des FA greffés vis-à-vis de la laccase est donc limitée quand FA est proche du squelette HA. Ceci peut s'expliquer par une accessibilité plus difficile de la laccase en direction des FA greffés, elle-même due soit à la position des FA sur les chaînes de HA, soit au caractère associatif des FA. Pour autant, nos résultats en dilué (non montrés ici) n'ont pas indiqué que les dérivés MDH était plus associatifs que les dérivés ADH : même viscosité intrinsèque pour des ordres de grandeurs de masses molaires équivalentes. Il semble donc bien que ce soit uniquement la position des FA greffés, trop proche de la chaîne de HA qui limite l'accès de l'enzyme.

### III.2.5. Influence de la masse molaire

L'effet de la masse molaire sur la réaction de réticulation est examiné sur le comportement rhéologique des solutions de  $HA_{HM}$ -ADH-FA-10%,  $HA_{MM}$ -ADH-FA-10%,  $HA_{HM}$ -MDH-FA-16% et  $HA_{MM}$ -MDH-FA-10% à une concentration et quantité d'enzyme fixes à 10 g/L et 0,2 nkat, respectivement (Figure D-13 et Tableau D-14).



**Figure D-13** : Influence de la masse molaire sur la réaction de gélification et les propriétés des hydrogels : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de gélification par la laccase (0,2 nkat) à 25°C de solution  $HA_{HM}$ -ADH-FA-10% (bleu),  $HA_{MM}$ -ADH-FA-10% (rouge)  $HA_{HM}$ -MDH-FA-16% (vert) et  $HA_{MM}$ -MDH-FA-10% (violet) à 10 g/L dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5)

Avant d'analyser les courbes obtenues, rappelons que les dérivés dégradés HA<sub>MM</sub>-ADH-FA-10% et HA<sub>MM</sub>-MDH-FA-10% possèdent des masses molaires moyennes en nombre respectives de  $210 \times 10^3$  et  $262 \times 10^3$  g/mol tandis que les dérivés HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10% et HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-16% possèdent des masses molaires moyennes en nombre  $883 \times 10^3$  et  $873 \times 10^3$  g/mol, respectivement.

**Tableau D-14 : Données rhéologiques des réactions de réticulation des solutions HA-FA à haute et moyenne masse molaire dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) à 25°C**

Produit	[C] (g/L)	AE (nkat)	t <sub>gel</sub> <sup>a</sup> (min)	G' <sub>plateau</sub> (Pa)	G'' <sub>plateau</sub> (Pa)	tan δ
HA <sub>HM</sub> -ADH-FA-10%	10	0,2	1,4	350	6	0,02
HA <sub>MM</sub> -ADH-FA-10%	10	0,2	5,5	70	1,4	0,02
HA <sub>HM</sub> -MDH-FA-16%	10	0,2	3,7	150	4	0,03
HA <sub>MM</sub> -MDH-FA-10%	10	0,2	8,8	45	0,6	0,01

<sup>a</sup> Temps au point d'intersection  $G' = G''$

Tout paramètre égal par ailleurs, l'augmentation de la masse molaire entraîne une augmentation sensible du module G' au plateau (i.e. nombre de liens créés) et une accélération de la réticulation. L'effet est finalement identique à celui d'une augmentation de la concentration en polymère à masse molaire constante. L'influence de la masse molaire est ainsi logiquement corrélée au degré d'enchevêtrement des chaînes de HA.

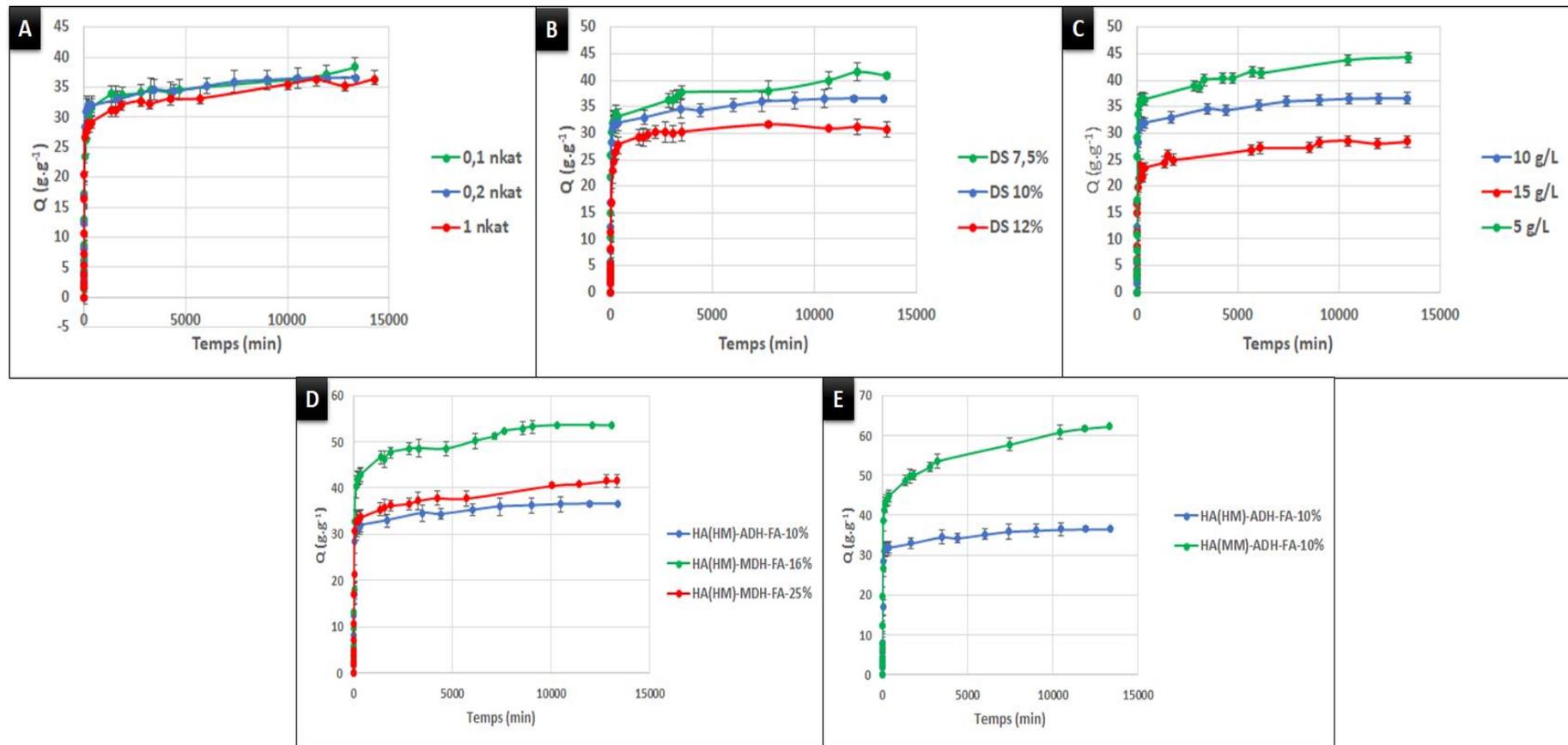
### III.3. Propriétés de gonflement

L'étude des propriétés de gonflement a été réalisée dans un premier temps dans l'eau pure, puis nous avons modifié le milieu (pH et force ionique) compte tenu du caractère anionique de l'hydrogel.

#### III.3.1 Influence des paramètres intrinsèques

Les paramètres intrinsèques dans le cas des hydrogels à base de HA-FA sont la quantité d'enzyme utilisée lors de la réaction de réticulation, le degré de substitution en acide férulique, la concentration des solutions initiales en HA-FA, la longueur du bras espaceur utilisée lors de la réaction du greffage de l'acide férulique sur l'acide hyaluronique et finalement la masse molaire du HA modifié par l'acide férulique.

Les effets de tous ces paramètres sont regroupés dans la Figure D-14.



**Figure D-14 :** Influence sur les propriétés de gonflement dans l'eau milli Q à température ambiante de : **A)** l'activité enzymatique pour l'hydrogel obtenu à partir de HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10% (10 g/L). **B)** le degré de substitution en acide férulique pour les hydrogels obtenus à partir de HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-7,5%, HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10% et HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-12% à 10 g/L avec une activité enzymatique de 0,2 nkat. **C)** la concentration en polysaccharide pour les hydrogels obtenus à partir de de HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10% avec une activité enzymatique de 0,2 nkat. **D)** la longueur du bras espaceur pour les hydrogels obtenus à partir de de HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10%, HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-16% et HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-25% à 10 g/L avec une activité enzymatique de 0,2 nkat. **E)** la masse molaire pour les hydrogels obtenus à partir de de HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10%, HA<sub>MM</sub>-ADH-FA-10% à 10 g/L avec une activité enzymatique de 0,2 nkat

Dans leur ensemble, ces courbes sont parfaitement corrélées aux résultats obtenus en rhéologie. Et très logiquement le gonflement varie de façon inversement proportionnelle au module élastique au plateau ( $G'_{\text{plateau}}$ ).

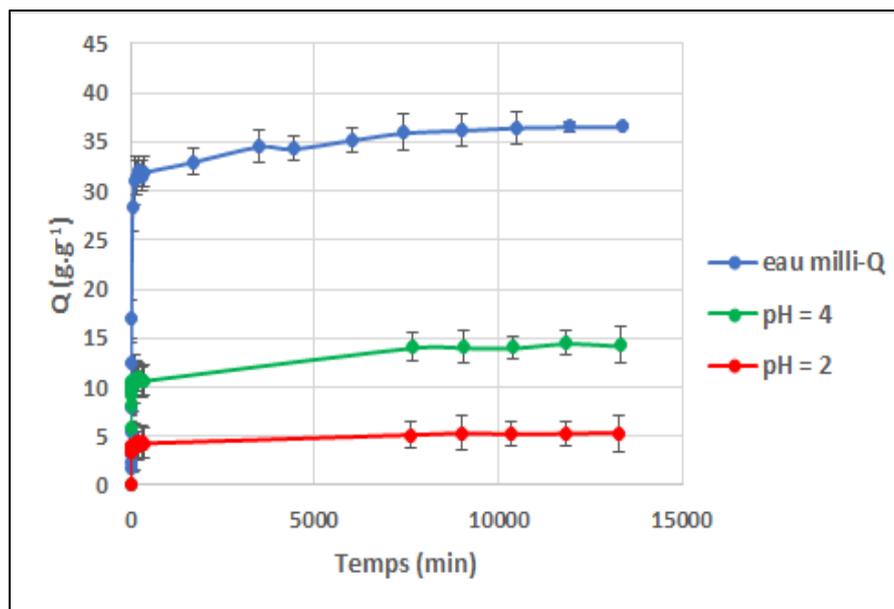
L'activité enzymatique n'a ainsi aucun impact sur les propriétés de gonflement des hydrogels (Figure D-14-A). L'augmentation du  $DS_{\text{FA}}$  conduit à une diminution du gonflement suite à l'augmentation de la densité de réticulation (Figure D-14-B). L'augmentation de la concentration (Figure D-14-C) réduit le gonflement en raison de l'enchevêtrement plus prononcé des chaînes polymères constituant le réseau de l'hydrogel obtenu. L'influence du bras espaceur sur les propriétés de gonflement des hydrogels élaborés (Figure D-14-D) sont également cohérents avec les valeurs de modules obtenues précédemment. En ce qui concerne la masse molaire (Figure D-14-E), les hydrogels synthétisés avec les plus faibles masses molaires présentent logiquement des taux de gonflement très importants.

Ces courbes de gonflement confirment aussi les analyses réalisées avec les CMP-FA.

### **III.3.2. Influence des paramètres externes**

#### **III.3.2.1. Effet du pH**

Pour évaluer l'influence du pH sur les propriétés de gonflement des hydrogels HA-FA, nous avons choisi de suivre la cinétique de gonflement de l'hydrogel élaboré à partir du dérivé  $HA_{\text{HM}}\text{-ADH-FA-10\%}$  avec une concentration de 10 g/L et une activité enzymatique de 0,2 nkat dans 3 milieux différents : l'eau milli-Q et deux solutions aqueuses acides une à pH 4 et l'autre à pH 2 (Figure D-15).

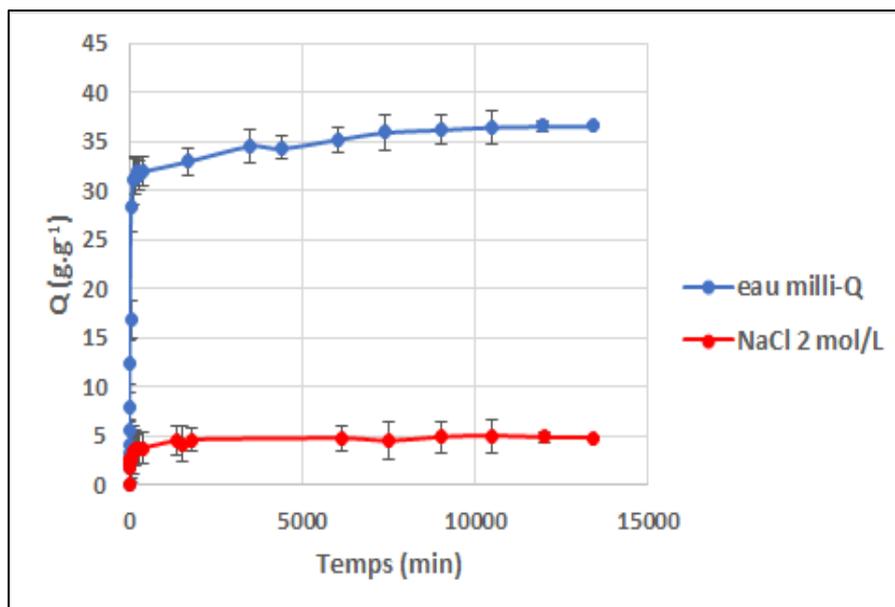


**Figure D-15 :** Influence du pH sur les propriétés de gonflement de l'hydrogel obtenu à partir de  $\text{HA}_{\text{HM}}\text{-ADH-FA-10\%}$  à 10 g/L avec une activité enzymatique de 0,2 nkat

Une baisse très importante des propriétés de gonflement de l'hydrogel, respectivement 3,5 et 7 fois moins, est observée en diminuant le pH du milieu à 4 et à 2. En effet, l'augmentation de l'acidité du milieu induit la protonation des fonctions carboxylate du HA, par conséquent les répulsions de nature électrostatique entre sites chargés deviennent de moins en moins significatives, les chaînes de polymères deviennent plus souples et le maillage du réseau est réduit. Par conséquent, le volume d'eau retenue donc le gonflement, diminue. Nous avons également remarqué le même effet du pH dans le cas des hydrogels CMP-FA lors de l'utilisation du milieu citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH= 5,5) (voir Chapitre D-I.3.3.2).

### III.3.2.2. Effet de la salinité du milieu

L'étude suivante porte sur l'évaluation de l'influence de la présence de cations sur la capacité d'absorption des hydrogels HA-FA. Pour cette raison, nous avons utilisé une solution concentrée de NaCl (2 mol/L) (Figure D-16).



**Figure D-16 :** Influence de la salinité du milieu sur les propriétés de gonflement de l'hydrogel obtenu à partir de HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-10% à 10 g/L avec une activité enzymatique de 0,2 nkat

Nous constatons une chute très sensible du taux de gonflement de l'hydrogel qui passe de 36 g×g<sup>-1</sup> à 5 g×g<sup>-1</sup>. Cette conséquence bien connue, s'explique par l'effet d'écran créé sur les groupes carboxylate du HA par l'insertion des contre ions entre les chaînes macromoléculaires conduisant aux mêmes conséquences que la protonation observée ci-avant. Le même effet a été observé dans le cas des hydrogels de CMP-FA immergés dans le milieu NaCl 0,15 mol/L<sup>2</sup>.

### III.4. Conclusion sur la gélification

La capacité de la laccase à créer des points de réticulation via son action sur les motifs d'acide férulique préalablement greffés sur l'acide hyaluronique a été de nouveau confirmée.

La forte masse molaire du HA ainsi que sa rigidité intrinsèque permet de travailler à des concentrations comprises entre 5 et 15g/L. Le module élastique des hydrogels obtenus peut atteindre des valeurs de 1000 Pa confirmant de bonnes propriétés mécaniques. Les différents hydrogels présentent des gonflements dans l'eau pure allant de 25 à 50 g×g<sup>-1</sup>, gonflement qui s'effondre logiquement en acidifiant le milieu ou en présence d'une force ionique en raison de la réduction des répulsions électrostatiques.

## **Conclusion**

Le greffage de l'acide férulique (FA) sur des polysaccharides anioniques nécessite une autre chimie que celle mise en œuvre pour les polysaccharides neutres. Nous avons ainsi réussi à greffer FA sur le CMP et sur le HA dans un solvant mixte vert (eau/éthanol) en utilisant la chimie des carbodiimides (bien connue au laboratoire) et une molécule intermédiaire bifonctionnelle jouant aussi le rôle de bras espaceur (ADH pour les CMP et ADH ou MDH pour HA).

La fonctionnalisation des CMP s'est avérée assez efficace et n'entraîne pas de dégradation notable. Les dérivés CMP-FA obtenus présentent un caractère amphiphile en raison des groupes FA hydrophobes greffés sur la chaîne anionique hydrophile du CMP. Cette particularité est à l'origine du caractère associatif mis en évidence notamment en régime dilué. Celui-ci est toutefois beaucoup moins marqué que pour les homologues PUL-FA neutres. En régime semi-dilué (i.e. au-dessus de  $C^*$ ), la réticulation chimique des CMP-FA par l'enzyme laccase a été mise en évidence avec la formation d'hydrogels percolés suivie par rhéologie ( $G'_{\text{Plateau}}$  et  $t_{\text{gel}}$ ) et gonflement. Ces études montrent que la cinétique de réticulation est logiquement accélérée quand la quantité d'enzyme (activité enzymatique) mais aussi quand le  $DS_{\text{FA}}$  augmentent (si le caractère associatif trop important ne vient pas limiter la réticulation). Les propriétés mécaniques du réseau formé sont améliorées quand le nombre de liens créés augmente ( $G'_{\text{Plateau}}$  augmente en même temps que le gonflement diminue). Ceci est observé quand  $DS_{\text{FA}}$  augmente tandis que l'activité enzymatique (simple catalyseur) n'a aucun effet. Le caractère anionique du CMP, plus rigide que son homologue pullulane neutre, permet aussi d'atteindre le régime semi-dilué, nécessaire à la réticulation, pour des concentrations beaucoup plus faibles (20g/L pour CMP-FA contre 100g/L pour PUL-FA). Par contre le caractère anionique des hydrogels élaborés entraîne une forte sensibilité de leurs propriétés de gonflement au pH et à la force ionique.

La fonctionnalisation du HA est également possible mais plus délicate en raison d'une importante dégradation constatée suite à l'hydrolyse des chaînes du HA via des  $\beta$ -éliminations causées par l'augmentation de la basicité du milieu réactionnel lors des étapes de greffage et de purification (dialyse). Cette dégradation est réduite lorsque le nombre d'équivalent de FA/GAG est élevé en raison d'un effet tampon apporté par la présence en forte quantité d'acide férulique n'ayant pas réagi. Pour améliorer cette synthèse, il serait sans doute nécessaire d'utiliser un tampon externe type phosphate ou MES (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique) par exemple. Le greffage de FA est par ailleurs favorisé en utilisant une rotule MDH plus courte

que l'ADH. Le caractère amphiphile des dérivés greffés et leur tendance à l'association, probablement effective, est toutefois plus complexe à interpréter en régime dilué que pour les dérivés à base de pullulane ou de CMP en raison de la dégradation constatée. L'étude rhéologique en régime semi-dilué, sur les solutions de HA-FA (non menée sur les dérivés CMP-FA) confirme la réduction de masses molaires et semble aussi indiquer la présence d'interactions hydrophobes avec un comportement partiellement de type polysavon. La réticulation en présence de laccase est toutefois largement possible. Les hydrogels de HA se comportent globalement de manière identique à leurs homologues CMP-FA en fonction des paramètres du type activité enzymatique ou  $DS_{FA}$ . Les effets de la concentration et/ou de la masse molaire en HA ont été étudiés indiquant une forte corrélation des propriétés mécaniques et de la cinétique avec l'état de l'enchevêtrement des chaînes. En effet plus l'enchevêtrement est important (i.e. forte concentration ou forte masse molaire) plus le réseau réticulé est fortement structuré ( $G'_{\text{Plateau}}$  élevé, gonflement faible) et plus la cinétique est accélérée. L'influence de la rotule de greffage ou bras espaceur, ADH ou MDH, a également été étudiée sur les hydrogels de HA-FA. Les résultats indiquent que l'efficacité de la laccase (i.e. efficacité de la réticulation) était limitée par un bras espaceur plus court comme avec MDH en raison probable d'une difficulté d'accès au FA, trop proche de la chaîne de HA, par la laccase. Comme pour les dérivés CMP-FA, le caractère anionique de HA permet d'atteindre le régime semi-dilué facilement, mais le HA plus rigide que le CMP permet encore de diminuer la valeur de la concentration critique  $C^*$  (autour de 1 à 3g/L pour le HA selon la masse molaire, contre 16g/L pour le CMP). Comme pour les hydrogels à base de CMP-FA, les hydrogels de HA-FA sont particulièrement sensibles au pH et à la force ionique.

## Références bibliographiques

1. Simon, S., Dugast, J. Y., Le Cerf, D., Picton, L. & Muller, G. Amphiphilic polysaccharides. Evidence for a competition between intra and intermolecular associations in dilute system. *Polymer (Guildf)*. **44**, 7917–7924 (2003).
2. Dulong, V., Kouassi, M.-C., Labat, B., Le Cerf, D. & Picton, L. Antioxidant properties and bioactivity of Carboxymethylpullulan grafted with ferulic acid and of their hydrogels obtained by enzymatic reaction. *Food Chem.* **262**, 21–29 (2018).
3. Sannino, A. & Nicolais, L. Concurrent effect of microporosity and chemical structure on the equilibrium sorption properties of cellulose-based hydrogels. *Polymer (Guildf)*. **46**, 4676–4685 (2005).
4. de Oliveira, S. A., da Silva, B. C., Riegel-Vidotti, I. C., Urbano, A., de Sousa Faria-Tischer, P. C. & Tischer, C. A. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. *Int. J. Biol. Macromol.* **97**, 642–653 (2017).
5. La Gatta, A., De Rosa, M., Marzaioli, I., Busico, T. & Schiraldi, C. A complete hyaluronan hydrodynamic characterization using a size exclusion chromatography–triple detector array system during in vitro enzymatic degradation. *Anal. Biochem.* **404**, 21–29 (2010).
6. Guarino, V., Caputo, T., Altobelli, R. & Ambrosio, L. Degradation properties and metabolic activity of alginate and chitosan polyelectrolytes for drug delivery and tissue engineering applications. *AIMS Mater. Sci.* **2**, 497–502 (2015).
7. Kouassi, M.C., Thébault, P., Rihouey, C., Dé, E., Labat, B., Picton, L. & Dulong, V. Carboxymethylpullulan Grafted with Aminoguaiacol: Synthesis, Characterization, and Assessment of Antibacterial and Antioxidant Properties. *Biomacromolecules* **18**, 3238–3251 (2017).

# **Chapitre E- Activités biologiques**

---



## Sommaire

Introduction.....	245
I. Activités antioxydantes .....	247
I.1. Acide férulique et ses dimères .....	247
I.1.1. Synthèse des dimères d'acide férulique .....	247
I.1.2. Analyse des propriétés antioxydantes .....	249
I.2. Pullulane précurseur et dérivés PUL-FA.....	250
I.2.1. Pullulane précurseur .....	250
I.2.2. Dérivés PUL-FA.....	251
I.3. CMP précurseur, dérivés CMP-FA et hydrogels CMP-FA.....	256
I.4. HA précurseur et dérivés HA-FA.....	258
II. Cytocompatibilité .....	260
II.1. FA et ses dimères .....	260
II.1.1. Test Live /Dead.....	260
II.1.2. Test Alamar Blue® .....	261
II.2. PUL et dérivés PUL-FA.....	262
II.2.1. Test Live/Dead.....	262
II.2.2. Test Alamar Blue® .....	262
II.3. CMP et dérivés CMP-FA.....	264
II.4. HA et dérivés HA-FA .....	265
II.4.1. HA et dérivés HA-FA à haute masse molaire.....	265
II.4.2. HA et dérivés HA-FA à faible masse molaire .....	267
II.5. Conclusion .....	268
Références bibliographiques .....	270



## Introduction

L'évaluation des propriétés physico-chimiques des polysaccharides modifiés par l'acide férulique a démontré des propriétés très intéressantes. En outre, ces dérivés peuvent également posséder des activités biologiques qui feront l'objet de ce cinquième chapitre réparti sur deux parties.

Nous présenterons dans une première partie l'évaluation des activités antioxydantes de tous les dérivés greffés par de l'acide férulique. La deuxième partie sera consacrée à l'étude de la cytocompatibilité de ces polysaccharides.

## I. Activités antioxydantes

L'évaluation des propriétés antioxydantes de l'acide férulique ainsi que des dérivés greffés PUL-FA, CMP-FA et HA-FA a été réalisée face au radical DPPH• dont l'aspect théorique a été présenté dans la partie B-IV.1.

Le FA étant sous forme de dimères (DiFA) dans les hydrogels, nous avons élaboré par voie enzymatique ces dimères pour pouvoir également estimer leur activité antioxydante.

### I.1. Acide férulique et ses dimères

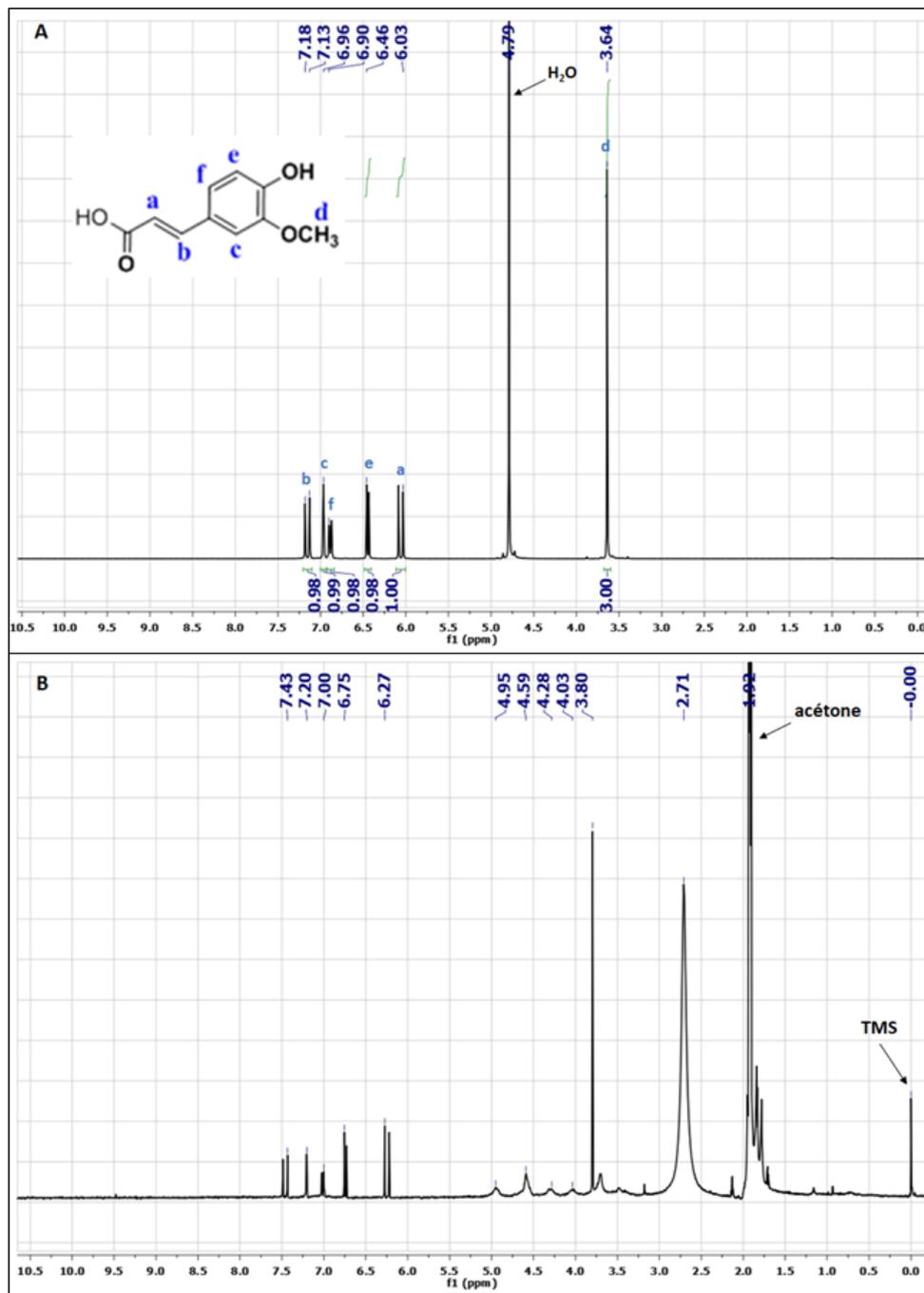
#### I.1.1. Synthèse des dimères d'acide férulique

Inspiré des travaux d'*Adelakun et al.*<sup>1</sup> avec quelques modifications, les dimères d'acide férulique ont été préparés comme suit.

Tout d'abord, 175 mg d'acide férulique (0,9 mol) et 2,9 mg de laccase de *Trametes versicolor* (10 U soit 166,7 nkat) sont solubilisés à température ambiante séparément dans 40 mL d'éthanol et 10 mL de tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5), respectivement. Ensuite, la solution de laccase est ajoutée goutte à goutte à celle de l'acide férulique et on laisse réagir pendant 24h à température ambiante sous agitation magnétique de 400 tr/min. À la fin de la réaction, la solution est totalement évaporée. On obtient une poudre jaune-orange qu'on solubilise de nouveau dans 50 mL d'éthanol avant filtration sur fritté P4 pour enlever l'enzyme et le tampon citrate/phosphate. Le filtrat est ensuite évaporé et on obtient finalement une poudre jaune-orange.

Une caractérisation par RMN-<sup>1</sup>H dans l'acétone-d<sub>6</sub> du produit obtenu a été réalisée pour confirmer le bon déroulement de la réaction de dimérisation de l'acide férulique par oxydation.

La Figure E-1 représente le spectre obtenu accompagné de celui de l'acide férulique dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v) pour la comparaison.



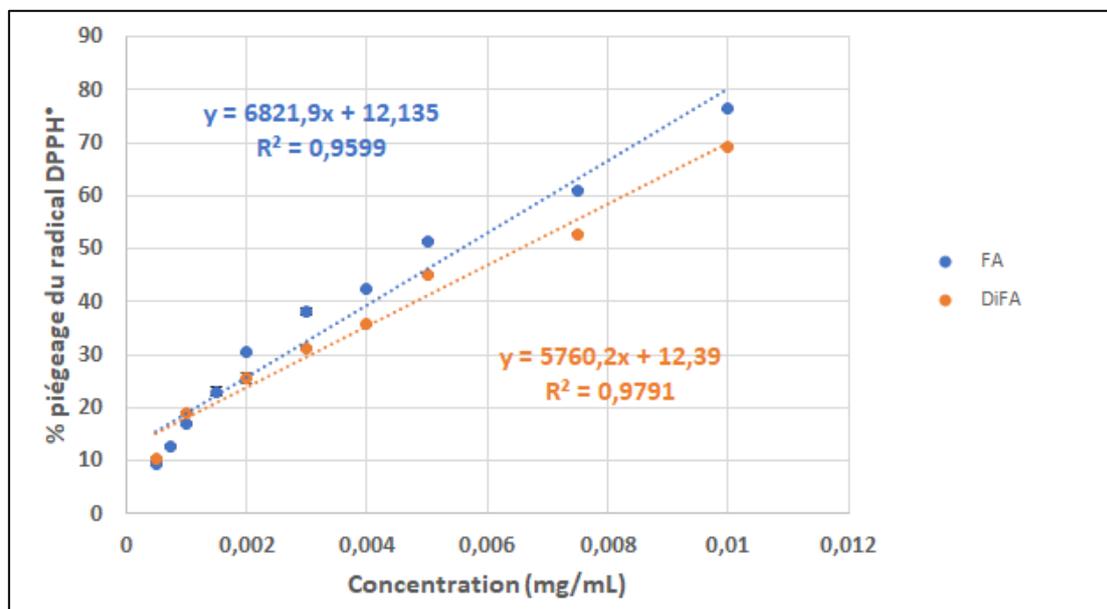
**Figure E-1** : Spectres RMN-<sup>1</sup>H de : **A**) Acide férulique dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v). **B**) Dimères d'acide férulique dans l'acétone-d<sub>6</sub>

Comparé au spectre de l'acide férulique (Figure E-1-A) détaillé précédemment (voir Chapitre C-I.2.2.2), le spectre RMN-<sup>1</sup>H des dimères d'acide férulique montre, en plus des pics caractéristiques de FA (entre 6,2 – 7,5ppm et à 3,8 ppm), la présence de nouveaux pics à 2,71 ; 4,03 ; 4,28 ; 4,59 et 4,95 ppm ce qui confirme le succès de la réaction de dimérisation.

Cependant, l'attribution de ces pics aux protons correspondants est inaccessible en raison des différentes formes possibles des dimères de FA nécessitant tout d'abord une séparation<sup>1</sup>.

### I.1.2. Analyse des propriétés antioxydantes

La mise en évidence des activités antioxydantes de l'acide férulique et de ses dimères vis-à-vis du radical DPPH• (100 µM) a été effectuée sur une gamme de concentration comprise entre 0,5 et 10 µg/mL en milieu éthanol. La Figure E-2 représente les pourcentages de piégeage du radical DPPH• déterminés par l'Eq. B31 (voir Chapitre B-IV.1). Les mesures d'absorbance ont été réalisées à une longueur d'onde de 517 nm (longueur d'onde de l'absorbance maximale de DPPH• dans l'éthanol).



**Figure E-2 :** Pourcentages moyens de piégeage du radical DPPH• par l'acide férulique et les dimères d'acide férulique à t = 20min

Les pourcentages de piégeage du radical DPPH• par l'acide férulique ou par les dimères d'acide férulique augmentent linéairement avec la concentration sur le domaine étudié avec une activité légèrement plus élevée pour FA par rapport à DiFA. Ceci est confirmé par les valeurs de concentration inhibitrice IC<sub>50</sub> égale à 5,55 µg/mL (soit 28,6 µmol/L) pour FA contre 6,53 µg/mL (soit 33,63 µmol/L) pour DiFA. Par conséquent, l'acide férulique possède un pouvoir antioxydant légèrement plus fort que celui de ses dimères ce qui est en accord avec les travaux de *Dulong et al*<sup>2</sup>. En effet, la formation des dimères d'acide férulique exige une condensation de deux quinones (radicaux) créés suite à l'oxydation de l'acide férulique par la laccase (voir Chapitre A-III.2.1.2). De ce fait, une partie des radicaux de FA sera impliquée dans la création des dimères et non au profit du piégeage du radical DPPH• d'où la diminution du pouvoir antioxydant des DiFA.

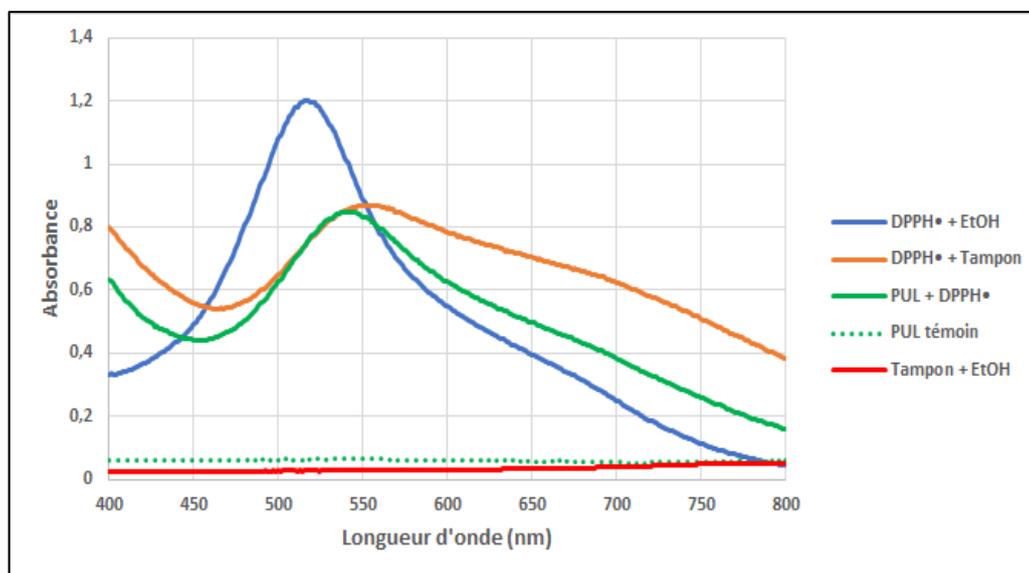
Pour l'acide férulique, la concentration inhibitrice  $IC_{50}$  obtenue est en accord avec la littérature où des valeurs de  $22 \mu\text{mol/L}^3$ ,  $25,1 \mu\text{mol/L}^4$ ,  $27,8 \mu\text{mol/L}^5$  ou  $28,1 \mu\text{mol/L}^2$  ont été reportées. En comparaison avec ses homologues de composés phénoliques non-flavonoïdes, l'acide férulique possède un pouvoir antioxydant quasi-similaire à son homologue d'acide hydroxycinnamique, l'acide caféique ( $5 \mu\text{g/mL}$  soit  $27,75 \mu\text{mol/L}$ )<sup>6</sup> et plus faible que celui des deux acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique ( $1,16 \mu\text{g/mL}$  soit  $6,82 \mu\text{mol/L}$ )<sup>7</sup> et l'acide syringique ( $2,42 \mu\text{g/mL}$  soit  $12,2 \mu\text{mol/L}$ )<sup>7</sup>. La molécule d'acide férulique est également moins active que l'aminoguaïacol ( $1,9 \mu\text{g/mL}$  soit  $13,7 \mu\text{mol/L}$ )<sup>8</sup>, le gaïacol ( $4,15 \mu\text{g/mL}$  soit  $33,5 \mu\text{mol/L}$ )<sup>9</sup> ou encore à l'eugénol ( $11,7 \mu\text{g/mL}$  soit  $71,3 \mu\text{mol/L}$ )<sup>10</sup> face au radical DPPH•.

## I.2. Pullulane précurseur et dérivés PUL-FA

Les propriétés antioxydantes du pullulane précurseur et de ses dérivés PUL-FA ont été évaluées vis-à-vis du radical DPPH• pour des concentrations de 2,5 ; 5 et 7,5 g/L dans le milieu tampon citrate-phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) / éthanol à une proportion de 75/25 (v/v) pour éviter la précipitation des échantillons (PUL et PUL-FA sont insolubles dans l'éthanol).

### I.2.1. Pullulane précurseur

Un exemple de courbes obtenues suite aux mesures d'absorbance d'une solution de PUL précurseur (5 g/L) + DPPH• (100  $\mu\text{M}$ ) dans un mélange tampon citrate-phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) / éthanol 75/25 (v/v) est présenté dans la Figure E-3.



**Figure E-3 :** Spectre d'absorbance du mélange PUL précurseur (5 g/L) en présence du DPPH• (trait plein vert) dans un mélange tampon citrate-phosphate / éthanol. Pour comparaison, les autres milieux : DPPH• + éthanol (bleu), DPPH• + tampon (orange), PUL précurseur (5 g/L) (points verts) et le mélange tampon/éthanol (rouge)

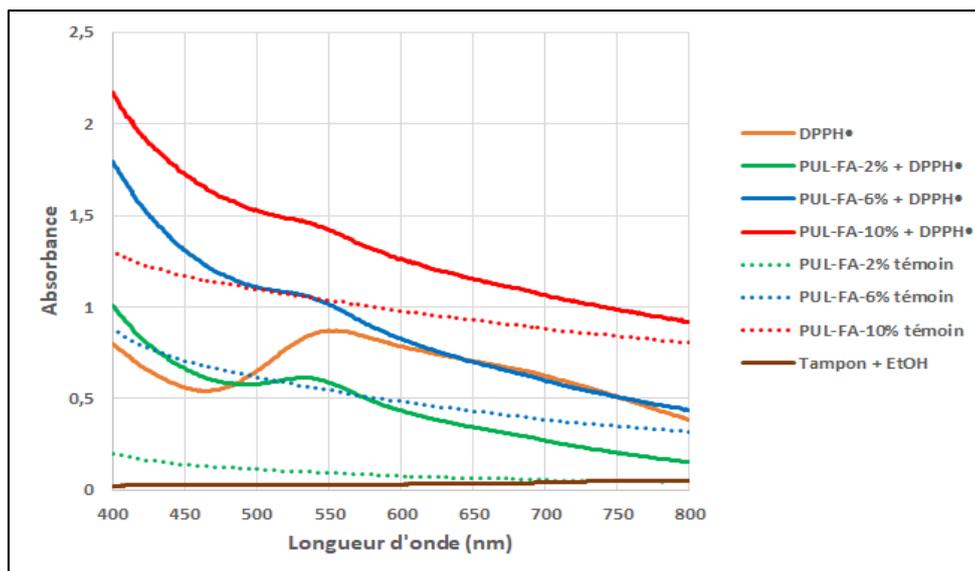
En comparaison avec la courbe d'absorbance du radical DPPH• dans l'éthanol, les courbes du DPPH• et de PUL précurseur + DPPH• dans le milieu tampon citrate-phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) / éthanol 75/25 (v/v) montrent un décalage de la longueur d'onde d'absorbance maximale du DPPH• vers une valeur plus grande égale à 543 nm (contre 514 nm en milieu éthanol pur). Par conséquent, dans ce milieu, les lectures d'absorbances ont été effectuées à une longueur d'onde de 543 nm.

On remarque également une diminution de la valeur d'absorbance maximale du DPPH• dans le mélange tampon / éthanol comparée à celle du DPPH• dans l'éthanol en raison d'une solvataion limitée de ce dernier en présence d'eau.

Dans le milieu tampon citrate-phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) / éthanol 75/25 (v/v), on observe que le maximum de la courbe de PUL précurseur + DPPH• présente une valeur d'absorbance quasi-identique à celle du DPPH•. Le pullulane ne possède donc aucun pouvoir antioxydant face au radical DPPH• à une concentration de 5 g/L. Des résultats similaires ont été obtenus en testant les deux autres concentrations (2,5 et 7,5 g/L). Ceci est confirmé aussi par l'aspect visuel des échantillons analysés où aucun changement de coloration du radical DPPH• n'a été observé en présence du polysaccharide pullulane (la couleur reste violette).

### **I.2.2. Dérivés PUL-FA**

L'étude des activités antioxydantes des dérivés PUL-FA a été réalisée aux mêmes concentrations que pour le pullulane précurseur soit 2,5 ; 5 et 7,5 g/L dans le milieu tampon citrate-phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) / éthanol 75/25 (v/v). Nous avons observé une couleur jaunâtre avec une légère turbidité des solutions de PUL-FA dans ce mélange en absence du DPPH• qui devient de plus en plus intense en augmentant la concentration ou le DS des dérivés PUL-FA. L'acide férulique absorbe donc dans la zone d'étude. Des mesures d'absorbance de ces solutions sur l'intervalle [400-800 nm] ont été ainsi effectuées (Figure E-4).



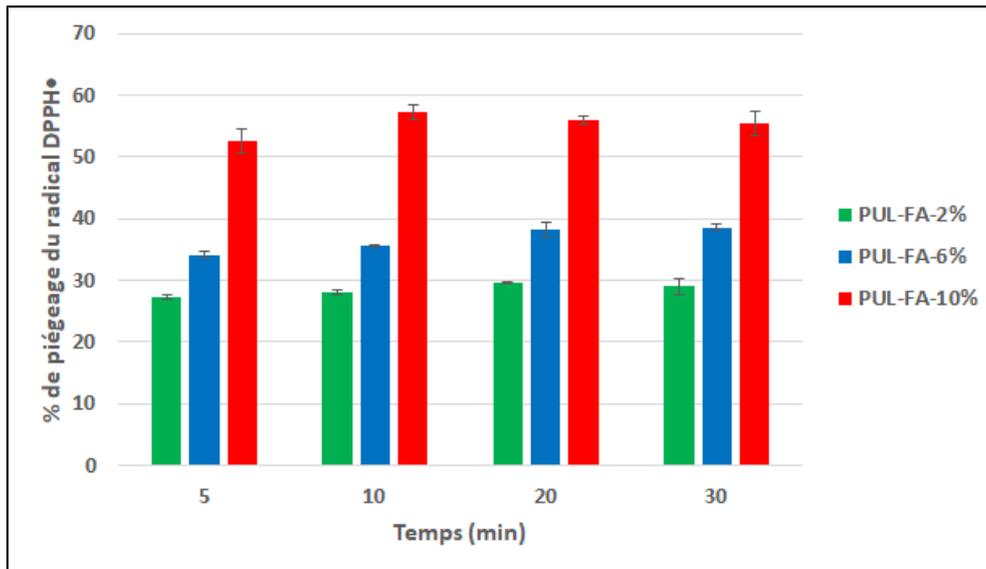
**Figure E-4 :** Spectres d'absorbance des dérivés PUL-FA (5 g/L) en présence du DPPH• dans un mélange tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) / éthanol (75/25). DPPH• (trait plein orange), PUL-FA-2% + DPPH• (trait plein vert), PUL-FA-6% + DPPH• (trait plein bleu), PUL-FA-10% + DPPH• (trait plein rouge), PUL-FA-2% (points verts), PUL-FA-6% (points bleus), PUL-FA-10% (points rouges) et tampon + éthanol (trait plein marron). Analyse au temps  $t = 20$  min.

Sur la Figure E-4, nous constatons que l'allure des courbes des dérivés PUL-FA + DPPH• est différente de celle du radical DPPH• et le maximum d'absorbance à 543 nm dans le cas du DPPH• en solvant tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) / éthanol n'apparaît plus sous forme de pic mais plutôt sous forme d'un épaulement. Nous remarquons également que les solutions de PUL-FA en absence du DPPH• (PUL-FA témoin) absorbent à 543 nm avec une valeur qui augmente avec le DS en FA.

De ce fait, le pourcentage de piégeage du radical DPPH• par les dérivés PUL-FA est calculé en tenant compte des témoins de coloration et de turbidité selon l'équation suivante :

$$\% \text{ de piégeage des radicaux DPPH}^{\bullet} = \left( 1 - \frac{Abs_{(PUL-FA + DPPH^{\bullet})} - Abs_{PUL-FA}}{Abs_{DPPH^{\bullet}}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. E1})$$

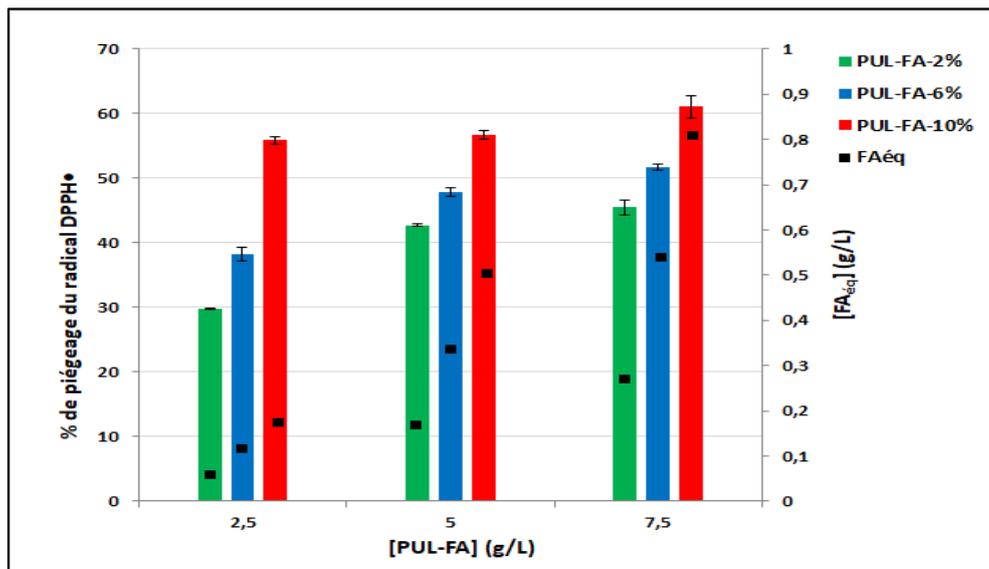
Une étude cinétique a été ensuite réalisée pour déterminer le temps d'analyse nécessaire pour le piégeage des radicaux DPPH• par les dérivés PUL-FA. Des tests à des concentrations identiques en PUL-FA (2,5 ; 5 et 7,5 g/L) ont été effectués en faisant varier le temps d'analyse de 5 à 30 min. Comme exemple, nous montrerons la Figure E-5 qui regroupe l'étude cinétique des dérivés PUL-FA à une concentration fixe de 2,5 g/L.



**Figure E-5** : Pourcentages de piégeage du radical DPPH• par les dérivés PUL-FA (2,5 g/L) en fonction du temps d'analyse

La Figure E-5 montre que le pourcentage de piégeage du radical DPPH• par les dérivés PUL-FA aux différents DS<sub>FA</sub> différents augmente légèrement en augmentant le temps d'attente avant analyse de 5 à 20 min. A partir de 20 min, on ne remarque aucune évolution du pourcentage de piégeage. Les autres tests à des concentrations de 5 et 7,5 g/L ont montré des cinétiques similaires.

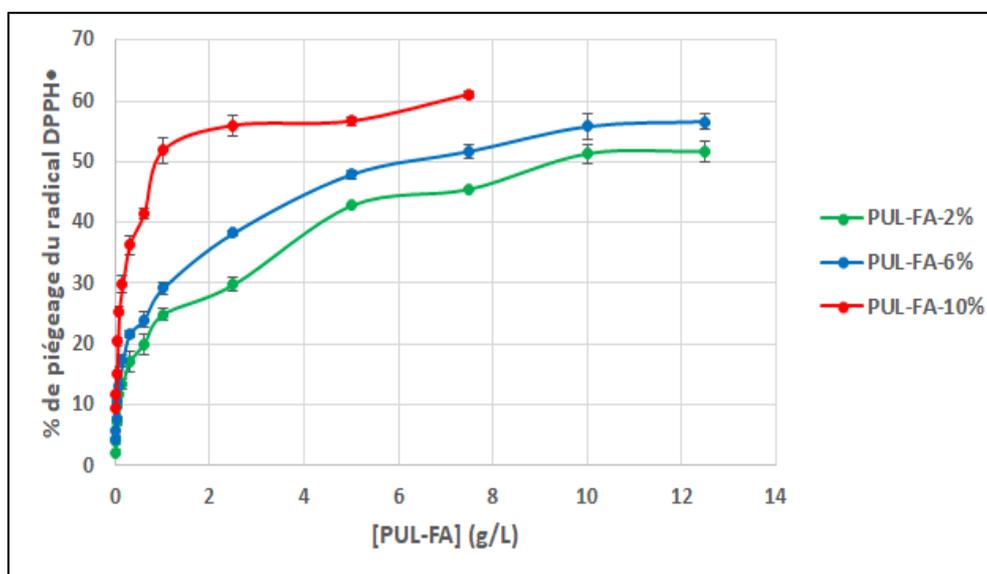
Par conséquent, le temps d'analyse est fixé à 20 min et les résultats obtenus pour tous les dérivés PUL-FA aux concentrations 2,5 ; 5 et 7,5 g/L sont présentés dans la Figure E-6.



**Figure E-6** : Pourcentages de piégeage du radical DPPH• par les dérivés PUL-FA à t= 20 min. Concentrations équivalentes en acide férulique [FA]<sub>éq</sub> (■) sur l'axe de droite

On constate que tous les dérivés PUL-FA possèdent un pouvoir antioxydant face au radical DPPH• avec un pourcentage de piégeage qui augmente indépendamment avec la concentration en PUL-FA et avec le degré de substitution en acide férulique. Étant donné que le pullulane précurseur n'est pas antioxydant (démonstré plus haut), les activités antioxydantes sont donc apportées par les greffons d'acide férulique.

Nous avons ensuite déterminé les  $IC_{50}$  des dérivés PUL-FA. Pour ce faire, les mesures d'absorbance ont été réalisées en présence de DPPH• sur des solutions de PUL-FA à des concentrations comprises entre 0,005 et 12,5 g/L pour les dérivés greffés à 2 et 6% en FA et entre 0,005 et 7,5 g/L pour le dérivé greffé à 10% en raison de la plus faible solubilité de ce dernier. La Figure E-7 représente les pourcentages de piégeage calculés à ces concentrations.



**Figure E-7 :** Pourcentages de piégeage du radical DPPH• par les dérivés PUL-FA à  $t = 20$  min en fonction de la concentration en PUL-FA

L'allure des courbes montre dans un premier temps une augmentation importante des pourcentages de piégeage du radical DPPH• avec la concentration en dérivés PUL-FA qui tend dans un deuxième temps à atteindre un plateau. Les concentrations inhibitrices  $IC_{50}$  calculés des dérivés PUL-FA-2%, PUL-FA-6% et PUL-FA-10% diminuent logiquement lorsque le  $DS_{FA}$  augmente et sont respectivement égales à 9,7 ; 6 et 0,9 g/L. Ceux-ci sont beaucoup plus importants que celui obtenu pour le FA libre ce qui confirme une baisse importante du pouvoir antioxydant du FA lorsqu'il est greffé.

Ces valeurs peuvent être comparées à celles obtenues par *Wen et al.*<sup>11</sup> pour de l'amidon greffé d'acide férulique. Dans ce cas, elles sont légèrement plus faibles, traduisant donc un pouvoir antioxydant plus marqué en raison du taux d'incorporation de FA plus important.

L'ensemble des données sont reprises dans le Tableau E-1. Il faut noter qu'ils ont dû utiliser un autre mode opératoire en raison de la très faible hydrosolubilité de leurs dérivés amidon-FA.

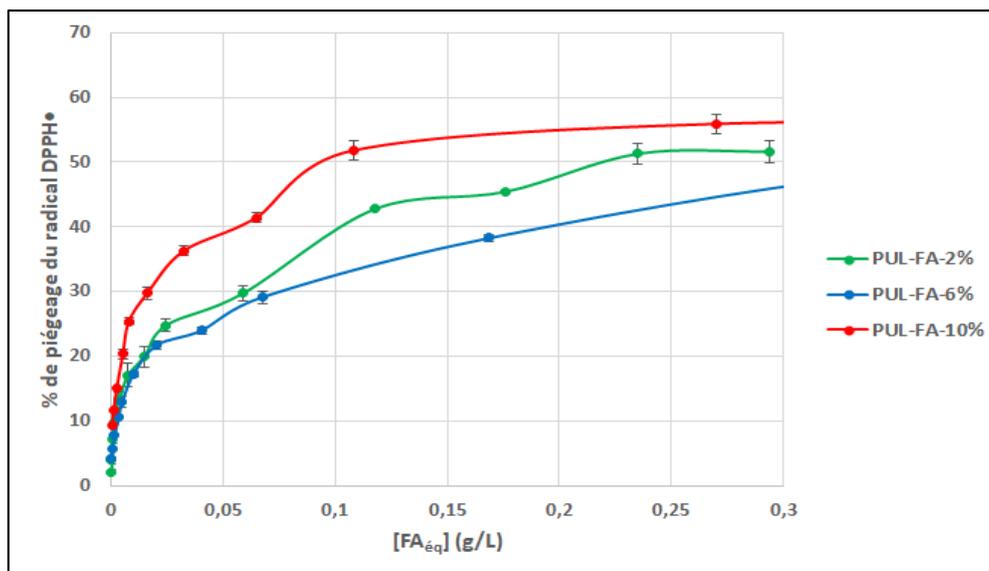
**Tableau E-1 : Comparaison du pouvoir antioxydant des systèmes PUL-FA avec la littérature**

Échantillon	DS <sub>FA</sub> (%)	FA éq (mg/g)*	IC <sub>50</sub> (g/L)	Réf.
PUL-FA	2	23,5	9,7	-
	6	67,5	6	
	10	108,1	0,9	
Amidon-FA	13	136,5	1,859	11
	21	204,9	0,781	
	35	303,9	0,339	
Chitosane-FA	-	66,7	0,75	12

\* Équivalent d'acide férulique contenu dans 1g de polysaccharide-FA

Du chitosane a été également greffé par du FA avec une teneur comparable à notre PUL-FA-6%<sup>12</sup>. De nouveau, l'IC<sub>50</sub> est plus faible pour le dérivé à base de chitosane. Cela peut s'expliquer cette fois par la solubilité parfaite de ce dérivé dans le milieu d'analyse ainsi qu'à la présence de fonction amine sur le chitosane qui amène des propriétés antioxydantes intrinsèques à ce polysaccharide.

Nous avons également tracé les courbes des pourcentages de piégeage du radical DPPH• en fonction de la concentration équivalente en acide férulique [FA<sub>éq</sub>] présente dans les différents produits PUL-FA (Figure E-8). Les trois courbes devraient se superposer si l'activité des FA est indépendante de leur greffage sur le PUL.

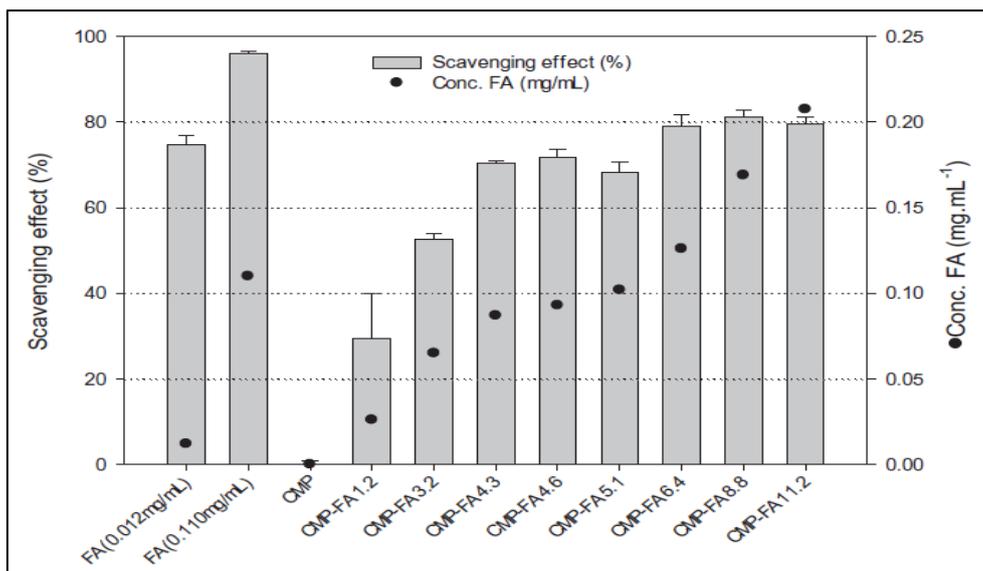


**Figure E-8 :** Pourcentages de piégeage du radical DPPH• par les dérivés PUL-FA à t= 20 min en fonction de la concentration équivalente en acide férulique

Cela n'est pas le cas. Cela peut être lié à la mauvaise solubilité de ces dérivés qui réduit l'accessibilité aux radicaux DPPH• mais également à la formation de clusters hydrophobes favorisant ce piégeage. Pour le PUL-FA 2%, nous n'avons pas rencontré de mauvaise solubilité puisque toutes les solutions étaient parfaitement limpides ce qui n'était pas le cas pour les deux autres pourcentages. Pour le PUL-FA 6%, la moins bonne solubilité entrainerait une moins bonne efficacité des FA alors que pour le PUL-FA 10%, c'est la formation de clusters qui augmenterait l'activité antioxydante. Des analyses complémentaires devront être effectuées pour mieux appréhender cet aspect.

### I.3. CMP précurseur, dérivés CMP-FA et hydrogels CMP-FA

Les propriétés antioxydantes du CMP précurseur, des dérivés CMP-FA et des hydrogels CMP-FA ont été montrées par *Dulong et al*<sup>2</sup> à une concentration de 2,5 g/L en polymère et de 50  $\mu\text{mol/L}$  en DPPH• dans le milieu NaCl 0,15M / éthanol (50/50, v/v). L'ensemble des données est rassemblé dans la Figure E-9.



**Figure E-9** : Pourcentages de piégeage du radical DPPH• par les dérivés CMP-FA à t= 30 min. Concentrations équivalentes en acide férulique [FA]<sub>éq</sub> (●) sur l'axe de droite<sup>2</sup>

Le CMP précurseur ne possède logiquement aucun pouvoir antioxydant. Les dérivés CMP-FA expriment des activités antioxydantes face au radical DPPH• qui augmentent avec le taux de greffage en acide férulique. La dépendance des propriétés antioxydantes avec la quantité d'acide férulique greffée a été confirmée par la comparaison des dérivés CMP-FA à la même concentration équivalente en FA (0,11 g/L). Contrairement aux PUL-FA, ces dérivés expriment un pourcentage de piégeage quasi-identique en raison d'aucun problème de solubilité.

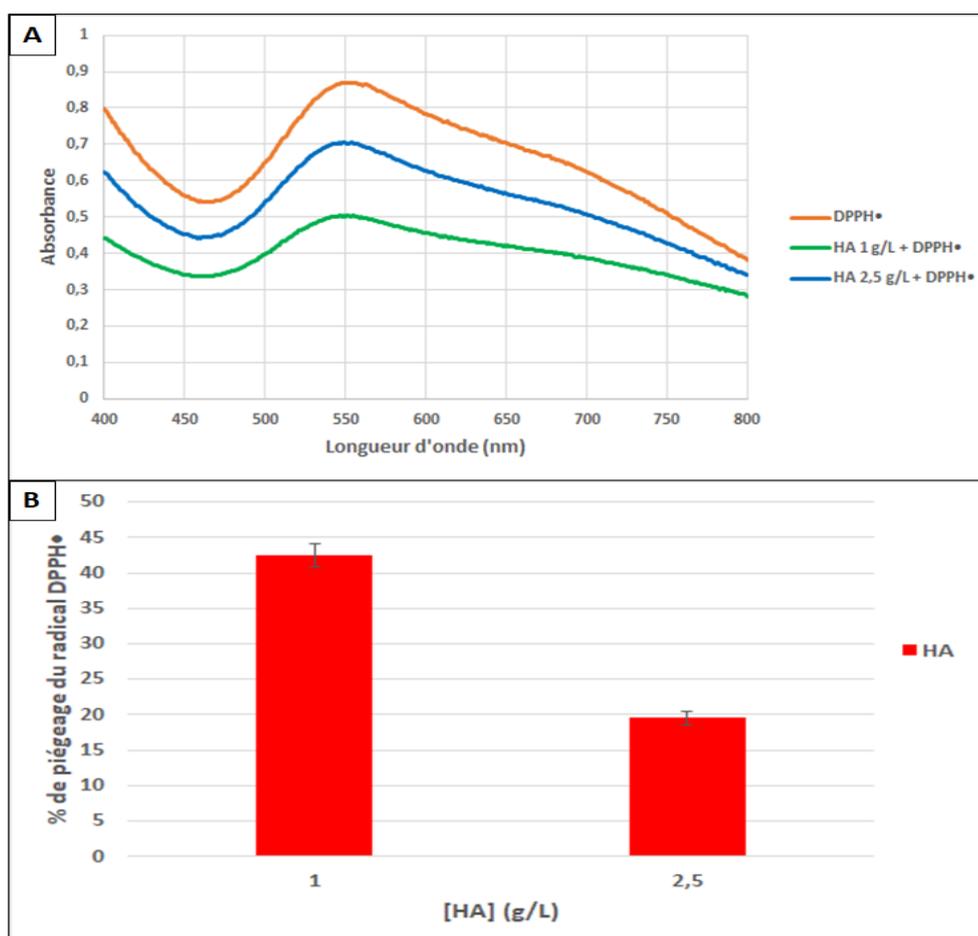
Les auteurs ont également montré que les dérivés CMP-FA à des taux de greffage de 35 ; 51 et 67 mg de FA/g de CMP-FA possèdent des IC<sub>50</sub> respectives de 0,34 ; 0,17 et 0,14 g/L soit des IC<sub>50</sub> de 11,92 ; 8,7 et 9,55 mg/L (c.-à-d. 61,4 ; 44,8 et 49,2 μmol/L) en équivalent d'acide férulique. Ces valeurs sont toutes supérieures à celle de FA non greffé (5,45 μg/mL soit 28,1 μmol/L) confirmant notre conclusion précédente concernant la baisse d'activité antioxydante de FA une fois qu'il est greffé.

Comparés aux systèmes PUL-FA, les CMP-FA possèdent un pouvoir antioxydant plus important. Par exemple, les deux dérivés PUL-FA-6% et CMP-FA-8,8% possédant un taux de greffage similaire (respectivement 67,5 et 67 mg de FA/g de produit) ont des IC<sub>50</sub> respectives de 7,9 et 0,17 g/L. Cette grande différence peut s'expliquer par la différence de solubilité des deux systèmes dans le milieu de l'analyse antioxydante où une turbidité a été constatée pour les dérivés PUL-FA contre une solubilité parfaite des dérivés CMP-FA grâce à la présence des charges négatives sur leurs chaînes polymères.

Concernant les hydrogels CMP-FA, ils possèdent également des activités antioxydantes face au radical DPPH• même si les activités restent inférieures à celles des dérivés CMP-FA en raison du pouvoir antioxydant moindre des DiFA par rapport au FA et à la difficulté de diffusion des radicaux DPPH• dans le réseau de l'hydrogel surtout en augmentant la densité de réticulation par l'augmentation du  $DS_{FA}$ .

#### I.4. HA précurseur et dérivés HA-FA

Les tests antioxydants du HA précurseur et des dérivés HA-FA ont été réalisés dans les mêmes conditions que les systèmes PUL-FA excepté pour la concentration en polymère où nous avons dû travailler à plus faible concentration compte tenu de la viscosité (1 et 2,5 g/L). Nous avons tout d'abord mesuré l'absorbance des solutions du HA précurseur à 1 et 2,5 g/L et les avons comparés à la solution du radical DPPH• seul. Les courbes obtenues ainsi que les pourcentages de piégeage calculés sont présentés dans la Figure E-10.

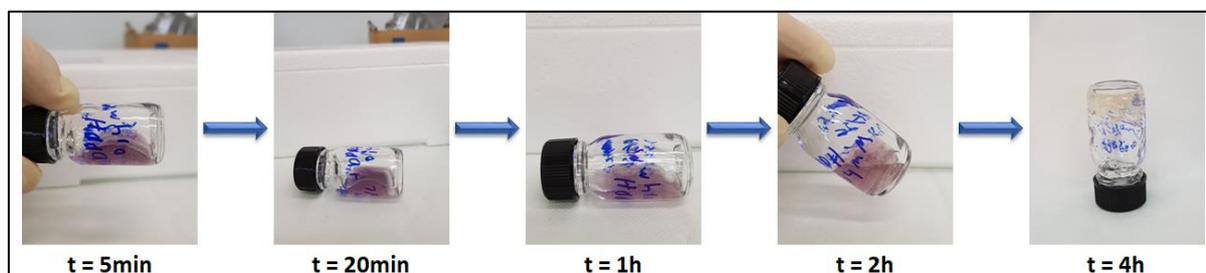


**Figure E-10 :** **A)** Spectre d'absorbance du HA précurseur à 1 g/L (vert) et 2,5 g/L (bleu) en présence du DPPH•. DPPH• + tampon (orange). **B)** Pourcentages de piégeage du radical DPPH• par HA précurseur à 1 et 2,5 g/L. Analyses à  $t=20$ min dans un mélange tampon citrate-phosphate / éthanol (75/25, v/v)

La Figure E-10-A montre que les courbes du HA précurseur en présence du DPPH• présentent une allure similaire à celle du DPPH• seul avec une absorbance maximale à la même longueur d'onde (543 nm) mais avec une intensité plus faible montrant une activité antioxydante de ce polysaccharide comme déjà reporté dans la littérature<sup>13</sup>.

L'origine de ce pouvoir antioxydant est probablement liée à l'amine de la fonction acétyle du HA tandis que la baisse du pourcentage de piégeage avec la concentration peut s'expliquer par la hausse de la viscosité qui empêche la diffusion des radicaux DPPH• au sein des chaînes polysaccharides.

Les propriétés antioxydantes des dérivés HA-FA ont été donc évaluées dans un premier temps à une concentration de 1 g/L. De manière inattendue, nous avons observé la formation d'un gel en ajoutant 0,5 mL la solution de DPPH• (400  $\mu$ M dans l'éthanol) à 1,5 mL des solutions de HA<sub>HM</sub>-FA à 1 g/L dans le tampon citrate-phosphate. Cela n'a pas empêché ces solutions d'agir sur les radicaux DPPH• car un changement de coloration de violet au jaune est observé mais avec un temps long (environ 4h). Un exemple visuel de l'évolution de la coloration de la solution de HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-7,5% (1 g/L) + DPPH• est donné dans la Figure E-11. L'évaluation quantitative des activités antioxydantes des dérivés HA<sub>HM</sub>-FA n'est pas accessible vue l'impossibilité du prélèvement des mélanges (gels) de HA<sub>HM</sub>-FA+ DPPH•.



**Figure E-11 :** Évolution de la coloration de la solution HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-7,5% (1 g/L) + DPPH• en fonction du temps

## II. Cytocompatibilité

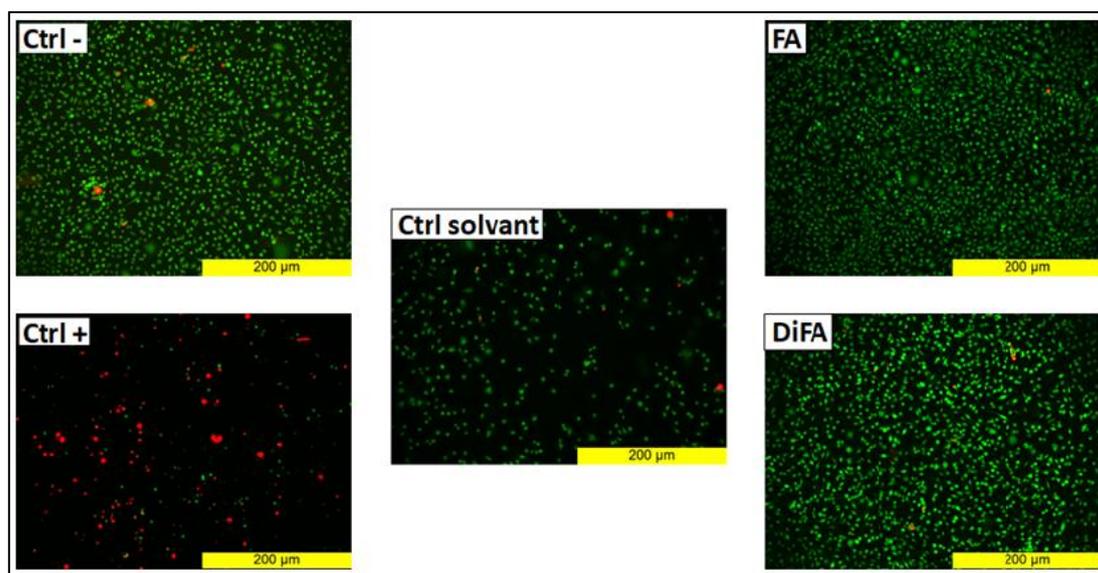
Les tests de cytotoxicité de l'acide férulique, de ses dimères ainsi que des polysaccharides (PUL, CMP et HA) greffés et non greffés d'acide férulique ont été réalisés sur des cellules de souris fibroblastes (L929 - ATCC<sup>®</sup> CCL-1) au moyen de deux méthodes : le Live/Dead et l'Alamar Blue<sup>®</sup> détaillées précédemment (voir Chapitre B-IV.2.).

### II.1. FA et ses dimères

Les essais de cytotoxicité de FA et de ses dimères ont été effectués dans le milieu de culture  $\alpha$ -MEM complet avec 0,5% d'éthanol (concentration non toxique pour les cellules) à une concentration de 1mM à cause de la solubilité limitée de FA et ses dimères à des concentrations supérieures dans ce milieu.

#### II.1.1. Test Live /Dead

La Figure E-12 représente les résultats obtenus suite aux tests Live/Dead de FA et de ses dimères.

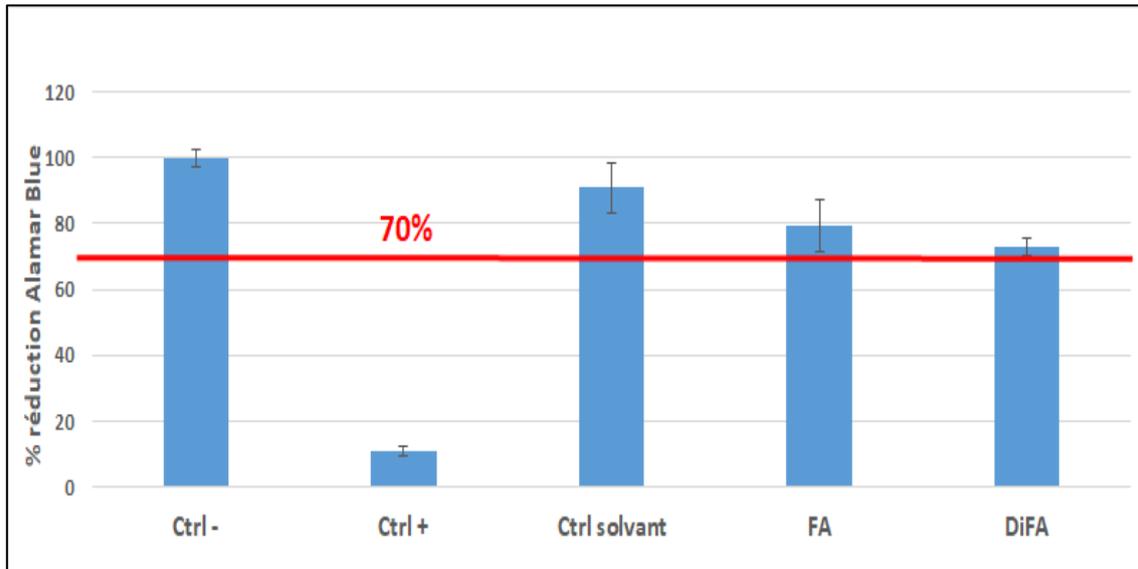


**Figure E-12** : Images obtenues par le test Live/Dead après 24h de contact des solutions de FA et de ses dimères (DiFA) avec les cellules fibroblastes. Contrôle négatif (Ctrl -,  $\alpha$ -MEM complet), contrôle positif (Ctrl +, DMSO 10%) et contrôle solvant (Ctrl solvant, éthanol 0,5%). Cellules vivantes (vert) et cellules mortes (rouge)

On remarque qu'en présence de FA et de DiFA à 1mM, les cellules présentent une fluorescence verte démontrant ainsi une bonne viabilité. Par conséquent, après 24h de contact, l'acide férulique et ses dimères ne possèdent aucun effet cytotoxique à une concentration de 1mM.

### II.1.2. Test Alamar Blue®

Les résultats obtenus par le test Alamar Blue® des solutions de FA et DiFA sont présentés dans la Figure E-13.



**Figure E-13 :** Activités métaboliques des cellules fibroblastes L929 après 48h de contact avec des solutions (1mM) de FA et de ses dimères (DiFA). Contrôle négatif (Ctrl -,  $\alpha$ -MEM complet), contrôle positif (Ctrl +, DMSO 10%), et contrôle solvant (Ctrl solvant, éthanol 0,5%)

Le test à l'Alamar Blue® confirme le résultat obtenu par le test Live/Dead. En effet, ce réactif (résazarine) est utilisé comme indicateur des réactions d'oxydo-réduction pendant la prolifération cellulaire. Les cellules vivantes ont la capacité de transformer la résazarine de couleur bleue en résosurine (produit métabolique) de couleur rose fluorescente. De ce fait, nous nous intéressons à travers ce test au pourcentage de réduction de l'Alamar Blue®. Les cellules ayant un bon métabolisme en contact avec les solutions testées sont celles qui possèdent un pourcentage de réduction d'Alamar Blue  $\geq 70\%$  du contrôle négatif. Ces solutions seront donc considérées cytocompatibles.

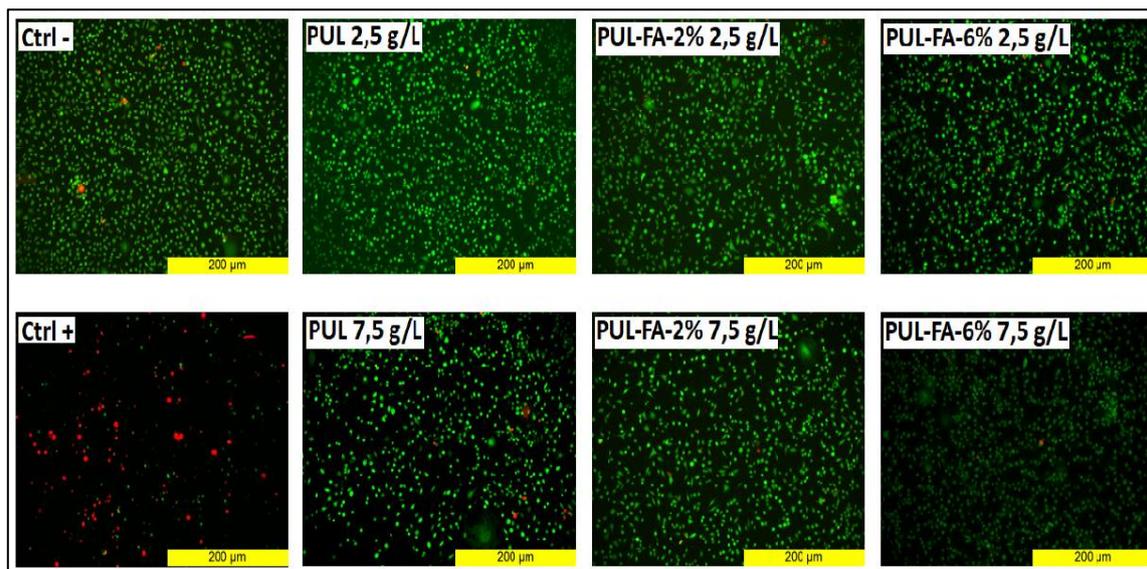
Sur la Figure E-13, nous constatons que FA et ses dimères possèdent des pourcentages de réduction supérieurs à 70% (79,2 et 72,8 respectivement) et par conséquent le métabolisme des cellules n'est pas affecté lorsqu'elles sont en contact avec le FA et ses dimères. De ce fait, le FA et ses dimères n'ont aucun effet cytotoxique sur les cellules fibroblastes après 48h de contact, confirmant ainsi le test Live/Dead réalisé précédemment.

## II.2. PUL et dérivés PUL-FA

La cytocompatibilité du pullulane précurseur et des dérivés PUL-FA à des taux de substitution en FA de 2 et 6% a été évaluée dans le milieu de culture  $\alpha$ -MEM complet à des concentrations de 2,5 et 7,5 g/L.

### II.2.1. Test Live/Dead

Les images résultantes du test Live/Dead sont regroupées dans la Figure E-14.

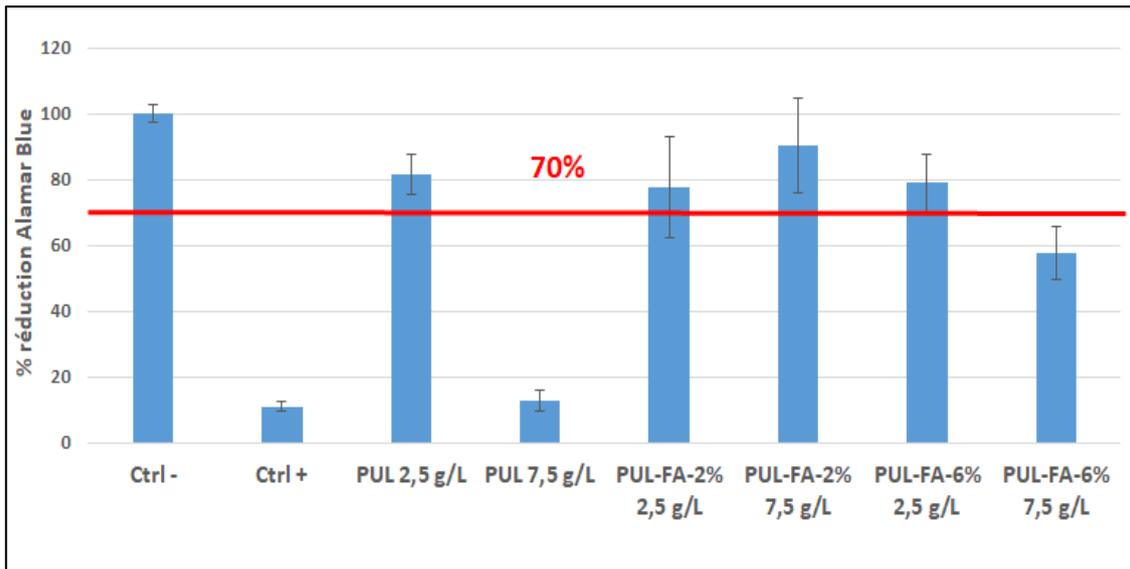


**Figure E-14 :** Images obtenues par le test Live/Dead après 24h de contact des cellules fibroblastes avec les solutions de PUL précurseur et des dérivés PUL-FA-2% et PUL-FA-6% à des concentrations de 2,5 et 7,5 g/L. Contrôle négatif (Ctrl -,  $\alpha$ -MEM complet) et contrôle positif (Ctrl +, DMSO 10%).  
Cellules vivantes (vert) et cellules mortes (rouge)

La Figure E-14 montre que les cellules en présence du pullulane précurseur et des deux dérivés PUL-FA à différentes concentrations d'étude présentent toutes une fluorescence verte avec la présence de quelques cellules rouges pour le pullulane précurseur et le PUL-FA-6% à 7,5 g/L. Par conséquent, le pullulane et les dérivés PUL-FA-2 et 6% n'ont aucun effet cytotoxique sur les cellules fibroblastes après un contact de 24h.

### II.2.2. Test Alamar Blue®

La Figure E-15 représente les pourcentages de réduction de l'Alamar Blue® obtenus pour les solutions de pullulane précurseur et des dérivés PUL-FA.



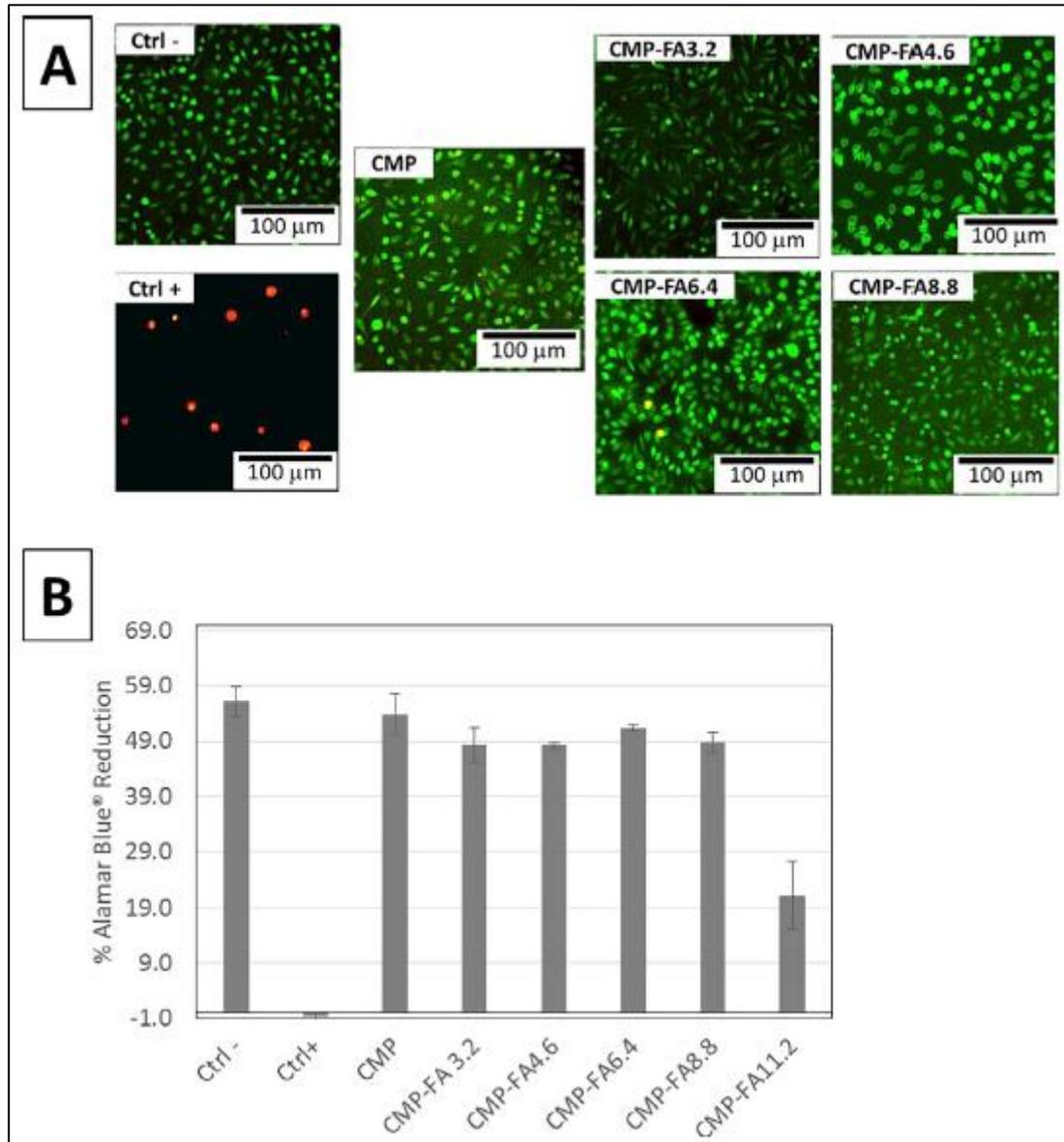
**Figure E-15 :** Activités métaboliques des cellules fibroblastes L929 après 48h de contact avec des solutions de PUL précurseur et des dérivés PUL-FA-2% et PUL-FA-6% à des concentrations de 2,5 et 7,5 g/L. Contrôle négatif (Ctrl -,  $\alpha$ -MEM complet) et contrôle positif (Ctrl +, DMSO 10%).

Sur la Figure E-15, on remarque que tous les échantillons possèdent des pourcentages de réduction Alamar Blue® > 70% du pourcentage de réduction du contrôle négatif à l'exception du PUL précurseur et PUL-FA-6% à 7,5g/L qui présentent des pourcentages inférieurs (12,7 et 57,6% respectivement). Il est difficile de comprendre pourquoi une augmentation de la concentration en PUL d'un facteur 3 aurait un tel effet sur l'activité cellulaire. Ce résultat est en désaccord avec le test Live/Dead. Cependant, il faut noter que ce test nous a montré la présence de quelques cellules rouges pour les conditions PUL précurseur et PUL-FA-6% à 7,5 g/L, probablement les prémices d'une souffrance cellulaire à 48h de contact, observée par le test Alamar Blue®. Par conséquent, il faudra reproduire une nouvelle série de test pour confirmer ces résultats. Pour la solution PUL-FA-6% à 7,5g/L, la réduction constatée de l'activité peut être expliquée par l'augmentation de la viscosité par la présence de FA à cette concentration qui rend le passage de l'oxygène plus difficile vers les cellules ralentissant leur métabolisme.

Cet effet n'est pas apparu dans le test Live/Dead puisque la mise en contact des cellules avec ces solutions n'a duré que 24h contre 48h pour le test Alamar Blue®.

### II.3. CMP et dérivés CMP-FA

Les tests de cytotoxicité du CMP et des dérivés CMP-FA ont été réalisés par *Dulong et al.*<sup>2</sup> à une concentration de 2,5 g/L dans les mêmes conditions que le PUL et ses dérivés PUL-FA. La Figure E-16 représente les résultats obtenus.



**Figure E-16** : Analyse de cytotoxicité du CMP et des dérivés CMP-FA<sup>2</sup>. **A)** Test Live/Dead. **B)** Test à l'Alamar Blue®

Nous avons évalué tout d'abord la viabilité des cellules de manière qualitative en réalisant le test Live/Dead à 24h de contact des cellules avec les solutions des produits testés (CMP et dérivés CMP-FA à des DS<sub>FA</sub> de 3,2 ; 4,6 ; 6,4 et 8,8 %). Comme le montre la Figure E-16-A, les images de cellules obtenues par le microscope à fluorescence ont montré une bonne viabilité cellulaire pour tous les échantillons testés.

Ensuite, nous avons évalué l'activité métabolique des cellules par le test Alamar Blue<sup>®</sup> après 48h de contact avec les solutions des échantillons analysés (Figure E-16-B). Tous les échantillons possèdent des pourcentages de réduction d'Alamar Blue<sup>®</sup> quasi-identiques sans effet sur le métabolisme cellulaire sauf dans le cas du dérivé CMP-FA-11,2% qui exprime un pourcentage de réduction plus faible et possède donc un impact sur les cellules. Cet impact a été attribué à la difficulté de solubilité de ce dérivé dans le milieu de culture ( $\alpha$ -MEM) et à la viscosité plus importante de la solution obtenue comparée aux autres solutions.

## II.4. HA et dérivés HA-FA

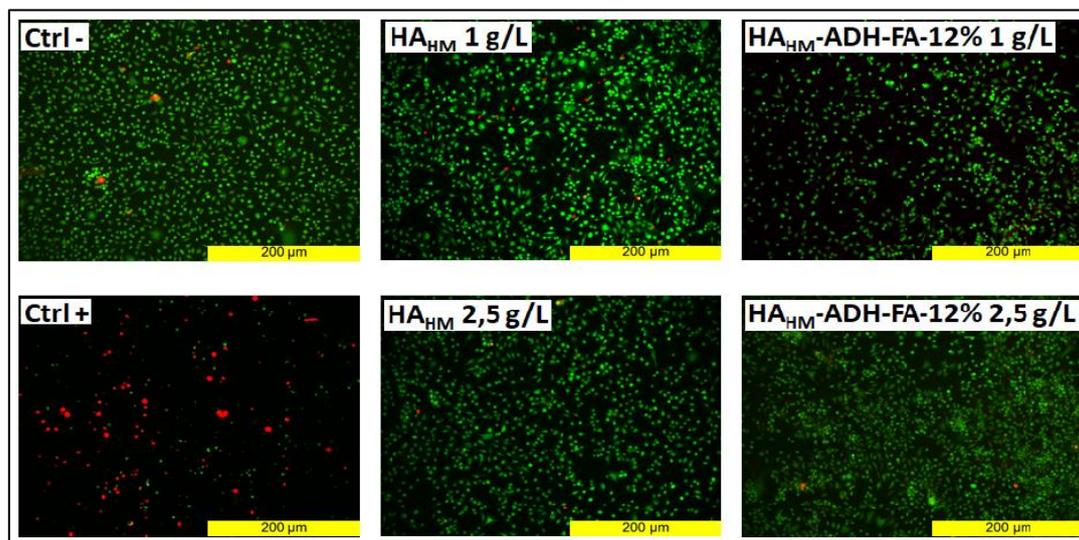
La cytocompatibilité du HA précurseur et des dérivés HA-FA a été évaluée à une concentration de 1 et 2,5 g/L en respectant les mêmes conditions que le pullulane et ses dérivés PUL-FA.

### II.4.1. HA et dérivés HA-FA à haute masse molaire

Pour cette étude, nous avons sélectionné le HA précurseur à haute masse molaire ( $HA_{HM}$ ) et les dérivés  $HA_{HM}$ -ADH-FA-7,5%,  $HA_{HM}$ -ADH-FA-12% et  $HA_{HM}$ -MDH-FA-16%.

#### II.4.1.2. Test Live/Dead

La Figure E-17 représente les images obtenues par le microscope à fluorescence suite aux tests Live/Dead.

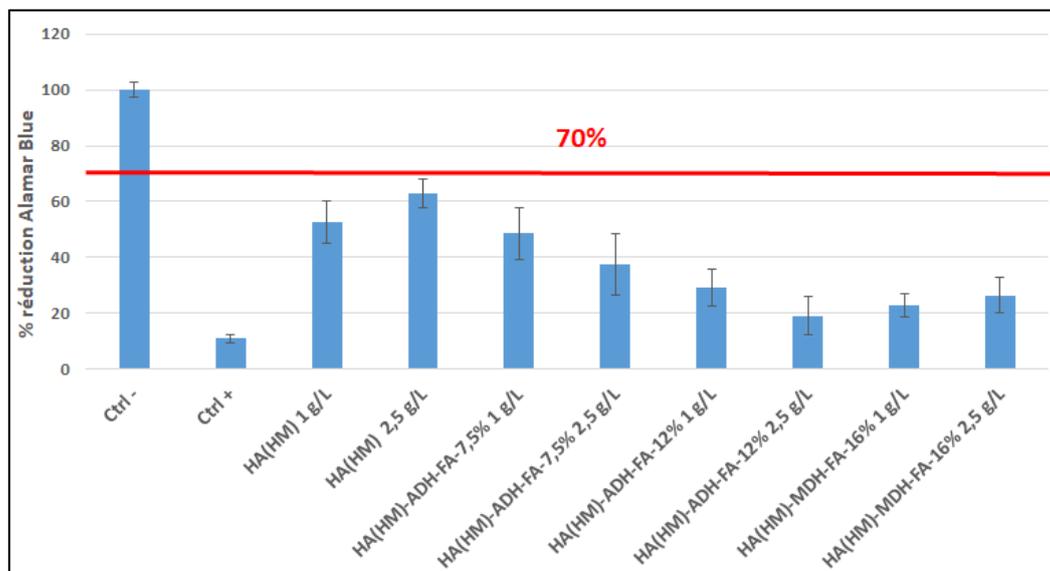


**Figure E-17 :** Images obtenues par le test Live/Dead après 24h de contact des cellules fibroblastes avec les solutions de  $HA_{HM}$  et du dérivé  $HA_{HM}$ -ADH-FA-12% à des concentrations de 1 et 2,5 g/L. Contrôle négatif (Ctrl -,  $\alpha$ -MEM complet) et contrôle positif (Ctrl +, DMSO 10%). Cellules vivantes (vert) et cellules mortes (rouge)

Sur la Figure E-17, une fluorescence verte des cellules est observée en présence des solutions d'acide hyaluronique et du dérivé HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-12% quelle que soit la concentration d'étude. Ceci confirme qu'après 24 de mise en contact, les cellules présentent une bonne morphologie pour ces conditions.

#### II.4.1.3. Test Alamar Blue®

La Figure E-18 représente les résultats obtenus suite au test à l'Alamar Blue®.



**Figure E-18 :** Activités métaboliques des cellules fibroblastes L929 après 48h de contact avec des solutions de HA<sub>HM</sub> et des dérivés HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-7,5%, HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-12% et HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-16% à des concentrations de 1 et 2,5 g/L. Contrôle négatif (Ctrl -,  $\alpha$ -MEM complet) et contrôle positif (Ctrl +, DMSO 10%),

La Figure E-18 montre que tous les échantillons testés possèdent des pourcentages de réduction < 70% du pourcentage du contrôle négatif mais qui restent supérieurs au % du contrôle positif (11%). De ce fait, à haute masse molaire, le HA précurseur ainsi que les dérivés HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-7,5%, HA<sub>HM</sub>-ADH-FA-12% et HA<sub>HM</sub>-MDH-FA-16% ont un effet sur le métabolisme cellulaire après 48h de contact. Ce résultat peut être expliqué par la grande viscosité des solutions testées en raison de la forte masse molaire du HA précurseur des dérivés HA-FA. Cette viscosité importante empêche le passage de l'oxygène aux cellules, limite les apports nutritifs et par conséquent leur métabolisme.

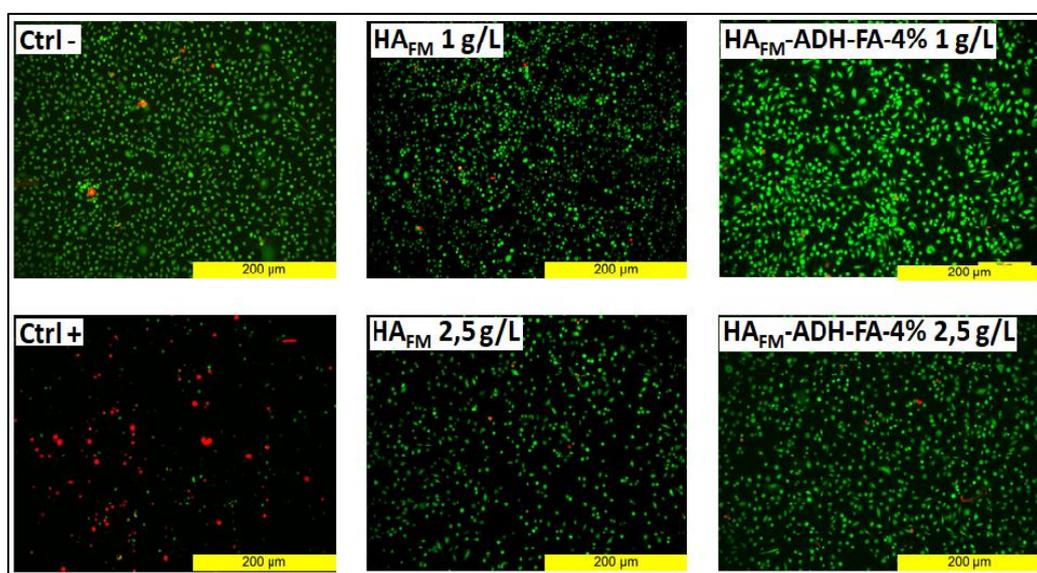
Pour surmonter à ce problème, nous avons décidé de reprendre les tests de cytotoxicité avec un HA précurseur et des dérivés HA-FA aux plus faibles masses molaires.

## II.4.2. HA et dérivés HA-FA à faible masse molaire

Les échantillons choisis pour cette étude sont : HA précurseur à  $50 \times 10^3$  g/mol noté  $HA_{FM}$  et les deux dérivés HA-ADH-FA-6 et HA-MDH-FA-8 à des degrés de substitution en acide férulique de 4 et 6,5% et des masses molaires de  $51 \times 10^3$  et  $42 \times 10^3$  g/mol, respectivement (voir Chapitre D-II-I.3). Ces deux dérivés seront désignés par  $HA_{FM}$ -ADH-FA-4% et  $HA_{FM}$ -MDH-FA-6,5% pour la suite des analyses de cytotoxicité.

### II.4.2.1. Test Live/Dead

Les images obtenues suite au test Live/Dead du HA précurseur et des dérivés HA-FA à faible masse molaire sont regroupées ci-dessous dans la Figure E-19.

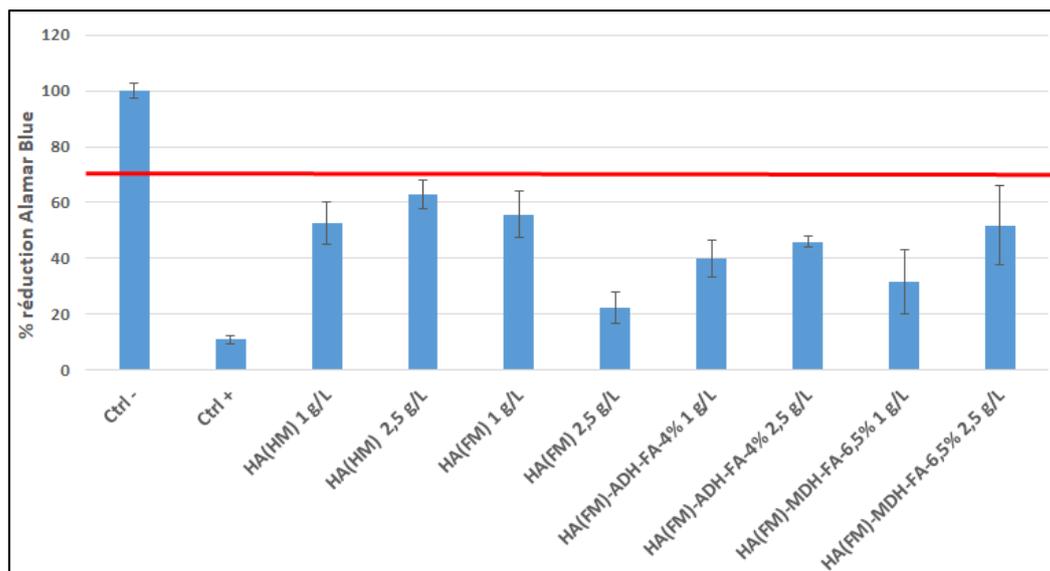


**Figure E-19 :** Images obtenues par le test Live/Dead après 24h de contact des cellules fibroblastes avec les solutions de  $HA_{FM}$  et du dérivé  $HA_{DM}$ -ADH-FA-4% à des concentrations de 1 et 2,5 g/L. Contrôle négatif (Ctrl -,  $\alpha$ -MEM complet) et contrôle positif (Ctrl +, DMSO 10%). Cellules vivantes (vert) et cellules mortes (rouge)

Identiquement aux tests Live/Dead précédents, le HA précurseur et les dérivés HA-FA à faible masse molaire ne présentent aucun effet cytotoxique sur les cellules fibroblastes après 24h de contact.

### II.4.2.2. Test Alamar Blue®

Les pourcentages de réduction de l'Alamar Blue® obtenus pour les solutions de  $HA_{FM}$  et des dérivés  $HA_{FM}$ -ADH-FA-4% et  $HA_{FM}$ -MDH-FA-6,5% sont présentés dans la Figure E-20.



**Figure E-20 :** Activités métaboliques des cellules fibroblastes L929 après 48h de contact avec des solutions de HA<sub>FM</sub> et des dérivés HA<sub>FM</sub>-ADH-FA-4%, HA<sub>FM</sub>-MDH-FA-6,5% à des concentrations de 1 et 2,5 g/L. Contrôle négatif (Ctrl -,  $\alpha$ -MEM complet) et contrôle positif (Ctrl +, DMSO 10%).

Comparé au contrôle négatif, le HA précurseur à faible masse molaire et les dérivés HA<sub>FM</sub>-ADH-FA-4% et HA<sub>FM</sub>-MDH-FA-6,5% présentent encore des pourcentages de réduction inférieurs à 70%. En comparaison avec le HA précurseur à haute masse molaire, le HA<sub>FM</sub> possède des pourcentages légèrement supérieurs à 1 g/L et beaucoup plus faible à 2,5 g/L. Ceci nous mène à conclure que le ralentissement de la croissance des cellules n'est pas causé uniquement par l'élévation de la viscosité mais en raison d'autre paramètre qui peut être lié aux conditions d'analyse comme la stérilisation.

## II.5. Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre concernent l'évaluation des activités biologiques (antioxydantes et cytocompatibilité) de l'acide férulique et ses dimères ainsi que des polysaccharides (pullulane, carboxyméthylpullulane et acide hyaluronique) précurseurs ou modifiés par l'acide férulique.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord synthétisé les dimères d'acide férulique en faisant réagir la laccase sur l'acide férulique dans un milieu éthanol/tampon citrate-phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) (80/20, v/v). La RMN-<sup>1</sup>H réalisée après plusieurs étapes de purification, a confirmé qualitativement le succès de la réaction de dimérisation mais la quantification reste inaccessible vue les différentes formes dimères possibles.

L'analyse des activités antioxydantes face au radical DPPH• a révélé que l'acide férulique libre possède des propriétés antioxydantes ( $IC_{50}=5,55 \mu\text{g/mL}$  soit  $28,6 \mu\text{mol/L}$ ) plus importantes que celles de ses dimères ( $IC_{50}=6,53 \mu\text{g/mL}$  soit  $33,63 \mu\text{mol/L}$ ) tandis que les polysaccharides précurseurs ne possèdent aucune activité antioxydante excepté l'acide hyaluronique qui a exprimé un pouvoir antioxydant en raison de la présence d'une fonction amine dans sa structure.

Le greffage de l'acide férulique sur le pullulane et le CMP conduit à l'obtention de dérivés actifs mais avec des  $IC_{50}$  supérieurs (c.-à-d. activités antioxydantes moins importantes) à celle de FA non greffé. L'accessibilité au FA lorsqu'ils sont greffés et les problèmes de solubilité sont défavorables à l'activité antioxydante des dérivés alors que le caractère associatif (présence de clusters hydrophobes) semble être favorable au piégeage des radicaux DPPH•. Les hydrogels de CMP-FA possèdent également des propriétés antioxydantes mais qui restent inférieures à celles des solutions CMP-FA.

Dans le cas des dérivés HA-FA, nous avons détecté la formation d'un gel lors de l'ajout du radical DPPH• à la solution de HA-FA ce qui nous a empêché d'évaluer quantitativement leurs propriétés antioxydantes. Cependant, les observations visuelles ont confirmé cette activité. Pour quantifier ces activités, il serait nécessaire soit de changer le radical en utilisant le radical cation ABTS•+ par exemple soit de changer la méthode d'analyse comme FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Poxer)<sup>14</sup> ou ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)<sup>14</sup>.

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés sur les cellules fibroblastes L929 au moyen de deux méthodes : une qualitative qui est le test Live/Dead et une quantitative qui est le test à l'Alamar Blue®. Après 24 h de contact avec les cellules, le test Live/Dead a révélé aucun effet cytotoxique de l'acide férulique, des dimères ainsi que de tous les polysaccharides greffés ou non. Le test Alamar Blue®, obtenu après 48h de contact, a montré quelques résultats négatifs sans doute dus à des problèmes de viscosité notamment. Des tests de cytotoxicité supplémentaires doivent être effectués afin de confirmer ou non cette cytotoxicité et d'en comprendre l'origine exacte.

## Références bibliographiques

1. Adalakun, O. E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I. R., Le Roes-Hill, M. & Burton, S. G. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **74**, 29–35 (2012).
2. Dulong, V., Kouassi, M.-C., Labat, B., Le Cerf, D. & Picton, L. Antioxidant properties and bioactivity of Carboxymethylpullulan grafted with ferulic acid and of their hydrogels obtained by enzymatic reaction. *Food Chem.* **262**, 21–29 (2018).
3. Cassano, R., Trombino, S., Muzzalupo, R., Tavano, L. & Picci, N. A novel dextran hydrogel linking trans-ferulic acid for the stabilization and transdermal delivery of vitamin E. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **72**, 232–238 (2009).
4. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**, 25–30 (1995).
5. Olga, G., Styliani, C. & Ioannis, R. G. Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp-b-cyclodextrin. *Food Chem.* **185**, 33–40 (2015).
6. Gülçin, İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* **217**, 213–220 (2006).
7. Salgueiro, F. B., Lira, A. F., Rumjanek, V. M. & Castro, R. N. Phenolic composition and antioxidant properties of Brazilian Honeys. *Quim. Nov.* **37**, 821–826 (2014).
8. Kouassi, M.C., Thébault, P., Rihouey, C., Dé, E., Labat, B., Picton, L. & Dulong, V. Carboxymethylpullulan Grafted with Aminoguaiacol: Synthesis, Characterization, and Assessment of Antibacterial and Antioxidant Properties. *Biomacromolecules* **18**, 3238–3251 (2017).
9. Yu, L., Ren, J.-X., Nan, H.-M. & Liu, B.-F. Identification of antibacterial and antioxidant constituents of the essential oils of *Cynanchum chinense* and *Ligustrum compactum*. *Nat. Prod. Res.* **29**, 1779–1782 (2015).
10. Pérez-Rosés, R., Risco, E., Vila, R., Peñalver, P. & Cañigüeral, S. Biological and Nonbiological Antioxidant Activity of Some Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 4716–4724 (2016).
11. Wen, Y., Ye, F., Zhu, J. & Zhao, G. Corn starch ferulates with antioxidant properties prepared by N,N'-carbonyldiimidazole-mediated grafting procedure. *Food Chem.* **208**, 1–9 (2016).
12. Liu, J., Wen, X., Lu, J., Kan, J. & Jin, C. Free radical mediated grafting of chitosan with caffeic and ferulic acids: Structures and antioxidant activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **65**, 97–106 (2014).
13. Hafsa, J., Chaouch, M. A., Charfeddine, B., Rihouey, C., Limem, K., Le Cerf, D., Rouatbi, S. & Majdoub, H. Effect of ultrasonic degradation of hyaluronic acid extracted from rooster comb on antioxidant and antiglycation activities. *Pharm. Biol.* **55**, 156–163 (2017).
14. Pisoschi, A. M. & Negulescu, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem. Anal. Biochem.* **1**, 1–10 (2012).

# **Chapitre F- Hydrogels à base de polysaccharides obtenus par photoréticulation**

---



## Sommaire

Introduction.....	273
I. Réactions de greffage de l'amine/acide gras insaturé.....	275
I.1. Couplage direct entre le pullulane et l'acide linoléique .....	275
I.1.1. Synthèse mise en jeu .....	275
I.1.2. Caractérisation structurale du greffage .....	276
I.2. Couplage direct entre le CMP ou le HA et l'amine grasse insaturée.....	280
I.2.1. Protocole expérimental du greffage direct de l'amine grasse insaturée sur le HA ou le CMP.....	281
I.2.2. Caractérisation structurale du greffage .....	282
I.3. Couplage indirect entre le CMP et l'acide gras insaturé.....	286
I.3.1. Protocole expérimental du greffage indirect de l'acide gras insaturé sur le CMP.....	287
I.3.2. Caractérisation structurale du greffage .....	288
I.4. Conclusion sur les réactions de greffage.....	291
II. Caractérisations physico-chimiques.....	292
II.1. Couplage SEC/MALLS/DRI/Visco .....	292
II.2. Mesures rhéologiques.....	294
II.2.1. Mesures en écoulement.....	294
II.2.2. Mesures dynamiques.....	295
III. Gélification.....	298
III.1. Optimisation des conditions de photoréticulation .....	299
III.1.1. Effet de la concentration en photoamorceur .....	299
III.1.2. Effet de l'intensité du rayonnement UV.....	300
III.1.3. Effet du temps de l'application du rayonnement UV.....	301
III.1.4 Conditions choisies pour la photoréticulation.....	301
III.2. Influence des paramètres intrinsèques.....	301
III.2.1. Effet du DS .....	302
III.2.2. Effet du mode de greffage .....	302
III.2.3. Effet du nombre d'insaturation.....	303
IV. Conclusion.....	304
Références bibliographiques .....	306



## **Introduction**

**L**es triglycérides, constituants principaux des graisses animales et des huiles végétales, sont largement valorisés industriellement après saponification pour obtenir des acides gras saturés et/ou insaturés. Les acides gras peuvent être modifiés chimiquement en présence d'ammoniac (obtention d'une fonction nitrile) suivi d'une hydrogénation de cette extrémité pour obtenir des amines grasses saturées et/ou insaturées<sup>1</sup>. Le greffage de ces acides/amines gras insaturés sur un polysaccharide peut être une nouvelle voie d'obtention d'hydrogel en utilisant la réactivité de ces doubles liaisons notamment sous rayonnement lumineux.

Ce chapitre se compose de trois parties. Nous détaillerons dans une première partie les différentes voies utilisées pour greffer l'amine/acide gras insaturé sur les trois polysaccharides : le pullulane (neutre modèle), le carboxyméthylpullulane (anionique modèle) et l'acide hyaluronique (anionique d'intérêt) ainsi que leurs caractérisations structurales. Une étude du comportement physico-chimique des dérivés obtenus en solution aqueuse dans différents régimes de concentration sera ensuite décrite dans une deuxième partie. Pour finir, les essais de gélification photo-contrôlée préliminaires de ces produits ainsi que les propriétés mécaniques de leurs hydrogels seront présentés.

## **I. Réactions de greffage de l'amine/acide gras insaturé**

### **I.1. Couplage direct entre le pullulane et l'acide linoléique**

#### **I.1.1. Synthèse mise en jeu**

Compte tenu des compositions chimiques du pullulane et de l'acide linoléique (C18:2), le couplage le plus simple entre ces deux composés ne peut se réaliser qu'à travers la création de liens ester comme dans le cas du couplage entre le pullulane et l'acide férulique. De ce fait, nous avons utilisé le même protocole de synthèse (voir Chapitre C-I.2.1) qui consiste à utiliser le CDI comme agent activateur des fonctions acide carboxylique de l'acide linoléique dans le DMSO anhydre (Figure F-1). Dans un premier test, nous avons visé un taux de greffage théorique d'acide linoléique / AGU de 15% codifié (PUL-C18:2-15%).

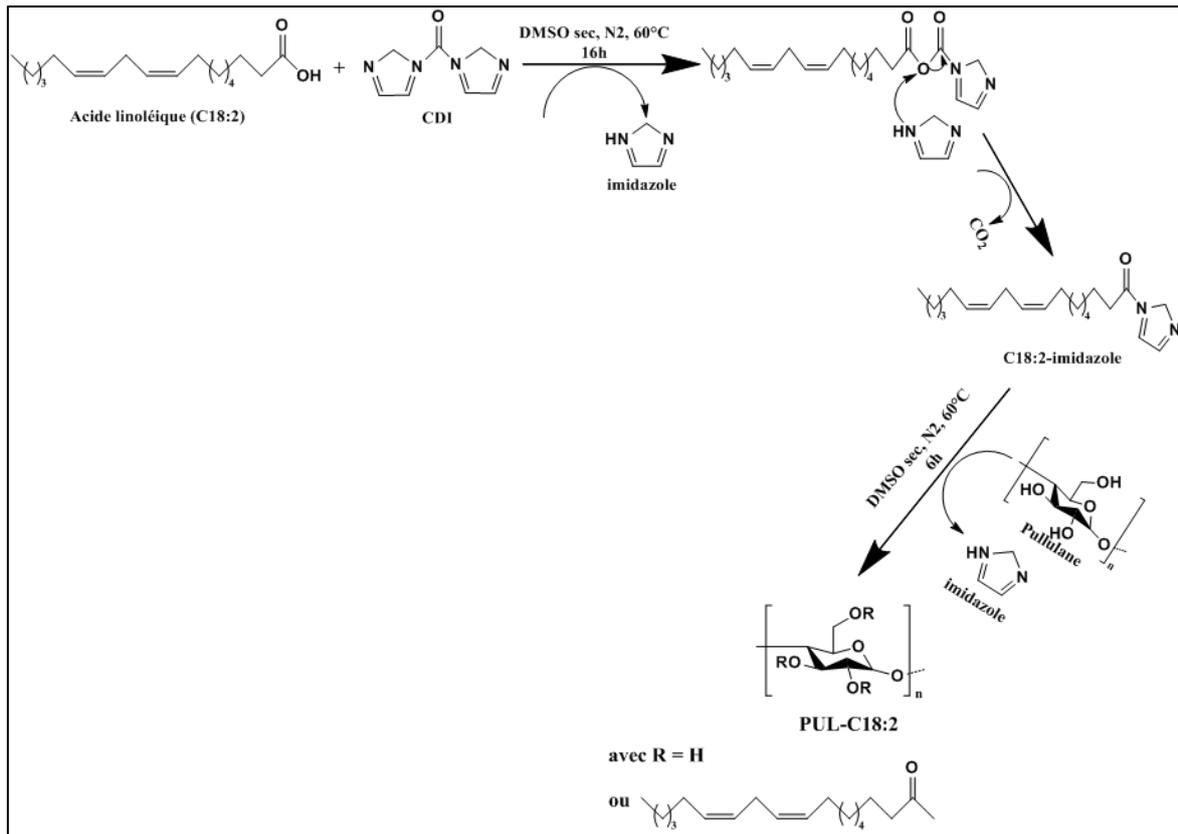


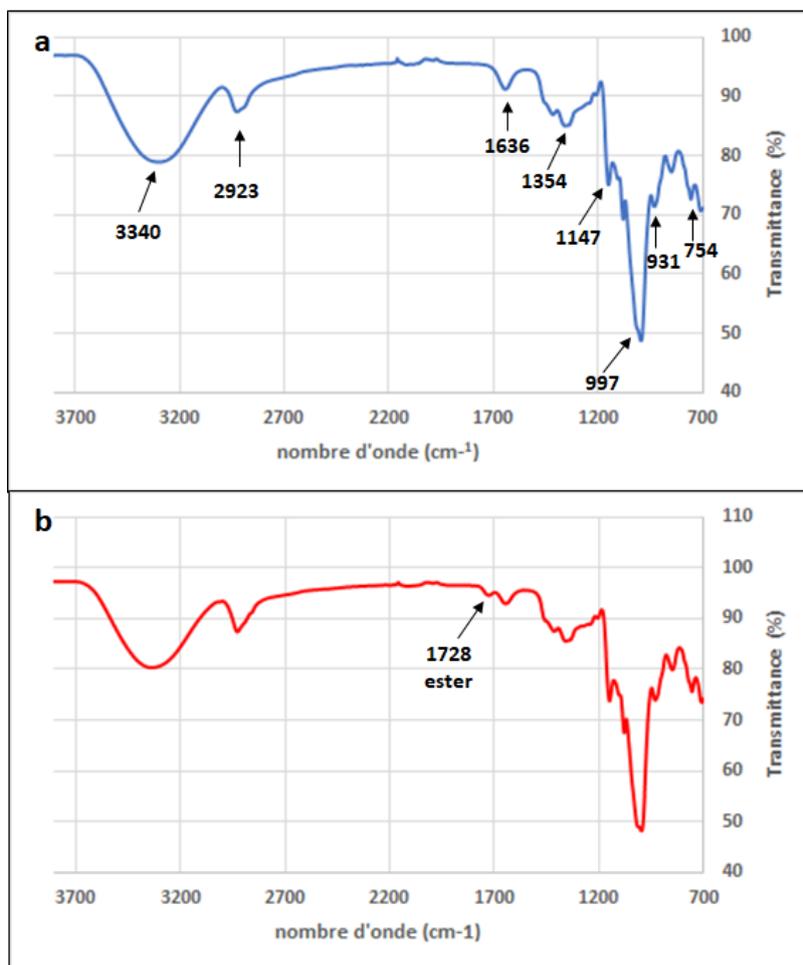
Figure F-1 : Réaction de greffage de l'acide linoléique sur le pullulane

### I.1.2. Caractérisation structurale du greffage

La détection qualitative des greffons d'acide linoléique a été effectuée par IR tandis que leur quantification a été assurée par RMN-<sup>1</sup>H.

#### I.1.2.1. Spectroscopie IR

Les spectres FT-IR (transmittance = f (nombre d'onde)) du pullulane précurseur et du pullulane modifié par l'acide linoléique (PUL-C18 :2-T15%) sont présentés dans la Figure F-2.



**Figure F-2 :** Spectres IR de : a) Pullulane. b) PUL-C18:2-T15%

Le spectre IR du PUL (Figure F-2-a) a été discuté dans le Chapitre C-I.2.2.1. Celui du PUL-C18:2 (Figure F-2-b) montre l'apparition d'un nouveau pic, certes modeste, vers 1728 cm<sup>-1</sup> caractéristique de la vibration d'élongation du carbonyle (C=O) du lien ester établi entre le pullulane et l'acide linoléique. Ce résultat semble bien confirmer de manière qualitative le succès du greffage.

### I.1.2.2. Spectroscopie RMN

L'analyse RMN-<sup>1</sup>H de ce dérivé a été réalisée dans le DMSO-d<sub>6</sub>. Le spectre obtenu est présenté dans la Figure F-3 accompagné par les spectres du pullulane précurseur et de l'acide linoléique réalisés dans le même solvant deutéré.

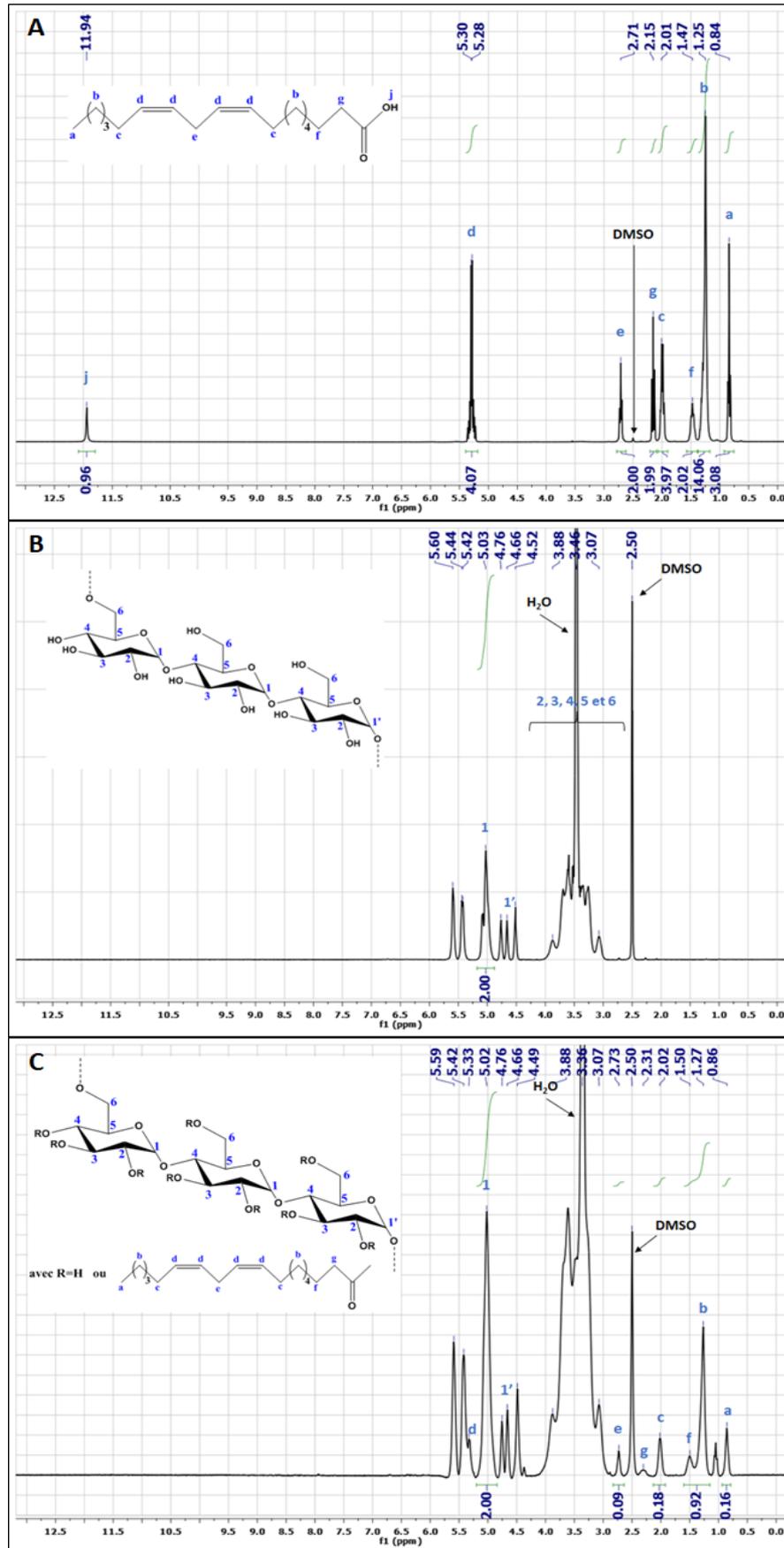


Figure F-3 : Spectres RMN-<sup>1</sup>H dans DMSO-d<sub>6</sub> de : A) Acide linoléique. B) Pullulane. C) PUL-C18:2-T15%

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H de l'acide linoléique (Figure F-3-A) montre un pic à 0,84 ppm attribué aux 3 protons du groupe méthyle (3H<sub>a</sub>). Les protons méthylènes en position α (2H<sub>g</sub>) et en position β (2H<sub>f</sub>) du groupement carbonyle apparaissent respectivement à 2,15 et 1,47 ppm. Le signal à 1,25 ppm correspond aux protons méthylènes en position β des doubles liaisons (14H<sub>b</sub>) tandis que ceux à 2,01 et 2,71 ppm sont attribués respectivement aux deux méthylènes en position α des deux côtés des doubles liaisons (4H<sub>c</sub>) et au méthylène en position α entre les deux doubles liaisons (2H<sub>e</sub>). Les protons éthyléniques (4H<sub>d</sub>) sont détectés à 5,3 ppm alors que celui de la fonction acide (H<sub>j</sub>) apparaît à 11,94 ppm<sup>2</sup>.

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H du PUL dans DMSO-d<sub>6</sub> (Figure F-3-B) est quasiment identique à celui dans NaOD/D<sub>2</sub>O (85/15, v/v) (voir Chapitre C-I.2.2.2) avec une légère différence au niveau du déplacement chimique des pics caractéristiques en raison d'un comportement différent de ce polysaccharide dans ce milieu. Les protons cycliques non anomères (H<sub>2, 3, 4, 5 et 6</sub>) sont détectés au même déplacement chimique (entre 3 et 4 ppm) confondus avec le pic de l'eau résiduelle à 3,46 ppm. Cependant, entre 4,25 et 5,75 ppm à côté des protons anomères en α-1,6 (H<sub>1'</sub>, 4,66 ppm) et en α-1,4 (2H<sub>1</sub>, 5,03 ppm), de nouveaux pics sont apparus et peuvent être attribués aux protons des fonctions hydroxyle du pullulane<sup>3</sup>.

La Figure F-3-C présente le spectre du dérivé PUL-C18:2-T15% qui montre la présence des pics caractéristiques du pullulane (entre 3 – 4 ppm et 4,25 – 5,75 ppm) et de l'acide linoléique (0,86, 1,27, 1,5, 2,02, 2,31, 2,73 et 5,33 ppm). Ces observations accompagnées par la disparition du proton H<sub>j</sub> caractéristique de la fonction acide de l'acide linoléique, confirment de nouveau et clairement cette fois le succès de la réaction de greffage.

L'intégration du pic à 5,02 ppm référée à 2 (2H<sub>1</sub> anomères en α-1,4 du pullulane) et du pic à 0,86 ppm (3 H<sub>a</sub> du groupe méthyle de l'acide linoléique) permet la détermination du degré de substitution expérimental du C18 :2 par rapport à l'unité maltotriose (MTR) en appliquant la relation suivante :

$$\%DS_{C18:2/MTR} = \frac{I(H_a)}{3} \times 100 \quad (\text{Eq. F1})$$

Pour calculer le DS de C18 :2 par rapport à l'unité d'anhydroglucose (AGU), l'Eq. E1 devient :

$$\%DS_{C18:2} = \frac{I(H_a)}{3 \times 3} \times 100 \quad (\text{Eq. F2})$$

Ceci nous donne une valeur de DS<sub>C18:2</sub> ≈ 2% de C18 :2 / AGU et par conséquent le dérivé obtenu sera noté PUL-C18:2-2%.

### **I.1.2.3. Tests de solubilité**

Un problème de solubilisation du dérivé obtenu PUL-C18 :2-2% dans l'eau à 10 g/L a été détecté même en chauffant à 60°C. De ce fait, une étude de solubilité de ce dérivé à la même concentration et à température ambiante dans différentes proportions eau/DMSO a été réalisée démontrant une bonne solubilité à partir d'une proportion de 60/40 eau/DMSO (v/v). L'hydrosolubilité limitée du dérivé obtenu est due certainement au caractère neutre du pullulane et à la forte hydrophobie du greffon (en comparaison de l'acide férulique). Par conséquent, l'obtention des hydrogels n'est pas accessible à partir ce dérivé. Il faudrait envisager des dérivés plus faiblement greffés au risque que ceux-ci ne soient pas assez fonctionnalisés pour donner lieu à une percolation lors de la réticulation photoamorcée.

Nous avons ainsi préféré nous focaliser sur les modifications apportées aux polysaccharides anioniques : CMP et HA.

## **I.2. Couplage direct entre le CMP ou le HA et l'amine grasse insaturée**

Inspirée des travaux de *Pavan et al.*<sup>4</sup> sur le greffage d'amine grasse saturée sur l'acide hyaluronique, la réaction du greffage direct de l'amine grasse insaturée (oleylamine, NH<sub>2</sub>-C18:1) sur le CMP ou le HA repose également sur la chimie des imidazoles en utilisant le CDI comme agent de couplage dans le DMSO. Nous avons choisi cette chimie à la place de celle des carbodiimides en raison de l'insolubilité de l'oleylamine dans le mélange éthanol/eau (80/20, v/v) et la réactivité limitée de l'agent de couplage EDC dans les solvants organiques (voir Chapitre C-I.1.1).

La réaction de greffage se déroule donc en deux étapes successives ; l'activation des fonctions acide du CMP ou HA par le CDI puis le couplage entre cette fonction activée et la fonction amine de l'oleylamine via la création de lien amide (Figure F-4). Les proportions de l'oleylamine / HA et de l'oleylamine / CMP ont été adaptées de façon à viser des DS théoriques de 15 et 30%. Nous nous sommes limités à un DS théorique maximal de 30% pour garantir l'hydrosolubilité du dérivé obtenu vue la grande hydrophobie de la molécule à greffer. Un exemple de protocole de greffage du NH<sub>2</sub>-C18:1 sur le HA à un DS théorique de 30% et les différentes analyses de caractérisation structurale seront présentés à la suite.

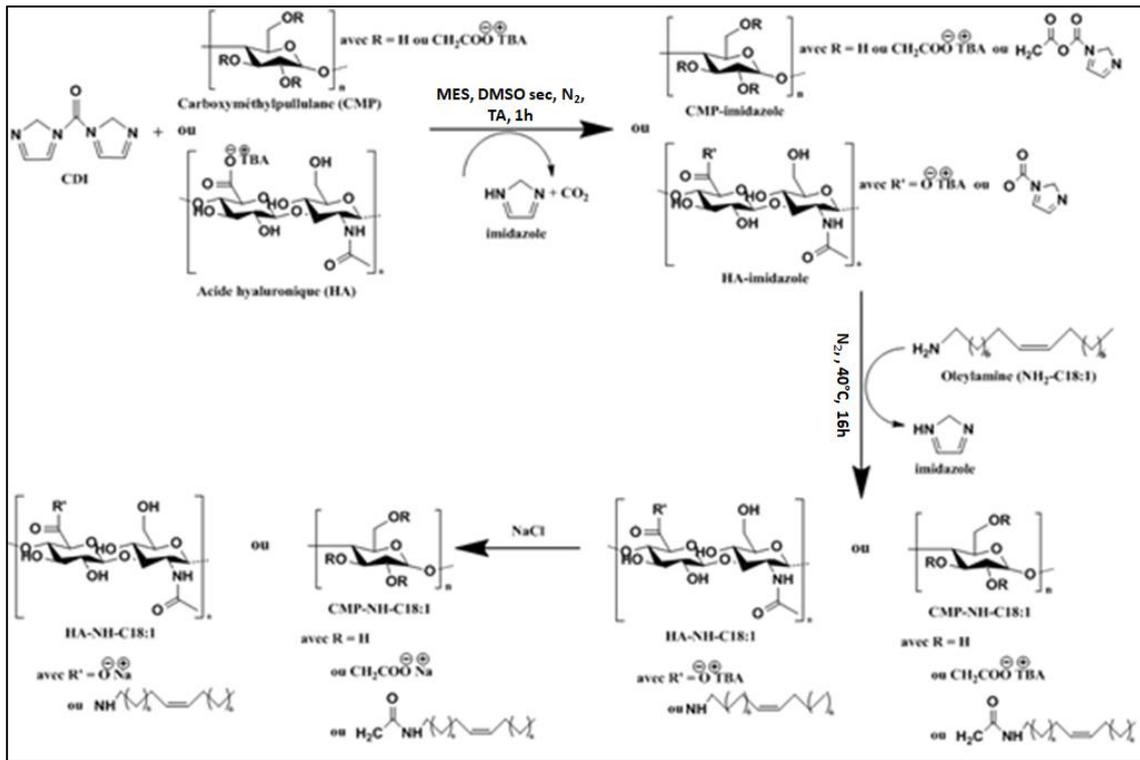


Figure F-4 : Réaction de greffage de l'oleylamine sur le CMP ou le HA

### I.2.1. Protocole expérimental du greffage direct de l'amine grasse insaturée sur le HA ou le CMP

Étant donné que le CMP et le HA sont sous forme de sel de sodium, ils ne sont pas solubles dans le DMSO, solvant de la réaction. Pour les rendre solubles dans ce solvant, leur transformation sous forme de sel de tétrabutylammonium (TBA) est nécessaire.

Pour ce faire, on prépare une solution de CMP à 25 g/L (1 g/L dans le cas de HA) dans l'eau et la solution est passée dans une colonne échangeuse de cation (IRN 77) préalablement régénérée. Au cours du passage du CMP ou du HA dans la colonne, on vérifie régulièrement le pH qui doit être autour de 3 afin de s'assurer que l'échange de cation ait lieu. Les cations Na<sup>+</sup> sont alors échangés par des protons H<sup>+</sup> qui seront plus facilement substitués par le tétrabutylammonium. Pour cela, la solution est récupérée puis neutralisée doucement par une solution de TBAOH jusqu'à atteindre la neutralité (pH=7). L'ajout doit être bien précis afin d'éviter la présence de sel de TBA en excès qui nécessitera une étape supplémentaire de purification (dialyse). La solution de CMP TBA ou de HA TBA est ensuite congelée et lyophilisée.

Une fois que le changement de sel est réalisé, on peut procéder au greffage de l'amine grasse insaturée sur les deux polysaccharides sous forme de sel de TBA.

À titre d'exemple, pour la synthèse du HA-NH-C18:1 à un DS théorique de 30%, 0,5 g de HA TBA (0,8 mmol) est solubilisé dans 250 mL de DMSO anhydre dans un ballon bicol durant 24h sous agitation magnétique (400 tr/min) à température ambiante. La solution est ensuite dégazée sous diazote puis on ajoute une quantité catalytique de 10  $\mu$ L d'acide méthanesulfonique (MES), catalyseur permettant la protonation des fonctions carboxylate de HA. Après environ 15 min, on introduit 145 mg de CDI (0,88 mmol) et on laisse réagir pendant 45 min à température ambiante. Ensuite, 80  $\mu$ L d'oleylamine (0,24 mmol) est ajouté à la solution placée par la suite dans un bain-marie à 40°C sous agitation durant 16h.

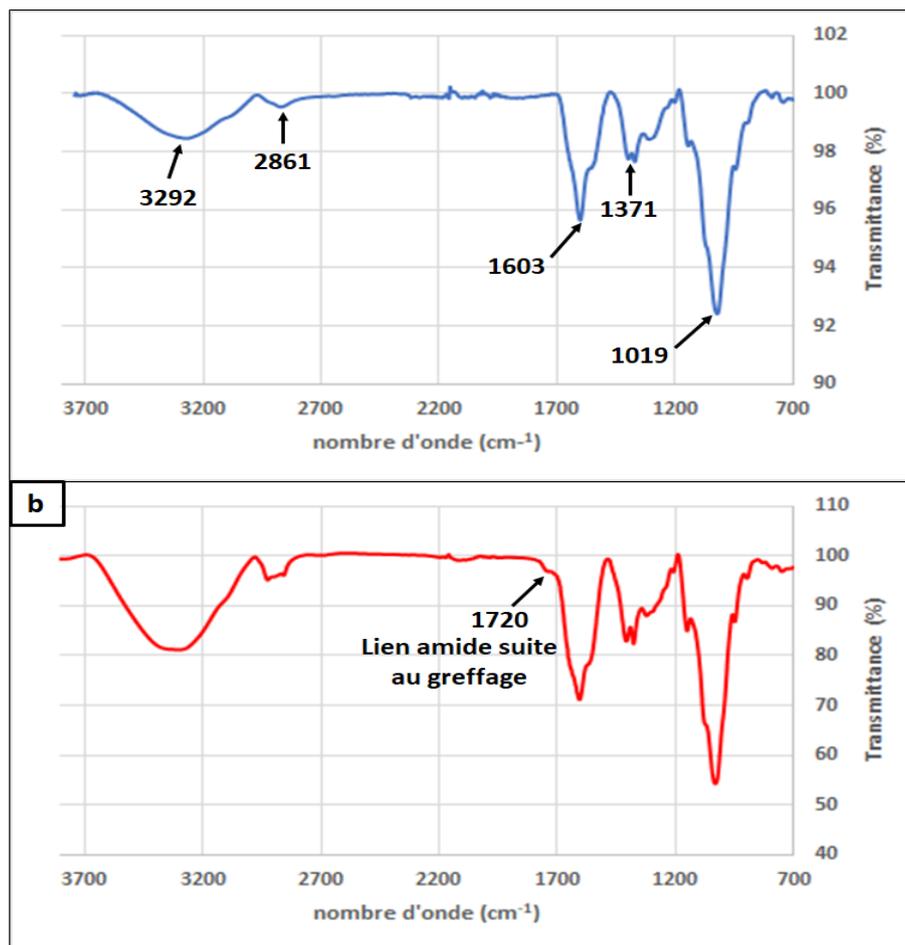
À la fin de la réaction, on ajoute goutte à goutte 100 mL d'une solution saturée de NaCl pour substituer les ions TBA encore présents sur la chaîne polymère par Na<sup>+</sup> permettant l'arrêt de la réaction, la future hydrosolubilité et un début de précipitation. La précipitation est achevée par l'ajout d'un large excès d'acétone (1,5 L). On obtient alors une fine poudre blanche que l'on récupère sur un fritté P4. Celle-ci est solubilisée dans 250 mL d'eau milli-Q que l'on dialyse (membrane de dialyse Spectra-Por 12-14 kDa) contre l'eau milli-Q jusqu'à la baisse de la conductivité des eaux de dialyse à une valeur proche de celle de l'eau milli-Q. La solution dialysée est ensuite congelée avant d'être lyophilisée pendant une semaine. On récupère ainsi le dérivé greffé sous forme de coton blanc et qui sera annoté HA-NH-C18:1-T30% (avec T pour théorique).

Les produits obtenus suite au greffage de l'oleylamine sur le CMP à deux DS théoriques de 15 et 30% et en appliquant le même protocole de synthèse seront désignés quant à eux par CMP-NH-C18:1-T15% et CMP-NH-C18:1-T30%.

## **I.2.2. Caractérisation structurale du greffage**

### **I.2.2.1. FT-IR**

Les spectres IR d'acide hyaluronique et du dérivé HA-NH-C18:1-T30% sont présentées dans la Figure F-5.

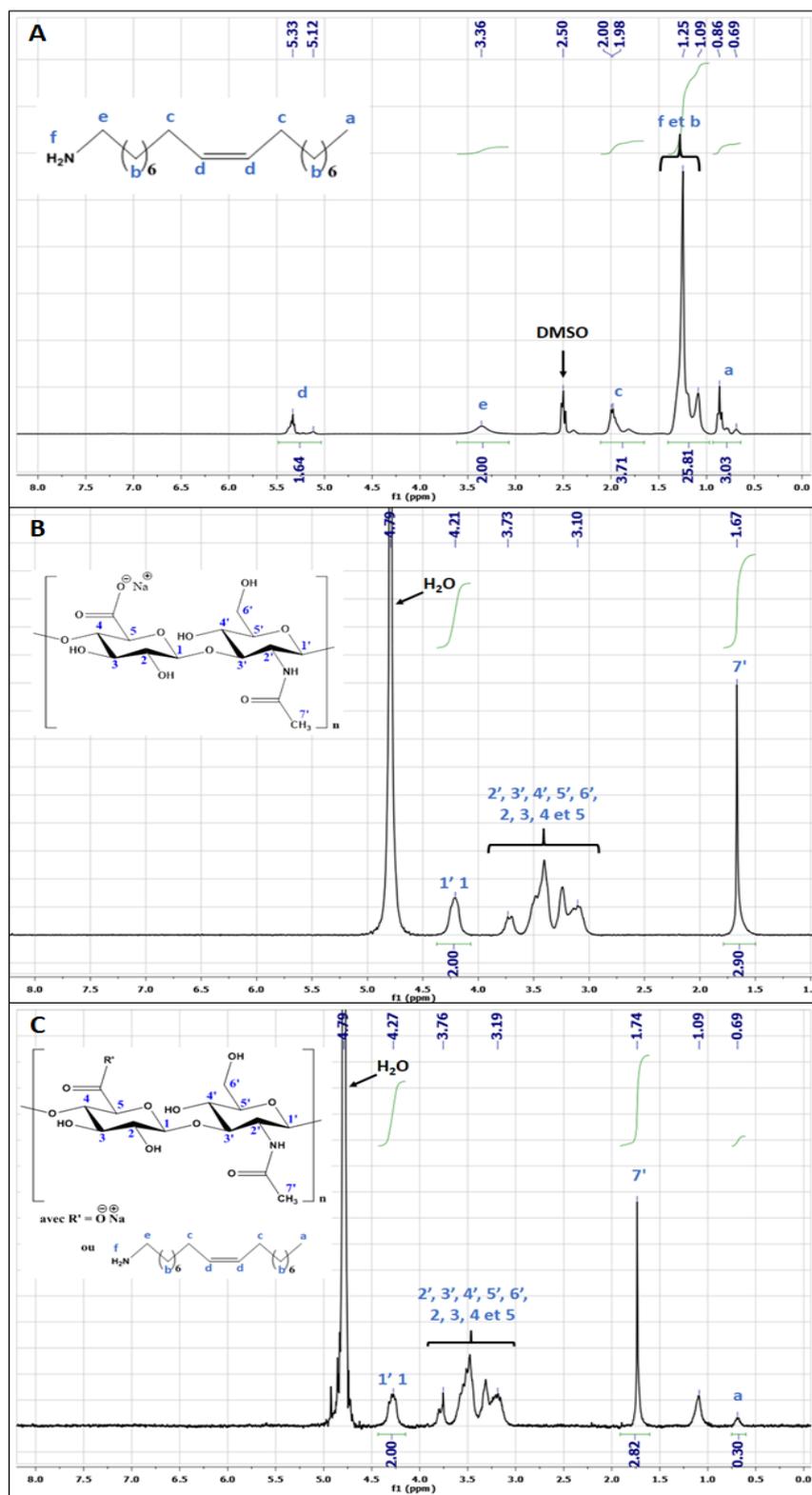


**Figure F-5** : Spectres IR de : a) Acide hyaluronique. b) HA-NH-C18:1-T30%

En comparaison avec le spectre du HA précurseur (Figure F-5-a), on remarque l'apparition d'un pic modeste vers  $1720\text{ cm}^{-1}$  sur le spectre IR du dérivé HA-NH-C18:1-T30% (Figure F-5-b). Ce pic est caractéristique de la fonction carbonyle du lien amide créé entre le HA et l'oleylamine, preuve de la réussite de la réaction de greffage.

#### I.2.2.2. RMN

La spectroscopie RMN- $^1\text{H}$  a été utilisée pour déterminer le taux de greffage expérimental de l'amine grasse insaturée. La Figure F-6 représente le spectre RMN- $^1\text{H}$  réalisé dans  $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$  (85/15, v/v) pour le dérivé HA-NH-C18:1-T30% accompagné par les spectres de HA précurseur dans le même solvant deutéré et de l'oleylamine dans le  $\text{DMSO-d}_6$ .



**Figure F-6** : Spectres RMN-<sup>1</sup>H dans DMSO-d<sub>6</sub> de : **A**) Oleylamine et dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15) de : **(B)** Acide Hyaluronique. **C**) HA-NH-C18:1-T30%

Le spectre RMN-1H de l'oleylamine (Figure F-6-A) montre tout d'abord la présence d'un pic entre 0,69 et 0,86 ppm caractéristique des trois protons du groupe méthyle (3H<sub>a</sub>). Le large pic observé entre 1,09 et 1,25 ppm est attribué aux protons de la fonction amine (2H<sub>f</sub>) et

aux protons en position  $\beta$  (24 H<sub>b</sub>) des protons éthyléniques qui apparaissent à leur tour entre 5,12 et 5,33 ppm (2H<sub>d</sub>). Les signaux qui résonnent à 2 et 3,36 ppm correspondent respectivement aux protons en position  $\alpha$  de la double liaison (4H<sub>c</sub>) et en position  $\alpha$  de la fonction amine (2H<sub>e</sub>)<sup>5</sup>.

Comparé au spectre RMN-<sup>1</sup>H du HA (Figure F-6-B) détaillé précédemment (voir Chapitre D-II-1.2.2.2), celui du dérivé HA-NH-C18:1-T30% (Figure F-6-C) montre, en plus des protons des pics caractéristiques du HA (1,74 ppm, entre 3,1 – 3,8 ppm et 4,27 ppm), l'apparition du pic à 0,69 ppm caractéristique des protons du groupe méthyle de l'oleylamine (3H<sub>a</sub>) confirmant le bon déroulement de la réaction de greffage. La non-présence des autres pics de l'oleylamine est due probablement à sa mauvaise solvatation dans le D<sub>2</sub>O (oleylamine est insoluble dans l'eau).

En se basant sur les deux protons anomères du HA (H<sub>1</sub> et H<sub>1'</sub>) et les trois protons du méthyle de l'oleylamine (3H<sub>a</sub>), le degré de substitution de l'oleylamine/GAG (DS<sub>NH<sub>2</sub>-C18:1</sub>) peut être calculé par l'équation suivante :

$$\%DS_{NH_2-C18:1} = \frac{I(H_a)}{3} \times 100 \quad (\text{Eq. F3})$$

Dans le cas des dérivés CMP-NH-C18 :1, nous nous sommes basés sur les trois protons anomères du CMP et sur les trois protons du méthyle de l'oleylamine pour évaluer le taux de greffage expérimental de l'oleylamine / CMP<sub>AGU</sub> en appliquant la relation suivante :

$$\%DS_{NH_2-C18:1} = \frac{I(H_a)}{I(H_{\text{anomériques}}) \times 3} \times 100 \quad (\text{Eq. F4})$$

Le Tableau F-1 regroupe les différentes valeurs de DS expérimentaux obtenus suite au greffage de l'oleylamine sur le HA et le CMP.

**Tableau F-1 : DS expérimentaux de NH<sub>2</sub>-C18 :1 des dérivés HA-NH-C18:1-T30%, CMP-NH-C18:1-T15% et CMP-NH-C18:1-T30% déterminés par RMN-<sup>1</sup>H**

Dérivé	DS <sub>NH<sub>2</sub>-C18:1</sub> th	DS <sub>NH<sub>2</sub>-C18 :1</sub> exp	Efficacité du greffage
HA-NH-C18 :1-T30%	30 %	10 %	33 %
CMP-NH-C18 :1-T30%	30 %	10 %	33 %
CMP-NH-C18 :1-T15%	15 %	3 %	20 %

L'efficacité de la réaction de greffage de l'oleylamine sur le HA et le CMP est comprise entre 20 et 33% soit entre 2 et 3 fois plus élevée que celle obtenue par Pavan *et al.*<sup>4</sup> avec de l'octylamine, dodécylamine, pentadécylamine, hexadécylamine et octadécylamine (10%).

### I.3. Couplage indirect entre le CMP et l'acide gras insaturé

Les acides gras ne peuvent pas facilement être condensés sur les polysaccharides anioniques. Pour réagir sur les fonctions acide carboxylique du CMP, les deux acides gras insaturés retenus (acide oléique (C18:1) et acide linoléique (C18:2)) doivent être modifiés initialement par un intermédiaire diamine comme l'ADH (qui agira aussi comme un bras espaceur) selon le protocole précédemment décrit pour l'acide férulique (Chapitre D-II-I.1). Ensuite, le greffage de ces dérivés est possible via la chimie des imidazoles en utilisant le CDI comme agent de couplage, méthode décrite lors du couplage direct entre l'oleylamine et le HA/CMP (Chapitre F-I.2). La Figure F-7 résume ces deux étapes.

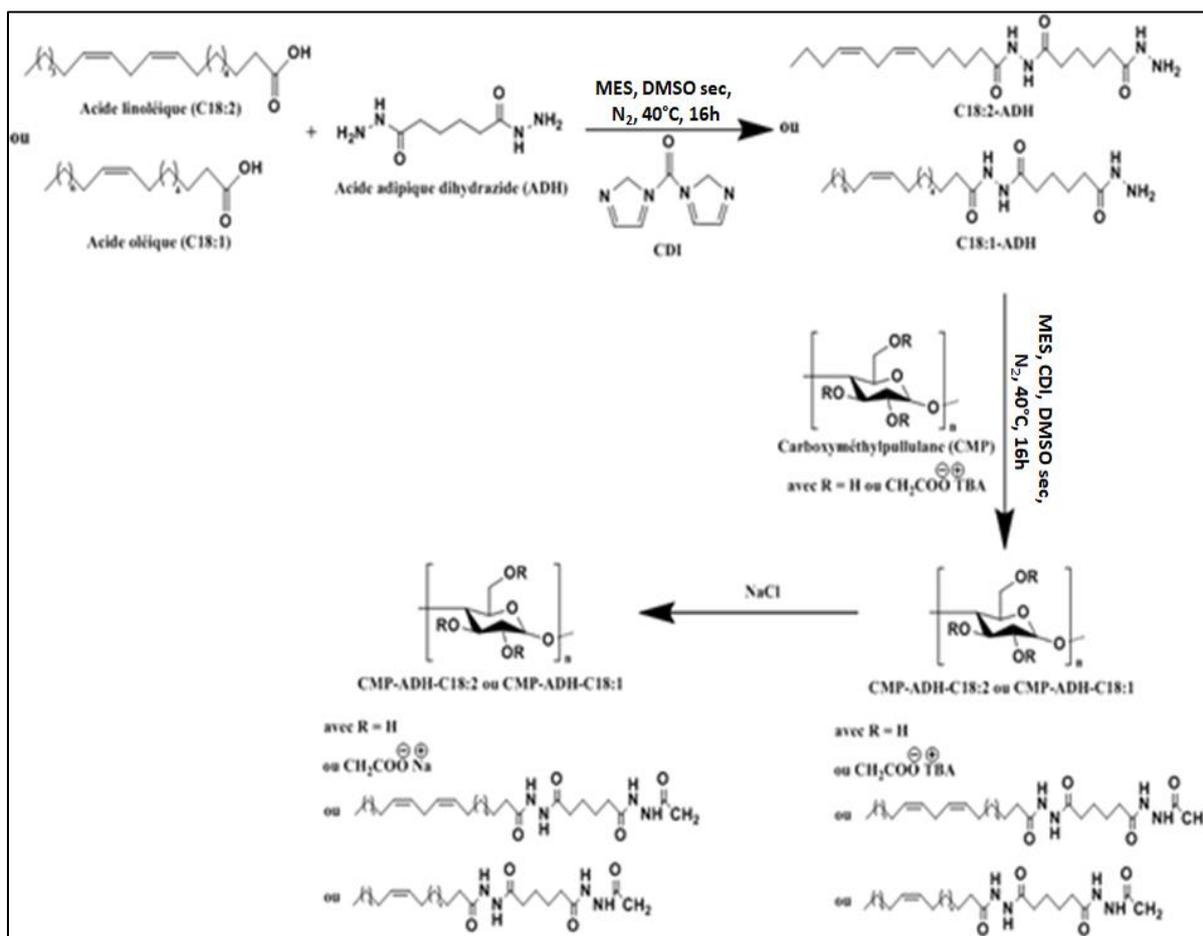


Figure F-7 : Réaction de greffage de l'acide oléique ou de l'acide linoléique sur le CMP

### **I.3.1. Protocole expérimental du greffage indirect de l'acide gras insaturé sur le CMP**

Nous détaillerons dans cette partie la réaction de couplage entre l'acide oléique (C18:1) et le CMP comme exemple de protocole avec un taux théorique de 60% pour obtenir l'échantillon codifié par CMP-ADH-C18:1-T60%.

La première étape de synthèse consiste à la pré-fonctionnalisation de l'acide oléique par l'ADH. Pour ce faire, dans un ballon bicol de 25 mL, on introduit 240  $\mu$ L d'acide oléique (0,75 mmol) qu'on solubilise dans 10 mL de DMSO anhydre. Une fois que la solution est dégazée sous diazote, on lui ajoute 134 mg de CDI (0,83 mmol). Après 45 min, 132 mg d'ADH (0,75 mmol) est incorporé à la solution déplacée ensuite dans un bain d'huile à 40°C pendant 16h.

À la fin de la réaction de la première étape, on ajoute 10  $\mu$ L de MES au CMP (0,5 g, soit 1,25 mmol) préalablement solubilisé de façon séparée dans 50 mL de DMSO anhydre. Après 15min, on introduit 225 mg de CDI (1,4 mmol) à cette solution après dégazage sous diazote et on laisse réagir encore 45 min. Puis, on ajoute goutte à goutte la solution récupérée de la première étape à celle du CMP activé. Le mélange est ensuite maintenu sous agitation dans un bain d'huile à 40°C pendant 16h. A la fin de la réaction, 50 mL d'une solution saturée de NaCl est introduit avant de réaliser une précipitation dans 500 mL d'acétone. Le précipité est ainsi récupéré par filtration sur fritté P4, solubilisé de nouveau dans 250 mL d'eau milli-Q et dialysé contre l'eau milli-Q en utilisant une membrane de dialyse Spectra-Por 12-14 kDa. À la fin de la dialyse, la solution est congelée puis lyophilisée pendant une semaine. On récupère un « coton » blanc qui est ensuite conservé à 4°C.

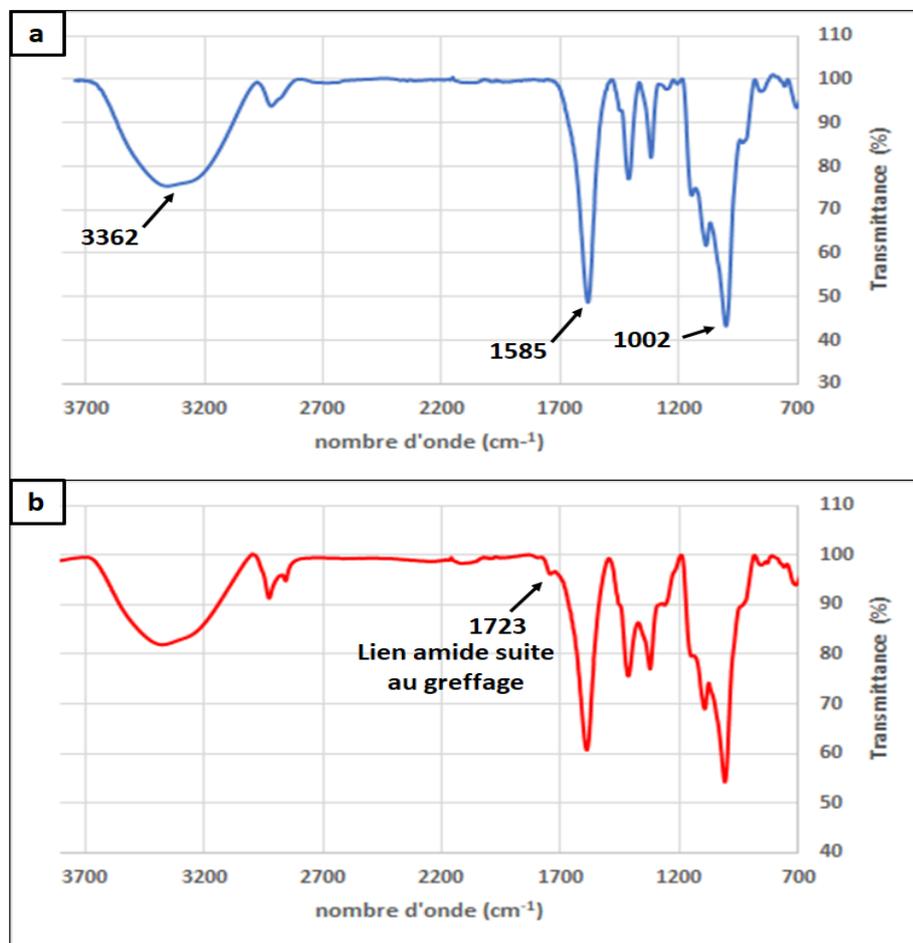
Ce protocole a été adapté de manière à obtenir un dérivé de CMP modifié par l'acide linoléique à un DS théorique égal à 60% désigné par CMP-ADH-C18:2-T60%.

Compte tenu de l'efficacité limitée de la première étape de la réaction du greffage (voir Chapitre D-II-1.1), nous avons choisi de travailler à un DS théorique de 60% dans le but d'obtenir des degrés de substitution expérimentaux proches de ceux des dérivés obtenus précédemment par le couplage direct permettant ainsi une comparaison plus adéquate.

## I.3.2. Caractérisation structurale du greffage

### I.3.2.1. FT-IR

La Figure F-8 représente les spectres IR de CMP et du dérivé CMP-ADH-C18 :1-T60%.



**Figure F-8** : Spectres IR de : a) CMP. b) CMP-ADH-C18:1-T60%

La présence d'un petit pic à  $1723\text{ cm}^{-1}$  sur le spectre IR du dérivé CMP-ADH-C18:1-T60% (Figure F-8-b) est liée à la vibration d'élongation du C=O du groupement carboxyle du lien amide établi entre le CMP et l'acide oléique pré-fonctionnalisé.

### I.3.2.2. RMN

La caractérisation quantitative a été assurée par la spectroscopie RMN- $^1\text{H}$ . Les spectres obtenus de l'acide linoléique dans le DMSO- $d_6$ , du CMP et du CMP-ADH-C18:1-T60% dans  $\text{D}_2\text{O}$  sont regroupés dans la Figure F-9.

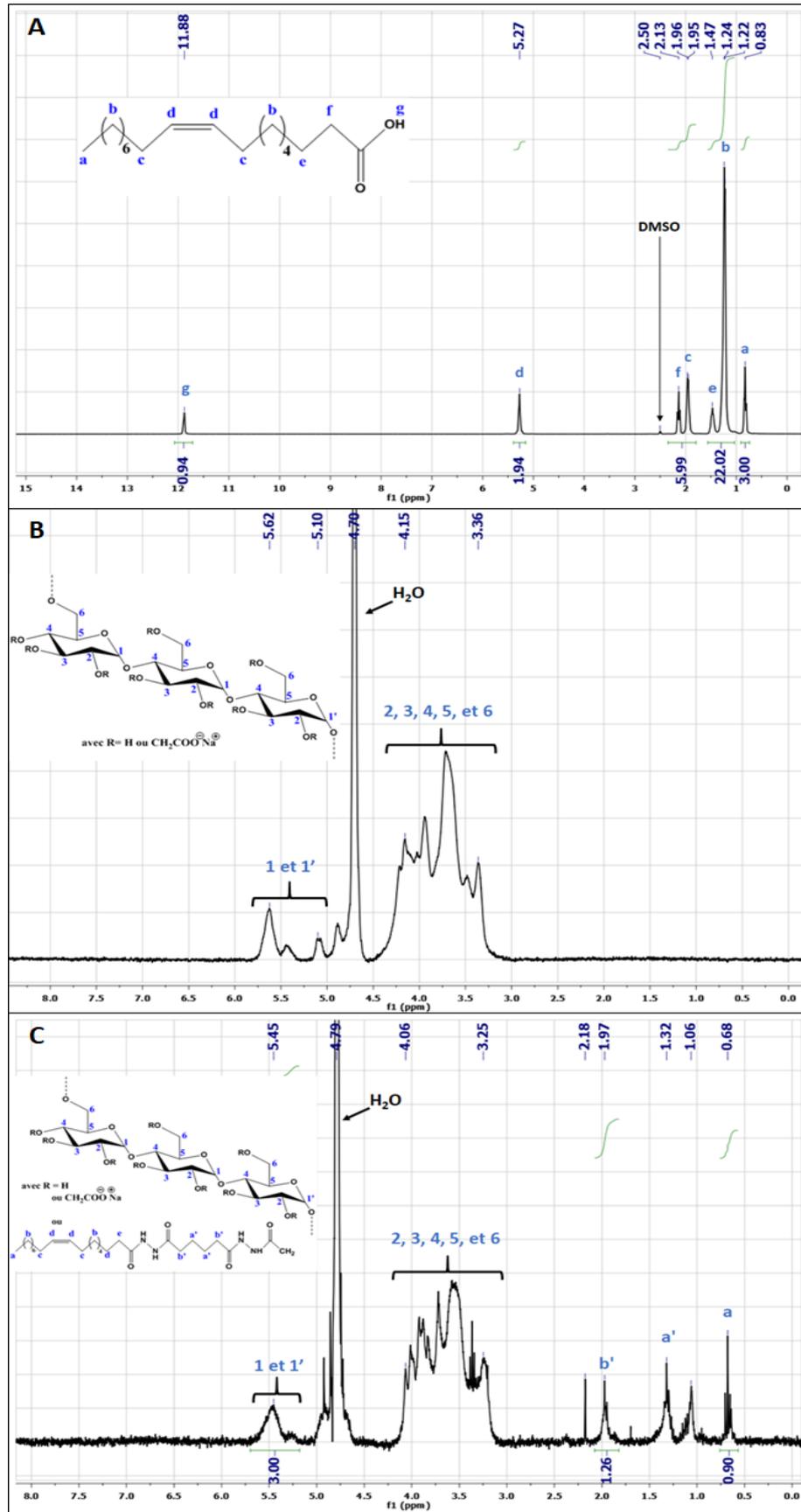


Figure F-9 : Spectres RMN-<sup>1</sup>H dans DMSO-d<sub>6</sub> de : A) Acide oléique et dans D<sub>2</sub>O de : (B) CMP. C) CMP-ADH-C18:1-T60%

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H de l'acide oléique (Figure F-9-A) présente des signaux à 0,83 ; 1,22 et 1,47 ppm attribués respectivement aux protons du méthyle (3H<sub>a</sub>), aux protons en position β de la double liaison (2H<sub>b</sub>) et aux protons en position β du carbonyle de la fonction acide (2H<sub>c</sub>). Le pic observé à 1,95 ppm correspond aux protons en position α de la double liaison (4H<sub>c</sub>) tandis que celui à 2,13 ppm est caractéristique des deux protons en position α du carbonyle de la fonction acide (2H<sub>f</sub>). Les protons éthyléniques (2H<sub>d</sub>) apparaissent à 5,27 ppm alors que le proton de la fonction acide (H<sub>g</sub>) apparaît à 11,88 ppm<sup>6</sup>.

En comparaison avec le spectre du CMP présenté dans la Figure F-9-B (détaillé antérieurement, voir Chapitre D-I-I) et le spectre de l'ADH (voir Chapitre D-I.2.2.2), le spectre RMN-<sup>1</sup>H du CMP-ADH-C18:1-T60% (Figure F-9-C) montre la présence des pics caractéristiques du CMP (entre 3 – 4,25 ppm et entre 5,25 – 5,75 ppm), des pics caractéristiques de l'ADH (1,32 et 1,97 ppm) et du pic caractéristique des trois protons du méthyle de l'acide oléique (0,68 ppm). Ces observations confirment le greffage de l'acide oléique pré-fonctionnalisé par l'ADH sur le CMP.

La détermination du degré de substitution expérimental que ce soit de l'acide oléique ou de l'acide linoléique par rapport à l'unité de répétition CMP<sub>AGU</sub> (DS<sub>exp</sub>) a été réalisée en utilisant l'équation F3 présentée plus haut. Les différentes valeurs calculées sont collectées dans le Tableau F-2.

**Tableau F-2 : DS expérimentaux du CMP modifié par C18:1 ou C18:2 obtenus par RMN-<sup>1</sup>H**

Dérivé	DS <sub>th</sub>	DS <sub>exp</sub>	Efficacité du greffage
CMP-ADH-C18:1-T60%	60 %	10 %	17 %
CMP-ADH-C18:2-T60%	60 %	10 %	17 %

Nous obtenons une efficacité de greffage de 17% proche mais un peu plus faible que celle du greffage direct de l'oleylamine sur le HA ou le CMP (entre 20 et 33%). Cette légère baisse est due probablement à l'étape supplémentaire réalisée afin de fonctionnaliser l'acide gras insaturé.

## **I.4. Conclusion sur les réactions de greffage**

La chimie des imidazoles a montré de nouveau une bonne efficacité pour la modification chimique de polysaccharide neutre et anionique par une chaîne grasse insaturée que ce soit par la création d'un lien ester ou d'un lien amide.

Basé sur cette chimie, nous avons tout d'abord greffé de manière directe l'acide linoléique sur le pullulane par l'établissement d'un lien ester entre ces deux réactifs. Le taux de greffage est de 2% avec une efficacité de greffage de 13%. En raison du caractère neutre du pullulane et de l'hydrophobie importante du greffon, ce dérivé s'avère non soluble dans l'eau.

Nous avons ensuite greffé une amine grasse insaturée (oleylamine) sur le CMP et le HA. Les conditions de la réaction ont été adaptées de manière à obtenir des DS expérimentaux de 3 et 10% (efficacité de greffage entre 20 et 33% selon le taux théorique utilisé) et les dérivés obtenus sont tous parfaitement solubles dans l'eau.

Nous avons également réussi à modifier le CMP par l'acide oléique et l'acide linoléique après une étape de pré-fonctionnalisation de l'acide gras insaturé par le bras espaceur diamine ADH. Le taux de greffage de chaque acide gras insaturé est de 10% (efficacité de greffage 17%). Les deux dérivés présentent une bonne solubilité dans l'eau.

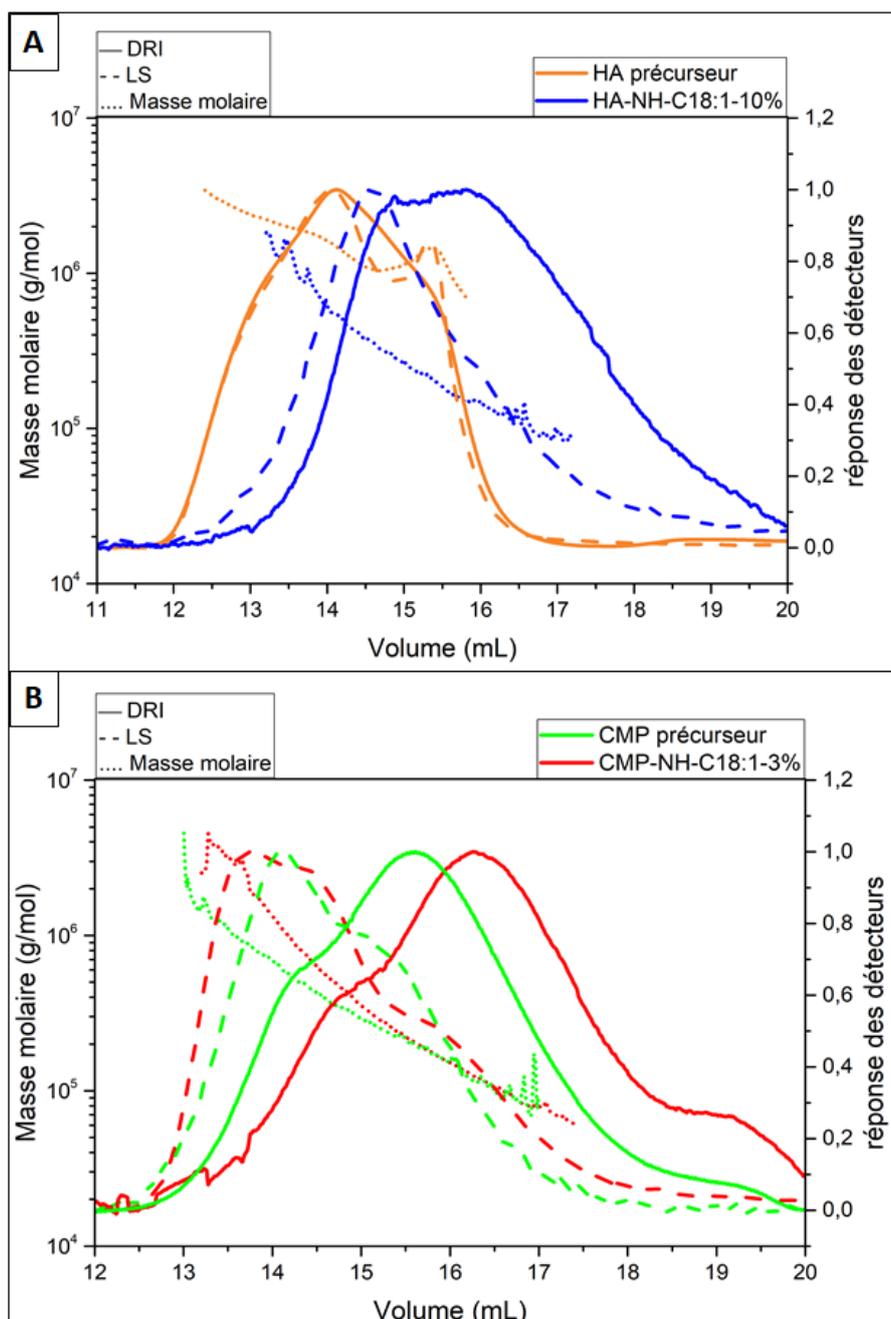
Dans la suite de cette étude, nous aurons ainsi 5 produits à notre disposition :

- 3 polysaccharides modifiés par l'oleylamine et qui seront désignés par :
  - HA-NH-C18:1-10%
  - CMP-NH-C18:1-3%
  - CMP-NH-C18:1-10%
- 2 CMP modifiés par l'acide oléique et l'acide linoléique annotés comme suit :
  - CMP-ADH-C18:1-10%
  - CMP-ADH-C18:2-10%

## II. Caractérisations physico-chimiques

### II.1. Couplage SEC/MALS/DRI/Visco

Les chromatogrammes obtenus dans le cas des dérivés HA-NH-C18 :1-10% et CMP-NH-C18:1-3% sont présentés dans la Figure F-10. Pour comparaison, nous avons ajouté les profils d'élution de HA précurseur et du CMP précurseur.



**Figure F-10** : Profils d'élution dans  $\text{LiNO}_3$  (0,1 mol/L) à  $25^\circ\text{C}$  de l'indice de réfraction (trait plein) et de la diffusion de la lumière à  $90^\circ$  (tirets) avec la distribution des masses molaires (pointillés) de : **A**) HA précurseur (orange) et HA-NH-C18:1-10% (bleu). **B**) CMP précurseur (vert) et CMP-NH-C18:1-3% (rouge).

Les tracés DRI et LS des deux dérivés modifiés (HA-NH-C18:1-10% et CMP-NH-C18:1-3%) présentent un décalage vers les plus forts volumes d'éluion si on les compare à ceux de leur précurseur correspondant (HA et CMP). Cela est dû à de plus faibles tailles signe d'une diminution notable des volumes hydrodynamiques conséquence d'une dégradation du polysaccharide au cours de la réaction de greffage et/ou d'une compaction des pelotes due à l'apparition d'associations hydrophobes entre les greffons de l'oleylamine.

Les grandeurs macromoléculaires intrinsèques de ces échantillons sont présentées dans le Tableau F-3.

**Tableau F-3 : Grandeurs caractéristiques moyennes intrinsèques du HA précurseur, HA-NH-C18 :1-10%, CMP précurseur et CMP-NH-C18 :1-3% obtenus par couplage SEC/MALS/DRI/Visco/UV à une concentration de 1 g/L dans LiNO<sub>3</sub> 0,1 mol/L à 25°C**

Produit	M <sub>n</sub> (g/mol)	M <sub>w</sub> (g/mol)	Masse récupérée
HA précurseur	1 480 000	1 680 000	83 %
HA-NH-C18:1-10%	172 000	259 000	13 %
CMP précurseur	202 000	328 000	81 %
CMP-NH-C18:1-3%	149 000	351 000	21 %

L'intégration du pic réfractométrique rapporté à la quantité de matière injectée nous montrent une très forte perte due à de la rétention sur le filtre lors de la phase de filtration préalable à l'injection des dérivés modifiés. Ceux-ci présentent donc un comportement fortement associatif hydrophobe dû au caractère très hydrophobe des greffons. Les objets ainsi agrégés sont de très grande taille, probablement supérieure à la porosité des filtres de 0,45µm.

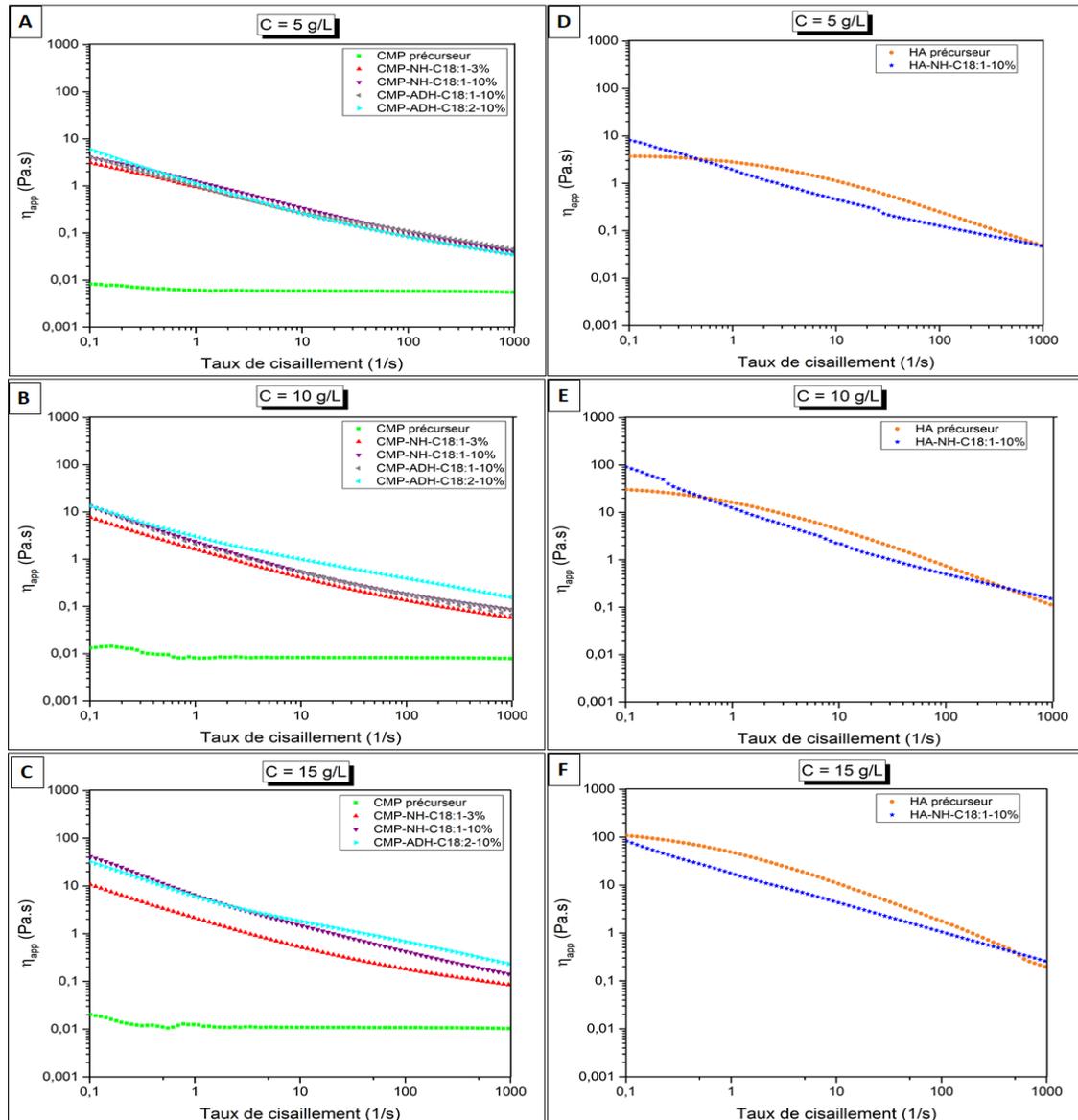
Sur la fraction non retenue par le filtre et donc analysée en sortie de colonne, on constate des masses molaires comparables au précurseur dans le cas du dérivé du CMP alors qu'elles diminuent fortement pour celui du HA. Nous retrouvons donc une sensibilité importante du HA à la dégradation lors d'une modification chimique et aucune pour le CMP.

Les faibles taux de récupération de matière lors de l'analyse chromatographique ont été également obtenus pour les autres dérivés amphiphiles ce qui rend les chromatogrammes obtenus difficilement exploitables. Ainsi, nous ne donnerons donc pas ici les valeurs des rayons hydrodynamiques et des viscosités intrinsèques peu représentatives de nos échantillons.

## II.2. Mesures rhéologiques

### II.2.1. Mesures en écoulement

Les mesures rhéologiques en mode écoulement (cisaillement compris entre 0,1 et 1000  $s^{-1}$ ) ont été réalisées sur des solutions à 5, 10 et 15 g/L des dérivés HA-NH-C18:1, CMP-NH C18:1, CMP-ADH-C18:1 et CMP-ADH-C18:2 ainsi que leurs précurseurs HA et CMP dans l'eau milli-Q (Figure F-11).



**Figure F-11** : Courbes d'écoulement (rampe = 0,1 à 1000  $s^{-1}$ ) à 25°C dans l'eau milli Q du :  
 -CMP précurseur (vert), CMP-NH-C18:1-3% (rouge), CMP-NH-C18:1-10% (violet), CMP-ADH-C18:1-10% (gris) et CMP-ADH-C18:2-10% (bleu ciel) à une concentration de : **A)** 5 g/L. **B)** 10 g/L.

**C)** 15 g/L.

-HA précurseur (orange) et HA-NH-C18:1-10% (bleu) à ) à une concentration de : **D)** 5 g/L. **E)** 10 g/L. **F)** 15 g/L.

Nous allons discuter séparément les courbes d'écoulement obtenues avec les systèmes à base de CMP puis de HA.

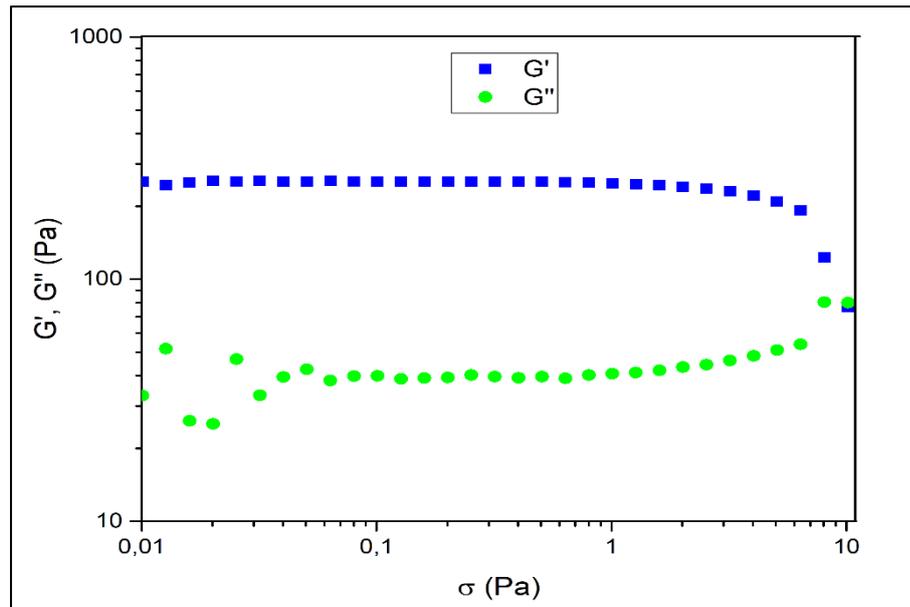
Si les solutions de CMP présentent un comportement newtonien classique quelle que soit la concentration en raison d'une conformation flexible, celui des dérivés du CMP est très fortement rhéofluidifiant, sans domaine newtonien visible, faisant penser à des fluides à contrainte seuil. Nous n'avons pas pu appliquer le modèle de type Herschel-Bulkley à ces écoulements car nos premières mesures ont été probablement réalisées au-delà de la contrainte seuil. Les viscosités mesurées aux faibles cisaillements sont de toute façon très élevées car la présence des différents greffons hydrophobes entraîne la formation d'interactions intermoléculaires ralentissant considérablement la dynamique de ces systèmes associatifs. Ces phénomènes sont très largement observés avec des polysaccharides porteurs de longues chaînes grasses<sup>4,7-10</sup>. On remarque également que le DS en chaînes grasses augmente les propriétés rhéologiques ce qui indique assez logiquement que le caractère associatif est fonction du nombre de chaînes hydrophobes dans le milieu. Par contre, le nombre d'instauration ne semble pas modifier de façon marquée ce caractère associatif puisque des dérivés CMP greffés par des groupes C18:1 ou C18:2 présentent sensiblement le même comportement rhéologique.

Pour le dérivé amphiphile du HA, le comportement est de nouveau rhéofluidifiant. Comme pour le CMP, ces écoulements présentent un profil de type contrainte seuil pour lesquels le modèle Herschel Bulkley n'est toujours pas applicable. Cette fois, les viscosités mesurées sont proches de celles du HA précurseur confirmant la dégradation des chaînes lors de l'étape de synthèse comme nous l'avons démontré avec les valeurs de masses molaires obtenues par chromatographie d'exclusion stérique. L'effet associatif est donc également largement mis en évidence.

### **II.2.2. Mesures dynamiques**

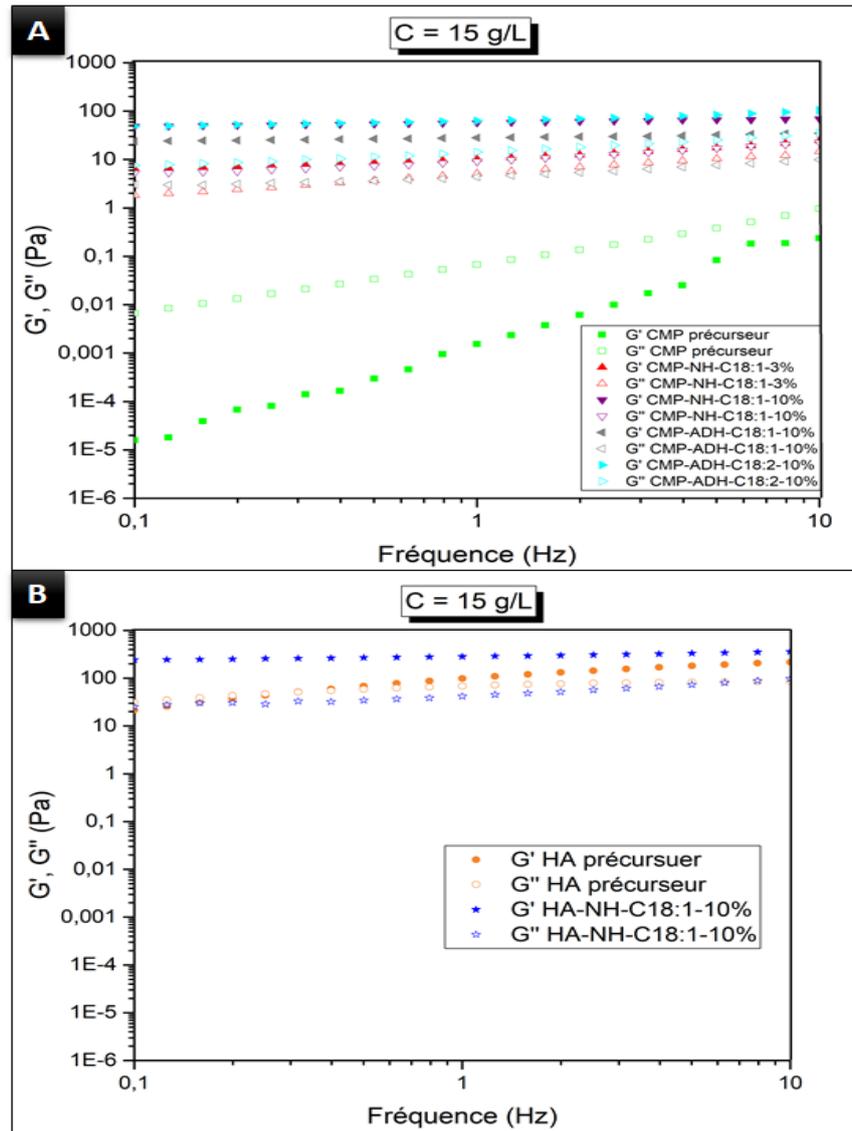
Pour confirmer le comportement particulier des solutions des dérivés modifiés, nous avons réalisé des analyses non destructurantes en mesurant les modules  $G'$  et  $G''$  lors d'un balayage en fréquence (0,1 à 10 Hz) dans la zone de viscoélasticité linéarité (entre 0,1 et 0,5 Pa) (Figure F-13). La concentration d'étude est de 15 g/L et l'eau milli-Q est le solvant utilisé pour solubiliser ces échantillons.

Un exemple de linéarité est donné pour le système HA-NH-C18:1-10% à 1Hz (Figure F-12).



**Figure F-12** : Variations de  $G'$  (bleu) et  $G''$  (vert) en fonction de la contrainte à 1Hz de solution HA-NH-C18:1-10% à 15 g/L à 25°C

Il apparait clairement pour ce système une contrainte de sortie de linéarité proche de 5 Pa. Cette contrainte est de l'ordre de grandeur de la contrainte seuil. Ce résultat explique également pourquoi nous n'avons pas pu déterminer les contraintes seuils en écoulement. Typiquement pour ce système (i.e. HA-NH-C18:1-10%), les premières mesures en écoulement (Figure F-11-F) à  $0,1 \text{ s}^{-1}$  correspondent à une contrainte de 8,2 Pa, bien supérieure à la contrainte seuil ici obtenue (4 Pa).

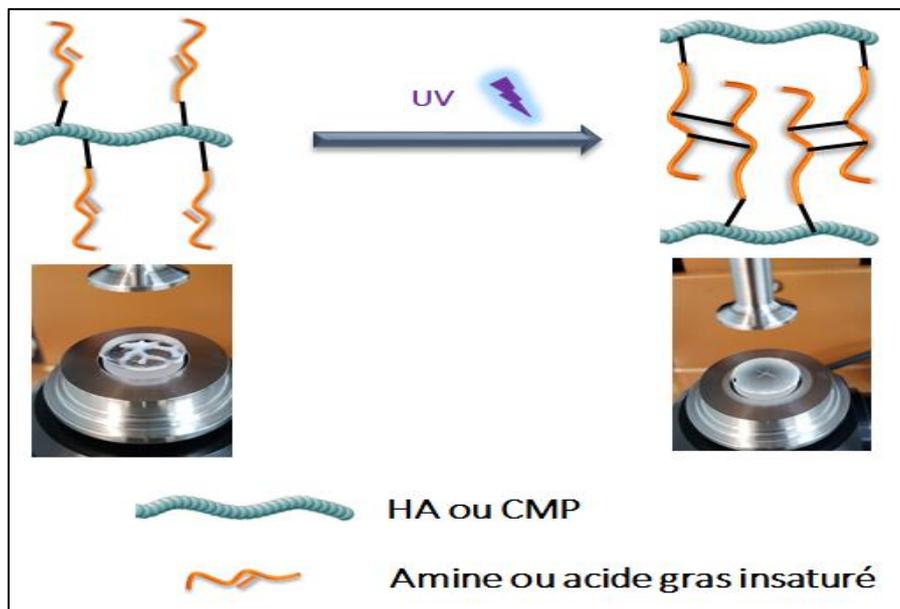


**Figure F-13 :** Variations de  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) en fonction de la fréquence, à 25°C et une concentration à 15 g/L dans l'eau milli-Q de : **A)** CMP précurseur (vert), CMP-NH-C18:1-3% (rouge), CMP-NH-C18:1-10% (violet), CMP-ADH-C18:1-10% (gris) et CMP-ADH-C18:2-10% (bleu ciel). **B)** HA précurseur (orange), HA-NH-C18:1-10% (bleu)

Les solutions des dérivés greffés que ce soit à base du CMP (Figure F-13-A) ou du HA (Figure F-13-B) possèdent un comportement élastique ( $G' > G''$ ) de type pseudogel sur toute la gamme de fréquence étudiée tandis que la solution du CMP précurseur est visqueuse ( $G' < G''$ ) et la solution du HA précurseur est quant à elle viscoélastique (point de croisement de  $G'$  et  $G''$  observé à 0,4 Hz). On note également une augmentation notable des valeurs de  $G'$  et de  $G''$  des dérivés greffés par rapport à leurs précurseurs. Conformément à l'étude en écoulement, la présence d'un bras espaceur et le nombre d'insaturation ont peu d'impact sur les propriétés rhéologiques des solutions analysées tandis que le DS les affecte clairement en accentuant l'effet associatif.

### III. Gélification

La gélification des solutions des dérivés du HA et du CMP modifiés par l'amine ou l'acide gras insaturé est assurée par photoréticulation, processus de réticulation sous rayonnement UV. En effet, l'olyelamine, l'acide oléique et linoléique contiennent dans leur structure des insaturations (double liaison), qui sous rayonnement lumineux peuvent se transformer en des radicaux réactifs. Ces radicaux ont la capacité de se lier entre eux de manière covalente. Par conséquent, la réticulation va se produire par la création des liaisons covalentes entre les radicaux formés à partir des doubles liaisons des greffons d'amine ou acide gras insaturé appartenant à deux chaînes polymères différentes (Figure F-14).



**Figure F-14 :** Schéma représentatif de la formation d'un hydrogel à base de HA ou de CMP greffé amine ou acide gras insaturé

La photoréticulation nécessite, la plupart du temps, l'emploi d'un générateur de radicaux appelé photoamorceur qui doit présenter une forte absorption dans le domaine d'émission de la source UV utilisée (permettant sa photolyse) avec une solubilité suffisante dans le milieu réactionnel. Il doit être également utilisé à une concentration où la lumière photonique émise puisse pénétrer la solution exposée. L'intensité du rayonnement UV et le temps d'application sont également des paramètres importants pour la réaction de photoréticulation.

Le suivi de la cinétique de la gélification et l'évaluation des propriétés mécaniques finales des hydrogels ont été réalisés *in situ* avec le rhéomètre HR2 équipé d'une géométrie cône-plan 2 cm et relié à une photodiode UV avec une longueur d'onde comprise entre 320 et 500 nm avec un pic primaire à 365 nm (voir Chapitre B-III.2.2). Le Darocur 1173<sup>®</sup> a été utilisé

comme photoamorceur car il absorbe essentiellement entre 250 et 400 nm. Cependant, il faut noter que c'est un photoamorceur organique de couleur jaune et souvent utilisé dans des solvants organiques tel que l'acétonitrile.

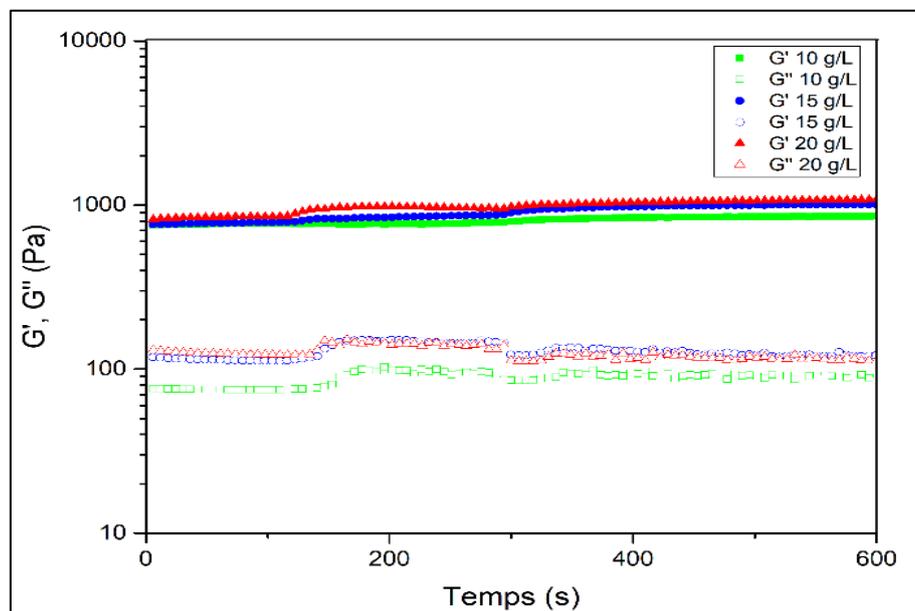
L'utilisation de la géométrie cône-plan 2 cm nous a conduit à travailler à des concentrations élevées (25 et 50 g/L dans l'eau milli-Q dans le cas des dérivés greffés à base du HA et du CMP, respectivement). L'application du rayonnement lumineux a été réalisée 120 secondes après le début de l'analyse rhéologique pour assurer la stabilisation des solutions avant de les photoréticuler.

Une optimisation des conditions opératoires de la photoréticulation a été tout d'abord menée par l'étude de l'influence de la concentration en photoamorceur, de l'intensité du rayonnement UV et du temps de son application.

### III.1. Optimisation des conditions de photoréticulation

#### III.1.1. Effet de la concentration en photoamorceur

L'évaluation de l'effet de la concentration en photoamorceur a été réalisée sur le dérivé HA-NH-C18:1-10% en testant trois concentrations en Darocur : 10, 15 et 20g/L pour un rayonnement incident d'intensité de 75 mW/cm<sup>2</sup> appliqué pendant 3 min (Figure F-15).

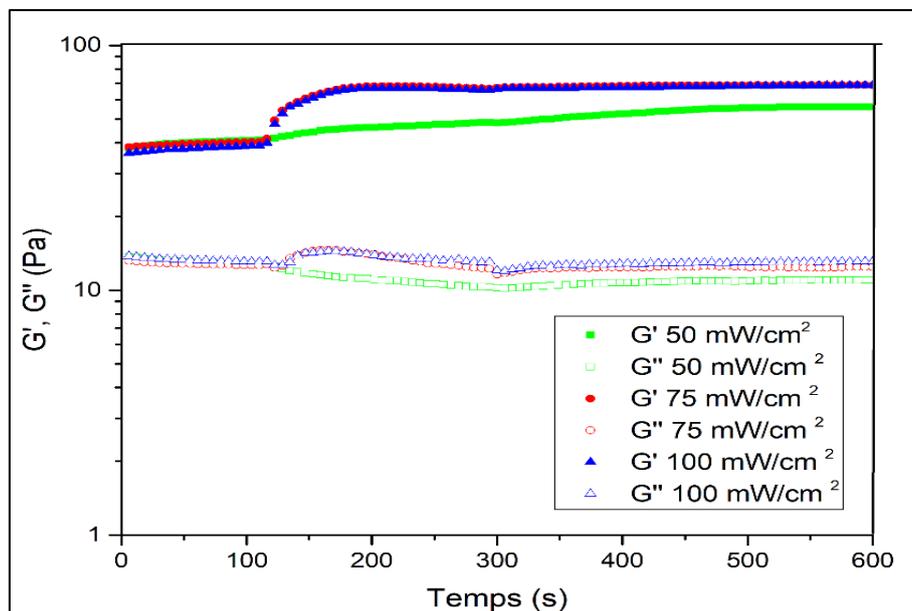


**Figure F-15 :** Influence de la concentration en photoamorceur sur la formation des hydrogels : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de gélification du HA-NH-18:1-10% (25 g/L) en utilisant une concentration en Darocur 1173<sup>®</sup> de 10 (vert), 15 g/L (bleu) et 20 g/L (rouge)

L'effet rhéologique n'est pas très marqué mais on observe cependant une légère augmentation des modules après l'irradiation. On remarque finalement peu d'effet de la concentration en Darocur 1173<sup>®</sup>. Nous avons alors choisi de travailler avec une concentration en photoamorceur de 15 g/L.

### III.1.2. Effet de l'intensité du rayonnement UV

La Figure F-16 représente l'influence de l'intensité du rayonnement lumineux émis (de 50 à 100 mW/cm<sup>2</sup>) sur l'évolution des propriétés mécaniques de l'hydrogel élaboré à partir du dérivé CMP-NH-C18:1-3% pendant la photoréticulation. La concentration en amorceur et le temps d'application du rayonnement ont été fixés respectivement à 15g/L et 3 min.

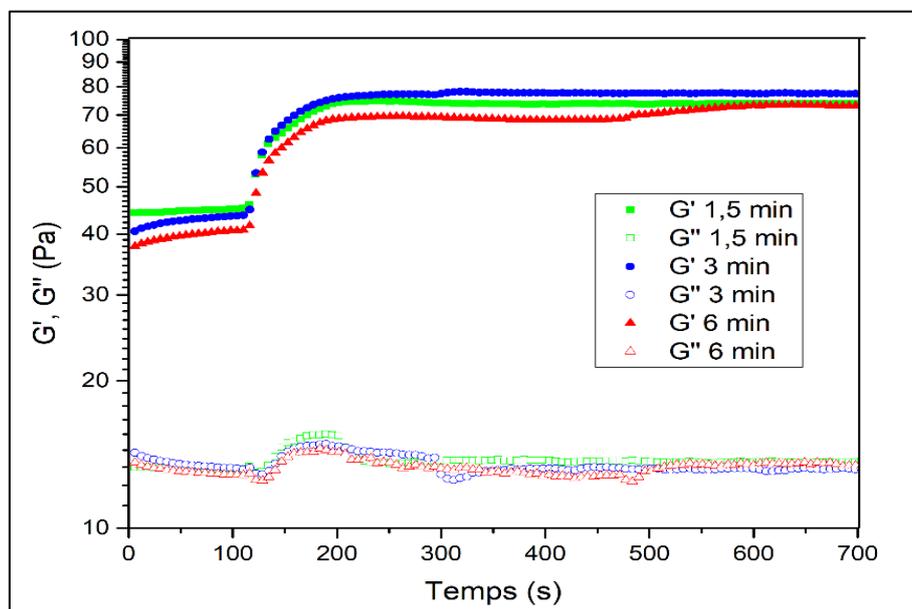


**Figure F-16 :** Influence de l'intensité du rayonnement UV sur la formation des hydrogels : courbes G' (symbole plein) et G'' (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de gélification du CMP-NH-18:1-3% (50 g/L) en appliquant une intensité 50 mW/cm<sup>2</sup> (vert), 75 mW/cm<sup>2</sup> (rouge) et 100 mW/cm<sup>2</sup> (bleu)

A 50 mW/cm<sup>2</sup> nous n'observons pas de brusque variation du module G' lorsque le rayonnement lumineux est appliqué. Celui-ci doit être insuffisant car à 75 et 100 mW/cm<sup>2</sup> le module G' augmente rapidement de 40 à 80 Pa signe d'une évolution au sein de la solution traduisant une probable réticulation. De ce fait, nous avons décidé de travailler à une intensité de 75 mW/cm<sup>2</sup> dans la suite de l'étude rhéologique.

### III.1.3. Effet du temps de l'application du rayonnement UV

La Figure F-17 montre l'impact du temps d'application du rayonnement UV émis sur les propriétés viscoélastiques de l'hydrogel à base du CMP-NH-C18:1-3% obtenu en utilisant une concentration de 15 g/L en Darocur 1173<sup>®</sup> et une intensité de 75mW/cm<sup>2</sup> du rayonnement.



**Figure F-17** : Influence du temps d'application du rayonnement UV sur la formation des hydrogels : courbes G' (symbole plein) et G'' (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de gélification du CMP-NH-18:1-3% (50 g/L) en appliquant le rayonnement pendant 1,5 min (vert), 3 min (bleu) et 6 min (rouge)

Nous remarquons que le temps d'application du rayonnement UV que ce soit à 1,5 ; 3 ou 6 min a peu d'impact sur les propriétés rhéologiques de l'échantillon analysé. Par conséquent, nous avons fixé un temps de 3 min pour le reste des mesures rhéologiques de gélification.

### III.1.4 Conditions choisies pour la photoréticulation

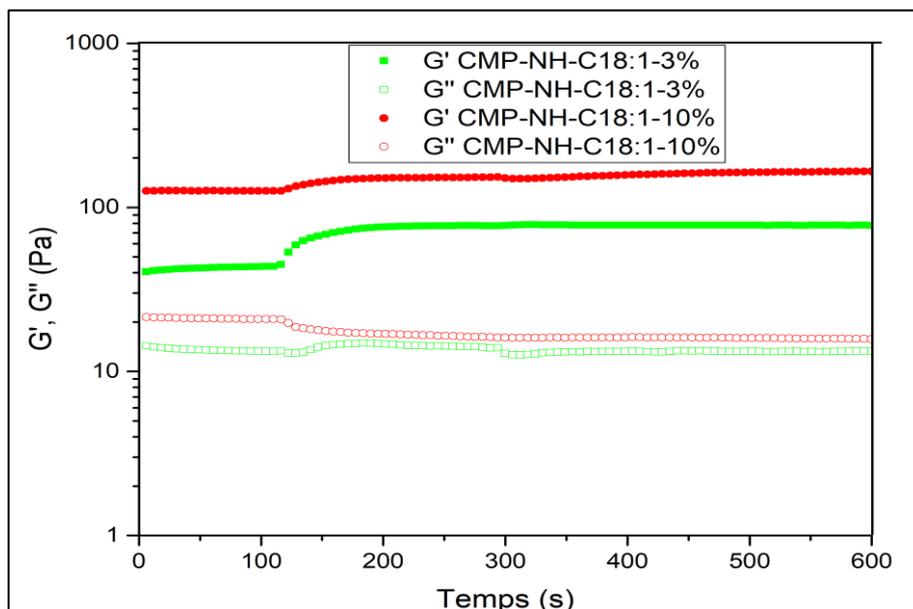
En conclusion, les conditions opératoires optimales pour la réaction de photoréticulation sont une concentration de 15 g/L de photoamorceur (Darocur 1173<sup>®</sup>) et une irradiation à une intensité de 75 mW/cm<sup>2</sup> pendant 3min.

## III.2. Influence des paramètres intrinsèques

Les paramètres intrinsèques que nous pouvons étudier avec les échantillons préalablement synthétisés à partir du CMP sont le taux de greffage (3 ou 10%) et le nombre d'insaturation (1 ou 2) de l'amine ou de l'acide gras insaturé des dérivés.

### III.2.1. Effet du DS

L'étude de l'effet du DS a été réalisée par l'analyse rhéologique des deux dérivés CMP-NH-C18:1-3% et CMP-NH-C18:1-10% (Figure F-18).

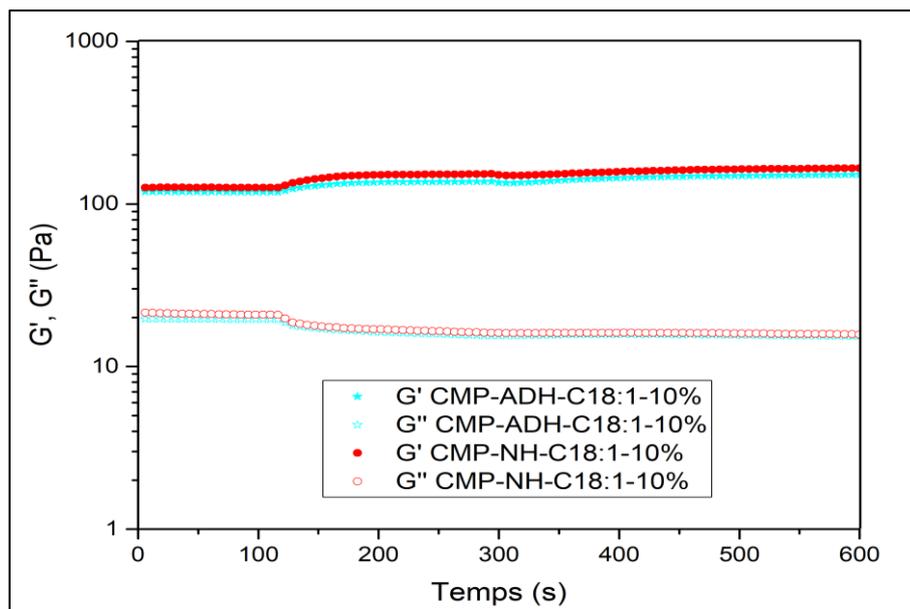


**Figure F-18** : Influence du degré de substitution : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de photoréticulation de solutions de dérivés CMP-NH-C18:1-3% (vert) et CMP-NH-C18:1-10% (rouge) à 50 g/L

En raison du caractère associatif décrit précédemment, les solutions de CMP-NH-C18:1 à 3 et 10% présentent avant l'irradiation un comportement majoritairement élastique ( $G' > G''$ ) par la présence de fortes interactions intermoléculaires entre les greffons. Ce comportement est d'autant plus marqué que le degré de substitution est important (Figure F-18). Sous l'irradiation, il y a une légère augmentation des deux modules confirmant un début de réticulation. De façon surprenante, l'augmentation du  $G'$  est plus importante pour le CMP le moins modifié, peut être en raison d'une mobilité des greffons hydrophobes plus importantes facilitant la réaction entre radicaux. Très rapidement les valeurs des modules se stabilisent.

### III.2.2. Effet du mode de greffage

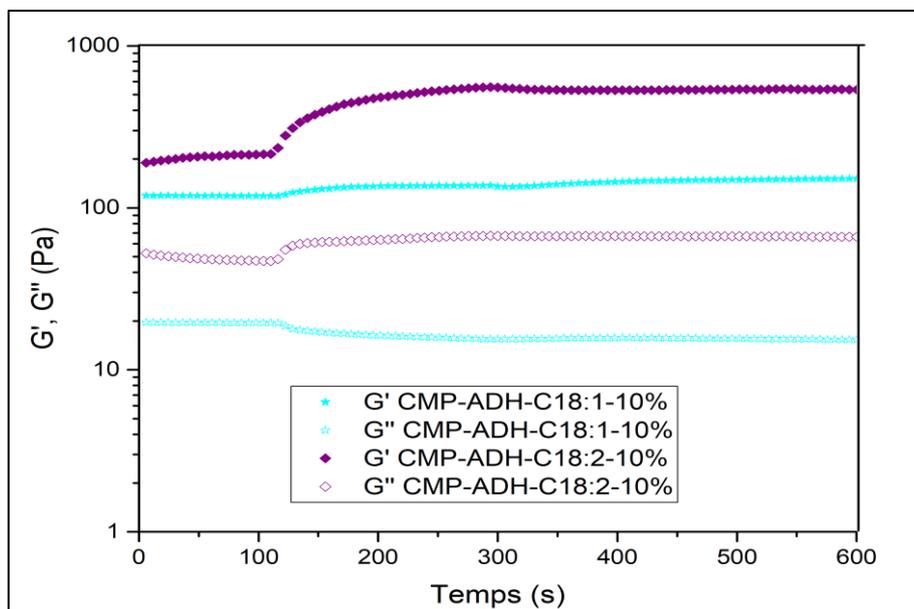
Nous avons greffé sur le CMP de l'acide oléique à l'aide d'un bras espaceur diamine et son équivalent amine avec un degré de substitution identique, CMP-ADH-C18:1-10% et CMP-NH-C18:1-10%. Ces deux dérivés mis en solution à 50g/L et irradiés donnent en rhéologie un même comportement (Figure F-19). L'augmentation du  $G'$  est faible. Le mode de greffage ne semble pas affecter la photoréticulation.



**Figure F-19** : Influence du degré de substitution : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de photoréticulation de solutions de dérivés CMP-ADH-C18:1-10% (bleu ciel) et CMP-NH-C18:1-10% (rouge) à 50 g/L

### III.2.3. Effet du nombre d'insaturation

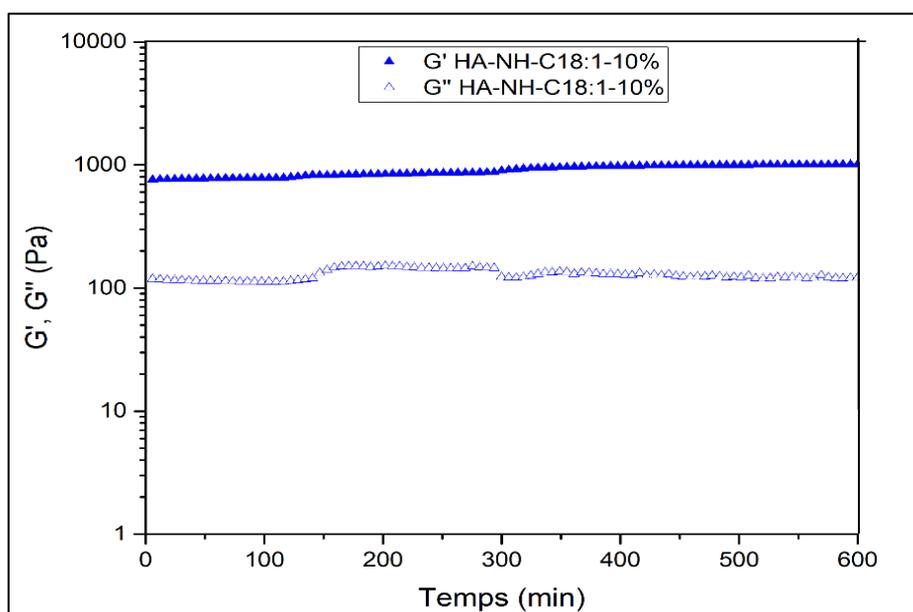
Nous avons comparé le comportement rhéologique sous irradiation du CMP greffé à 10% par l'acide oléique et linoléique, CMP-ADH-C18 :1-10% et CMP-ADH-C18 :2-10% (Figure F-20).



**Figure F-20** : Influence du nombre d'insaturation : courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps de la réaction de photoréticulation de solutions de dérivés CMP-ADH-C18 :1-10% (bleu ciel) et CMP-ADH-C18 :2-10% (violet) à 50 g/L

La Figure F-20 montre que l'accroissement du module est beaucoup plus prononcé avec les greffons bi-insaturés. Cette double insaturation présente plus de fonctionnalités de réticulation qu'une mono-insaturation, elle conduit donc logiquement à des dérivés plus propices à la formation de nœuds de réticulation sous rayonnement UV.

Nous avons synthétisé un seul dérivé à partir du HA, le HA-NH-C18 :1-10%. Celui-ci est fortement dégradé. Une solution à 25 g/L a un module  $G'$  de 700Pa (Figure F-21). Avec l'irradiation, nous n'observons pas d'évolution des propriétés sans doute en raison des caractéristiques élastiques déjà importantes (rigidité du HA et interactions hydrophobes intermoléculaires).



**Figure F-21** : Comportement rhéologique de la solution du dérivé HA-NH-C18 :1-10% à 50 g/L pendant la réaction de photoréticulation. Courbes  $G'$  (symbole plein) et  $G''$  (symbole vide) à 1 Hz en fonction du temps

## IV. Conclusion

Pendant les travaux présentés dans ce chapitre, nous avons tout d'abord réussi à greffer l'acide linoléique sur le pullulane avec un taux de greffage expérimental de 2%. Cependant, ce dérivé n'est pas soluble dans l'eau et par conséquent nous avons décidé de travailler uniquement sur les polysaccharides anioniques HA et CMP.

Pour ce faire, nous avons commencé par le greffage direct de l'amine grasse insaturée sur ces deux polysaccharides et nous avons obtenu deux degrés de substitution d'oleylamine de 3 et 10%. Ensuite, nous avons testé une autre voie de modification du CMP par le greffage

indirect de l'acide oléique et de l'acide linoléique via l'utilisation d'un bras espaceur, l'ADH. Cette voie a révélé également une efficacité notable conduisant à un DS égal à 10% dans les deux cas.

La caractérisation physico-chimique des dérivés obtenus en régime dilué par SEC/MALS/DRI/Visco a montré une forte dégradation pendant la modification chimique du HA et un comportement fortement agrégatif induit par des interactions intra et intermoléculaires des greffons d'amine/acide gras insaturé. Ce caractère associatif a été confirmé par les mesures rhéologiques en écoulement et en oscillation.

Des tests préliminaires de réticulation ont été réalisés sur des solutions concentrées de ces dérivés sous rayonnement UV *in situ* dans le rhéomètre et en présence d'un photoamorceur de type Darocur 1173<sup>®</sup> qui doit permettre la transformation des doubles liaisons présentes sur la structure d'amine/acide gras insaturé greffé en des radicaux capables de se lier de manière covalente. Les résultats les plus significatifs ont été obtenus avec l'échantillon CMP-ADH-C18:2-10% en raison de la présence de deux insaturations sur les greffons hydrophobes. Cette voie prometteuse mérite d'être poursuivie notamment avec des greffons pluri-insaturés. La visualisation de l'effet sera sans doute plus prononcée en travaillant avec des taux de greffage plus faibles pour réduire le comportement associatif des dérivés. Il reste également à étudier les seuils de percolation en poursuivant les études rhéologiques. Par exemple, il serait intéressant de soumettre les gels formés à une montée en température pour vérifier si les propriétés élastiques ne sont pas affectées et si la percolation est bien atteinte.

Les premiers essais ont été réalisés dans le rhéomètre, soit sur une épaisseur de solution faible. L'efficacité des radiations UV dans les milieux aqueux est connue pour atteindre rapidement une limite au-delà d'une certaine profondeur au sein de la solution, il faudra donc étudier ce paramètre dans nos futurs travaux.

## Références bibliographiques

1. Madbouly, S. A., Zhang, C. & Kessler, M. R. Plant Oil-Based Derivatives. *Bio-Based Plant Oil Polym. Compos.* 19–35 (2016).
2. Gillet, B., Bléneau, S. & Beloeil, J.-C. Caractérisation des phospholipides et des triglycérides par RMN. *ANALYSIS MAGAZINE* **26**, 26–33 (1998).
3. Bruneel, D., Schacht, E. & Bruyn, A. De. Structural Analysis of Succinoylated and Chloroformate Activated Pullulan: NMR Study in DMSO Solution. *J. Carbohydr. Chem.* **12**, 769–778 (1993).
4. Pavan, M., Galesso, D., Menon, G., Renier, D. & Guarise, C. Hyaluronan derivatives: Alkyl chain length boosts viscoelastic behavior to depolymerization. *Carbohydr. Polym.* **97**, 321–326 (2013).
5. Tsai, H.-C., Hsiao, P. F., Peng, S., Tang, T.-C. & Lin, S.-Y. Enhancing the in vivo transdermal delivery of gold nanoparticles using poly(ethylene glycol) and its oleylamine conjugate. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 1867–1878 (2016).
6. Knothe, G. & Kenar, J. A. Determination of the fatty acid profile by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **106**, 88–96 (2004).
7. Wang, P. & Tao, B. Y. Synthesis and characterization of long-chain fatty acid cellulose ester (FACE). *J. Appl. Polym. Sci.* **52**, 755–761 (1994).
8. Huang, L., Cheng, X., Liu, C., Xing, K., Zhang, J., Sun, G., Li, X., Chen, X. Preparation, characterization, and antibacterial activity of oleic acid-grafted chitosan oligosaccharide nanoparticles. *Front. Biol. China* **4**, 321–327 (2009).
9. Liu, C.-G., Chen, X.-G. & Park, H.-J. Self-assembled nanoparticles based on linoleic-acid modified chitosan: Stability and adsorption of trypsin. *Carbohydr. Polym.* **62**, 293–298 (2005).
10. Hu, F.-Q., Ren, G.-F., Yuan, H., Du, Y.-Z. & Zeng, S. Shell cross-linked stearic acid grafted chitosan oligosaccharide self-aggregated micelles for controlled release of paclitaxel. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **50**, 97–103 (2006).

# **CONCLUSION GÉNÉRALE**

---



L'objectif principal de ce travail de thèse était la conception de nouveaux hydrogels par des voies plus vertueuses et respectueuses des considérations environnementales et permettant aussi d'ouvrir de nouvelles perspectives d'utilisation dans les domaines cosmétiques biomédicaux et/ou médicaux. Nous avons ainsi choisi des matrices à base de polymères d'origine naturelle, renouvelables et biocompatibles en l'occurrence des polysaccharides neutre et anionique modèles, respectivement le pullulane et le carboxyméthylpullulane (CMP) et un polysaccharide anionique d'intérêt, l'acide hyaluronique (HA). Dans cette démarche écoresponsable, deux stratégies de réticulation chimique ont été envisagées :

- Une approche biomimétique basée sur la dimérisation d'acide férulique préalablement greffé sur les polysaccharides neutre (partie C) et anionique (partie D), catalysée par une enzyme, la laccase. Ce procédé est en effet mis en œuvre naturellement au sein des arabinoxylanes porteurs de groupements de type acide férulique dans les mucilages des graines de certaines céréales comme le blé par exemple. Les activités biologiques (antioxydantes et cytocompatibles) de ces dérivés ont été évaluées (partie E).
- Une approche en photoréticulation de chaînes grasses mono ou polyinsaturées préalablement greffées sur les polysaccharides (partie F).

Selon l'approche biomimétique et dans un premier temps (chapitre C), nous nous sommes focalisés sur le greffage de l'acide férulique sur le pullulane, polysaccharide neutre modèle. Le premier travail a consisté à trouver la meilleure chimie de fonctionnalisation en solvants aqueux ou organiques. Ainsi des voies passant par les carbodiimides, la catalyse enzymatique ou encore la méthode de Mitsunobu ont été explorées mais finalement c'est la chimie des imidazoles et notamment le CDI, utilisé comme agent de couplage dans le DMSO, qui a conduit aux meilleurs résultats en termes d'efficacité et de reproductibilité. Les conditions de synthèse ont été adaptées de façon à obtenir trois dérivés PUL-FA hydrosolubles avec des degrés de substitution expérimentaux en acide férulique (2 ; 6 et 10%) vérifiés par RMN-<sup>1</sup>H. En raison du caractère hydrophobe des greffons acide férulique et du caractère hydrophile des chaînes principales de polysaccharide, le comportement global dans l'eau devient amphiphile. Les caractérisations physicochimiques en solution aqueuse dans les régimes dilué (SEC/MALS/DRI/Visco), semi-dilué et concentré (rhéologie) ont ainsi montré un caractère associatif des dérivés PUL-FA qui devient logiquement de plus en plus marqué en augmentant le degré de substitution en acide férulique. Ce comportement reflète les interactions

hydrophobes qui s'établissent entre les motifs greffés d'acide férulique conduisant à la formation de clusters hydrophobes. Le type de ces interactions dépend beaucoup du domaine de concentration étudié : majoritairement intramoléculaires en régime dilué (volume hydrodynamique plus compact) et plutôt intermoléculaires en régimes semi-dilué et concentré (augmentation des viscosités apparentes des solutions de PUL-FA comparée avec leur précurseur (PUL)). Toutefois en raison probable de la grande flexibilité du pullulane, le comportement associatif ne conduit pas à des structures de pseudogels élastiques mais simplement à une amélioration des propriétés viscoélastiques laissant penser à une coexistence des associations intra et intermoléculaires même en régime semi-dilué. La gélification des solutions PUL-FA dans le régime semi-dilué a été réalisée avec succès à 25°C dans le tampon citrate/phosphate (0,1 mol/L, pH=5,5) en utilisant la laccase. Notre approche biomimétique est donc possible, l'enzyme est ainsi capable de dimériser l'acide férulique greffé créant ainsi des points de réticulation covalents entre les chaînes du pullulane conduisant à l'hydrogel. L'étude rhéologique *in situ* de la réaction de gélification nous a permis de mettre en évidence le rôle uniquement catalytique de la laccase qui n'agit que sur l'accélération de la cinétique de la réaction. Le degré de substitution en acide férulique ( $DS_{FA}$ ) améliore la cinétique et permet aussi logiquement d'augmenter le nombre de liens de réticulation, c'est-à-dire les propriétés élastiques ( $G'_{Plateau}$ ). La concentration en polysaccharide limite plutôt la cinétique, ce qui peut s'expliquer par la densité d'enchevêtrement plus importante et l'accessibilité des acides féruliques plus difficile pour la laccase. Cependant, pour les mêmes raisons que le  $DS_{FA}$ , la concentration en polymère augmente le nombre de liens de réticulation (augmentation du  $G'_{Plateau}$ ). Les propriétés de gonflement des hydrogels obtenus suivent bien les propriétés rhéologiques avec un gonflement inversement proportionnel aux nombres de liens de réticulation formés (i.e.  $G'_{Plateau}$ ). Néanmoins ces derniers restent faibles dans l'ensemble ( $\leq 13,3 \text{ g}\times\text{g}^{-1}$ ) avec des cinétiques lentes (8jours) en raison du caractère neutre et très flexible du polysaccharide mais aussi des interactions hydrophobes entre les greffons d'acide férulique.

Dans le but d'élargir la gamme de polysaccharides supports pour cette approche biomimétique, nous avons poursuivi notre étude (Chapitre D) sur deux polysaccharides anioniques : le carboxyméthylpullulane (CMP), polysaccharide modèle et l'acide hyaluronique (HA), polysaccharide d'intérêt. En outre la matrice anionique devait aussi améliorer les propriétés de gonflement des hydrogels. Le greffage de FA sur ces deux polysaccharides anioniques a nécessité une chimie différente de celle utilisée dans le cas du pullulane au regard des fonctions réactives communes présentes sur l'acide férulique et le CMP ou le HA (acide

carboxylique et alcool). Cette nouvelle méthode repose sur la chimie des carbodiimides via l'utilisation de l'EDC comme agent de couplage et permet de former un lien amide entre l'acide carboxylique du polysaccharide et une amine portée par le groupe greffé. L'acide férulique ne portant pas d'amine, cette réaction nécessite un intermédiaire de type diamine permettant d'apporter une fonction amine terminale sur l'acide férulique. Nous avons choisi comme intermédiaire, appelé aussi 'bras espaceur diamine', ADH pour les CMP ou le HA et MDH pour HA. La réaction a été conduite dans un solvant mixte 'vert' (eau/éthanol). La modification des CMP s'est avérée efficace sans dégradation détectée. Cinq échantillons de CMP-FA ont été élaborés avec des  $DS_{FA}$  de 1 ; 1,2 ; 3,2 ; 8,5 et 11,2% vérifiés par RMN- $^1H$  et le dosage de Folin-Ciocalteu. L'étude physico-chimique des dérivés CMP-FA nous a permis de mettre en évidence la présence des associations hydrophobes conférant à ces derniers un comportement associatif mais moins marqué comparé à leurs homologues PUL-FA en raison du caractère polyélectrolyte du CMP. La laccase a démontré de nouveau son efficacité à gélifier les solutions CMP-FA dans les mêmes conditions que les systèmes PUL-FA. Le suivi de la réaction de réticulation par rhéologie nous a permis de mettre en évidence le rôle catalytique de l'enzyme et l'influence du degré de substitution en FA sur la cinétique et les propriétés mécaniques des hydrogels CMP-FA. Globalement, les tendances observées sont les mêmes que pour les PUL-FA. Toutefois, en raison de leur caractère polyélectrolyte, ces derniers présentent, comme attendu, des taux de gonflement plus importants dans l'eau milli-Q ( $97 \text{ g}\times\text{g}^{-1}$ ) que leurs homologues neutres. Les gonflements peuvent en contrepartie être affectés, comme les propriétés rhéologiques, par le pH et la force ionique.

La fonctionnalisation du HA, abordée par la même chimie que pour les CMP-FA, s'est avérée dégradante. L'hydrolyse observée est probablement la conséquence des  $\beta$ -éliminations dues à l'augmentation de la basicité du milieu réactionnel détectée pendant les étapes de greffage mais aussi pendant les étapes de purification notamment les dialyses. La dégradation des chaînes du HA semble être fortement dépendante du nombre d'équivalent de FA/GAG en raison d'un effet tampon probable des motifs libres d'acide férulique n'ayant pas réagi. Ce résultat nous a conduit à modifier les conditions de synthèse et de purification même si nous n'avons pas réussi à supprimer totalement la dégradation. Par ailleurs, la réaction de greffage s'est avérée plus efficace en utilisant un bras espaceur MDH plus court que l'ADH. Nous avons ainsi obtenu une large gamme de dérivés HA-ADH-FA et HA-MDH-FA avec des  $DS_{FA}$  variables, vérifiés par RMN- $^1H$ , mais aussi des masses molaires variables. Cette dégradation limite fortement les interprétations possibles de la caractérisation physicochimique, en

particulier en ce qui concerne le comportement associatif, que ce soit en régime dilué ou semi-dilué. Les mesures rhéologiques en régime semi-dilué des solutions de HA-FA ont confirmé la dégradation constatée. Mais celles-ci ont aussi, malgré tout, permis de mettre en évidence la présence d'interactions hydrophobes probablement majoritairement intramoléculaires à l'origine d'un comportement associatif partiellement de type polysavon. La laccase a confirmé encore une fois son efficacité à dimériser l'acide férulique créant ainsi des points de réticulation permettant l'obtention des hydrogels HA-FA. La cinétique de gélification et les propriétés rhéologiques des hydrogels sont influencées par le taux de greffage en acide férulique, la concentration en polysaccharide et la masse molaire en HA tandis que l'enzyme continue d'assurer uniquement son rôle catalytique. Encore une fois les tendances observées concordent avec les conclusions des systèmes PUL-FA et CMP-FA. Les hydrogels HA-FA présentent un taux de gonflement maximal de  $62 \text{ g} \times \text{g}^{-1}$ , un peu plus faible que celui des hydrogels CMP-FA et sensible également au pH et la force ionique.

Les activités biologiques des dérivés greffés FA ont été étudiées (Chapitre E). Tous les polysaccharides greffés acide férulique ont ainsi démontré des activités antioxydantes intéressantes face au radical DPPH• mais qui restent moins importantes que celle du FA non greffé en raison du problème d'accessibilité aux motifs d'acide férulique lorsqu'ils sont greffés et de la solubilité réduite des dérivés dans le mélange de solvant utilisé pour les tests antioxydants. La formation des clusters hydrophobes suite au caractère associatif de ces dérivés semble être favorable au piégeage des radicaux DPPH•. Les hydrogels de CMP-FA ont démontré également un pouvoir antioxydant intéressant. Pour les dérivés HA-FA, une formation surprenante d'un gel lors de l'addition du radical DPPH• à la solution de HA-FA a été détectée et donc l'activité antioxydante de ces dérivés n'a été déterminée que qualitativement par des observations visuelles. Les analyses de cytotoxicité ont été réalisées sur des cellules fibroblastes L929. Le test qualitatif Live/Dead (24 h de contact avec les cellules) a montré que tous les dérivés greffés acide férulique sont cytocompatibles tandis que le test quantitatif Alamar Blue® (48h de contact avec les cellules) est plus difficile à interpréter en raison de problèmes de viscosité limitant les apports nutritifs.

La seconde approche a consisté à envisager la formation d'hydrogels par photoréticulation de dérivés de polysaccharides greffée avec des chaînes grasses mono ou polyinsaturées (partie F). Dans un premier temps, l'acide linoléique (C18:2) a été greffé sur le pullulane. Le dérivé obtenu, possédant un taux de greffage de 2%, s'est avéré insoluble en raison du DS et du caractère hydrophobe trop important du greffon au regard du caractère neutre

du polysaccharide. Nous avons donc décidé de fonctionnaliser plutôt les polysaccharides anioniques HA et CMP via deux stratégies de synthèse différentes selon la molécule à greffer mais basées sur la même chimie (imidazoles). Nous avons commencé par le greffage direct de l'oleylamine (NH<sub>2</sub>-C18:1) sur ces deux polysaccharides et nous avons réussi à adapter les conditions opératoires de façon à obtenir deux degrés de substitution (3 et 10%) soient les échantillons HA-NH-C18:1-10%, CMP-NH-C18:1-3% et CMP-NH-C18:1-10%. En deuxième lieu, nous avons fonctionnalisé indirectement le CMP par l'acide oléique (C18:1) et l'acide linoléique (C18:2) via l'utilisation de l'ADH (bras espaceur) conduisant à un taux de substitution identique dans les deux cas (10%) soient les échantillons CMP-ADH-C18:1-10% et CMP-ADH-C18:2-10%. La caractérisation physico-chimique en régime dilué a montré une forte dégradation du HA et la présence attendue d'un très fort caractère associatif se traduisant notamment par une nette augmentation des propriétés rhéologiques en régime semi-dilué (i.e. associations intermoléculaires entre les greffons d'amine/acide gras insaturé). Les premiers tests de réticulation sous rayonnement UV (*in situ* en suivi rhéologique) des solutions des dérivés obtenus ont été réalisés en présence d'un photoamorceur de type Darocur 1173<sup>®</sup> qui a pour rôle de transformer les doubles liaisons d'amine/acide gras insaturé greffé en radicaux dont la condensation permet de créer des liens covalents entre les chaînes de polysaccharide. Les meilleures conditions de photoréticulation ont été fixées en utilisant une concentration de 15 g/L de photoamorceur (Darocur 1173<sup>®</sup>) et en irradiant à une intensité de 75 mW/cm<sup>2</sup> pendant 3min. L'irradiation de la solution du dérivé CMP-ADH-C18:2 a conduit aux résultats les plus pertinents comparés aux autres dérivés étudiés, probablement en raison de la présence de deux insaturations apportées par l'acide linoléique greffé.

Pour conclure, notre travail a montré que l'approche biomimétique basée sur la dimérisation de l'acide férulique greffé catalysée par une enzyme de type laccase était possible sur tout polysaccharide neutre ou anionique, ceci en prenant soin d'adapter la chimie de fonctionnalisation. Il est ainsi possible d'obtenir toute une gamme d'hydrogels aux cinétiques de réticulation et aux propriétés rhéologiques et de gonflement variées selon le polysaccharide utilisé, le DS<sub>FA</sub>, la concentration en polymère, l'activité enzymatique notamment. Les tests concernant les activités biologiques sont encourageants avec des potentiels antioxydants et cytocompatibles intéressants. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de ces différents systèmes dans un grand nombre d'applications dans les domaines cosmétiques et médicaux par exemple. Pour étendre ces potentielles utilisations, il sera utile d'étudier plus en détail le comportement de ces nouveaux hydrogels sous l'influence du pH, de la force ionique et de la

température notamment pour les hydrogels anioniques. L'utilisation de polysaccharides adaptatifs (thermosensibles par exemple) ou vectorisés dans ces hydrogels biomimétiques pourraient ouvrir également la voie à de nouveaux systèmes innovants.

Au regard des résultats préliminaires très intéressants obtenus dans le chapitre F, l'approche en photoréticulation des dérivés de HA ou de CMP fonctionnalisés par des amines/acides gras insaturés semble être une voie prometteuse qui mérite d'être poursuivie. Pour les études à venir, nous proposons de greffer des amines/acides gras pluri-insaturés en réduisant le taux de greffage pour minimiser au maximum le caractère associatif des dérivés. Il faudra s'assurer que la percolation a bien été atteinte au niveau de ces systèmes réticulés en menant des études rhéologiques plus complètes. On pourra, par exemple, construire les spectres mécaniques des systèmes réticulés et les soumettre à une montée en température pour s'assurer du caractère élastique irréversible. D'autre part, il faut prendre en considération dans les futurs travaux que ces premiers tests de photoréticulation (*in situ* en rhéologie) ont été réalisés sur une épaisseur de solution faible. Il faudra adapter cette approche sur différents types de systèmes en fonction de la profondeur de pénétration des radiations UV et donc de leur efficacité.

# **ANNEXES**

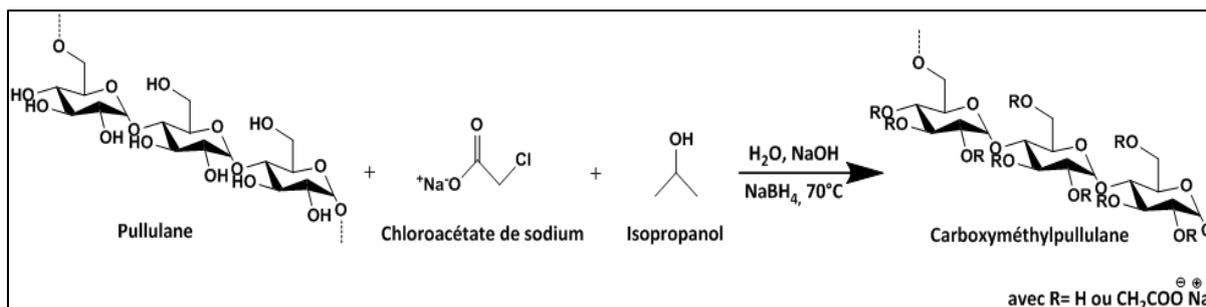
---



## Annexe 1 : Synthèse et caractérisation du carboxyméthylpullulane

➤ Exemple de protocole de synthèse et de caractérisation de carboxyméthylpullulane (degré de substitution en fonctions carboxylates visé égal à 1) :

La synthèse du CMP se produit par la carboxyméthylation du pullulane qui consiste à substituer des fonctions hydroxyles du pullulane (surtout ceux en position 6) par des fonctions carboxylates par la formation d'un lien éther avec les fonctions  $\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$  du chloroacétate de sodium (Figure 1). Un milieu réactionnel mixte eau/isopropanol est nécessaire afin de limiter l'hydrolyse basique du chloroacétate en acide glycolique. Les ajouts de NaOH et de chloroacétate de sodium sont réalisés en quatre fois avec des intervalles de temps de 15 min dans le but de limiter la dégradation des chaînes polysaccharidique par hydrolyse basique (Tableau 1).



**Figure 1** : Réaction de synthèse du CMP

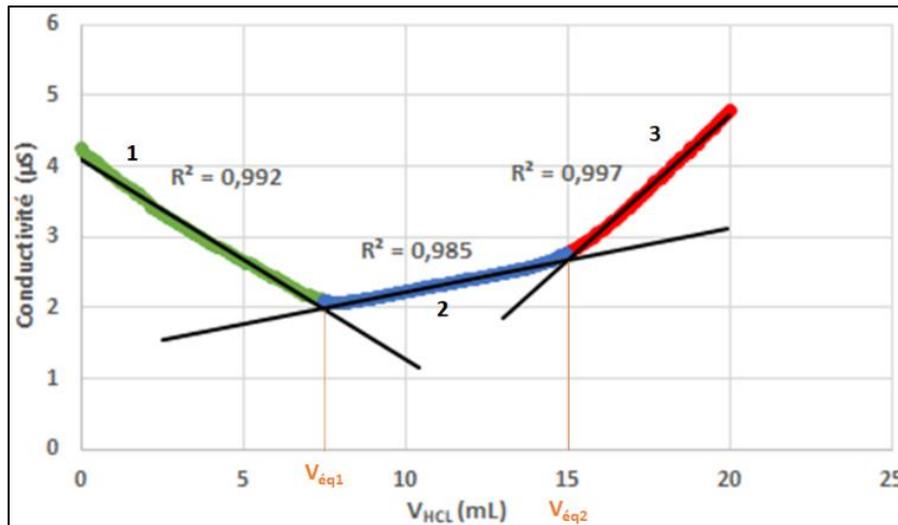
Le mode opératoire de la synthèse du CMP est le suivant : dans un réacteur de 500mL surmonté d'un réfrigérant, on introduit 30g de Pullulane PI-20 (185 mmol) qu'on solubilise dans 120 mL d'eau milli-Q pendant une nuit à température ambiante et sous agitation mécanique de 160 rpm. Le lendemain, le réacteur est placé dans un bain d'huile à 70°C auquel ont introduit ½ pastille de tétrahydroborate de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) et on laisse réagir pendant 30 minutes. Puis, un volume de 120mL d'isopropanol a été ajouté goutte à goutte suivi d'un ajout 5mL d'une solution aqueuse contenant 4,625g de NaOH. Après 15 minutes, 13,5g de chloroacétate de sodium sont ajoutés au milieu réactionnel. Cette opération est répétée 4 fois avec 15 minutes d'intervalles en ajoutant 40mL d'isopropanol au lieu de 120 mL à l'exception de la dernière fois où on ajoute 7mL de solution aqueuse contenant 6,45g de NaOH et 18,8g de chloroacétate de sodium. On laisse ensuite la réaction réagir pendant 4h à 70°C en maintenant la même vitesse d'agitation. La phase aqueuse est ensuite récupérée et neutralisée par ajout d'une solution de HCl 4 mol/L

jusqu'à l'obtention d'un pH= 7. On réalise ensuite une dialyse avec une membrane 12-14 kDa contre de l'eau milli-Q pendant environ une semaine jusqu'à obtenir une conductivité des eaux de dialyse suffisamment faible comprise entre 4 et 6  $\mu$ S. La solution est alors récupérée, congelée, lyophilisée et stockée à 4°C.

**Tableau 1 : Récapitulatif des ajouts effectués dans la réaction de synthèse du CMP**

<b>Temps</b>	<b>NaOH</b>	<b>Chloroacétate de sodium</b>	<b>Isopropanol</b>
1 <sup>er</sup> Ajout (t = 0)	4,625g / 5mL eau	-	120 mL
+15 min	-	13,5g	-
+15 min	4,625g / 5mL eau		40 mL
+15 min	-	13,5g	-
+15 min	4,625g / 5mL eau	-	40 mL
+15 min	-	13,5g	-
+15 min	6,45g / 5mL eau	-	40 mL
+15 min	-	18,8g	15 mL
<b>Masse ou volume total ajouté</b>	20,325g / 20 mL eau	59,3g (509 mmol)	255 mL

La détermination du degré de substitution en fonction carboxylate ( $DS_{COO-Na^+}$ ) a été réalisée par dosage conductimétrique. Pour ce faire, 200 mg de CMP obtenu sous forme de sel de sodium sont dissouts dans 50mL d'eau milli-Q durant une nuit à température ambiante. Afin de déterminer la concentration exacte de la solution dosée de CMP, une mesure de l'extrait sec est réalisée en prélevant 7 mL de cette solution qu'on introduit dans une étuve à 95°C pendant 24h. Dans un bécher à double paroi relié à un bain thermostaté réglé à 25°C, les 43 mL restants de la solution préparée sont ajoutés. Puis, 1 mL de NaOH 1 mol/L est ajouté pour déprotoner toutes les fonctions acide du CMP. Le dosage est ensuite réalisé avec une solution d'acide chlorhydrique 0,1 mol/L. La courbe conductivité = f( $V_{HCl}$ ) est alors obtenue (Figure 2).



**Figure 2 :** Exemple de courbe de dosage de CMP (conductivité = f(V<sub>HCl</sub>))

La courbe de dosage peut être divisée en 3 parties. La première partie (en vert) correspond au dosage des ions HO<sup>-</sup> de l'excès de soude par les ions H<sup>+</sup> de HCl. Ce dosage est désigné par la droite 1. La deuxième partie (en bleu) correspond au dosage des fonctions carboxylate du CMP illustré par la droite 2. Enfin, la troisième partie (en rouge) correspond à l'excès des ions H<sup>+</sup> de HCl dans le milieu désigné par la droite 3. Les valeurs en abscisse des intersections des droites 1∩2 et 2∩3 correspondent respectivement aux volumes équivalents V<sub>éq1</sub> et V<sub>éq2</sub>. Le volume de HCl nécessaire pour doser les fonctions carboxylates est donc :

$$\Delta V = V_{\text{éq}2} - V_{\text{éq}1} \quad (\text{Eq. 1})$$

La détermination de  $\Delta V$  nous permet alors d'accéder au nombre de moles de fonctions carboxylates dans la solution qui correspond à :

$$n_{\text{COO}^-} = C_{\text{HCl}} \times \Delta V \quad (\text{Eq. 2})$$

Le degré de substitution (DS<sub>COO-Na+</sub>) est ensuite calculé à partir de la relation suivante :

$$DS_{\text{COO-Na}^+} = \frac{M_{\text{AGU}} \times n_{\text{COO}^-}}{m - (n_{\text{COO}^-} \times M_1)} \quad (\text{Eq. 3})$$

avec :

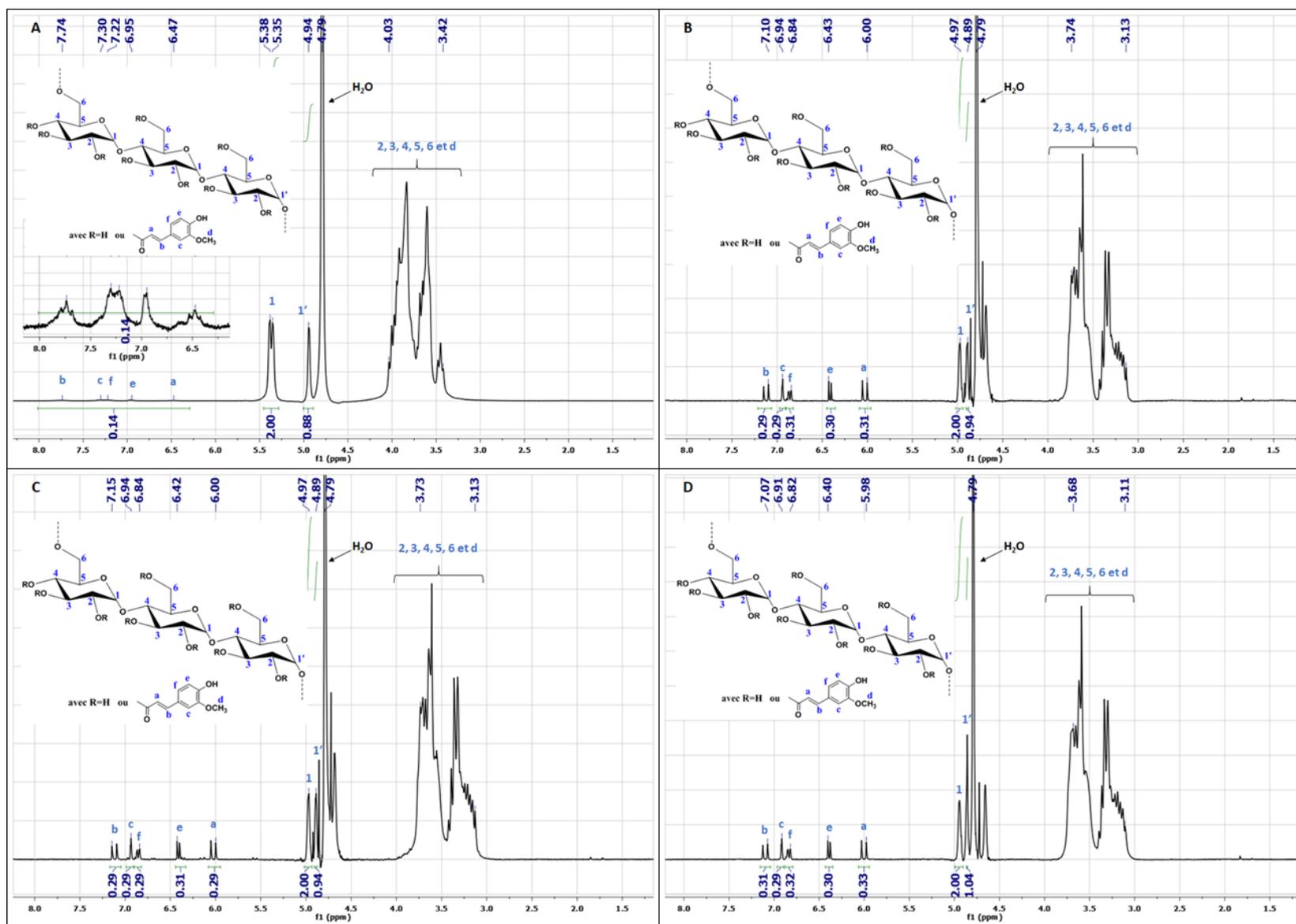
- m : la masse de CMP dosé
- n<sub>COO-</sub> : le nombre de moles de fonction carboxylate dans la solution dosée
- M<sub>AGU</sub> : la masse molaire d'une unité anhydroglucose (M<sub>AGU</sub> = 162 g/mol)
- M<sub>1</sub> : la différence de masse molaire entre une unité de CMP et une unité d'anhydroglucose (M<sub>1</sub> = 80 g/mol)

Le CMP synthétisé et utilisé pendant ces travaux de thèse possède un DS<sub>COO-Na+</sub> égal à 0,8.

## Annexe 2 : Effet NaOD dans les analyses RMN-<sup>1</sup>H

### ➤ Cas des systèmes PUL-FA :

Comme indiqué précédemment (voir chapitre C-I.2.2.2), la soude deutérée (NaOD) a été utilisée dans les analyses RMN-<sup>1</sup>H afin d'améliorer la solubilité des échantillons PUL-FA via la rupture des liens ester créés entre le pullulane et les motifs d'acide férulique. Pour déterminer le temps nécessaire pour une hydrolyse totale, une étude cinétique des systèmes PUL-FA par RMN-<sup>1</sup>H a été réalisée. Pour ce faire, les échantillons ont été solubilisés dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v) à une concentration de 30 g/L en chauffant à 60°C. Des prélèvements ont été effectués à 4 temps différents : avant chauffage (t = 0), après 4, 8 et 24h de chauffage. Les spectres obtenus de ces prélèvements pour le dérivé PUL-FA-T60% sont regroupés dans la Figure 3.



**Figure 3 :** Spectres RMN-<sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v) de PUL-FA-T60% à : **A)** t = 0. **B)** t = 4h. **C)** t = 8h. **D)** t = 24h

Sur la Figure 3, nous remarquons une grande différence entre le spectre RMN-<sup>1</sup>H du dérivé PUL-FA-T60% à t = 0 (Figure 3-A) et ceux du même dérivé après chauffage (Figure 3-B, C et D). Pour le spectre à t = 0, nous observons tout d'abord un décalage du déplacement chimique des signaux détectés vers des valeurs plus grandes. Au niveau des signaux des pics correspondant aux protons aromatiques et éthyléniques caractéristiques de l'acide férulique (entre 6,4 - 7,8 ppm), nous remarquons une mauvaise résonance et également une baisse de la valeur de leur intégration. Ceci peut être expliqué par la turbidité de l'échantillon avant hydrolyse due à la mauvaise solvation des greffons d'acide férulique.

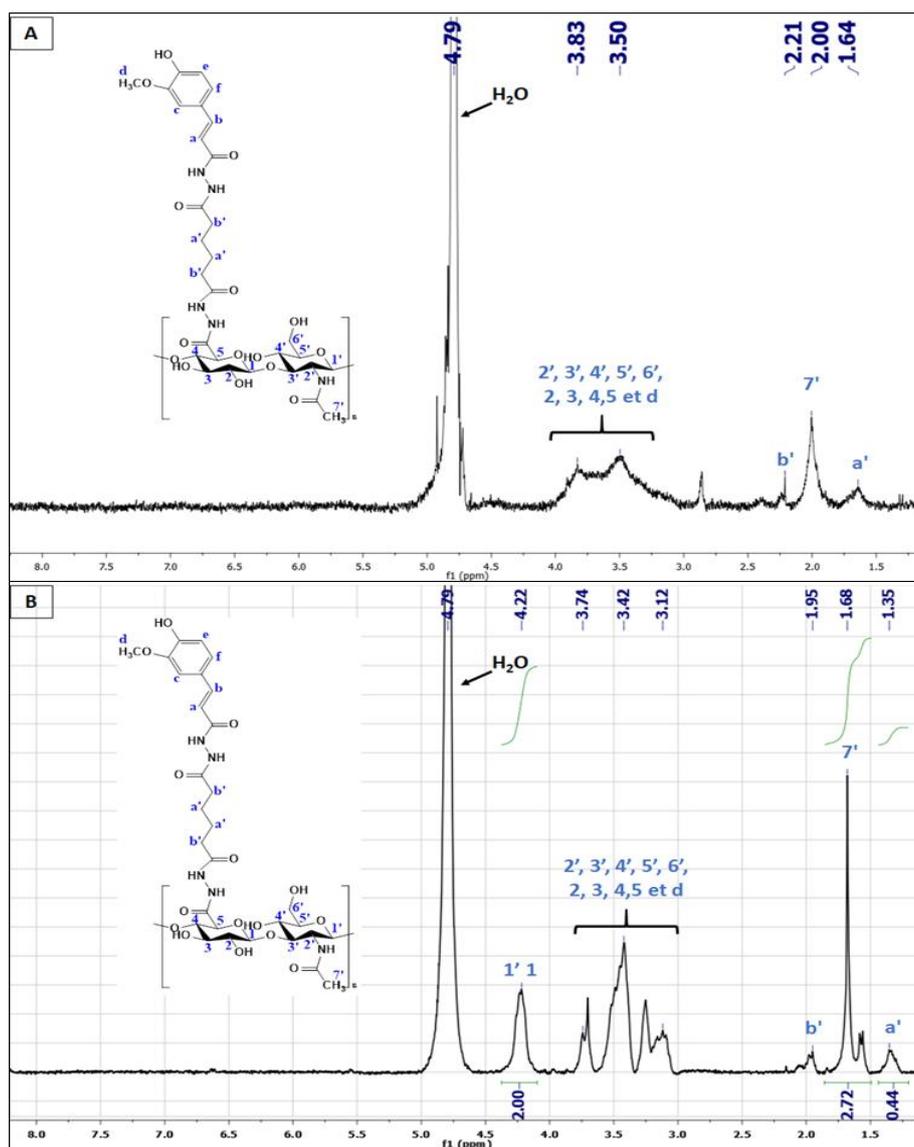
Après chauffage, et que quel que soit le temps, les 3 spectres RMN-<sup>1</sup>H du dérivé PUL-FA-T60% à 4, 8 et 24h présentent des pics similaires avec des déplacements chimiques identiques caractéristiques des systèmes PUL-FA (voir Chapitre C-I.2.2.2).

La détermination du degré de substitution en acide férulique selon l'équation C2 (Chapitre C-I-1.2) montre des valeurs quasi-identiques de 10,0 ; 9,8 et 10,3% pour les échantillons à 4, 8 et 24h, respectivement. Ceci confirme que l'hydrolyse totale du dérivé PUL-FA-T60% est atteinte après 4h de chauffage. Le même résultat a été obtenu pour les autres dérivés à T15 et T30%.

Par conséquent, pour l'analyse par spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H des systèmes PUL-FA, nous avons fixé un temps de chauffage de 4h pour assurer une hydrolyse totale des dérivés permettant ainsi une quantification plus exacte du taux de greffage d'acide férulique.

➤ **Cas des systèmes HA-FA et HA-NH-C18:1-T30% :**

La soude deutérée a été également utilisée dans les analyses RMN-<sup>1</sup>H des systèmes HA-FA et HA-NH-C18:1-T30% mais cette fois dans le but de réduire la viscosité des échantillons via la rupture des liaisons hydrogène participant à l'organisation structurale des chaînes du HA causant aussi leur dégradation par une  $\beta$ -élimination. Pour ceci, les échantillons ont été préparés dans le mélange solvant D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v) à une concentration de 10 g/L en agitant pendant 48h à l'ambiante. La Figure 4 présente les spectres RMN-<sup>1</sup>H de HA-ADH-FA1 dans D<sub>2</sub>O seule et en présence de la soude deutérée.



**Figure 4 :** Spectres RMN-<sup>1</sup>H de HA-ADH-FA1 dans : **A)** D<sub>2</sub>O. **B)** D<sub>2</sub>O/NaOD (85/15, v/v)

En réduisant la viscosité via l'utilisation de NaOD, on remarque l'apparition des protons anomères du HA qui résonnent à 4,22 ppm (Figure 4-B) tandis qu'en absence de NaOD (Figure 4-A), ces protons étaient inobservables à cause de la grande viscosité de la solution analysée. La détection de ces protons est primordiale pour le calcul du degré de substitution expérimental que ce soit de l'acide férulique ou de l'oleylamine (voir Chapitre D-I.2.2.2 et Chapitre F-I.2.2.2). Le même effet de NaOD a été observé par *Ret et al.*<sup>1</sup>.

- **Références bibliographiques**

1. Ret, D., Steiner, G., Gentilini, S. & Knaus, S. Exact determination of the degree of substitution of high molar mass hyaluronan by controlling the conformation in solution. *Carbohydr. Polym.* **204**, 124–130 (2019)

## Annexe 3 : Communications scientifiques

- Article :
  - Enzymatic cross-linking of carboxymethylpullulan grafted with ferulic acid  
Dulong V., Hadrich A, Picton L., Le Cerf D.  
Carbohydrate Polymers, 151, 78-87, 2016
  
- Communication par affiche (poster) :
  - « Hydrogels obtained with unclassical crosslinker on polysaccharides », **Journée de l'École Doctorale Normande de Chimie**, 13 Juin 2016 à Caen.
  
- Communications orales :
  - « Élaboration de nouveaux hydrogels à base de polysaccharides », **Journées Nord-Ouest Européennes des Jeunes Chercheurs et du Groupe Français des Polymères Grand Ouest**, 8 et 9 Juin 2017 à Caen.
  
  - « Hydrogels à base de polysaccharides : nouvelle voie de synthèse », **2<sup>ème</sup> Colloque du groupe de recherche (GDR) Cosm'actifs**, 25 et 26 Septembre 2017 à Nouan-Le-Fuzelier.
  
  - « Biomimetic hydrogels based on polysaccharides grafted ferulic acid », **4<sup>th</sup> International Conference on Bio-based Polymers and Composites (BiPoCo)**, du 2 au 6 Septembre 2018 à Balatonfüred (Hongrie)

## **Résumé**

Dans un contexte de démarche écoresponsable et pour répondre aux exigences de biocompatibilité notamment dans les applications cosmétiques et biomédicales, nous avons développé de nouveaux hydrogels à base de polysaccharides neutres et anioniques en utilisant deux voies originales. La 1<sup>ère</sup> approche est biomimétique et a consisté à mimer un phénomène d'élaboration naturelle d'hydrogels que l'on retrouve chez certains végétaux pour lesquels une enzyme, la laccase, permet de créer des liens de réticulation par dimérisation des composés phénoliques (en l'occurrence de l'acide férulique FA) présents sur les arabinoxylanes des mucilages des graines de céréales par exemple. Notre travail a ainsi consisté à greffer de l'acide férulique via deux chimies différentes de type imidazole et carbodiimide respectivement pour des polysaccharides neutres ou anioniques. Nous avons ainsi fonctionnalisé trois polysaccharides : le pullulane ou PUL (neutre modèle), le carboxyméthylpullulane ou CMP (anionique modèle) et l'acide hyaluronique ou HA (anionique d'intérêt). Des taux de greffage compris entre 2 et 25% ont été obtenus. L'étude physicochimique en régimes dilué et semi-dilué a permis de mettre en évidence un comportement associatif lié au caractère amphiphile des polysaccharides fonctionnalisés. La réticulation en présence de laccase, suivie *in situ* en rhéologie, a été réalisée avec succès sur les différents systèmes envisagés avec des contrôles possibles de la cinétique, des propriétés mécaniques finales ou encore du gonflement des hydrogels en fonction du caractère neutre ou chargé des polysaccharides, du degré de substitution en acide férulique, de la concentration en polymère ou de l'activité enzymatique fixée. Les dérivés synthétisés ont globalement démontré des activités biologiques (antioxydante et cytocompatible) intéressantes. La deuxième approche repose sur la photoréticulation possible de polysaccharides (PUL, CMP et HA) fonctionnalisés par le greffage d'amine/acide gras mono ou polyinsaturé (oleylamine, acide oléique et linoléique) via la chimie des imidazoles. Si le pullulane modifié par l'acide linoléique à 2% s'est avéré non hydrosoluble en raison de son caractère neutre, tous les autres dérivés avec des taux de greffages de 3 et 10% ont démontré une bonne solubilité dans l'eau. Les études physicochimiques mettent en évidence un très fort caractère associatif de ces dérivés amphiphiles avec la formation de gels physiques en régime semi-dilué. La photoréticulation a été démontrée en rhéologie sous irradiation UV *in situ* en présence d'un photoamorceur de type Darocur 1173<sup>®</sup>. Les résultats préliminaires obtenus selon cette approche en photoréticulation ouvrent ainsi des perspectives intéressantes.

**Mots clés :** hydrogel, polysaccharide, acide férulique, acide gras insaturé, réticulation, laccase, biomimétisme, rayonnement UV, physicochimie, rhéologie, antioxydant, imidazole, carbodiimide, cytocompatibilité.

## **Abstract**

In the framework of an eco-responsible context and to take advantage of biocompatibility, notably in cosmetic and biomedical applications, we have developed new hydrogels based on neutral and anionic polysaccharides using two original routes. The first approach is biomimetic and consists of mimicking a natural development of hydrogels that is found in certain plants for which an enzyme, laccase, allows to create crosslinks by dimerization of phenolic compounds, in occurrence of ferulic acid (FA) present on arabinoxylans mucilage of cereal seeds for example. Thus, our work consisted in grafting ferulic acid via two different chemical ways that means imidazole and carbodiimide respectively for neutral or anionic polysaccharides. We functionalized three polysaccharides: pullulan or PUL (neutral model), carboxymethylpullulane or CMP (model anionic) and hyaluronic acid or HA (anionic of interest) with grafting rates of between 2 and 25%. The physicochemical study in diluted and semi-diluted regimes evidenced an associative behavior due to the amphiphilic character of the functionalized polysaccharides. The crosslinking in the presence of laccase, followed *in situ* thanks to rheology, has been successfully performed on the various envisaged systems with possible controls of kinetics, the final mechanical properties or the swelling of the hydrogels as a function of the neutral or charged nature of the polysaccharides, the degree of substitution in FA, the polymer concentration or the enzymatic activity. The synthesized derivatives have generally demonstrated interesting biological activities (antioxidant and cytocompatibility). The second approach is based on the possible photocrosslinking of polysaccharides (PUL, CMP and HA) functionalized by the grafting of mono or polyunsaturated fatty amine/acid (oleylamine, oleic acid and linoleic acid) via imidazole chemistry. If pullulan grafted with 2% of linoleic acid was found to be water-insoluble due to its neutral character, all other derivatives (i.e. anionic ones) with grafting rates of 3 and 10% showed good solubility in water. The physicochemical studies show a very strong associative character of these amphiphilic derivatives with the formation of physical gels in semi-diluted regime. Photocrosslinking has been demonstrated *in situ* thanks to rheology/UV irradiation in the presence of a Darocur 1173<sup>®</sup> photoinitiator. The preliminary results according to this photocrosslinking approach thus open interesting perspectives.

**Keywords:** hydrogel, polysaccharide, ferulic acid, unsaturated fatty amine/acid, crosslinking, laccase, biomimicry, UV radiation, physicochemistry, rheology, antioxidant, imidazole, carbodiimide, cytocompatibility.