



**HAL**  
open science

# Développement de Polymères à Empreintes Moléculaires pour la Libération Contrôlée de la Ribavirine et de l'Adénosine -5'-monosphosphate

Mohamed Ayari

► **To cite this version:**

Mohamed Ayari. Développement de Polymères à Empreintes Moléculaires pour la Libération Contrôlée de la Ribavirine et de l'Adénosine -5'-monosphosphate. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2018. Français. NNT : 2018ORLE2047 . tel-02463832

**HAL Id: tel-02463832**

**<https://theses.hal.science/tel-02463832>**

Submitted on 2 Feb 2020

**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.

## ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Institut de Chimie Organique et Analytique

**THÈSE** présentée par :  
**Mohamed Ghazi AYARI**

Soutenue le : **06 décembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**  
Discipline/ Spécialité : Chimie

### **Développement de Polymères à Empreintes Moléculaires pour la Libération Contrôlée de la Ribavirine et de l'Adénosine-5'-monophosphate**

**THÈSE dirigée par :**

**Luigi A. AGROFOGLIO**

Professeur – Université d'Orléans

**Encadré par :**

**Patrick FAVETTA**

Maitre de Conférences – Université d'Orléans

**RAPPORTEURS :**

**Catherine BRANGER**

Maitre de Conférences – HDR – Université de Toulon

**Bernadette TSE SUM BUI**

Ingénieur de recherche – HDR – Université de Compiègne

---

**JURY :**

**Luigi A. AGROFOGLIO**

Professeur – Université d'Orléans

**Catherine BRANGER**

Maitre de Conférences HDR – Université de Toulon

**Benjamin CARBONNIER**

Professeur – Université Paris-Est

**Patrick FAVETTA**

Maitre de Conférences – Université d'Orléans

**Aurélie MALZERT-FREON**

Professeur – Université de Caen Normandie

**Bernadette TSE SUM BUI**

Ingénieur de recherche – HDR – Université de Compiègne



# Remerciements

Ce travail a été effectué à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de l'Université d'Orléans sous la direction du Pr. Luigi Agrofoglio et encadré par le Dr. Patrick Favetta.

Je remercie sincèrement le Dr. Bernadette Tse Sum Bui et le Dr. Catherine Branger d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie aussi le Pr. Benjamin Carbonnier et le Pr. Aurélie Malzert-Freon pour avoir accepté d'examiner mon travail, et de siéger dans ce jury de thèse.

Je tiens à remercier le Pr. Luigi. A. Agrofoglio, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail dans son laboratoire, et pour la confiance qu'il a pu me porter. Je le remercie également pour m'avoir laissé la totale liberté de conduire les projets qu'il m'a confiés. J'aimerais aussi le remercier pour son investissement permanent et sa patience démesurée et pour son aide dans les petits moments de crises. Il a été à la fois un directeur de thèse et un « vrai père de substitution ».

Je remercie aussi vivement le Dr. Patrick Favetta pour son encadrement au quotidien, ses conseils avisés, sa très grande disponibilité, son investissement hors du commun ainsi que sa bonne humeur. Je le remercie pour la richesse de son apport scientifique en Chimie analytique, en synthèse des polymères et en interface chimie-biologie. Ses énormes connaissances pluridisciplinaires ont permis de faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci d'être toujours à l'écoute, merci pour tes bons conseils et merci pour ta gentillesse. J'ai vraiment eu une chance unique de pouvoir travailler avec toi durant ces trois années.

Je remercie le DR. Mustapha Si-TAHAR ainsi que Virginie Vasseur de l'INSERM (CEPR-UMR1100) pour s'être impliqués dans la réalisation des études biologiques tout au long de ces trois années. Je remercie également le Dr. Dawid Warszycki (Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland) pour son apport au niveau de la modélisation moléculaire.

Je tiens également à remercier le Dr. Vincent Roy, la figure de l'ombre, pour sa contribution et son investissement surtout au niveau de la synthèse organique. Sa présence au quotidien, son soutien, sa disponibilité et son grand cœur font de lui une personne remarquable.

Je remercie aussi le Dr. Reine Nehmé pour m'avoir permis d'enseigner lors des séances de Travaux Pratiques au sein de l'IUT. Ainsi que David, Agnès, Berangère, Gisèle et martine pour leur participation au bon déroulement des TP.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes de l'ICOA sans qui le travail au quotidien serait bien difficile, et notamment Marie Madeleine Le Floch, Sophie Nicourt, Christophe Dubois, pascal bouyssou, Cyril Colas, Nathalie Percina, Alain-Michel Croze, Pascal Mazabraud et Stéphane Rétif.

Mes plus grands remerciements vont bien entendu au labo 6, mon labo, où j'ai passé trois années inoubliables. Je remercie Maxime et Florian pour m'avoir bien intégré au labo (même si le début était un peu difficile) ; votre bonne humeur, votre joie de vivre et nos séances de sport éprouvantes - surtout sans résultats pour moi, m'ont permis d'évoluer dans une excellente ambiance.

Merci à V2 qui n'a jamais cessé de s'occuper de mon régime alimentaire, ses cafés corsés qui ont failli faire sauter mes neurones, ses innombrables bêtises qui ont failli mettre un terme à ma vie et principalement merci d'être un des meilleurs jeunes collaborateurs avec qui j'ai travaillé. Aussi merci à Nicolas, mon petit Nico, avec qui j'ai une amitié hors norme qui a fait parler les gens tout autour. T'es à la fois mon meilleur ami et aussi des fois mon pire ennemi. Je n'oublierai jamais nos disputes intergalactiques et aussi nos petites soirées interminables et pleines de folies. Enfin, mes pensées vont aussi à Poko, Zahira la maman du labo, Pierre le meilleur stagiaire au monde, Marion, Matthieu, Sevil, Magalie, Hassna, Isma et Jean-Eddy.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues et amis en dehors de cet espace de travail, et j'en oublierai sûrement : Jo et Mimi (mes parents adoptifs), Doina, Fanny, R3 dont je suis méga fun, Audrey, Toto, Grosmin, Grég, Sylvain, Loic, Maria, Régis, Matthieu, Alex, Aksendra ma grande sœur, Miro, Julien, Jade, Séb, la belle Margaux, Ma Coco, Adrien le petit ange, Annia, ma petite femme Aga, mon petit Tommy etc. Et plus particulièrement, merci à Thibault, la meilleure découverte de cette dernière année et merci à Mazarine pour son grain de folie et son désir éternel de vouloir me rouler dessus.

Des remerciements particuliers vont à mes meilleurs amis de la Tunisie avec qui j'ai grandi et évolué. Particulièrement, merci à mon frère Yassine ; malgré la distance tu n'as jamais cessé d'être présent pour moi. Merci à Ma Dorra, mon reflet dans le miroir et mon petit souffle de vie malgré la distance qui nous sépare. Merci à Foufa al aloufa une des personnes les plus folles de cette terre et sans laquelle la vie n'aura pas le même goût. Et grand merci au reste de la petite bande : Yosra, Oumayma, Ahmed, Ala, Emna mais aussi ma petite Salma.

Des remerciements trop spéciaux vont pour mon Benou, mon meilleur ami de tous les temps. Merci pour les soirées de consoles, pour tes bons plats, pour les petites soirées de délires et de conneries incessantes. Merci d'être là dans les périodes les plus difficiles et même à 6000 km. Tu m'as réellement montré que ni la distance ni le décalage horaire ne pourront affectés notre grande amitié. Merci à Camille, notre rayon de soleil ; ta bonne humeur permanente et ton grand cœur ont été d'une grande aide pour moi.

Et bien évidemment, merci à mon Juju... eh oui MON JUJU, mon grand ami avec qui j'ai affronté ces trois années. Merci d'avoir été là même si en vrai on ne s'est pas trop écoutés durant ces années, vu qu'on parlait toujours en même temps ! Sache que c'était très dur d'essayer désespérément de suivre tes conseils pour avancer. Je n'oublie pas ta belle Christy que je remercie pour sa patience et son sourire inépuisable.

Mes meilleurs remerciements vont à celle qui a pris mon cœur, ma petite moitié, ma Chouchouette, ma petite Célia. Je n'imagine ni ma thèse ni ma vie sans toi. Merci d'avoir été toujours là pour moi. Merci pour nos petites et grandes soirées et surtout merci pour les grands délires et les petites escapades. Ton rire a toujours résonné dans mon cœur et surtout a explosé mes tympans ! Mais surtout n'arrête jamais de rire aux éclats... Merci d'avoir géré mon budget et surtout de m'avoir permis d'acheter toutes mes consoles. Je sais que je resterais toujours et à jamais ton petit chou chou à qui tu offriras plus qu'UN cadeau à chaque fête.

Et pour finir mes plus sincères remerciements vont à mes parents et à ma famille : mon Papa, l'homme au grand cœur, et ma banque centrale inépuisable, celui qui ne m'a jamais rien refusé. Merci à toi Ma Chère petite Maman ; tu n'as jamais cessé de croire en moi et tu m'a toujours donné la force d'aller vers l'avant. Comme quoi, ça sert de s'appeler trois fois par jours ;-)

Merci aussi à ma deuxième maman, ma réserve éternelle d'Amour et mon foyer de bonheur. Merci à mes deux sœurs sans lesquelles ma vie ne sera pas pareille. Vous avez toujours été là pour moi et je sais que je peux toujours compter sur votre soutien.

Enfin, je remercie du fond du cœur tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

M<sup>ed</sup> Ghazi AYARI  
Octobre, 2018

# Table des matières

Abréviations.....	IX
Liste des figures.....	XI
Liste des tableaux.....	XIV
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Les systèmes de libération contrôlée pour les maladies pulmonaires.....</b>	<b>3</b>
I. Généralités sur les maladies respiratoires.....	5
II. Les nucléosides comme agents antiviraux pulmonaires.....	7
III. Les systèmes de libération contrôlée (DDS).....	11
III.1. Généralités .....	11
III.2. Systèmes de libération contrôlée pulmonaires .....	14
IV. Objectifs de la thèse.....	24
<b>Chapitre 2 : Les polymères à empreintes moléculaires.....</b>	<b>25</b>
I. Généralités sur les empreintes moléculaires.....	27
II. Les MIPs comme systèmes de libération contrôlée.....	29
III. Synthèse des polymères à empreintes moléculaires.....	34
III.1. Choix des réactifs pour la synthèse des MIPs .....	37
III.1.1. La molécule cible ou template.....	37
III.1.2. Choix des monomères fonctionnels et stœchiométrie du complexe de pré-polymérisation.....	39
III.1.3. Agents réticulants .....	41
III.1.4. Le solvant porogène.....	42
III.2. Les différentes formes des polymères imprimés.....	44
III.2.1. Polymère monolithique ou en bulk .....	46
III.2.2. Polymères sphériques.....	47
III.2.3. Les hydrogels .....	48
IV. Caractérisation des polymères imprimés.....	50
IV.1. Stœchiométrie .....	50
IV.2. Caractérisation morphologique des MIPs.....	54
IV.3. Étude des isothermes d'adsorption des MIPs .....	54
IV.3.1. Etude de la recapture par batch.....	55
IV.3.2. Analyse frontale.....	55
IV.3.3. Les modèles d'isotherme d'adsorption .....	56
V. Mécanismes de libération contrôlée.....	58
VI. Modèles mathématiques pour les études de la libération d'un bioactif.....	60
VI.1. Le modèle cinétique d'ordre zéro.....	61
VI.2. Le modèle cinétique de premier ordre .....	61
VI.3. Le modèle d'Higuchi.....	62

VI.4. Le modèle de Korsmeyer-Peppas .....	62
VI.5. Le modèle de Baker-Lonsdale .....	64
<b>Chapitre 3 : Synthèse des hydrogels imprimés pour la libération de la ribavirine.....</b>	<b>67</b>
I. Introduction.....	69
I.1. Choix du template .....	69
I.2. Choix des monomères fonctionnels.....	70
I.3. Choix de l'agent de réticulation .....	72
I.4. Choix du solvant de polymérisation ou solvant porogène.....	72
II. Etude des interactions template-monomères fonctionnels.....	74
III. Synthèse des polymères imprimés.....	79
III. Caractérisation morphologique des MIP.....	84
IV. Etude et caractérisation de l'adsorption de la ribavirine.....	87
IV.1. Optimisation de l'adsorption de la ribavirine .....	91
V. Etude cinétique du relargage de la ribavirine.....	93
VI. Etude Biologique des matériaux pour la libération de la ribavirine dans les poumons.....	98
VI.1. Etude de la cytotoxicité et d'immunogénicité des matériaux .....	98
VI.2. Etude virologique .....	99
VII. Conclusion.....	101
VIII. Partie expérimentale.....	102
<b>Chapitre 4 : Synthèse des polymères imprimés rigides pour la libération contrôlée de la ribavirine.....</b>	<b>107</b>
I. Introduction.....	109
I.1. Choix des monomères fonctionnels.....	110
II. Résultats et discussions.....	113
II.1. Test de solubilité .....	113
II.2. Etude des interactions template-monomères fonctionnels .....	114
II.3. Synthèse des polymères imprimés.....	117
II.4. Caractérisation du MIP par FT-IR .....	117
II.5. Etude et caractérisation de l'adsorption.....	118
II.6. Etude cinétique du relargage de la ribavirine .....	122
II.7. Etude Biologique des matériaux pour la libération la ribavirine dans les poumons .....	125
III. Conclusion.....	131
IV. Partie expérimentale.....	132
<b>Chapitre 5 : Synthèse des MIP sphériques de la ribavirine par polymérisation par précipitation.....</b>	<b>135</b>
I. Introduction.....	137
II. Résultats et discussions.....	139
II.1. Optimisation de la synthèse des polymères .....	139
II.2. Caractérisations morphologiques des SMIPs .....	140



II.3. Etude comparative des capacités d'adsorption des polymères imprimés. ....	143
II.4. Etude cinétique de la libération de la ribavirine .....	145
II.5. Etude de l'effet antiviral des DDS de type SMIPs sur des cellules infectées avec le IAV .....	147
II.6. Optimisation de la synthèse des polymères imprimés sphériques .....	148
II.6.1. Synthèse de SMIP fluorescents pour l'étude de la bio-distribution in vitro.....	148
II.6.2. Etude de l'effet de l'ajout d'un monomère thermosensible sur la libération de la ribavirine .....	149
III. Conclusion.....	153
IV. Partie experimentale.....	154
<b>Chapitre 6 : Synthèse d'un hydrogel imprimé sphérique pour la libération contrôlée d'un nucléotide : l'adénosine-5'-monophosphate.....</b>	<b>157</b>
I. Introduction.....	159
I.1. Choix de la technique de polymérisation.....	160
I.2. Choix des réactifs de polymérisation .....	160
II. Résultats et discussions.....	163
II.1. Etude des interactions template-monomère.....	163
II.2. Synthèse et caractérisation des nanoparticules de silice modifiées.....	164
II.3. Synthèse des polymères.....	165
II.4. Etude de la taille et de la morphologie des polymères imprimés.....	166
II.5. Etude caractéristique des hydrogels .....	166
II.6. Etude cinétique de la libération de la 5'-AMP .....	170
III. Conclusion.....	174
IV. Partie experimentale.....	175
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>179</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>183</b>
Annexe I : Modélisation moléculaire.....	185
Annexe II : Synthèses du dummy template et des monomères.....	187
Annexe III : Pourcentages et quantités de ribavirine libérés au bout de 24h pour le NIP-03 et le NIP-07.....	189
Annexe IV : Pourcentages de ribavirine libérés les quantités relarguées pour chacun des MIP-09, MIP-10, MIP-11 monolithique et SMIP-13, SMIP-19 et SMPI-24 sphériques.....	189
Annexe V : Résultats de l'analyse frontale pour le MIP-25 et en batch pour le SMIP-26.....	190
Annexe VI : Modèles mathématiques caractérisant la cinétique du relargage.....	191
Références.....	192

## Abréviations

- **A**

**Asn** : Asparagine

**AIBN** : 2,2'-Azobisisobutyronitrile

**5'-ATP** : Adénosine-5'-triphosphate

**5'-AMP** : Adénosine-5'-monophosphate

**ADN** : Acide déoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**AAm** : Acrylamide

**AZT** : 3'-Azido-3'-déoxythymidine

**ANDS** : Acide naphtalène-disulfonique

**AcOH** : Acide acétique

- **B**

**Bi-L** : Bi-Langmuir

- **D**

**DDS** : Drug Delivery Systems

**DFT** : Density functional theory

**DMEAM** : 2-(Diméthylamino) éthyle méthacrylate

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DMF** : Diméthylformamide

- **E**

**EGDMA** : Ethylène glycol diméthacrylate

**EtOH** : Ethanol

- **F**

**F** : Freundlich

**F-L** : Freundlich-Langmuir

**FT-IR** : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

- **G**

**GTP** : Guanosine-5'-triphosphate

- **H**

**HEMA** : 2-Hydroxyléthyl méthacrylate

**hIL-6** : Interleukine-6

**HMDS** : Hexaméthylsilazane

- **I**

**IAV** : Virus influenza A

- **L**

**LCST** : Critical solution temperature

**L** : Langmuir

**LPS** : Lipopolysaccharide

- **M**

**MD** : Molecular dynamics

**MIP** : Polymère à empreintes moléculaires

**MAA** : Acide méthacrylique  
**MBA** : *N,N'*-méthylène *bis*acrylamide  
**MeCN** : Acétonitrile  
**MF** : Monomère fonctionnel  
**MeOH** : Méthanol  
**MOI** : Multiplicity of infection  
**MWNTs** : Multiwalled carbon nanotubes

- **N**

**NIP** : Polymère non imprimé  
**NIPAm** : *N-isopropylacrylamide*  
**NAT** : *N-acryloylthymine*  
**NAU** : *N-acryloyluracile*

- **P**

**PBS** : Tampon phosphate salin  
**PFU** : Plaque-forming unit

- **R**

**R** : Réticulant  
**RMN** : Résonance magnétique nucléaire  
**Riba** : Ribavirine

- **S**

**SIDA** : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis  
**SVF** : Sérum de veau fœtal  
**SiO<sub>2</sub>** : Silice

- **T**

**THF** : Tétrahydrofurane  
**T** : template

- **V**

**VHS** : Virus Herpès Simplex  
**VRS** : Virus respiratoire syncytiale  
**VHB** : Virus hépatite B  
**VHC** : Virus hépatite C  
**VA-044**: 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane]dihydrochloride

## Liste des Figures

Figure 1 : Excès de mortalité estimé sur les saisons épidémiques de grippe depuis 2006 en France. .5	5
Figure 2 : Cycle de réplication du virus de la grippe. ....6	6
Figure 3 : Cycle schématique de multiplication du virus grippal et cibles d'action des antiviraux actuels ou en essais cliniques . ....7	7
Figure 4 : Représentation structurale des nucléosides et des nucléotides. ....8	8
Figure 5 : Exemple des analogues nucléosidiques antiviraux pour le cancer et pour les virus ADN .....9	9
Figure 6 : Structure de la ribavirine [1-(β-D-ribofuranosyl)-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide].....9	9
Figure 7 : Mécanisme d'action de la ribavirine lors de sa pénétration dans la cellule cible. ....11	11
Figure 8 : Evolution des systèmes de libération contrôlée depuis 1950 .....12	12
Figure 9 : Aperçu du développement d'un DDS .....13	13
Figure 10 : Anatomie des voies respiratoires. ....15	15
Figure 11 : Mécanismes d'élimination des particules déposées dans les voies respiratoires .....16	16
Figure 12 : Effet de la taille des particules sur leur dépôt dans les voies respiratoires humaines .....17	17
Figure 13 : Représentation des profils de libération d'une substance active .....19	19
Figure 14 : Les différents systèmes de libérations pulmonaires. ....20	20
Figure 15 : Principe de formation d'un polymère à empreintes moléculaires.....27	27
Figure 16 : Stratégies de libérations obtenues après chargement du principe actif .....31	31
Figure 17 : Profils de relargage de la théophylline .....32	32
Figure 18 : Structure du timolol ( <b>21</b> ), R-propranolol ( <b>22</b> ) et le S-propranolol ( <b>23</b> ) .....32	32
Figure 19 : Influence de la température sur le gonflement/dégonflement. ....34	34
Figure 20 : Schéma de la complexation entre le galactose ( <b>27</b> ) et l'acide 4-vinylphényl boronique ( <b>28</b> ). .....35	35
Figure 21 : Illustration de l'approche semi covalente .....37	37
Figure 22 : Exemples de dummy-templates utilisés dans le développement des MIPs .....39	39
Figure 23 : Différents monomères fonctionnels utilisés dans la synthèse des MIP-DDS.....40	40
Figure 24 : Structure donnée du complexe formé par l'AAM ( <b>45</b> ) et la podophyllotoxine ( <b>47</b> ). .....40	40
Figure 25 : Différents agents réticulants utilisés dans la synthèse des MIP-DDS.....41	41
Figure 26 : Les différentes techniques de polymérisation pour l'obtention de polymères imprimés. 45	45
Figure 27 : Clichés obtenus par microscope électronique à balayage (MEB) et microscope électronique à transmission (MET) des polymères imprimés .....46	46
Figure 28 : Gonflement et rétrécissement des chaînes d'hydrogels sous l'effet de la solvatation ou des stimuli. ....49	49
Figure 29 : Distributions des affinités .....51	51
Figure 30 : Complexe de pré-polymérisation donnée par la modélisation moléculaire .....52	52
Figure 31 : Domaines de valeurs de Ka obtenus pour différentes combinaisons de $[H]_0 / [G]_0$ utilisées en RMN .....53	53
Figure 32 : Les étapes de l'étude de complexation par ITC.....54	54
Figure 33 : Etude de la recapture par Batch. ....55	55
Figure 34 : A) Procédure de l'analyse frontale, B) chromatographe obtenues suite à l'analyse frontale .....56	56
Figure 35 : Distribution des sites actifs proposés pour chaque modèle d'isotherme d'adsorption .....58	58
Figure 36 : Systèmes de libération contrôlée par le gonflement pour une matrice hydrophile.....60	60

Figure 37 : Structure de la ribavirine .....	70
Figure 38 : Structure du 2'-deoxy-inosine ( <b>54</b> ) et de l'asparagine ( <b>55</b> ). .....	71
Figure 39: Structure des monomères fonctionnels choisis. ....	71
Figure 40 : Isotherme d'association obtenue par titration <sup>1</sup> H-RMN .....	75
Figure 41 : Schéma montrant le complexe formé entre la molécule de ribavirine et 4 molécules d'acrylamide.....	77
Figure 42 : Nombre de liaisons intermoléculaires (template-monomère) et de liaisons intramoléculaires (monomère-monomère) en fonction du ratio template/monomère.....	78
Figure 43 : Exemple d'un schéma de synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires pour la reconnaissance de la ribavirine .....	80
Figure 44 : Le pourcentage d'extraction de la ribavirine en fonction du nombre de lavage. ....	82
Figure 45 : Le <i>binding capacity</i> obtenu pour les polymères à base d'AAM (bleu) et du NIPAm (rouge) .....	84
Figure 46 : Exemple d'un cliché par MEB de particules de MIP-03 .....	86
Figure 47 : Surface des particules du MIP-03 (A) et du MIP-07 (B) obtenues par MEB .....	86
Figure 48: Isothermes d'adsorption de la ribavirine pour les MIPs et NIPs à base d'AAM (MIP/ NIP-03) et de NIPAm (MIP/NIP-07) .....	88
Figure 49 : Pourcentage de recapture de la ribavirine .....	92
Figure 50 : Relargage de la ribavirine en fonction du temps dans l'eau à 25°C pour chacun des MIP/NIP 03 (AAM) et 07 (NIPAm) .....	94
Figure 51 : Relargage de la ribavirine (exprimé sous forme Mt/M <sub>0</sub> ) en fonction du temps dans l'eau et le PBS à 25°C pour chacun des MIP/NIP 03 (AAM) et 07 (NIPAm) .....	95
Figure 52 : Relargage de la ribavirine (exprimé sous forme Mt/M <sub>0</sub> ) en fonction du temps dans le PBS à 25°C et 40°C pour chacun des MIP/NIP 03 (AAM) et 07 (NIPAm) .....	96
Figure 53 : Pourcentage de viabilité cellulaire pour chacun des matériaux .....	98
Figure 54 : Concentration de l'interleukine-6 en pg/mL pour chacun des matériaux .....	99
Figure 55 : Résultats de la quantification virale en unité formant des plaques (PFU/mL) pour chacun des matériaux .....	100
Figure 56 : Molécule cible ( <b>6</b> ) et son dummy-template ( <b>56</b> ).....	109
Figure 57 : Représentation de la ribavirine ( <b>6</b> ) qui est un mime de la guanosine ( <b>8</b> ) et de l'adénosine ( <b>7</b> ) .....	111
Figure 58 : Monomères fonctionnels utilisés pour la synthèse de polymères imprimés.....	111
Figure 59 : Représentation graphique de la complémentarité entre la base de la ribavirine triacétylée ( <b>56</b> ) et chacun des monomères fonctionnels ( <b>57</b> et <b>58</b> ).....	112
Figure 60 : Résultats obtenus par modélisation moléculaire. ....	114
Figure 61 : Structure du complexe de pré-polymérisation.....	115
Figure 62 : Job-plot pour l'association du template 56 avec le monomère <b>57</b> (A), et le monomère <b>58</b> (B).....	117
Figure 63 : Spectre FT-IR des monomères 19 et 58 et leur polymère imprimé respectif .....	118
Figure 64 : Données expérimentales obtenues par une analyse frontale pour chacun des polymères imprimés/non-imprimés.....	119
Figure 65 : Relargage de la ribavirine (M <sub>t</sub> /M <sub>0</sub> ) en fonction du temps pour le MIP9 et le NIP-09 .....	122
Figure 66 : Profil de relargage de la ribavirine (M <sub>t</sub> /M <sub>0</sub> ) en fonction du temps.....	124

Figure 67 : Pourcentage de viabilité cellulaire pour le NIP 9 ou poly(MAA-co-EGDMA) à deux concentrations différentes de matériaux. ....	126
Figure 68 : Concentration de l'interleukine-6 en $\text{pg.mL}^{-1}$ pour le NIP-9 ou poly(MAA-co-EGDMA) à deux concentrations différentes de matériaux. ....	126
Figure 69 : Pourcentage de viabilité cellulaire pour chacun des matériaux. ....	127
Figure 70 : Concentration de l'interleukine-6 en $\text{pg.mL}^{-1}$ pour chacun des matériaux.....	128
Figure 71 : Résultats de la quantification virale obtenus en unité formant des plaques (PFU/mL) pour la formulation à base de MAA ou MIP-09 .....	129
Figure 72 : Résultats pour la quantification virale obtenus en unité formant des plaques (PFU/mL) pour chacun des matériaux .....	129
Figure 73 : Cliché obtenu par microscopie électronique à balayage montrant des particules sphériques.....	141
Figure 74 : Clichés obtenus en MEB pour les particules sphériques SMIPs à différents temps de polymérisation .....	141
Figure 75 : Exemples de clichés MEB obtenus pour les SMIP-19 (A) et SNIP-19 (B) dans les conditions optimales .....	143
Figure 76 : Capacités d'adsorption ( $\text{mol.g}^{-1}$ ) obtenues par batch pour les MIP-9, MIP-11, SMIP-13 et SMIP-19 et de leurs NIPs respectifs .....	144
Figure 77 : Profils de libération de la ribavirine ( $M_t/M_0$ ) en fonction du temps pour chacun des SMIP/SNIP 13 (A) et 19 (B).....	146
Figure 78 : Résultats de la quantification virale obtenue en unité formant des plaques (PFU/mL) pour chacun des matériaux chargés .....	147
Figure 79 : Clichés A) extracellulaires et B) intracellulaires obtenus par microscope confocal .....	149
Figure 80 : Cliché MEB montrant des particules polymériques sphériques micrométriques.....	150
Figure 81 : Capacités d'adsorption ( $\text{mol.g}^{-1}$ ) obtenues par Batch pour le SMIP-19, le SMIP-24 et de leur SNIP respectif.....	151
Figure 82 : Profil de libération de la ribavirine ( $M_t/M_0$ ) en fonction du temps pour les SMIP-19 (tracé noir) et SMIP-24 (tracé rouge).....	152
Figure 83 : Structure de l'adénosine 5'-monophosphate .....	159
Figure 84 : Schéma de l'AMP dans le site active de l'enzyme AMPKinase. ....	160
Figure 85 : Structure du monomère fonctionnel 2-(diméthylamino) éthyle méthacrylate .....	162
Figure 86 : Hypothèse du complexe de pré-polymérisation formé entre le template (59) et les monomères fonctionnels ( <b>60</b> et <b>24</b> ). ....	163
Figure 87 : UV job-plot des complexes [ <b>59/60</b> ] et [ <b>(59/60)/ 24</b> ] .....	164
Figure 88 : Spectre IR des nanoparticules de silice non modifiées (A) et modifiées (B). ....	165
Figure 89 : Clichés MEB du MIP-25 , NIP-25 monolithique, SMIP-26 , SNIP-26 sphérique .....	166
Figure 90 : Comparaison entre le modèle d'adsorption expérimental du template 59 et le meilleur modèle de régression non linéaire obtenu. ....	168
Figure 91 : Ajustement du modèle théorique selon les résultats de relargage obtenu.....	172

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les problèmes causés par la libération non contrôlée et les avantages de l'utilisation des DDS.....	12
Tableau 2 : Etat clinique des formulations de liposomes pour la libération prolongée des principes actifs dans les poumons.....	19
Tableau 3 : Exemple de la variation des tailles de pores en faisant varier le solvant porogène.....	43
Tableau 4 : Constantes diélectriques et paramètres de solubilité de différents solvants utilisés pour la synthèse des MIPs.....	44
Tableau 5 : Interprétation des modèles de libération d'un principe actif à partir d'une matrice polymérique avec différentes géométries. ....	63
Tableau 6 : Solubilité de la ribavirine dans différents solvants utilisés dans la synthèse de MIPs .....	73
Tableau 7 : Les valeurs résultats de la titration RMN obtenues par le modèle de régression non linéaire 1:1. ....	76
Tableau 8 : Formulations des polymères imprimés synthétisés avec l'AAM (45) et le NIPAm (24) dans l'eau.....	81
Tableau 9 : Les valeurs de taux de gonflement (g/g).....	85
Tableau 10 : Valeurs des constantes d'affinités ( $K_a$ ; $L \cdot mol^{-1}$ ), nombre de site actif ( $N$ ; $mol \cdot g^{-1}$ ), coefficient de détermination ( $R^2$ ), valeur du test statistique de Fisher ( $F_{value}$ ) obtenus en appliquant les différents modèles d'isotherme d'adsorption aux MIP/NIP-03 et MIP/NIP-7.....	89
Tableau 11 : Paramètres obtenus suite à la régression non linéaire selon le modèle Korsmeyer-Peppas.....	97
Tableau 12 : Pourcentages de ribavirine libérés et quantités relarguées ( $\mu mol$ ) .....	97
Tableau 13 : Example of composition of the $H^1$ -NMR titration steps .....	103
Tableau 14 : Polymer formulations used in synthesis of MIPs in DMSO.....	104
Tableau 15 : Solubilité du dummy-template (56) et des trois monomères choisis .....	113
Tableau 16 : les valeurs de $\Delta G$ obtenues pour les différents complexes de pré-polymérisation .....	115
Tableau 17 : Résultats de la titration $^1H$ -RMN en utilisant le modèle de régression non linéaire de type 1:1 .....	116
Tableau 18 : Formulations utilisées dans la synthèse des MIP-09 (monomère <b>19</b> ), MIP-10 (monomère 57) et MIP-11 (monomère <b>58</b> ).....	117
Tableau 19 : les constantes d'affinités ( $K_a$ , $L \cdot mol^{-1}$ ) et le nombre de sites actifs ( $N$ , $mol \cdot g^{-1}$ ) obtenues par applications des modèles de régression non linéaire. ....	120
Tableau 20 : Paramètres obtenus après régression non linéaire avec les modèles de Higuchi et de Korsmeyer-Peppas pour le MIP-09 et le NIP-09 .....	123
Tableau 21 : Paramètres obtenus suite à la régression non linéaire appliquée aux modèles de Higuchi et de Korsmeyer-Peppas pour le MIP/NIP (10-11) .....	124
Tableau 22 : Taille moyenne des particules sphériques en fonction de la technique de polymérisation. ....	137
Tableau 23 : Formulations des polymères imprimés sphériques (SMIP) .....	140
Tableau 24 : Caractérisation morphologique des MIPs sphériques (SMIPs).....	142
Tableau 25 : Tailles moyennes ( $\mu m$ ) des microsphères obtenues en polymérisation par précipitation .....	143
Tableau 26 : Comparaison des valeurs du « Binding capacity ».....	144

Tableau 27 : Paramètres calculés suite à une régression non linéaire appliquée aux modèles de Korsmeyer-Peppas et de Lonsdale-Baker pour les SMIP/SNIP 13 et 19.....	146
Tableau 28 : Formulations des polymères imprimés sphériques (SMIP) fluorescents .....	148
Tableau 29 : Synthèse des polymères sphériques SMIP/SNIP-24. ....	150
Tableau 30 : Formulation des MIP-25 et NIP-25 monolithique dans le DMSO. ....	165
Tableau 31 : Formulation de la phase aqueuse pour le Pickering inverse pour le SMIP-26 et SNIP-26. .....	165
Tableau 32 : Résultats obtenues par analyse frontal pour le MIP/NIP-25 et par batch pour le SMIP/SNIP-26.....	168
Tableau 33 : Les paramètres obtenus suite à la régression non linéaire selon les modèles de Korsmeyer-Peppas et Baker-Lonsdale. ....	172





# Introduction générale

Les infections des voies respiratoires, dont la grippe, représentent aujourd'hui l'une des causes majeures de mortalité dans le monde (jusqu'à 500 000 décès). Ces infections ont également un impact sur d'autres pathologies chroniques telles que l'asthme et les bronchites. La lutte contre les infections respiratoires est donc un enjeu sociétal majeur. La chimiothérapie (antibiotiques, antiviraux) ainsi que la vaccination représentent des moyens potentiels de lutte contre ces infections. Cependant, les mutations rapides des virus et les menaces de pandémies (H5N1 et H1N1) qui en résultent peuvent rendre inefficace la vaccination. L'usage des antiviraux reste de ce fait nécessaire pour, au moins, les cas les plus à risque : enfants, personnes âgées, personnes immunodéprimées. Parmi ces médicaments, nous trouvons l'oseltamivir, l'amantadine, la ribavirine...

Le virus responsable de la grippe (virus influenza) cible de façon privilégiée le poumon et les voies respiratoires humaines. Cela entraîne des complications pulmonaires, appelées « syndrome de détresse respiratoire aiguë » ou SDRA, qui peuvent s'accompagner d'un œdème pulmonaire et parfois conduire au décès du patient. Pour traiter les pathologies respiratoires sévères, les médicaments sont généralement administrés par voie systémique ou orale. Or, ces voies d'administration ne sont pas optimales, car certains médicaments peuvent moyennement diffuser au travers des barrières biologiques et sont retrouvés en faible quantité dans le poumon. Une voie d'administration alternative serait la voie respiratoire qui permet d'administrer directement dans le poumon les molécules antivirales sous la forme d'un aérosol. De plus, la délivrance de médicaments par voie pulmonaire qui est peu ou pas invasive, permet d'accéder à un grand nombre de cibles thérapeutiques (ORL, bronches, poumon profond).

Au cours de ces dernières années, un progrès significatif a été accompli dans le domaine des dispositifs de délivrance de médicaments. Ce progrès est dû en partie au développement de la science des matériaux. Ces avancées ont permis d'améliorer les systèmes de transport de médicaments (drug carriers) afin de répondre directement à la problématique de l'individualisation des soins. Ainsi, dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés au développement de polymères à empreintes moléculaires pour la libération contrôlée d'un nucléoside, la ribavirine et d'un nucléotide, l'adénosine-5'-monophosphate.

Le premier et le deuxième chapitre introduisent la problématique engendrée par le virus influenza A et la nécessité de trouver de nouveaux systèmes de libération. Les principaux cargos seront présentés (les liposomes, les dendrimères, les matériaux polymériques). La technologie des empreintes moléculaires, leur synthèse, caractérisation et mécanisme de libération sera alors introduite.

Dans un troisième chapitre, nous décrivons la mise en place de systèmes de libération imprimés de la ribavirine sous forme d'hydrogel. Deux monomères de choix ont été utilisés, l'acrylamide et son dérivé thermosensible le *N-isopropylacrylamide* en copolymérisation avec le *N,N'*-méthylène *bis*acrylamide comme agent réticulant dans l'eau selon une approche non covalente. L'étude du ratio template/monomère fonctionnel est menée par différentes techniques afin de

mettre en place la meilleure formulation pour aboutir à une bonne reconnaissance et une grande capacité du MIP. Suite à la caractérisation morphologique et l'étude de recapture, la cinétique de libération a été étudiée en faisant varier différents paramètres.

Le quatrième chapitre consiste en la synthèse d'un MIP par utilisation de monomères synthétisés au laboratoire selon une stratégie de complémentarités des bases nucléiques entre la ribavirine et chacun des monomères fonctionnels. La polymérisation a été effectuée dans le DMSO et le MeCN en utilisant l'EGDMA comme réticulant pour l'obtention d'un MIP rigide. Les études morphologiques et de recapture ont permis de mettre en place l'étude cinétique et de visualiser la libération contrôlée à partir de ces systèmes imprimés rigides.

Dans le cinquième chapitre, nous avons transposé les meilleures formulations obtenues à la synthèse de billes sphériques micrométriques adaptées à la libération pulmonaire. La polymérisation par précipitation a été choisie afin d'obtenir des billes micrométriques dont le diamètre est compris entre 1 et 5 microns. L'optimisation de la formulation des billes obtenues a amélioré les caractéristiques de billes imprimées. L'ajout d'un co-monomère fluorescent a permis d'étudier la bio-distribution de nos matériaux.

Dans le dernier chapitre nous allons décrire un autre type de système de libération sous forme d'hydrogel thermosensible sphérique obtenu par polymérisation par émulsion Pickering inverse. Ce système a été développé pour la libération de l'adénosine-5'-monophosphate.

La conclusion générale regroupera les résultats marquants de cette thèse et quelques perspectives sur l'avenir des systèmes de libération imprimés obtenus.

# **Chapitre 1 : Les systèmes de libération contrôlée pour les maladies pulmonaires.**



## I. Généralités sur les maladies respiratoires

Le virus de la grippe, le virus respiratoire syncytial, le métapneumovirus humain, le virus parainfluenza, les coronavirus et les rhinovirus sont parmi les virus les plus communs provoquant des rhumes saisonniers légers. Ces virus à ARN peuvent également provoquer des infections des voies respiratoires inférieures entraînant une bronchiolite et une pneumonie. Les jeunes enfants, les personnes âgées et les patients dont le système cardiaque, pulmonaire ou immunitaire est compromis, sont les plus exposés au risque de maladies graves associées à ces infections respiratoires à virus à ARN. Les virus Influenza infectent chaque année entre 5 et 10 % de la population mondiale. En outre, les virus de la grippe porcine et aviaire, associés aux coronavirus ou au syndrome respiratoire aigu sévère, représentent des menaces pandémiques importantes.

Au niveau mondial, ces épidémies annuelles sont responsables d'environ 3 à 5 millions de cas de maladies graves, et 250 000 à 500 000 décès.<sup>1</sup> En France, l'excès de taux de mortalité a atteint 21200 cas comme le montre la figure 1.

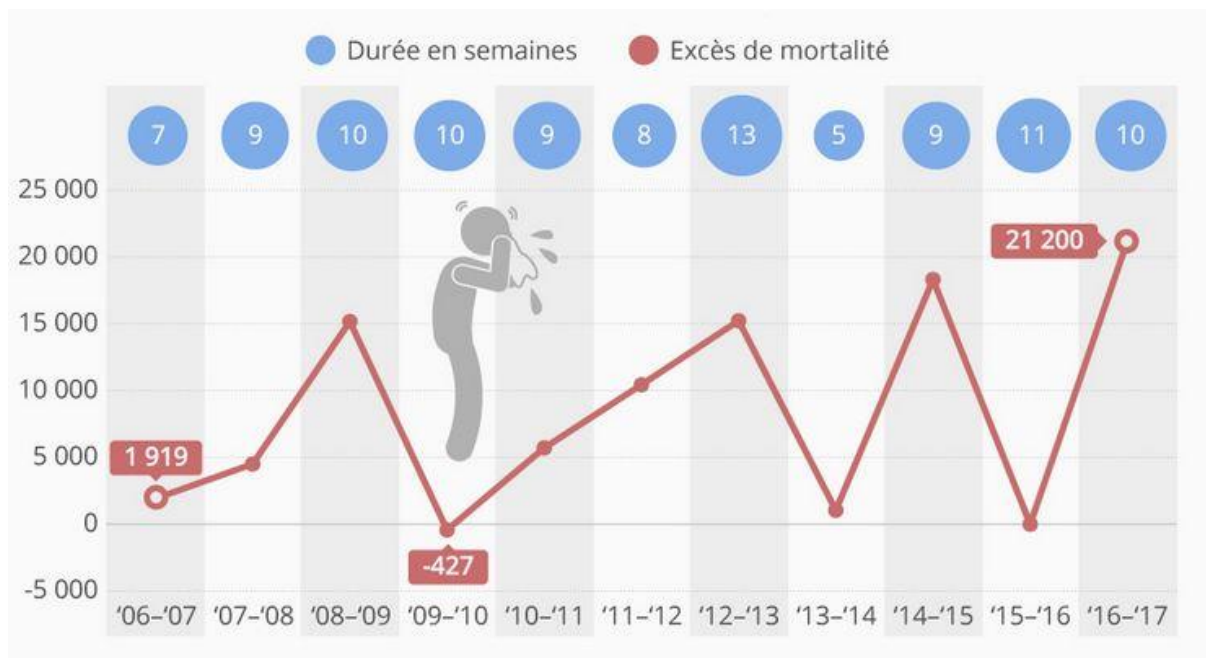


Figure 1 : Excès de mortalité estimé sur les saisons épidémiques de grippe depuis 2006 en France.<sup>2</sup>

Les virus de la grippe font partie de la famille des orthomyxoviridae, qui incluent les virus influenza A, B et C. Le virus Influenza est enveloppé d'une capsid de symétrie hélicoïdale. La particule virale (ou virion) a un diamètre compris entre 80 et 100 nm. Le génome viral est fait d'ARN monocaténaire (simple brin) de polarité négative (ARN complémentaire de l'ARN messager). Les virus influenza qui sont bien adaptés à l'homme sont les virus influenza A de type H1N1, H2N2, et H3N2 et le virus influenza B. Les virus influenza A dits « aviaires » H5N1, H7N7 et H9N2 peuvent infecter l'homme, dans un contexte épidémiologique particulier (contact rapproché avec des volailles).<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Organisation mondiale de la santé, [http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).

<sup>2</sup> Source : InVS santé publique France.

Le cycle de réplication<sup>3</sup> du virus est rapide et ne dure que dix heures. Il se divise en 8 étapes importantes (voir Figure 2) :

- **La fixation au récepteur** pendant laquelle les virions se fixent *via* des antirécepteurs aux cellules de l'épithélium.
- **L'endocytose** qui consiste à la formation d'une vacuole d'endocytose autour du virion permettant sa pénétration cellulaire.
- **La fusion et la libération des ribonucléoprotéines** contenant les gènes viraux dans le cytoplasme
- **Le passage nucléaire des ARN négatifs** qui se fait du cytoplasme au noyau à travers les pores nucléaires et présente un phénomène actif « ATP dépendant ».
- **La synthèse des ARNm et de l'ARN viral** se fait dans le noyau où l'ARN polymérase est responsable de la réplication et la transcription de l'ARN virale. Elle permet de copier les molécules d'ARN en deux types d'ARN positifs : les premiers servent de matrice à la synthèse des brins négatifs constituant le génome viral et les deuxièmes constituent les ARN positifs messagers.
- **La synthèse de protéines virales** qui consiste au passage des ARN positifs messagers (ARNm) dans le cytoplasme où ils sont traduits en protéines.
- **Le bourgeonnement** se traduit par l'assemblage des virions qui a lieu à la membrane cytoplasmique de la cellule.
- **La libération des nouveaux virions** est la dernière étape pendant laquelle les nouveaux virions sont évacués dans l'espace extracellulaire.

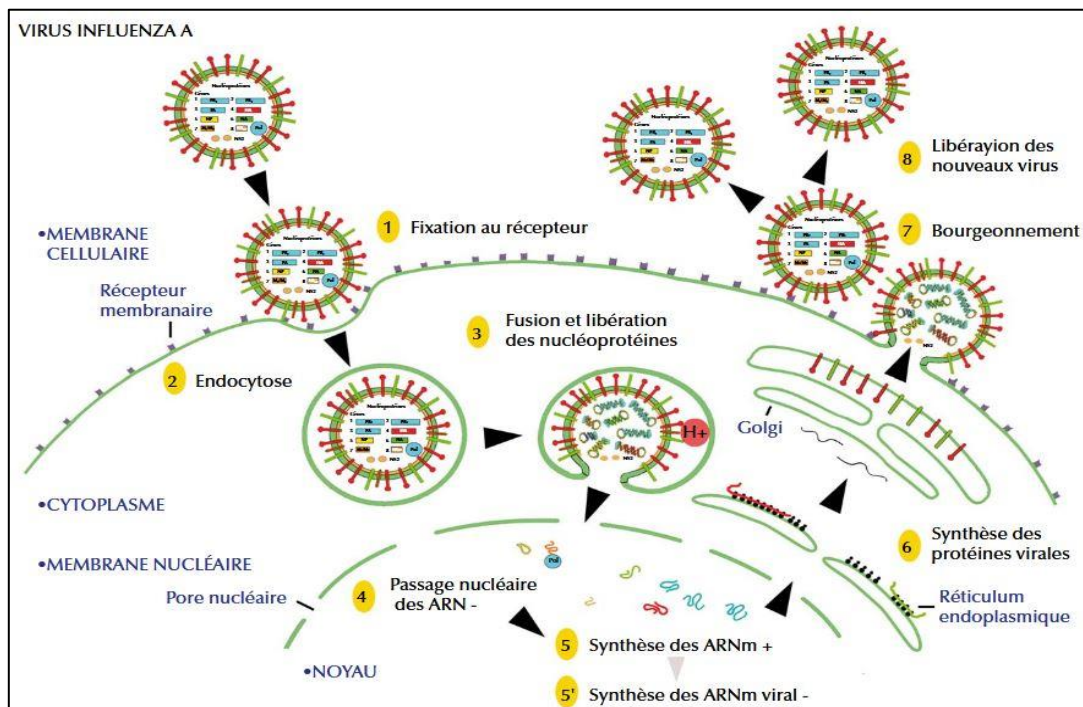


Figure 2 : cycle de réplication du virus de la grippe.<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Lagathu, G.; Colimon, R., Grippe : vaccination, prophylaxie et traitement par les antiviraux. *Médecine thérapeutique* 2010, 16, 357-373.

Le meilleur moyen de prévention contre les virus grippaux reste la vaccination. Mais sa mise à jour est nécessaire chaque année. Les antiviraux restent par conséquent un moyen efficace de lutte contre les virus grippaux lorsque le vaccin n'est pas encore disponible ou dans le cas d'une infection sévère. Parmi ces antiviraux, on peut citer les dérivés de l'adamantane, tels l'amantadine (1) et la rimantadine (2), les inhibiteurs de la neuraminidases tels que l'oseltamivir (3) et le zanamivir (4) ou des dérivés nucléosidiques tels que le favipiravir (5) ou la ribavirine (6) qui agissent comme inhibiteurs de la transcription et de la réplication des ARN, (Figure 3).

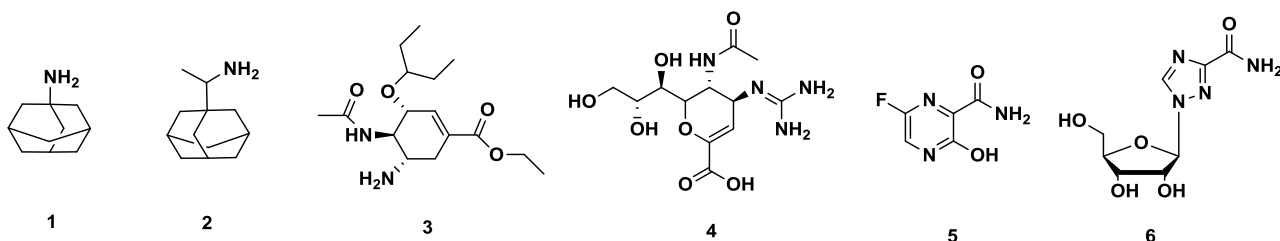
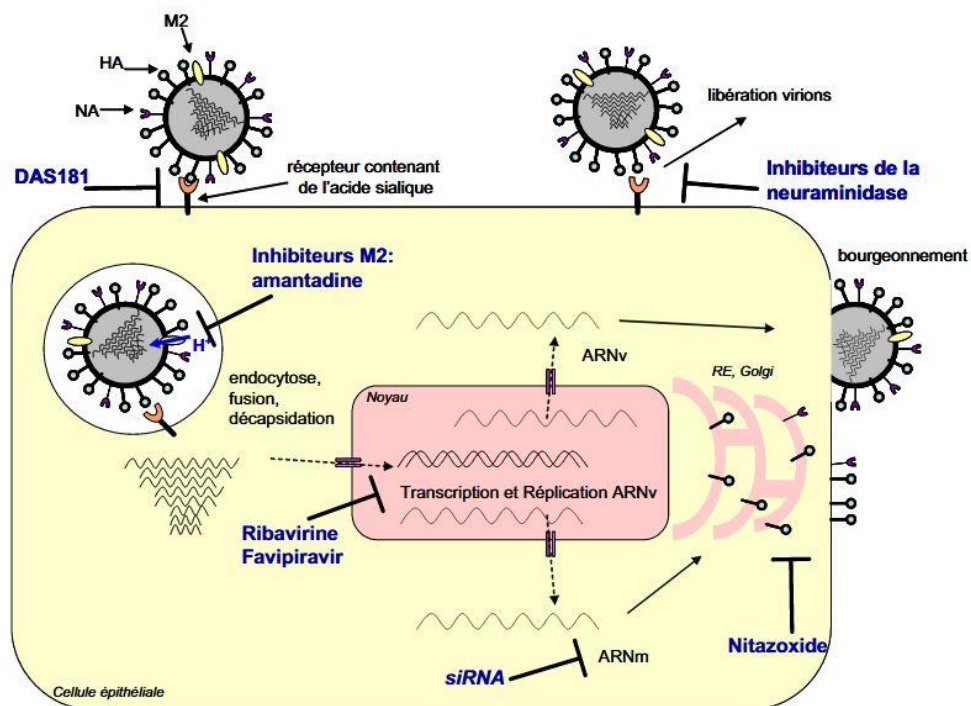


Figure 3 : Cycle schématique de multiplication du virus grippal<sup>4</sup> et quelques antiviraux : (1) amantadine, (2) rimantadine, (3) oseltamivir, (4) zanamivir, (5) favipiravir et la (6) ribavirine.

## II. Les nucléosides comme agents antiviraux pulmonaires<sup>5</sup>

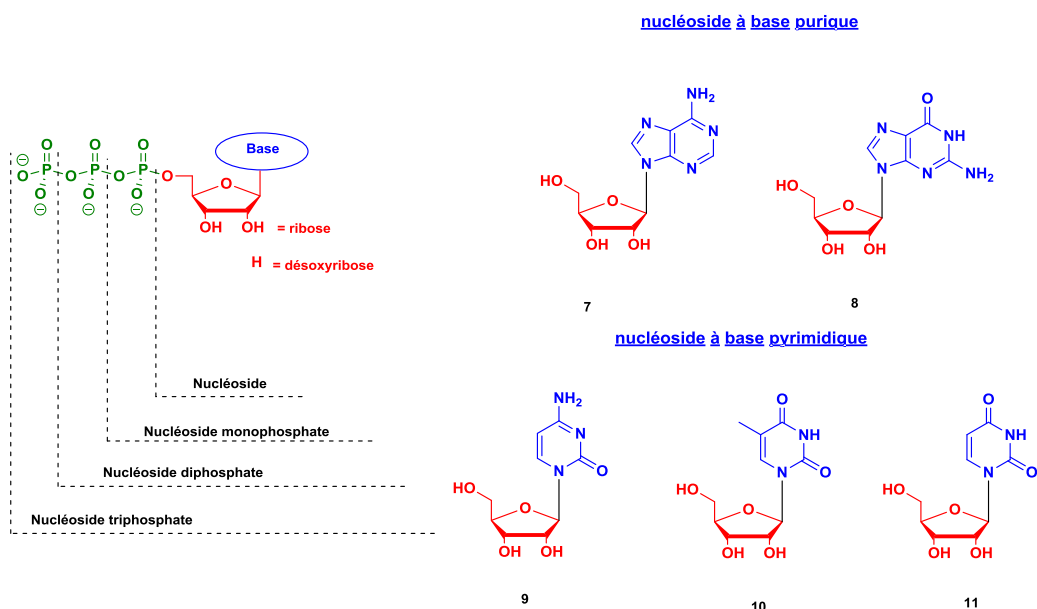
Les nucléosides<sup>6</sup> sont des glycosylamines des sous unités structurales des acides nucléiques (ADN, ARN). Ils sont formés par une base nucléique liée à un ribose ou un 2'-déoxyribose *via* une liaison glycosidique. Les nucléosides peuvent être classés selon leur type de nucléobase : purine comme l'adénosine (7) la guanosine (8), et pyrimidine comme la cytidine (9), la thymidine (10) et l'uridine (11).

<sup>4</sup> Escuret, V.; Frobert, E.; Lina, B., Grippe et antiviraux, *Réanimation*. **2011**, *20*, 169-177.

<sup>5</sup> Jordan, P. C.; Stevens, S. K.; Deval, J., Nucleosides for the treatment of respiratory RNA virus infections, *Antivir. Chem. Chemother.* **2018**, *26*, 1-19.

<sup>6</sup> Adams, R. P.; Knowler, J.; Leader, D., The structure of the nucleic acids. In *The Biochemistry of the Nucleic Acids*; Ed Springer: Netherlands, **1992**, 5-39.





**Figure 4 : Représentation structurale des nucléosides et des nucléotides.**

En pénétrant la cellule, les nucléosides peuvent être phosphorylés par des kinases spécifiques, permettant la formation des nucléotides qui sont les éléments constitutifs des acides nucléiques (ADN et ARN). Dans le domaine thérapeutique, différents analogues des nucléosides sont utilisés comme bioactifs. Ces analogues nucléosidiques se sont avérés particulièrement performants dans la lutte face aux infections virales tels que le SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise), les virus de l'Hépatite C et B (VHC et VHB) ou encore le virus Herpès Simplex (VHS). Ils se sont également révélés attrayant dans le cadre des chimiothérapies anticancéreuses, comme la cladribine (**12**) et la pentostatine (**13**) indiquées dans la leucémie à tricholeucocytes et la gemcitabine (**14**) pour traiter les cancers du pancréas et du poumon. Ce sont des anti-métabolites, une classe de médicaments qui inhibent la synthèse de l'ADN soit directement, soit par inhibition de la synthèse de précurseurs d'ADN.<sup>7</sup>

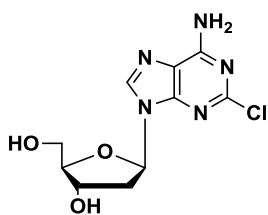
En ce qui concerne plus spécifiquement les poumons, cible thérapeutique visée dans notre étude, les nucléosides et les nucléotides y jouent un rôle important.<sup>8</sup> Ils ont des effets contractiles et relaxants sur le muscle lisse des voies aériennes et ils stimulent la sécrétion de mucus et de surfactant et l'activité ciliaire des poumons. Les nucléosides et les nucléotides activent ou modulent un certain nombre de cellules inflammatoires impliquées dans les maladies pulmonaires, notamment les mastocytes, les neutrophiles, les macrophages et les éosinophiles<sup>9</sup> comme par exemple les formes triphosphate de l'adénosine (**7**) et de l'uridine (**11**). Par contre, en terme de traitement des virus à ARN respiratoire, il n'existe, aujourd'hui, que très peu d'analogues nucléosidiques pertinents sur le plan clinique. La ribavirine (**6**), antiviral analogue de la guanosine, à large spectre et le favipiravir (**5**), ou 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinocarboxamide, ont été approuvés au Japon, pour le traitement de l'infection au virus Influenza, depuis 2014.<sup>5</sup>

<sup>7</sup> Diab, R.; Degobert, G.; Hamoudeh, M.; Dumontet, C.; Fessi, H., Nucleoside analogue delivery systems in cancer therapy, *Expert. Opin. Drug. Deliv.* **2007**, *4*, 513-531.

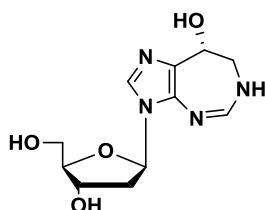
<sup>8</sup> Fedan, J. S., Nucleotides and nucleosides in pulmonary function. In *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics*. K. A. Jacobson and M. F. Jarvis, editors. Wiley-Liss, Inc., **1997**, New York.

<sup>9</sup> Fedan, J. S., Nucleosides and Nucleotides in the Lung: Role in Asthma, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **1999**, *21*, 7-9.

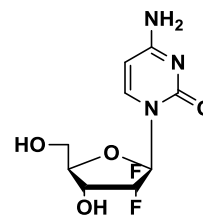
- Cancer



12

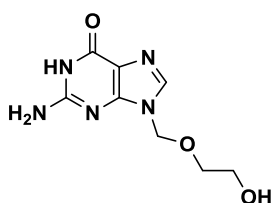


13

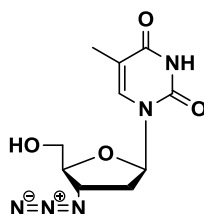


14

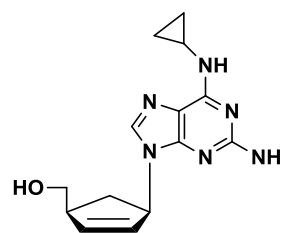
- Virus ADN



15



16

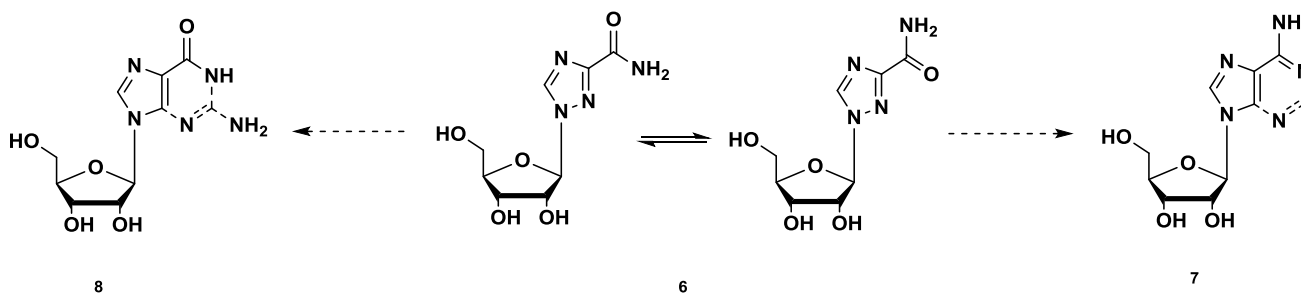


17

Figure 5 : Exemple des analogues nucléosidiques antiviraux pour le cancer tels que (12) claribine, (13) pentostatine, (14) gemcitabine et pour les virus ADN tels que (15) acyclovir, (16) zidovudine ou AZT et (17) abacavir.

### • La ribavirine

La ribavirine, synthétisée en 1972 par Sidwell *et al.*<sup>10</sup> est un analogue nucléosidique de la guanosine mais aussi de l'adénosine par rotation de son groupement carboxamide.



8

6

7

Figure 6 : Structure de la ribavirine [1-(β-D-ribofuranosyl)-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide] qui est un mime de la guanosine (8), et de l'adénosine (7) par rotation de son groupement carboxamide

La ribavirine est un antiviral à large spectre puisqu'il a été démontré qu'elle était capable d'inhiber l'effet cytopathique en culture cellulaire des rhinovirus de type 1A, 2, 8, 56 et 143, du virus de la stomatite vésiculeuse, des virus para influenza de type 1 et 3, du virus de la forêt de SemLiki, du virus de la maladie de Newcastle, du virus de la rougeole et d'autres virus à ARN.<sup>11</sup> Plus récemment,

<sup>10</sup> Sidwell, R. W.; Huffman, J. H.; Khare, G. P.; Allen, L. B.; Witkowski, J. T.; Robins, R. K., Broad-spectrum antiviral activity of Virazole : 1-beta-D-ribofuranosyl- 1,2,4-triazole-3-carboxamide, *Science*. **1972**, *177*, 705-706.

<sup>11</sup> (a) Sidwell, R. W.; Allen, L. B.; Khare, G. P.; Huffman, J. H.; Witkowski, J. T.; Simon, L. N.; Robins, R. K., Effect of 1-beta-D-ribofuranosyl- 1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on herpes and vaccinia keratitis and encephalitis in laboratory animals, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1973**, *3*, 242-246. (b) Huffman, J. H.; Sidwell, R. W.; Khare, G. P.;

son activité contre le cancer et notamment les leucémies ont été découverte.<sup>12</sup> De plus, elle active l'apoptose et module l'expression de plusieurs dizaines de gènes qui ont des rôles dans la prolifération cellulaire, la biosynthèse de la purine, la signalisation oncogénique et la survie cellulaire. Malgré ses nombreuses cibles potentielles, l'autorisation de mise sur le marché de la ribavirine se limite à l'heure actuelle au traitement de l'hépatite C chronique en association avec des interférons. Egalement, une autorisation temporaire d'utilisation sous forme d'aérosol dans le cadre des infections sévères dues au virus respiratoire syncytial (VRS) a été accordée.<sup>13</sup> Elle est utilisée aussi dans le cas clinique des fièvres hémorragiques virales.<sup>14</sup>

Le mécanisme d'action de la ribavirine reste de nos jours mal défini. Cependant, on peut distinguer cinq mécanismes d'actions principaux directs ou indirects :

- Comme tout antiviral analogue de nucléoside, la ribavirine subit une série d'étapes de phosphorylation intracellulaire et est transformée successivement en ribavirine-5'-monophosphate, ribavirine-5'-diphosphate et ribavirine-5'-triphosphate. La ribavirine inhibe directement la polymérase ARN-dépendante en s'incorporant sous sa forme triphosphate ce qui provoque des terminaisons.<sup>15</sup>
- La ribavirine monophosphate inhibe l'activité de l'inosine-5'-monophosphate déshydrogénase ou IMPDH, l'enzyme responsable de la synthèse *de novo* de la guanosine triphosphate (GTP) et réduit le réservoir de nucléotides de l'hôte.<sup>16</sup>
- La ribavirine triphosphate peut jouer le rôle d'un agent mutagène de l'ARN viral, ce qui ferait muter le virus et réduirait son caractère infectieux.<sup>17</sup>
- La ribavirine triphosphate peut inhiber le recouvrement de l'ARN messager (ARN<sub>m</sub>) ce qui peut indirectement affecter la réplication du virus.<sup>18</sup>
- La ribavirine stimule la réponse immunitaire par l'induction des cellules T de type 1 et inhibe celles induites par les cytokines de type 2. Le traitement à base de ribavirine contre le virus respiratoire syncytial n'éradique pas seulement le virus mais réduit aussi la prévalence de

---

Witkowski, J. T.; Allen, L. B.; Robins, R. K., In vitro effect of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1973**, *3*, 235-241.

<sup>12</sup> (a) Borden, K. L.; Culjkovic-Kraljacic, B., Ribavirin as an anti-cancer therapy: acute myeloid leukemia and beyond ?, *Leuk. Lymphoma.* **2010**, *51*, 1805-1815. (b) Kokeny, S.; Papp, J.; Weber, G.; Vaszko, T.; Carmona-Saez, P.; Olah, E., Ribavirin acts *via* multiple pathways in inhibition of leukemic cell proliferation, *Anticancer. Res.* **2009**, *29*, 1971-1980.

<sup>13</sup> Schleuning, M.; Buxbaum-Conradi, H.; Jager, G.; Kolb, H. J., Intravenous ribavirin for eradication of respiratory syncytial virus (RSV) and adenovirus isolates from the respiratory and/or gastrointestinal tract in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants, *Hematol. J.* **2004**, *5*, 135-144.

<sup>14</sup> Haas, W. H.; Breuer, T.; Pfaff, G.; Schmitz, H.; Köhler, P.; Asper, M.; Emmerich, P.; Drosten, C.; Gölitz, U.; Fleischer, K.; Günther, S., Imported Lassa fever in Germany : surveillance and management of contact persons, *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *36*, 1254-1258.

<sup>15</sup> (a) Vo, N. V.; Young, K. C.; Lai, M. M., Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase, *Biochemistry.* **2003**, *42*, 10462-10471. (b) Bougie, I.; Bisailon, M., Initial binding of the broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin to the hepatitis C virus RNA polymerase, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52471-52478.

<sup>16</sup> (a) Lowe, J. K.; Brox, I.; Henderson, J. F., Consequences of inhibition of guanine nucleotide synthesis by mycophenolic acid and virazole, *Cancer. Res.* **1977**, *37*, 736-743. (b) Muller, W. E.; Maidhof, A.; Taschner, H.; Zahn, R. K., Virazole (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; a cytostatic agent, *Biochem. Pharmacol.* **1977**, *26*, 1071-1075.

<sup>17</sup> (a) Crotty, S.; Cameron, C. E.; Andino, R., RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 6895-6900. (b) Vignuzzi, M.; Stone, J. K.; Andino, R., Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications, *Virus. Res.* **2005**, *107*, 173-181.

<sup>18</sup> Goswami, B. B.; Borek, E.; Sharma, O. K.; Fujitaki, J.; Smith, R. A., The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *89*, 830-836.

l'hyper-réactivité des voies respiratoires qui est associée à la réponse d'une cytokine de type 2.<sup>19</sup>

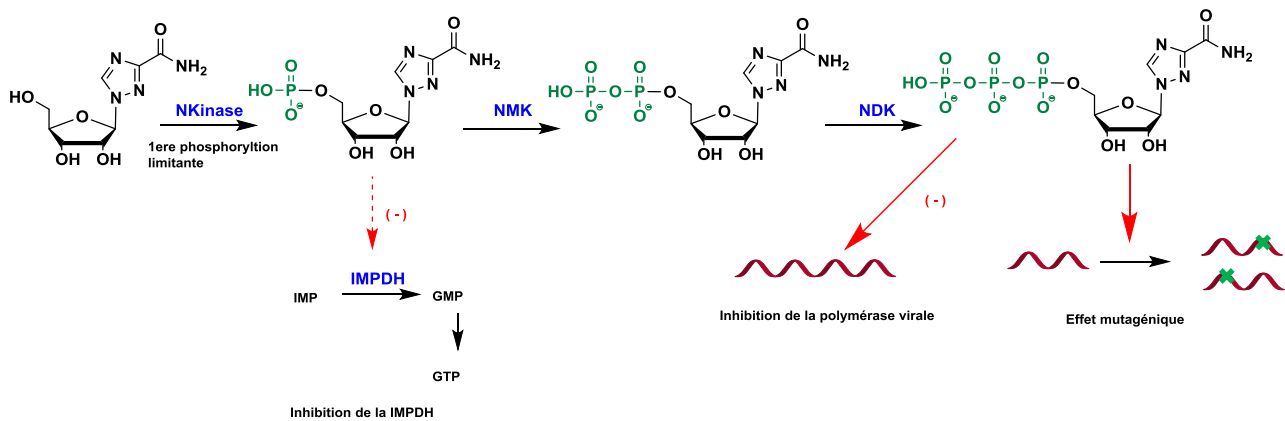


Figure 7 : Mécanisme d'action de la ribavirine lors de sa pénétration dans la cellule cible.

Cependant, malgré le grand nombre de cibles virales potentielles (des virus émergents, hautement pathogènes ou mutants) et qui sont des virus à ARN, la ribavirine reste peu utilisée. Le sous-emploi de cet analogue nucléosidique est en partie dû à sa mauvaise biodisponibilité. Le développement de systèmes de libération contrôlée de cet antiviral peut donc être une alternative thérapeutique intéressante.

### III. Les systèmes de libération contrôlée (DDS)

#### III.1. Généralités

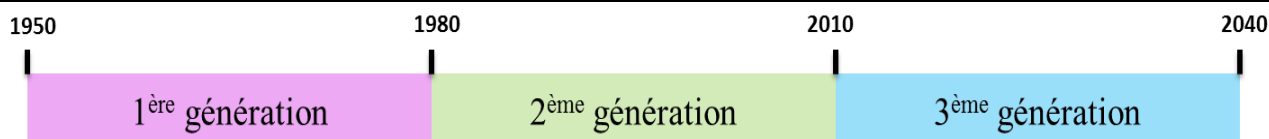
Un grand nombre des propriétés pharmacologiques des principes actifs conventionnels peut être amélioré grâce à l'utilisation de systèmes de libération des médicaments ou *Drug Delivery Systems* (DDS). Les DDS sont conçus pour modifier la pharmacocinétique et la bio-distribution des principes actifs associés ou pour fonctionner comme réservoirs de médicaments (c.-à-d. comme systèmes à libération prolongée), ou les deux. Le Tableau 1 donne des exemples de problèmes posés par les médicaments utilisés seuls qui peuvent être améliorés par l'utilisation de DDS.

Les systèmes de libérations de médicaments ont grandement progressé au fil du temps. En effet, ces systèmes ont évolué d'une génération à une autre en passant de systèmes de libération contrôlée basique (dissolution, diffusion...) à des systèmes intelligents de libération contrôlée répondant à différents stimuli, ou reconnaissant spécifiquement une cible thérapeutique. Cette évolution continue encore aujourd'hui pour aller vers le développement de systèmes de libération extrêmement lente ou modulée comme le montre la Figure 8.

<sup>19</sup> Tam, R. C.; Pai, B. P.; Bard, J.; Lim, C.; Averett, D. R.; Phan, U. T.; Milovanovic, T., Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J. Hepatol.* **1999**, *30*, 376-382.

**Tableau 1 : Les problèmes causés par la libération non contrôlée et les avantages de l'utilisation des DDS.<sup>20</sup>**

Problème	Conséquence	Effet du DDS
<b>Faible solubilité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possibilité de précipitation</li> <li>• Toxicité augmentée par utilisation des excipients permettant d'augmenter la solubilité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les DDS tels que les micelles lipidiques ou les liposomes fournissent des environnements hydrophiles et hydrophobes, améliorant la solubilité des médicaments.</li> </ul>
<b>Lésion tissulaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• une extravasation accidentelle de médicaments cytotoxiques entraîne une lésion tissulaire, par exemple une nécrose tissulaire avec de la doxorubicine libre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La libération régulée du médicament à partir du DDS peut réduire ou éliminer les lésions tissulaires lors d'une extravasation accidentelle.</li> </ul>
<b>Décomposition rapide du bioactif <i>in vivo</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perte considérable de l'activité du principe actif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le DDS protège le médicament contre la dégradation prématurée et fonctionne comme un système à libération prolongée. Des doses plus faibles de médicament sont utilisées</li> </ul>
<b>Faible bio-distribution</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les bioactifs qui ont une large distribution dans l'organisme peuvent affecter les tissus normaux, entraînant des effets secondaires limitant la dose, telle la toxicité cardiaque de la doxorubicine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La nature du DDS diminue le volume de distribution et aide à réduire les effets secondaires sur les tissus sensibles non ciblés</li> </ul>
<b>Faible sélectivité pour les tissus ciblés</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La distribution du médicament aux tissus normaux entraîne des effets secondaires qui limitent la quantité de médicament pouvant être administrée. De faibles concentrations de médicaments dans les tissus cibles entraîneront des effets thérapeutiques sous-optimaux</li> </ul>	<p>Les DDS peuvent augmenter les concentrations du bioactif dans les tissus infectés tels que les tumeurs. Le ciblage par ligand du DDS peut améliorer la spécificité du médicament</p>



Systèmes de libérations basique

- Voie orale : 1 ou deux jours
- Voie cutanée : 1 ou deux jours
- Mécanismes de libération par diffusion, dissolution, osmotique ou échange d'ions.

Systèmes de libérations intelligents

- Polymères intelligents et hydrogels pour une libération autorégulée et sous l'effet de différents stimuli
- Polymères biodégradables
- Libération des protéines et des peptides
- Nanoparticules pour la libération ciblée des cellules cancéreuses
- Mécanismes de libération d'ordre zéro et du premier ordre

Systèmes de libérations modulés

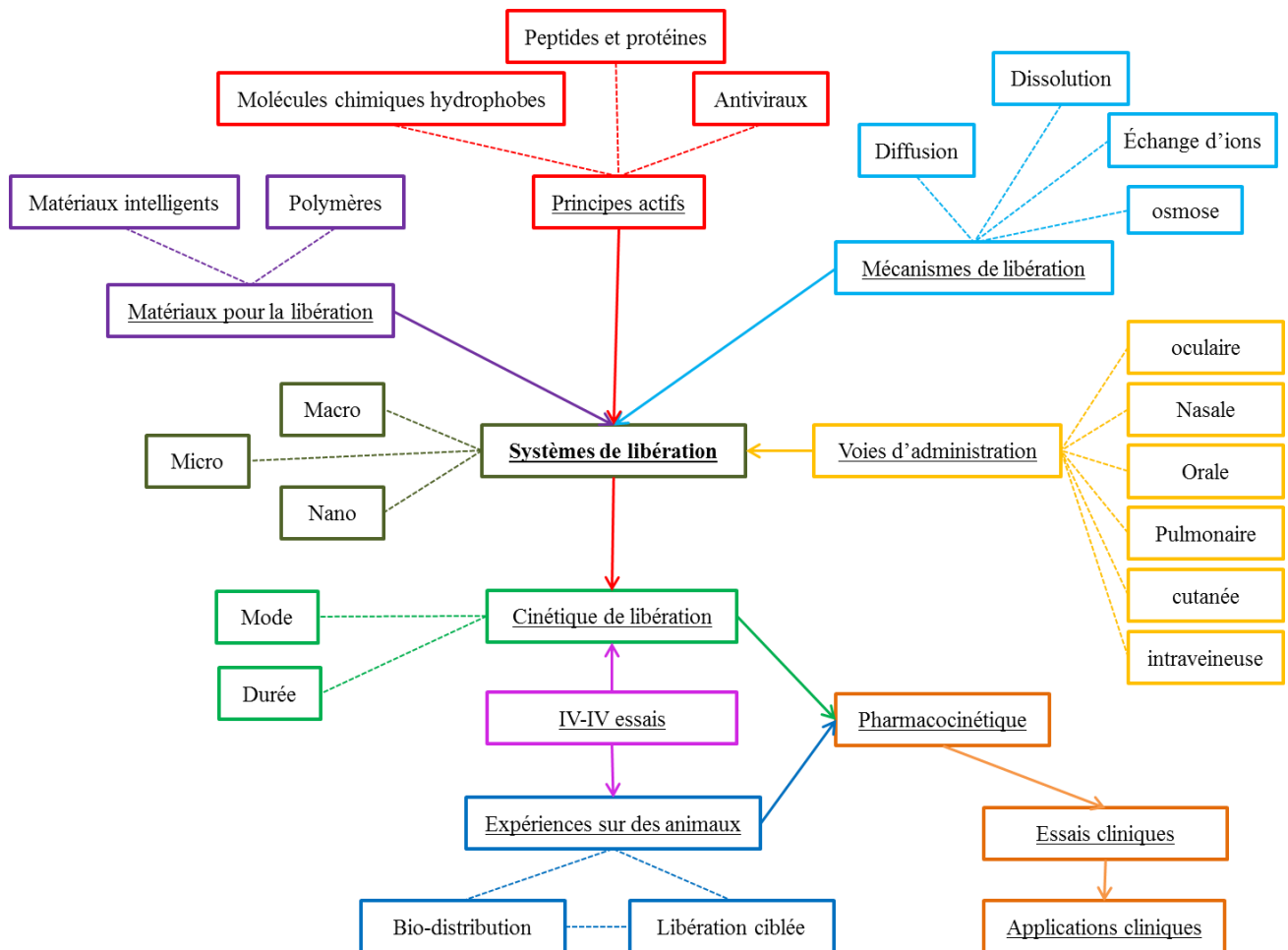
- Libérations modulés de l'insuline (On-Off release), libération sensible au glucose.
- Libération à long terme (6 à 12 mois)

**Figure 8 : Evolution des systèmes de libération contrôlée depuis 1950.<sup>21</sup>**

<sup>20</sup> Allen, T. M.; Cullis, P. R. ; Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Science*. **2004**, *19*, 1818-1822.

<sup>21</sup> Park, K., Controlled drug delivery systems: Past forward and future back, *J. Control. Release*. **2014**, *190*, 3-8.

La conception de systèmes de libération contrôlée dépend de plusieurs paramètres comme la nature des principes actifs à transporter, la nature des matériaux à utiliser, le mécanisme de libération souhaité et la voie d'administration visée. Ces études permettent l'obtention de DDS de différentes tailles (nano, micro et macrométriques) avec des modes et des temps de libération variables et ajustés selon la nécessité. (Figure 9)



**Figure 9 : Aperçu du développement d'un DDS** du stade de recherche (en prenant en considération tous les paramètres) au stade des applications cliniques (IV-IV : *in vitro-in vivo*).<sup>21</sup>

Ces systèmes de libération contrôlée peuvent être utilisés dans le traitement de nombreuses pathologies telles que l'asthme, l'arthrite, les maladies cardiaques, les altérations du tractus gastro-intestinal... Ces systèmes multiparticulaires sont devenus une alternative efficace aux médicaments conventionnels ou à libération immédiate.<sup>22</sup> En effet, ils présentent de nombreux avantages :

- Diminution du nombre de prises
- Obtention de différents profils de libération du principe actif
- Limitation des fluctuations intra et inter-individuelles
- Limitation des effets secondaires
- Amélioration de l'efficacité de certains principes actifs
- Thérapie à plus faible coût

<sup>22</sup> Schultz, P.; Kleinebudde, P., A new multiparticulate delayed release system. Part I: Dissolution properties and release mechanism, *J. Control. Release.* **1996**, *47*, 181-189.

Ces formes pharmaceutiques ont une facilité d'usage plus prononcée pour la voie orale. On retrouve les systèmes matriciels, les systèmes réservoirs et les pompes. Néanmoins, on peut les rencontrer également dans les voies transdermique, nasale et pulmonaire.<sup>21</sup>

### III.2. Systèmes de libération contrôlée pulmonaires

La voie d'administration pulmonaire est une approche non invasive, rapide et efficace pour administrer des agents thérapeutiques à la fois localement et par voie systémique.<sup>23</sup> En effet, les voies respiratoires commencent au niveau du nez suivi par le pharynx, le larynx et la trachée, qui se divisent en bronches gauche et droite. Chacune de ces dernières se divise ensuite en bronchioles plus petites et se terminent par des bronchioles terminales profondes dans les poumons, au niveau des sacs alvéolaires. Il existe plusieurs formats pour la classification des différentes régions des voies respiratoires. L'une des catégories les plus couramment utilisées consiste à diviser les voies respiratoires en deux parties principales : les voies respiratoires supérieures, qui comprennent le nez, la cavité nasale et le pharynx ; et les voies respiratoires inférieures, comprenant le larynx, la trachée, les bronches et les alvéoles (Figure 10).<sup>24</sup>

L'aérosolthérapie fait partie des recommandations internationales pour la prise en charge thérapeutique de l'asthme, de la broncho-pneumopathie chronique obstructive ou BPCO, incluant ses différentes composantes comme la bronchite chronique et l'emphysème pulmonaire, ainsi que de la mucoviscidose plus ou moins associée à une dilatation des bronches (ou bronchectasies).<sup>25</sup> L'inhalation offre un grand potentiel pour la délivrance systémique, car les poumons ont une vaste surface disponible pour l'absorption du bioactif et sont très fortement vascularisés. Ces propriétés créent des conditions bien adaptées à une absorption efficace des principes actifs, offrant une voie prometteuse pour l'administration systémique des médicaments.<sup>26</sup>

Cependant, après l'inhalation de particules d'aérosol par les poumons, celles-ci sont soit éliminées des poumons *via* le mécanisme d'ascenseur muco-ciliaire, soit absorbées par la circulation sanguine (ou lymphatique), soit dégradées par le métabolisme. Plusieurs mécanismes de clairance des particules ont été décrits tels que la clairance mucociliaire, la clairance mécanique, la dégradation enzymatique ou la phagocytose par les macrophages alvéolaires. La clairance mucociliaire fournit un mécanisme de défense important pour éliminer les particules inhalées insolubles des voies respiratoires et constitue une barrière physique potentielle à la pénétration du médicament. La majorité des particules déposées dans la région trachéo-bronchique des voies respiratoires sont éliminées dans les 24 heures qui suivent l'inhalation chez des sujets en bonne santé. Ce mécanisme est présent dans les voies respiratoires supérieures. Par contre, le phénomène de clairance mécanique est représenté de façon plus large par la toux, les éternuements ou l'ingestion des particules inhalées dans la région supérieure des voies respiratoires. Ce mécanisme se produit instantanément après le dépôt de particules dans les grandes voies respiratoires. Lorsqu'une

---

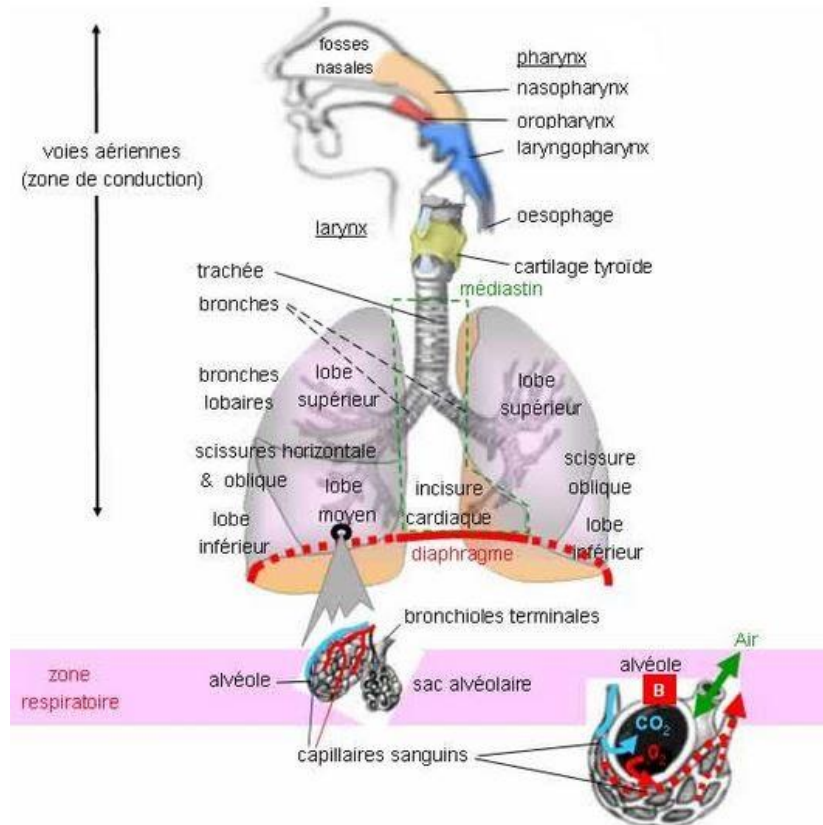
<sup>23</sup> Courrier, H. M.; Butz, N.; Vandamme, T. F., Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* **2002**, *19*, 425-98.

<sup>24</sup> Nokhodchi, A.; Martin, P. G., Pulmonary drug delivery : advances and challenges. Wiley Book series, **2015**.

<sup>25</sup> Byron, P. R.; Patton, J. S., *Drug delivery via the respiratory tract. J. Aerosol. Med.* **1994**, *7*, 49-75.

<sup>26</sup> Zhoua, Q.; Tang, P.; Leung, S. S. Y.; Chan, J. G. Y.; Chan, H., Emerging inhalation aerosol devices and strategies: Where are we headed ?, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *75*, 3-17.

particule de taille  $\geq 10 \mu\text{m}$  est inhalée, la toux est provoquée spontanément. Pour un dégagement efficace dû à la toux, un débit d'air élevé est nécessaire, il n'est donc efficace que dans la région supérieure des poumons. Dans les affections respiratoires telles que la bronchite, l'asthme ou la pneumonie, où la clairance mucociliaire est altérée, la toux devient le principal mécanisme de clairance. Il est donc important de maintenir les aérosols dans des tailles  $\leq 10 \mu\text{m}$  pour obtenir l'effet optimal du médicament.<sup>24</sup>

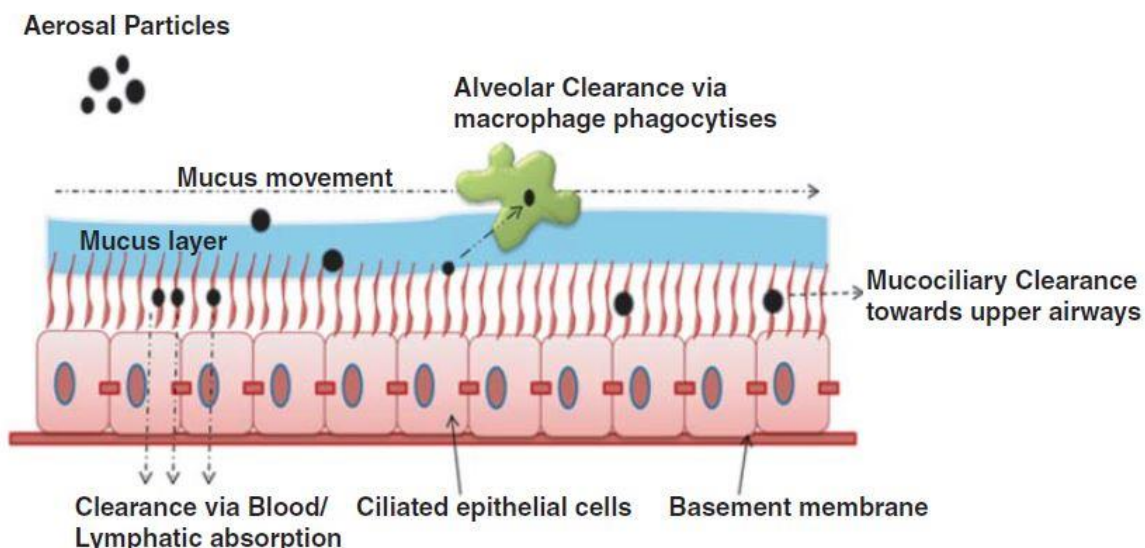


**Figure 10 : Anatomie des voies respiratoires.**

L'activité des macrophages alvéolaires peut aussi limiter considérablement l'efficacité d'un traitement par inhalation. Si le médicament inhalé a une faible solubilité et que les particules restent dans les alvéoles pendant un temps suffisant, elles peuvent être éliminées par des macrophages, ce qui réduit la quantité de médicament disponible pour un effet thérapeutique. La clairance par les macrophages alvéolaires reste le principal obstacle à la libération contrôlée du médicament dans les alvéoles. La plupart des matériaux utilisés pour préparer les particules capables de soutenir la libération d'un médicament pendant une période prolongée sont rigides et possèdent toutes les caractéristiques physicochimiques qui en font une cible idéale pour l'absorption de macrophages. Mais, lors d'une infection grippale, les macrophages pulmonaires sont eux-mêmes infectés par les virus de type influenza. Ce qui leur confère un pouvoir phagocytaire plus faible.<sup>27</sup>

<sup>27</sup> Nicol, M. Q.; Dutia, B. M., The role of macrophages in influenza A virus infection Future, *Virology*. **2014**, *9*, 847-886.





**Figure 11 : Mécanismes d'élimination des particules déposées dans les voies respiratoires.<sup>24</sup>**

La dégradation enzymatique s'avère faible au niveau des poumons car les enzymes métabolisant les agents thérapeutiques sont beaucoup moins présentes dans les poumons que dans le foie ou le tractus gastro-intestinal. Néanmoins, certaines enzymes métaboliques telles que les estérases et les peptidases sont exprimées dans les poumons. Les concentrations de ces enzymes (CYP2S et CYP2F par exemple) diffèrent considérablement entre les différents types de cellules qui tapissent les différentes régions des poumons.<sup>24</sup>

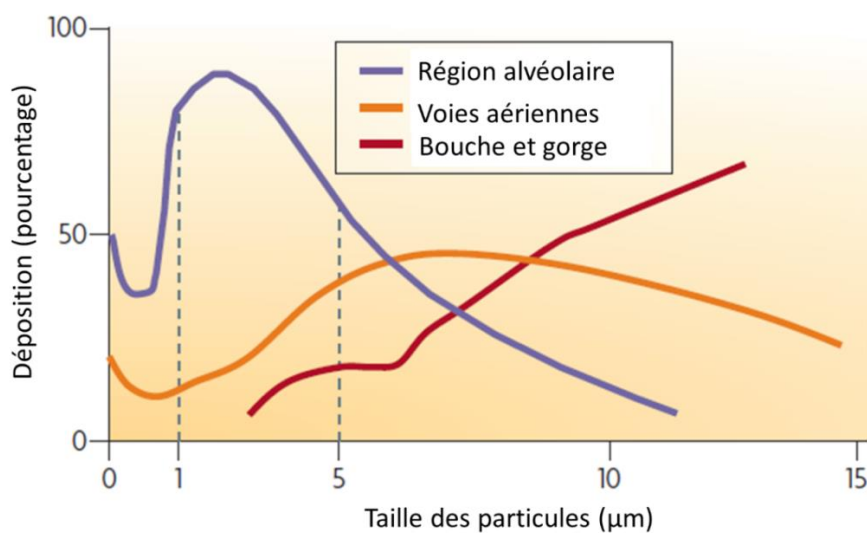
L'administration de médicaments par voie pulmonaire reste cependant une voie d'administration difficile. Tout d'abord, l'efficacité de la thérapie par inhalation dépend du site de dépôt du principe actif dans les poumons. Le dépôt du médicament, après inhalation, est un processus complexe qui repose sur l'anatomie et la physiologie du poumon, les propriétés physico-chimiques du principe actif, la nature et les caractéristiques de la formulation et le type de système d'administration utilisé.<sup>28</sup> Le flux et le dépôt de particules d'aérosol dans les poumons sont fortement influencés par la géométrie des voies aériennes de l'appareil respiratoire. Seules des particules de taille spécifique (généralement entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ ) et de forme bien spécifique se déposent dans la région alvéolaire, qui représente le principal site d'absorption.<sup>25,29</sup> En effet, les aérosols médicaux à administrer par voie pulmonaire sont habituellement composés de particules de tailles différentes, allant de 0,5 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre aérodynamique, avec un diamètre aérodynamique moyen en masse inférieur à 6  $\mu\text{m}$ .<sup>30</sup> La taille aérodynamique tient compte de la forme et de la densité des particules et, pour de nombreuses formulations, elle est semblable à la taille physique qui serait obtenue par une mesure effectuée au microscope. L'appareil respiratoire forme un système qui sélectionne les particules selon leur taille, rejetant de façon progressive les

<sup>28</sup> Patton, J. S.; Byron, P. R., Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, *6*, 67-74.

<sup>29</sup> Byron, P. R.; Hindle, M.; Lange, C. F.; Longest, P. W.; McRobbie, D.; Oldham, M. J.; Olsson, B.; Thiel, C. G.; Wachtel, H.; Finlay, W. H., *In vivo-in vitro* correlations: predicting pulmonary drug deposition from pharmaceutical aerosols, *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug. Deliv.* **2010**, *23*, 59-69.

<sup>30</sup> Dolovich, M.; MacIntyre, N. R.; Anderson, P. J.; Camargo, C. A.; Chew, N.; Cole, C. H.; Dhand, R.; Fink, J. B.; Gross, N. J.; Hess, D. R.; Hickey, A. J.; Kim, C. S.; Martonen, T. B.; Pierson, D. J.; Rubin, B. K.; Smaldone, G. C., Consensus statement: Aerosols and delivery devices, *Respir. Care.* **2000**, *45*, 589-596.

particules de plus en plus fines du flux d'air inhalé lorsqu'elles passent par la bouche, le larynx, les bronches pour se rendre jusqu'aux espaces alvéolaires.<sup>31</sup> Pour un adulte dont le schéma respiratoire est normal, il sera admis que les particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à environ 5  $\mu\text{m}$  se déposeront principalement dans les voies aériennes des poumons. Le dépôt périphérique (alvéolaire) dans les poumons atteindra des proportions maximales avec des particules inférieures comprises entre 2 et 4  $\mu\text{m}$ . Les particules au diamètre supérieur à 5  $\mu\text{m}$  se déposeront principalement au niveau de l'oropharynx. Cependant, le dépôt central (bronchial) dans les voies aériennes culmine avec des particules d'un diamètre aérodynamique se situant entre 7 et 9  $\mu\text{m}$ . Par contre, les particules de taille inférieure à 1  $\mu\text{m}$  sont expirées et donc rejetées du système respiratoire assez rapidement. Au final, les particules de faible densité (<0,4 g/cm<sup>3</sup>) et une taille de particules moyenne d'environ 3  $\mu\text{m}$  présentent un dépôt pulmonaire profond.<sup>32</sup> Cependant, ces particules peuvent être absorbées par les macrophages pulmonaires, car la phagocytose dépend de la taille mais aussi de la densité d'IgG recouvrant la surface des microbilles.<sup>33</sup> Pour ces raisons, les grosses particules poreuses ayant une taille de particule moyenne de 5 à 30  $\mu\text{m}$  sont intéressantes pour la délivrance pulmonaire<sup>34</sup> ou par ailleurs l'utilisation de particules entre 1 et 5  $\mu\text{m}$  en utilisant une protection sous forme de PEG afin de les protéger contre les macrophages.<sup>35</sup>



**Figure 12 : Effet de la taille des particules sur leur dépôt dans les voies respiratoires humaines** suite à une inhalation lente et à une respiration de 5 secondes. Les grosses particules se déposent dans les voies respiratoires (oropharynx) ou dans la bouche et la gorge, tandis que les particules plus petites se déposent dans la région alvéolaire. Les particules <1  $\mu\text{m}$  peuvent être expirées, réduisant ainsi les dépôts pulmonaires profonds.<sup>36</sup>

<sup>31</sup>Heyder, J.; Svartengren, M. U., Basic principles of particle behavior in the human respiratory tract. In: Drug Delivery to the Lung. Bisgaard, H.; O'Callaghan, C.; Smaldone, G. C., Eds., Marcel Dekker, NY, USA. **2002**, 21-45.

<sup>32</sup> Beletsi, A.; Leontiadis, L.; Klepetsanis, P.; Ithakissios, D. S.; Avgoustakis, K., Effect of preparative variables on the properties of poly(DL-lactide-co-glycolide)-methoxypoly(ethylene glycol) copolymers related to their application in controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.* **1999**, *182*, 187-197.

<sup>33</sup>Pacheco, P.; White, D.; Sulchek, T., Effects of Microparticle Size and Fc Density on Macrophage Phagocytosis, *PLoS ONE*. **2013**, *8*, e60989.

<sup>34</sup> Crotts, G.; Park, T. G., Preparation of porous and nonporous biodegradable polymeric hollow microspheres, *J. Control. Release*. **1995**, *35*, 91-105.

<sup>35</sup> Sanchez, L.; Yi, Y.; Yu, Y., Effect of partial PEGylation on particle uptake by macrophages, *Nanoscale*. **2017**, *9*, 288-297.

<sup>36</sup> Yang, W.; Peters J. I.; Williams III, R. O., Inhaled Nanoparticles-A Current Review, *Int. J. Pharm.* **2008**, *356*, 239- 247.

Les modifications patho-physiologiques des voies respiratoires induites par les infections peuvent modifier le schéma de dépôt des aérosols thérapeutiques inhalés. Par conséquent, la prédiction du dépôt de médicaments dans les voies respiratoires est essentielle pour optimiser l'administration de médicaments par inhalation et pour évaluer son efficacité thérapeutique éventuelle.<sup>37</sup>

L'efficacité thérapeutique des médicaments inhalés est limitée par leur clairance rapide dans les poumons.<sup>38</sup> Plus le poids moléculaire des particules est élevé, plus leur biodisponibilité est faible, rendant difficile l'utilisation des peptides et protéines biologiques. Les petites molécules hydrophobes subissent une diffusion passive par les membranes plasmiques dépendante de leur coefficient de partage avec une durée de diffusion allant d'une minute jusqu'à une heure. Les petites molécules hydrophiles, quant à elles, sont absorbées soit par des transporteurs spécifiques, soit au travers des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, avec une durée d'absorption moyenne plus longue<sup>39</sup> (cela est intéressant en cas d'utilisation d'antiviral polaire tel que la ribavirine). Enfin, les peptides et protéines sont majoritairement assimilés par un passage paracellulaire dans les voies aériennes distales juste avant les alvéoles.<sup>40</sup>

La rétention pulmonaire des médicaments est un phénomène qu'il faut optimiser lorsque l'effet recherché de la molécule inhalée est un effet local, afin d'éviter son élimination locale ou par voie sanguine. Parmi les différentes formes développées pour augmenter le temps de résidence du médicament au sein des poumons, il y a la création de DDS qui permettent un relargage lent du bioactif. De plus, ces systèmes sont capables de préserver la quantité de principe actif transportée et la libérer sur une période prolongée dans le temps en maintenant un niveau thérapeutique efficace (Figure 13). Cette libération prolongée locale permet d'améliorer l'efficacité de l'agent thérapeutique et diminuer les effets secondaires systémiques. Ces DDS pourraient éviter des pics de concentrations élevées qui peuvent s'avérer toxique pour le tissu pulmonaire principalement pour les agents chimio-thérapeutiques. En effet, la libération contrôlée est destinée à maintenir une concentration thérapeutique suffisante durant une période plus longue que celle obtenue après administration répétée au cours du temps. Elle modifie donc la pharmacocinétique du médicament. Cette définition se différencie de la libération modifiée qui comprend les formes à libération retardée, accélérée et prolongée où la vitesse de libération est modifiée par rapport à la libération immédiate ou conventionnelle.<sup>41</sup> Les systèmes de libération contrôlée pourraient ainsi améliorer les résultats thérapeutiques obtenus par inhalation.

---

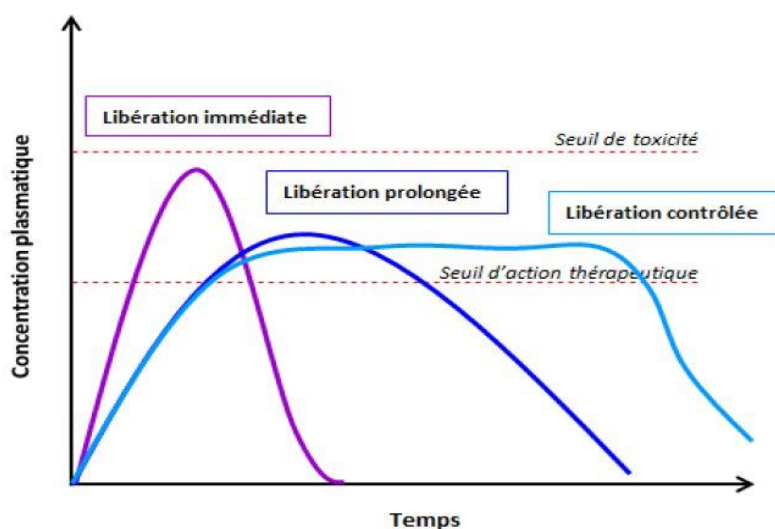
<sup>37</sup> Newman, S. P., Aerosol deposition considerations in inhalation therapy, *Chest*. **1985**, 88, 152S-160S.

<sup>38</sup> Todoroff, J.; Vanbever, R., Fate of nanomedicines in the lungs, *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.* **2011**, 16, 246-254.

<sup>39</sup> Benattia, A.; Cavillon, P.; Gachelin, E.; Devillier, P.; Vecellio, L.; Williams, G.; Dubus, J. C., Traitements inhalés : critères de choix des dispositifs, absorption systémique des médicaments par voie inhalée et récepteurs pulmonaires à l'amertume, *Rev. Mal. Respir.* **2015**, 32, 791-799.

<sup>40</sup> (a) Baginski, L.; Tachon, G.; Falson, F.; Patton, J. S.; Bakowsky, U.; Ehrhardt, C., Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of proteolytic enzymes in cultures of human respiratory epithelial cells, *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug. Deliv.* **2011**, 24, 89-101. (b) Yamahara, H.; Morimoto, K.; Lee, V. H.; Kim, K. J., Effects of protease inhibitors on vasopressin transport across rat alveolar epithelial cell monolayers, *Pharm. Res.* **1994**, 11, 1617-1622.

<sup>41</sup> Boudendouna, A. H., Méthodologie de la formulation d'une forme orale solide à libération prolongée. **2010**. Thèse doctorale en Science Génie Matériaux, Toulouse : Institut National Polytechnique, 246.



**Figure 13 : Représentation des profils de libération d'une substance active.**<sup>41</sup>

Cependant, bien que la libération prolongée des principes actifs dans les poumons présente un fort potentiel d'amélioration de l'efficacité thérapeutique et de diminution de la toxicité des médicaments inhalés, il n'existe pas encore de formulation à libération prolongée aérosolisable disponible sur le marché. Seules quelques formulations à libération prolongée sont actuellement en développement clinique et toutes se présentent sous forme de liposomes<sup>42</sup> (Tableau 2).

**Tableau 2 : Etat clinique des formulations de liposomes pour la libération prolongée des principes actifs dans les poumons.**<sup>42</sup>

Active, registered trade name	Phase of clinical development	Indication
Amikavine, Arikace®	III	Cystic fibrosis patients with <i>Pseudomonas</i> lung infection
Ciprofloxacin, Pulmaquin®		Management of chronic lung infections with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasie
Amphotericine B, Ambisome®	III	Lung transplant recipients
Amphotericine B, Ambisome®	II-III	Prophylaxis of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic hemato-oncologic patients
Fentanyl, AeroLef®	II	Moderate/severe acute pain in post-surgical setting in adults
9-Nitro-20-S-camptothecin	II	Non-small cell lung cancer
Ciclosporien	I	Chronic rejection in lung transplant recipients

Ces dernières années, plusieurs stratégies d'administration pour la libération prolongée du médicament dans les poumons ont été abordées. Il existe plusieurs types de cargos ou vésicules

<sup>42</sup> Loira-Pastoriza, C.; Todoroff, J.; Vanbever, R., Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2014**, *75*, 81-91.

permettant la libération retardée d'agents thérapeutiques dans les poumons. Ils diffèrent en fonction de leur composition, leur forme ou leur structure comme le montre la Figure 14 :

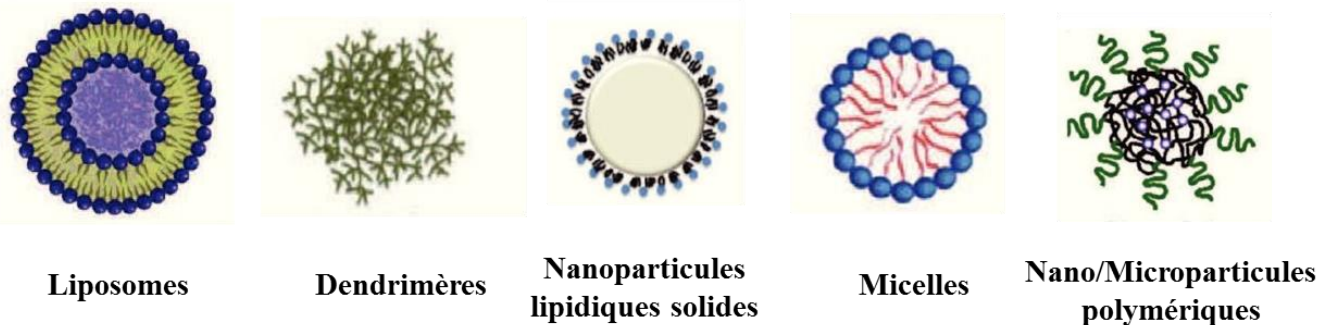


Figure 14 : Les différents systèmes de libérations pulmonaires.

### a) Les liposomes

Les liposomes représentent aujourd'hui le seul système de libération pulmonaire qui a atteint le stade du développement clinique. Les liposomes découverts en 1965 par Bangham, Standish et Watkins,<sup>43</sup> représentent l'un des premiers matériaux utilisés en nanomédecine.<sup>44</sup> Actuellement, il existe plus de 11 formulations en développement clinique, et encore plus en développement préclinique. Les liposomes sont des nanoparticules sphériques composées d'un cœur aqueux entouré d'une couche de phospholipides. Ils contiennent une ou plusieurs bicouches membranaires constituées de lipides naturels ou synthétiques.<sup>44</sup> Selon la stratégie de synthèse utilisée, la taille des liposomes peut varier de 10 nm à quelques microns. En plus de leur biocompatibilité, les liposomes présentent l'avantage de pouvoir encapsuler des agents hydrophiles grâce à leur cœur aqueux et des principes actifs hydrophobes dans la bicouche lipidique (Figure 10). Ils permettent ainsi d'augmenter la solubilité des principes actifs et d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques. Les liposomes sont des systèmes de libération particulièrement appropriés pour la voie pulmonaire de par leur non toxicité et leur tolérance. En particulier, ils peuvent être préparés en utilisant des phospholipides et des lipides neutres endogènes aux poumons tels que la 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine, qui représente le principal phospholipide du tensio-actif pulmonaire, et le cholestérol.<sup>45</sup> Les familles et les structures de médicaments utilisées dans les études de libération pulmonaire utilisant les liposomes sont nombreuses, comme les antibiotiques,<sup>46</sup> les bronchodilatateurs,<sup>47</sup> les

<sup>43</sup> Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238-252.

<sup>44</sup> Wang, A. Z.; Langer, R.; Farokhzad, O. C., Nanoparticle delivery of cancer drugs, *Annu. Rev. Med.* **2012**, *63*, 185-198.

<sup>45</sup> Willis, L.; Hayes Jr., D.; Mansour, H. M., Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery, *Lung*. **2012**, *190*, 251-262.

<sup>46</sup> (a) Finlay, W.H.; Wong, J. P., Regional lung deposition of nebulized liposome-encapsulated ciprofloxacin. *Int. J. Pharm.* **1998**, *167*, 121-127. (b) Chimote, G.; Banerjee, R., In vitro evaluation of inhalable isoniazid-loaded surfactant liposomes as an adjunct therapy in pulmonary tuberculosis, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **2010**, *94*, 1-10.

<sup>47</sup> (a) Huang, W. H.; Yang, Z. J.; Wu, H.; Wong, Y. F.; Zhao, Z. Z.; Liu, L., Development of liposomal salbutamol sulfate dry powder inhaler formulation, *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33*, 512-517. (b) Chen, X.; Huang, W.; Kwan Wong, B. C.; Yin, L.; Wong, Y. F.; Xu, M.; Yang, Z., Liposomes prolong the therapeutic effect of anti-asthmatic medication via pulmonary delivery, *Int. J. Nanomedicine.* **2012**, *7*, 1139-1148.

immunosuppresseurs,<sup>48</sup> les anticancéreux,<sup>49</sup> les hormones sexuelles,<sup>50</sup> les peptides,<sup>51</sup> les protéines<sup>52</sup> et les oligonucléotides.<sup>53</sup>

Les liposomes peuvent être administrés aux poumons par nébulisation d'une suspension de ces capsules.<sup>45</sup> Cependant, la nébulisation peut provoquer une rupture structurelle des liposomes et entraîner la libération anticipée du principe actif. Une alternative a été adoptée en mettant en place l'utilisation des liposomes sous forme de poudre sèche.<sup>54</sup> Cependant, un inconvénient majeur d'un tel procédé est le stress auquel les liposomes sont soumis durant l'étape de séchage. Elle entraîne un risque de fusion et / ou d'agrégation important et une rupture de la structure bicouche des liposomes. Ces désavantages s'ajoutent à certaines limitations des liposomes qui peuvent influencer la libération du principe actif tels que la stabilité, la reproductibilité, la polydispersité au niveau de la taille, l'emprisonnement du principe actif et le coût de fabrication.<sup>55</sup>

## b) Les dendrimères

Les dendrimères sont des macromolécules branchées formées à partir de monomères (ou dendrons) qui s'associent sous une forme arborescente à partir d'un cœur. Ils sont généralement obtenus à partir d'éléments synthétiques ou naturels tels que les acides aminés, les sucres et les nucléotides.<sup>56</sup> Ces nanoparticules, dont la taille varie de 1 à 100 nm, peuvent être facilement modifiées et conjuguées à des fins thérapeutiques. Les dendrimères peuvent être chargés en principe actif grâce aux cavités présentes dans leur cœur par des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes ou par greffage chimique. La cytotoxicité de ces systèmes dépend de la nature chimique du cœur et de leur surface. Comparés aux formulations liposomales actuellement disponibles, les dendrimères ont l'avantage d'être plus stables. En effet, le contrôle de leurs

---

<sup>48</sup> (a) Waldrep, J. C.; Arppe, J.; Jansa, K. A.; Vidgren, M., Experimental pulmonary delivery of cyclosporin A by liposome aerosol. *Int. J. Pharm.* **1998**, *160*, 239-249. (b) Chougule, M.; Padhi, B.; Misra, A., Nano-liposomal dry powder inhaler of tacrolimus : preparation, characterization, and pulmonary pharmacokinetics. *Int. J. Nanomedicine.* **2007**, *2*, 675-688.

<sup>49</sup> Hitzman, C. J.; Elmquist, W. F.; Wattenberg, L. W.; Wiedmann, T. S., Development of a respirable, sustained release microcarrier for 5-fluorouracil I: in vitro assessment of liposomes, microspheres, and lipid coated nanoparticles, *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 1114-1126.

<sup>50</sup> (a) Murata, M.; Nakano, K.; Tahara, K.; Tozuka, Y.; Takeuchi, H., Pulmonary delivery of elcatonin using surface-modified liposomes to improve systemic absorption: polyvinyl alcohol with a hydrophobic anchor and chitosan oligosaccharide as effective surface modifiers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80*, 340-346. (b) Shahiwala, A.; Misra, A., Pulmonary absorption of liposomal levonorgestrel, *AAPS. PharmSciTech.* **2004**, *5*, E13.

<sup>51</sup> Hajos, F.; Stark, B.; Hensler, S.; Prassl, R.; Mosgoeller, W., Inhalable liposomal formulation for vasoactive intestinal peptide, *Int. J. Pharm.* **2008**, *357*, 286-294.

<sup>52</sup> Liu, F.Y.; Shao, Z.; Kildsig, D. O.; Mitra, A. K., Pulmonary delivery of free and liposomal insulin. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 228-232.

<sup>53</sup> Garbuzenko, O. B.; Saad, M.; Betigeri, S.; Zhang, M.; Vetcher, A. A.; Soldatenkov, V. A.; Reimer, D. C.; Pozharov, V. P.; Minko, T., Intratracheal versus intravenous liposomal delivery of siRNA, antisense oligonucleotides and anticancer drug, *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 382-394.

<sup>54</sup> (a) Gaspar, M. M.; Bakowsky, U.; Ehrhardt, C., Inhaled liposomes - Current strategies and future challenges. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2008**, *4*, 245-257. (b) Gibbons, A.; McElvaney, N. G.; Cryan, S. A., A dry powder formulation of liposome-encapsulated recombinant secretory leukocyte protease inhibitor (rSLPI) for inhalation: preparation and characterisation, *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* **2010**, *11*, 1411-1421.

<sup>55</sup> Sharma, A.; Sharma, U. S., Liposomes in drug delivery: progress and limitations, *Int. J. Pharm.* **1997**, *154*, 123-140.

<sup>56</sup> (a) Bonacucina, G.; Cespi, M.; Misici-Falzi, M.; Palmieri, G. F., Colloidal soft matter as drug delivery system, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 1-42. (b) Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Hirasaki, G. J.; Mikos, A. G., Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency, *Gene. Ther.* **1999**, *6*, 1380-1388. (c) Radler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R., Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes, *Science.* **1997**, *275*, 810-814.

structures ainsi que la possibilité d'encapsuler une grande quantité de molécules, sont des atouts majeurs pour la délivrance de principes actifs. Plusieurs études ont montré que les dendrimères peuvent prolonger la rétention des médicaments dans les poumons.<sup>57</sup> Mais, la taille de ces transporteurs les amènerait plutôt à jouer un rôle dans la délivrance de médicaments au niveau du poumon profond, les alvéoles,<sup>58</sup> ou à être rejetés du système respiratoire par expiration. De plus, bien qu'ils offrent un système de libération intéressant pour la thérapie combinée, les dendrimères doivent encore surmonter quelques difficultés pour être évalués au niveau clinique, tels que la reproductibilité nécessaire dans la synthèse des polymères, la charge de médicament et la stabilité. Les principaux verrous de leur utilisation sont la sécurité du patient (endocytose avérée des nanoparticules et leur biodégradabilité) et la preuve de leur efficacité.<sup>59</sup>

### c) Les micro/nanoparticules polymériques

Les micro/nanoparticules polymériques sont des matériaux dont la taille est comprise de 1 à 1000 µm pour les microparticules et est inférieure à 100 nm pour les nanoparticules. Elles sont obtenues à partir de polymères synthétiques tels que le poly-ε-caprolactone,<sup>60</sup> le polyacrylamide<sup>61</sup> et les polyacrylates,<sup>62</sup> ou de polymères naturels tels que l'albumine,<sup>63</sup> le chitosane<sup>64</sup> et le dextrane.<sup>65</sup>

Un médicament hydrophile ou lipophile peut être incorporé dans le réseau polymérique des micro/nanoparticules avec une efficacité relativement élevée. De plus, il a été prouvé que ce type de système de transport de médicament a une stabilité physico-chimique plus importante que les liposomes tant *in vivo* que lors de leur stockage.<sup>66</sup> Ces microparticules possèdent l'avantage d'être

---

<sup>57</sup> (a) Inapagolla, R.; Guru, B. R.; Kurtoglu, Y. E.; Gao, X.; Lieh-Lai, M.; Bassett, D. J. P.; Kannan, R. M., In vivo efficacy of dendrimer-methylprednisolone conjugate formulation for the treatment of lung inflammation, *Int. J. Pharm.* **2010**, *399*, 140-147. (b) Ryan, G. M.; Kaminskas, L. M.; Kelly, B. D.; Owen, D. J.; McIntosh, M. P.; Porter, C. J. H., Pulmonary administration of PEGylated polylysine dendrimers: absorption from the lung versus retention within the lung is highly size-dependent, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 2986-2995. (c) Kaminskas, L.M.; McLeod, V. M.; Ryan, G. M.; Kelly, B. D.; Haynes, J. M.; Williamson, M.; Thienthong, N.; Owen, D. J.; Porter, C. J., Pulmonary administration of a doxorubicinconjugated dendrimer enhances drug exposure to lung metastases and improves cancer therapy, *J. Control. Release.* **2014**, *183*, 18-26.

<sup>58</sup> Morris, C. J.; Aljayyousi, G.; Mansour, O.; Griffiths, P.; Gumbleton, M., Endocytic Uptake, Transport and Macromolecular Interactions of Anionic PAMAM Dendrimers within Lung Tissue, *Pharm. Res.* **2017**, *34*, 2517-2531.

<sup>59</sup> Palmerston Mendes, L.; Pan, J.; Torchilin, V. P., Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy, *Molecules.* **2017**, *22*, 1401-1421.

<sup>60</sup> Bilensoy, E.; Sarisozen, C.; Esendağlı, G.; Doğan, A. L.; Aktaş, Y.; Sen, M., Mungan NA. Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors, *Int. J. Pharm.* **2009**, *371*, 170-176.

<sup>61</sup> Bai, J.; Li, Y.; Du, J.; Wang, S.; Zheng, J.; Yang, Q.; Chen, X., One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite, *Mat. Chem. Phys.* **2007**, *106*, 412-415.

<sup>62</sup> Zhang, Z. Y.; Smith, B. D., High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model, *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 805-814.

<sup>63</sup> Martínez, A.; Iglesias, I.; Lozano, R.; Teijón, J. M.; Blanco, M. D., Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems, *Carbo. Poly.* **2011**, *83*, 1311-1321.

<sup>64</sup> Saraogi, G. K.; Gupta, P.; Gupta, U. D.; Jain, N. K.; Agrawal, G. P., Gelatin nanocarriers as potential vectors for effective management of tuberculosis, *Int. J. Pharm.* **2010**, *385*, 143-149.

<sup>65</sup> Thambi, T.; You, D. G.; Han, H. S.; Deepagan, V. G.; Jeon, S. M.; Suh, Y. D.; Choi, K. Y.; Kim, K.; Kwon, I. C.; Yi, G.; Lee, J. Y.; Lee, D. S.; Park, J. H., Bioreducible Carboxymethyl Dextran Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery, *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 1829-1838.

<sup>66</sup> (a) Brannon-Peppas, L., Recent Advances on the Use of Biodegradable Microparticles and Nanoparticles in Controlled Drug Delivery, *Int. J. Pharm.* **1995**, *116*, 1-9. (b) Ravi Kumar, M. N., Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices, *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2000**, *3*, 234-258.



faciles à utiliser aussi bien en injection dans les tissus que par voie intraveineuse, en inhalation sous forme de poudre sèche, ou par voie topique. L'eau pénètre plus rapidement dans les particules plus petites, ce qui se traduit par une augmentation de la libération de type « burst » et généralement par une cinétique de libération plus rapide. De plus, les particules plus petites sont plus susceptibles de s'agréger.

Les microsphères font partie du système d'administration multiparticulaire et sont préparées pour obtenir une libération contrôlée du médicament à partir de la forme posologique pour améliorer la biodisponibilité, réduire l'action indésirable et prolonger l'action du médicament, réduire la différence d'absorption chez les patients, réduire la fréquence d'administration et les effets indésirables prolonger le traitement. En général, la particule polymérique appropriée conçue pour une application clinique doit avoir les caractéristiques suivantes :

- Posséder des propriétés mécaniques souhaitées pour être utilisée en aérosolthérapie
- Profils de biocompatibilité et de toxicité acceptables
- Taux de dégradation approprié
- Capacité de charge élevée en médicaments : définie comme la quantité d'agent bioactif pouvant être transportée par unité de masse du polymère
- Faible affinité de liaison : l'affinité de liaison est définie comme la manière dont l'agent bioactif interagit ou se lie au polymère ; cette affinité de liaison doit être suffisamment faible pour permettre la libération du bioactif
- La cinétique de la libération du médicament doit être contrôlée pour permettre à la dose appropriée de médicament d'atteindre les cellules sur une période de temps donnée
- Stabilité suffisante : la stabilité des agents thérapeutiques incorporés dans la particule à la température physiologique doit être suffisante pour maintenir leur structure et leur activité sur une période de temps prolongée

Ces particules polymériques sont avantageuses pour obtenir une délivrance contrôlée par voie pulmonaire avec une fréquence d'administration réduite et la capacité de cibler des cellules ou des organes spécifiques, ainsi qu'une taille appropriée pour échapper à la clairance des macrophages alvéolaires ou faciliter le transport trans-épithélial. Cependant, il est déconseillé d'utiliser des nanoparticules pour cibler une pathologie pulmonaire, car elles ont tendance à être expirées au lieu de se déposer dans les poumons profonds en raison de leur faible inertie.

Les microsphères polymériques peuvent être synthétisées en suivant deux stratégies différentes. Les sphères peuvent être produites à partir de chaînes polymères préexistantes linéaires ou peuvent être formées au cours du processus de polymérisation, à partir d'une solution de monomères. La morphologie des particules polymériques est un paramètre sur lequel on peut jouer pour modifier la cinétique de relargage du médicament adsorbé. En effet, la rigidité des microparticules peut être modifiée en ajoutant plus ou moins d'agent réticulant au mélange de pré-polymérisation. Les particules micrométriques étant synthétisées avec un pourcentage molaire faible en agent réticulant ont un comportement de gel. Celles capables de gonfler en milieu aqueux, et donc dans les fluides physiologiques, sont appelées hydrogel et apportent une autre voie prometteuse dans le domaine de la libération contrôlée de bioactifs. Utilisées en aérosols, ces microparticules d'hydrogel ont une



taille comprise entre 0,5 et 5  $\mu\text{m}$ , ce qui les rend inhalables lorsqu'elles sont sèches. Mais, une fois déposées sur la surface pulmonaire humide, leur taille augmente significativement par gonflement au contact du milieu aqueux ce qui permet d'atténuer le phénomène de phagocytose des macrophages et modifie le profil de libération du principe actif par rapport à des particules rigides.<sup>67</sup>

#### IV. Objectifs de la thèse

En se basant sur l'introduction générale, cette thèse propose l'exploration et le développement de différents systèmes polymériques pour la libération contrôlée de la ribavirine et de l'adénosine-5'-monophosphate. Ces systèmes de délivrance seront associés à la technologie des empreintes moléculaires afin d'aboutir à des systèmes avec des profils de relargage prolongés sur le temps. De ce fait, les principaux objectifs proposés sont :

- 1) Le développement des hydrogels imprimés en utilisant la ribavirine comme molécule template dans l'eau. Le choix des monomères fonctionnels va permettre la création des différents MIPs sensibles aux stimuli externes tels que le milieu physiologique (par gonflement) ou la température (en utilisant un monomère thermosensible : NIPAm) pour la libération contrôlée et prolongée de la ribavirine.
- 2) L'exploration de l'approche Dummy-template a été exploitée afin de diminuer la polarité de la ribavirine par acétylation de la partie ribose. Cette approche s'avère intéressante car elle permet d'augmenter le choix des solvants de polymérisation et par conséquent améliorer la stabilité du complexe de pré-polymérisation. Des monomères synthétiques « Made-Lab » vont être utilisés pour la complexation de la molécule empreinte en se basant sur la mésappariement entre la base de ribavirine acétylée et des différents monomères synthétiques.
- 3) La transposition des meilleures formulations pour la synthèse des MIPs sphériques micrométriques (entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ ) pour la libération contrôlée de la ribavirine dans les poumons.
- 4) La validation biologique (toxicité, immunogénicité) des matériaux polymères sera contrôlée pour l'administration de ces systèmes de libération par voie pulmonaire.
- 5) La synthèse d'un MIP via la technique de polymérisation par pickering inverse pour la libération contrôlée de l'adénosine-5'-monophosphate. Les MIPs sphériques obtenus seront comparés avec les MIPs obtenus en bulk.

---

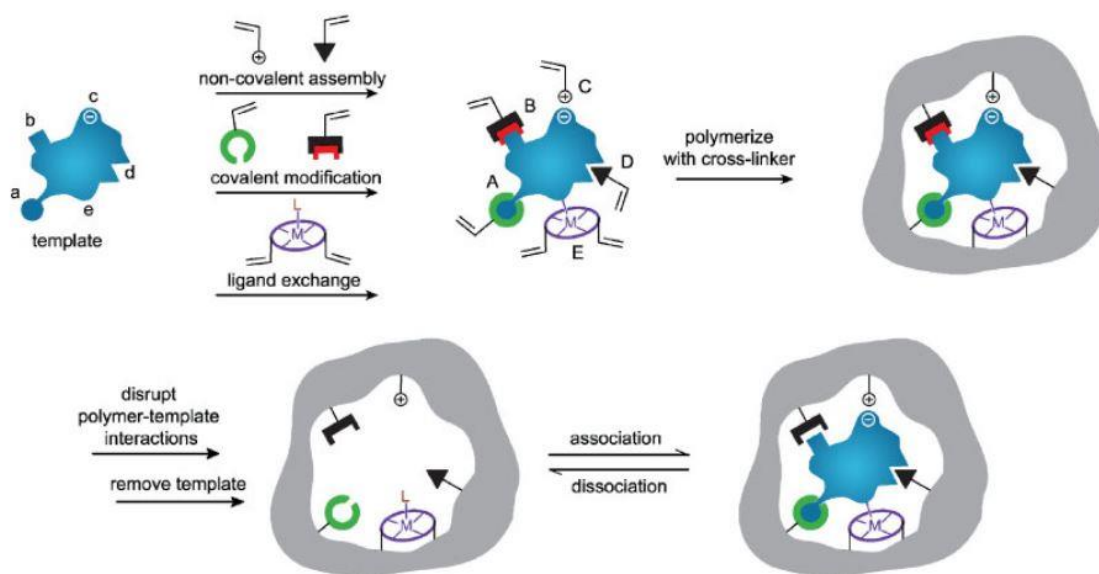
<sup>67</sup> (a) El-Sherbiny, I. M.; Abdel-Bary, E. M.; Harding, D. R. K., Swelling characteristics and in vitro drug release study with pH- and thermally sensitive hydrogels based on modified chitosan, *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *102*, 977-985. (b) El-Sherbiny, I. M.; McGill, S.; Smyth, H. D. C., Swellable microparticles as carriers for sustained pulmonary drug delivery, *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 2343-2356. (c) El-Sherbiny, I. M.; Smyth, H. D. C., Biodegradable nano-micro carrier systems for sustained pulmonary drug delivery: (I) self-assembled nanoparticles encapsulated in respirable/swellable semi-IPN microspheres, *Int. J. Pharm.* **2010**, *395*, 132-141. (d) El-Sherbiny, I. M.; Smyth, H. D. C., Novel cryomilled physically crosslinked biodegradable hydrogel microparticles as carriers for inhalation therapy, *J. Microencapsul.* **2010**, *27*, 657-668. (e) El-Sherbiny, I. M.; Smyth, H. D. C., Controlled release pulmonary administration of curcumin using swellable biocompatible microparticles, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 269-280.

## **Chapitre 2 : Les polymères à empreintes moléculaires**



## I. Généralités sur les empreintes moléculaires

La technologie de l'impression moléculaire a été lancée dans les années 1970 grâce à G. Wulff<sup>68</sup> et relayée dans les années 1980 par K. Mosbach.<sup>69</sup> Cette technologie a été inspirée par le phénomène de reconnaissance naturelle de type anticorps-antigène ou enzyme-substrat, mettant en jeu le concept clé-serrure chère à E. Fischer. Ces matériaux imprimés sont des polymères de synthèse capables de reconnaître spécifiquement une molécule cible avec des affinités similaires à celle des récepteurs naturels.<sup>70</sup> Ces polymères à empreintes moléculaires ou MIPs (Molecularly Imprinted Polymers) sont des matériaux de synthèse obtenus par une copolymérisation d'un ou plusieurs monomères fonctionnels et d'un agent réticulant en présence d'une molécule appelée template (molécule patron). La synthèse commence par une étape cruciale qui est la complexation entre la molécule cible et les monomères fonctionnels selon différentes approches afin d'obtenir un complexe de pré-polymérisation. Après ajout de l'agent réticulant, la polymérisation est initiée soit par voie thermique, soit par voie photochimique. Après la polymérisation, la molécule template est extraite par lavage donnant naissance à un polymère qui possède des cavités spécifiques de cette molécule. Ces cavités, ou empreintes, possèdent des complémentarités de forme, de taille et aussi chimique (groupe fonctionnels) avec la molécule cible<sup>69</sup> (Figure 15).



**Figure 15 : Principe de formation d'un polymère à empreintes moléculaires** : formation des différentes interactions réversibles entre le template et les différents monomères fonctionnels : (A-B) interactions covalentes réversibles, (C) interactions électrostatiques, (D) interactions hydrophobes ou de type van der Waals, (E) interactions type métal-ligand ; ces interactions sont formés respectivement avec les groupes fonctionnels adéquats de la molécule cible (a-e).<sup>71</sup>

<sup>68</sup> Wulff, G.; Sarhan, A., Über die Anwendung von enzymanalogen gebauten Polymeren zur Racemattrennung. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972**, *84*, 364.

<sup>69</sup> Arshady, R.; Mosbach, K., Synthesis of substrate - selective polymers by host - guest polymerization, *Die Makromolekulare Chemie* **1981**, *182*, 687-692.

<sup>70</sup> Haupt, K.; Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical. Reviews.* **2000**, *100*, 2495-2504.

<sup>71</sup> Alexander, C.; Andersson, H. S.; Andersson, L. I.; Ansell, R. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M. J., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 106-180.

Comparés aux macromolécules naturelles, comme les enzymes ou les anticorps, les MIPs possèdent des stabilités physique et chimique plus importantes. De plus, leur synthèse est simple à mettre en œuvre et d'un coût peu élevé.<sup>72</sup> Les MIPs ont montré des affinités de reconnaissances intéressantes pour une large gamme de molécules cibles<sup>73</sup> allant des petites molécules telles que les acides aminés<sup>74</sup>, les médicaments<sup>75</sup>, les pesticides<sup>76</sup>, les polluants<sup>77</sup>, jusqu'aux macromolécules telles que les protéines<sup>78</sup>, les peptides<sup>79</sup> ou de l'ADN<sup>80</sup>. Aujourd'hui, certains MIPs sont capables d'être spécifiques d'un microorganisme tel qu'une bactérie ou un virus,<sup>81</sup> voire même d'une cellule humaine.<sup>82</sup>

La technologie d'impression moléculaire peut avoir un rôle important à jouer dans différents domaines tels que dans l'alimentaire, la cosmétique, le biomédical... En effet, les MIPs peuvent être utilisés comme adsorbant pour extraire des molécules actives,<sup>83</sup> ou les séparer sur colonne chromatographique,<sup>84</sup> comme film sensible de capteurs,<sup>85</sup> comme catalyseurs en synthèse organique,<sup>86</sup> comme instruments de criblage de molécules thérapeutiques<sup>87</sup>... et aussi comme systèmes de libération contrôlée pour de nombreux principes actifs.<sup>88,89,90</sup>

---

<sup>72</sup> Svenson, J.; Nicholls, I. A., On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta.* **2001**, *435*, 19-24.

<sup>73</sup> Brüggemann, O.; Haupt, K.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Mosbach, K., New configurations and applications of molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. A.* **2000**, *889*, 15-24.

<sup>74</sup> Tarannum, N.; Singh, M., Selective recognition and detection of L-aspartic acid by molecularly imprinted polymer in aqueous solution, *Am. J. Analyt. Chem.* **2011**, *2*, 909-918.

<sup>75</sup> Çakir, P.; Cutivet, A.; Resmini, M.; Bui, B. T. S.; Haupt, K., Protein-Size Molecularly Imprinted Polymer Nanogels as Synthetic Antibodies, by Localized Polymerization with Multi-initiators, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 1048-1051.

<sup>76</sup> Nomura, Y.; Muguruma, H.; Yano, K.; Kugimiya, A.; McNiven, S.; Ikebukuro, K.; Karube, I., Selective recognition of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid using a molecularly imprinted polymer, *Anal. Lett.* **1998**, *31*, 973-980.

<sup>77</sup> Janotta, M.; Weiss, R.; Mizaikoff, B.; Brüggemann, O.; Ye, L.; Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers for nitrophenols-an advanced separation material for environmental analysis, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2001**, *80*, 75-86.

<sup>78</sup> Guo, T.; Xia, Y.; Hao, G.; Song, M.; Zhang, B., Adsorptive separation of hemoglobin by molecularly imprinted chitosan beads, *Biomaterials.* **2004**, *25*, 5905-5912.

<sup>79</sup> Zeng, Z.; Hoshino, Y.; Rodriguez, A.; Yoo, H.; Shea, K. J., Synthetic polymer nanoparticles with antibody-like affinity for a hydrophilic peptide, *ACS. nano.* **2009**, *4*, 199-204.

<sup>80</sup> Brahmabhatt, H.; Poma, A.; Pendergraff, H.M.; Watts, J. K.; Turner, N. W., Improvement of DNA recognition through molecular imprinting: hybrid oligomer imprinted polymeric nanoparticles (oligoMIP NPs), *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 281-287.

<sup>81</sup> Jenik, M.; Schirhagl, R.; Schirk, C.; Hayden, O.; Lieberzeit, P.; Blaas, D.; Paul, G.; Dickert, F. L., Sensing picornaviruses using molecular imprinting techniques on a quartz crystal microbalance, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5320-5326.

<sup>82</sup> Pan, J.; Chen, W.; Ma, Y.; Pan, G., Molecularly imprinted polymers as receptor mimics for selective cell recognition, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 5574-5587.

<sup>83</sup> He, C.; Long, Y.; Pan, J.; Li, K.; Liu, F., Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples, *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2007**, *70*, 133-150.

<sup>84</sup> Wistuba, D.; Schurig, V., Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A.* **2000**, *875*, 255-276.

<sup>85</sup> Hillberg, A. L.; Brain, K. R.; Allender, C. J., Molecular imprinted polymer sensors: Implications for therapeutics, *Adv. Drug. Delivery. Rev.* **2005**, *57*, 1875-1889.

<sup>86</sup> Alexander, C.; Davidson, L.; Hayes, W., Imprinted polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis, *Tetrahedron.* **2003**, *59*, 2025-2057.

<sup>87</sup> Rathbone, D. L., Molecularly imprinted polymers in the drug discovery process, *Adv. Drug Delivery. Rev.* **2005**, *57*, 1854-1874.

<sup>88</sup> Li, B.; Xu, J.; Hall, A. J.; Haupt, K.; Tse Sum Bui, B., Water-compatible silica sol-gel molecularly imprinted polymer as a potential delivery system for the controlled release of salicylic acid, *J. Mol. Recognit.* **2014**, *27*, 559-565.

<sup>89</sup> Puoci, F.; Iemma, F.; Cirillo, G.; Picci, N.; Matricardi, P.; Alhaique, F., Molecularly imprinted polymers for 5-fluorouracil release in biological fluids, *Molecules.* **2007**, *12*, 805-814.

Les études menées sur les MIPs en tant que DDS montrent que les polymères imprimés permettent de générer une libération prolongée dans le temps du principe actif,<sup>91,92</sup> mais aussi, pour certaines formulations, une libération contrôlée dépendante des paramètres du milieu.<sup>93</sup>

## II. Les MIPs comme systèmes de libération contrôlée

Les thérapies actuelles recherchent la conception de DDS capables de surmonter les limitations biopharmaceutiques des médicaments (principalement une faible solubilité et perméabilité) et de les délivrer au site requis et à un taux adéquat.<sup>94</sup> La régulation du processus de libération du médicament vise à prolonger la durée de l'action pharmacologique, à réduire les effets indésirables, à minimiser la fréquence d'administration et à améliorer l'observance du patient. La technologie d'impression moléculaire est particulièrement adaptée pour répondre à ce cahier des charges. Ils possèdent un réseau au sein de leur matrice polymérique ayant une affinité pour des molécules spécifiques. De telles molécules peuvent être des agents thérapeutiques ou des substances biochimiques. L'exploitation des polymères à empreinte moléculaire (MIP) dans le domaine de l'administration des médicaments est récente<sup>95</sup> et exploite leur affinité pour un template de deux façons. La première, pendant la préparation du système de libération, où l'affinité augmente la quantité de médicament pouvant être adsorbée par une quantité donnée de polymère. La seconde, une fois le DDS administré dans le corps, un mécanisme basé sur l'affinité contribue au contrôle du processus de libération du médicament. Par conséquent, contrairement aux autres types de DDS, les polymères à empreintes moléculaires sont capables de recapturer le médicament dans une large proportion par immersion dans une solution contenant ce dernier. Puis en le relarguant complètement *in vivo*, de façon prolongée. En jouant sur la sélectivité du MIP, et donc sur son affinité de liaison envers le template, le processus de libération peut ainsi être plus ou moins retardé.

En plus des exigences générales relatives à la préparation des MIPs, leur utilisation en tant que DDS doit être inoffensive et sans risque pour l'organisme vivant, un problème qui ne se pose pas pour d'autres applications. Par conséquent, des composants biocompatibles doivent être utilisés, les solvants organiques doivent être minimisés et choisis selon des critères de toxicité et une extraction soigneuse des espèces n'ayant pas réagi est obligatoire.<sup>96</sup> Il est de plus pressenti que des pourcentages de réticulations élevées, couramment utilisées dans les synthèses de MIPs avec

---

<sup>90</sup> Puoci, F.; Iemma, F.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Parisi, O. I.; Spizzirri, U. G.; Picci, N., New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media, *Eur. Polym. J.* **2009**, *45*, 1634-1640.

<sup>91</sup> Ali, M.; Horikawa, S.; Venkatesh, S.; Saha, J.; Hong, J. W.; Byrne, M. E., Zero-order therapeutic release from imprinted hydrogel contact lenses within in vitro physiological ocular tear flow, *J. Control. Release.* **2007**, *124*, 154-162.

<sup>92</sup> Piletska, E. V.; Turner, N. W.; Turner, A. P.; Piletsky, S. A., Controlled release of the herbicide simazine from computationally designed molecularly imprinted polymers, *J. Control. Release.* **2005**, *108*, 132-139.

<sup>93</sup> Suedee, R.; Jantararat, C.; Lindner, W.; Viernstein, H.; Songkro, S.; Srichana, T., Development of a pH responsive drug delivery system for enantioselective-controlled delivery of racemic drugs, *J. Control. Release.* **2010**, *142*, 122-131.

<sup>94</sup> Peppas, N. A., Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1, 5-9.

<sup>95</sup> Luliński, P., Molecularly imprinted polymers based drug delivery devices: a way to application in modern pharmacotherapy. A review, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **2017**, *76*, 1344-1353.

<sup>96</sup> Aydin, O.; Attila, G.; Dogan, A.; Aydin, M.V.; Canacankatan, N.; Kanik, A., The Effects of Methyl Methacrylate on Nasal Cavity, Lung, and Antioxidant System (An Experimental Inhalation Study), *Toxicol. Pathol.* **2002**, *30*, 350-356.

l'EGDMA (l'éthylène glycol diméthacrylate), augmentant l'hydrophobie du polymère, déclenchera l'adsorption de cellules hôtes et de protéines sur sa surface. Les performances du MIP peuvent ainsi être altérées. Ce revêtement de protéines peut constituer une barrière à la libération du médicament par le MIP, mais aussi rendre le MIP insensible aux stimuli visés, rendant l'affinité pour le template indépendante des variables externes.<sup>97</sup> Ce cas de figure, appelé « protein corona », est très connu pour être particulièrement actif en milieu plasmatique mais est assez méconnu dans les poumons humains.<sup>98</sup> Par conséquent, pour éviter l'effet négatif du « protein corona » sur le relargage du bioactif par le MIP, il peut être préconisé l'emploi d'agents de réticulation polaires, ou d'employer un taux de réticulation inférieur à celui couramment utilisé pour les MIPs. Dans ce dernier cas, le MIP pourrait changer de conformation et laisser s'échapper de sa cavité imprimée le template même engagé par les protéines. Enfin, une proportion élevée d'agent de réticulation augmente également considérablement la rigidité du réseau, pouvant provoquer une friction mécanique avec les tissus environnants et provoquer une cytotoxicité accrue.

Les MIPs n'ont été que récemment utilisés comme DDS de par les avantages qu'ils présentent tel que : protection du médicament, modulation du relargage par l'affinité contrôlée du template envers le polymère, rétrocontrôle possible sur la concentration libérée du médicament.<sup>95</sup> Selon la stratégie de synthèse adoptée, les MIPs peuvent être obtenus sous différentes formes, particules irrégulières, films, sphères, monolithe, ce qui permettrait de les utiliser dans de nombreuses voies d'administration, telles que la voie topique, intraveineuse, orale,... D'ailleurs, une des premières utilisations en tant que DDS citée dans la littérature était des lentilles de contacts souples imprimés.<sup>99</sup> Puis, d'autres formes ont ensuite été créées, comme des micelles bio-polymériques à cœur imprimé à base de gélatine-dextrane co-assemblés,<sup>100</sup> de nanosphères de polypyrrole sélectives à l'amoxicillin encage dans un hydrogel de polyacrylamide,<sup>101</sup> des microcapsules polysaccharidiques creuses revêtues d'une couche imprimée,<sup>102</sup> des nanoparticules imprimées biodégradables à base de molécules naturelles.<sup>103</sup>

Plusieurs stratégies ont été mises en place pour le développement de systèmes de libération imprimés en améliorant le chargement et la recapture de ces derniers telle que la libération prolongée, la libération activée sous divers stimuli (température, pH, gonflement, dégradation...) ou

---

<sup>97</sup> Pearson, R. M.; Juetter, V. V.; Hong, S., Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery, *Front. Chem.* **2014**, *2*, 108.

<sup>98</sup> Konduru, N. V.; Molina, R. M.; Swami, A.; Damiani, F.; Pyrgiotakis, G.; Lin, P.; Andreozzi, P.; Donaghey, T. C.; Demokritou, P.; Krol, S.; Kreyling, W.; Brain, J. D., Protein corona: implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells, *Part. Fibre. Toxicol.* **2017**, *14*, 42.

<sup>99</sup> Ribeiro, A.; Veiga, F.; Santos, D.; Torres-Labandeira, J. J.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C., Bioinspired imprinted PHEMA-hydrogels for ocular delivery of carbonic anhydrase inhibitor drugs, *Biomacromolecules.* **2011**, *12*, 701-709.

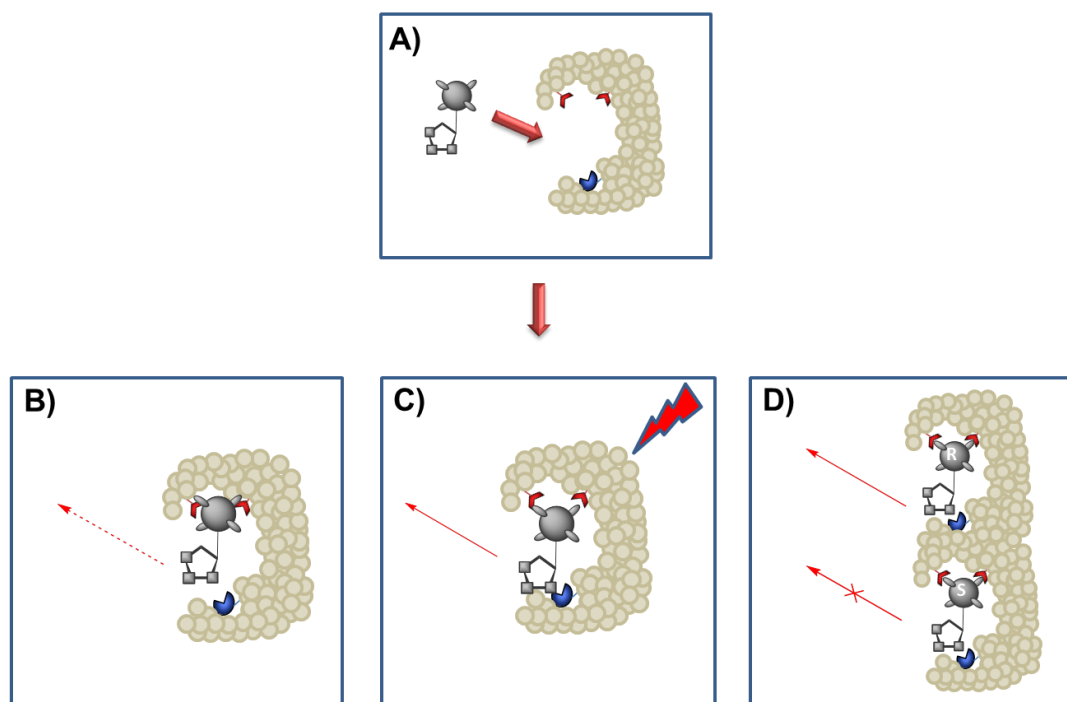
<sup>100</sup> Zhang, L.; Qi, Z.; Huang, Q.; Zeng, K.; Sun, X.; Li, J.; Liu, Y.-N., Imprinted-like biopolymeric micelles as efficient nanovehicles for curcumin delivery, *Colloids. Surf. B: Biointerfaces.* **2014**, *123*, 15-22.

<sup>101</sup> Castro, L. E. V.; Martinez, C. J. P.; Castro, T. C.; Ortega, M. M. C.; Encinas, J. C., Chemical polymerization of pyrrole in the presence of L-serine or L-glutamic acid: electrically controlled amoxicillin release from composite hydrogel, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 41804.

<sup>102</sup> Wang, P.; Zhang, A.; Jin, Y.; Zhang, Q.; Zhang, L.; Peng, Y.; Du, S., Molecularly imprinted layer-coated hollow polysaccharide microcapsules towards gate-controlled release of water-soluble drugs, *RSC. Adv.* **2014**, *4*, 26063-26073.

<sup>103</sup> Asadi, E.; Abdouss, M.; Leblanc, R. M.; Ezzati, N.; Wilson, J. N.; Azodi-Deilami, S., In vitro/in vivo study of novel anti-cancer biodegradable cross linked tannic acid for fabrication of 5-fluorouracil-targeting drug delivery nano-device based on molecular imprinted polymer, *RSC. Adv.* **2016**, *6*, 37308-37318.

la libération énantiosélective<sup>104,105</sup> (Figure 16). Le point important à prendre en considération dans ce genre de système est l'affinité entre le template (le principe actif à libérer) et les monomères fonctionnels comme le montre les études menées par Hiratani *et al.*<sup>106</sup> dans l'impression et la libération optique prolongée du timolol (**21**) à partir des lentilles de contact souples.



**Figure 16 : Stratégies de libérations obtenues après chargement du principe actif (A) tel que la libération prolongée (B), la libération contrôlée sous divers stimuli (C) ou la libération énantiosélective (D).**

Les premiers MIPs-DDS synthétisés ont permis rapidement d'améliorer les profils de libération des principes actifs en adaptant un mode de libération régulé et en prolongeant le temps de libération du template.<sup>107,108</sup> Le premier exemple d'utilisation de MIPs-DDS a été donné par l'équipe de Nicholls<sup>109</sup> pour la libération contrôlée de la théophylline (**18**) pour le traitement de l'asthme. La synthèse a été faite à partir de l'acide méthacrylique (MAA) (**19**) comme monomère fonctionnel et l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA) (**20**) comme agent de réticulation. La libération a été effectuée dans un tampon PBS à pH neutre en ajustant la quantité de théophylline chargée et son effet sur les profils de libération comme le montre la Figure 17.

<sup>104</sup> Luliński, P., Molecularly imprinted polymers as the future drug delivery devices, *Acta. Pol. Pharm.* **2013**, *70*, 601-609.

<sup>105</sup> Zaidi, S. A., Molecularly imprinted polymers as drug delivery vehicles, *Drug. Deliv.* **2014**, *23*, 2262-2271.

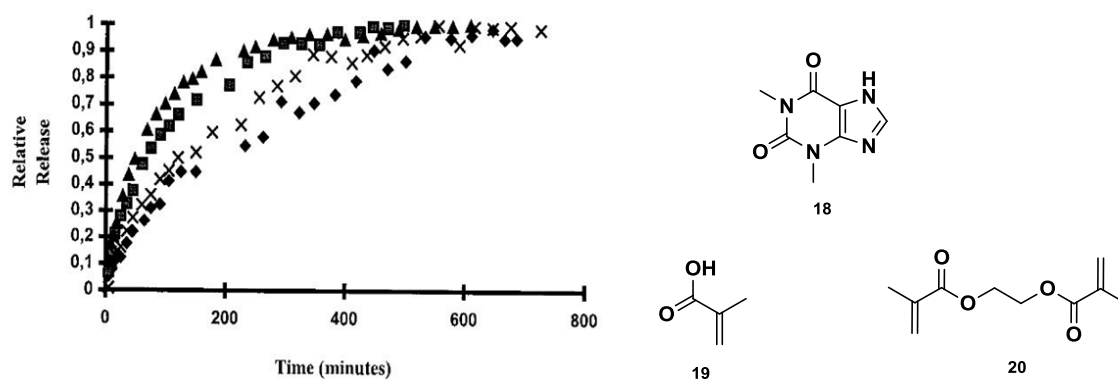
<sup>106</sup> (a) Hiratani, H.; Alvarez-Lorenzo, C., Timolol uptake and release by imprinted soft contact lenses made of *N,N*-diethylacrylamide and methacrylic acid, *J. Control. Release.* **2002**, *83*, 223-230. (b) Hiratani, H.; Fujiwara, A.; Tamiya, Y.; Mizutani, Y.; Alvarez-Lorenzo, C., Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses, *Biomaterials.* **2005**, *26*, 1293-1298.

<sup>107</sup> Cunliffe, D.; Kirby, A.; Alexander, C., Molecularly imprinted drug delivery systems, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1836-1853.

<sup>108</sup> Alvarez-Lorenzo, C.; Hiratani, H.; Gomez-Amoza, J. L.; Martinez-Pacheco, R.; Souto, C.; Concheiro, A., Soft contact lenses capable of sustained delivery of timolol, *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 2182-2192.

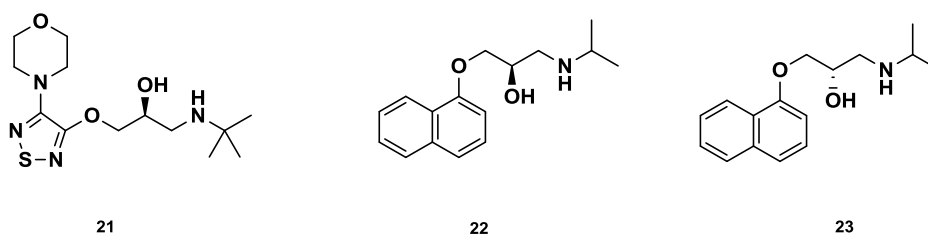
<sup>109</sup> Norell, M. C.; Andersson, H. S.; Nicholls, I. A., Theophylline molecularly imprinted polymer dissociation kinetics: a novel sustained release drug dosage mechanism, *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 98-102.





**Figure 17 : Profils de relargage de la théophylline** à partir des polymères imprimés. polymères chargés ( mg de théophylline par gramme de MIP) avec : (triangle) 50 mg/g, (carré) 10 mg/g, (losange) 2 mg/g, (croix) 0,1 mg/g<sup>109</sup>.

Dans une autre étude menée par Allender *et al.*<sup>110</sup> le relargage du *S*-propranolol (**23**) montre un profil de libération plus lent pour le MIP que le NIP. Il a été démontré qu'un MIP, de par sa sélectivité, est capable de relarguer différemment deux formes énantiomériques d'un médicament. Par exemple, Suedee *et al.*<sup>111</sup> ont décrit que la libération contrôlée énantiosélective du *S*-propranolol (**23**) s'est montrée plus rapide que le *R*-propranolol (**22**) en utilisant un MIP imprimé avec le *R*-propranolol (**22**) et chargé avec un mélange des deux énantiomères.



**Figure 18 : Structure du timolol (21), *R*-propranolol (22) et le *S*-propranolol (23)**

De plus, par l'incorporation de différents co-monomères capables de changer les propriétés physiques ou chimiques du polymère en répondant à différents stimuli externes comme la

<sup>110</sup>Allender, C.; Richardson, C.; Woodhouse, B.; Heard, C.; Brain, K., Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers, *Int. J. Pharm.* **2000**, *195*, 39-43.

<sup>111</sup> (a) Suedee, R.; Srichana, T.; Martin, G. P., Evaluation of matrices containing molecularly imprinted polymers in the enantioselective-controlled delivery of  $\beta$ -blockers, *J. Control. Release.* **2000**, *66*, 135-147. (b) Suedee, R.; Srichana, T.; Chotivatesin, R.; Martin, G., Stereoselective release behaviors of imprinted bead matrices, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28*, 545-554. (c) Suedee, R.; Srichana, T.; Rattananont, T., Enantioselective release of controlled delivery granules based on molecularly imprinted polymers, *Drug. Deliv.* **2002**, *9*, 19-30.

lumière<sup>112</sup>, le pH<sup>113</sup>, la température<sup>114</sup>, les MIPs peuvent devenir des systèmes de libération contrôlée de façon intelligente, appelés des Smart Polymers.<sup>115</sup>

En ce qui concerne plus spécifiquement la création de MIPs répondant à la température, plusieurs études ont montré l'effet de l'incorporation d'un monomère thermosensible sur la libération contrôlée. Le *N*-isopropylacrylamide (NIPAm ; **24**) est le monomère thermosensible de choix pour la synthèse de ce type de MIPs. En effet, ce monomère permet d'obtenir un polymère thermosensible qui, en milieu aqueux, subit une transition morphologique réversible à partir de 32°C. Dans l'eau et en-dessous de cette température critique inférieure de solubilité (LCST, lower critical solution temperature), le polymère est hydrophile et gonflé, au-delà (température proche du corps humain) il devient hydrophobe et se replie sur lui-même.<sup>116</sup> Ce MIP thermosensible peut être obtenu soit par une copolymérisation du NIPAm (**24**) avec d'autres monomères fonctionnels<sup>114</sup> soit par modification chimique en le greffant sur la surface de la matrice.<sup>117</sup> L'exemple marquant de l'utilisation d'un MIP thermosensible est l'étude menée par Alvarez-Lorenzo et al., où la libération de l'acide naphthalène-disulfonique (ANDS) est en fonction du gonflement du polymère qui lui-même est guidé par la température du milieu, comme le montre la Figure 19. Ce MIP est synthétisé à base de *N*-amino-propylméthacrylamide et de NIPAm comme monomères fonctionnels et de *N*, *N'*-méthylènebisacrylamide comme agent réticulant.

De ce fait, l'utilisation des polymères imprimés reste une technologie intéressante vu la large gamme de réactifs qu'on pourra utiliser mais aussi les propriétés physiques et chimiques sur lesquelles on peut jouer pour ajuster les profils de relargage à notre demande.

---

<sup>112</sup> Gong, C.; Wong, K. L.; Lam, M. H., Photoresponsive molecularly imprinted hydrogels for the photoregulated release and uptake of pharmaceuticals in the aqueous media, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 1353-1358.

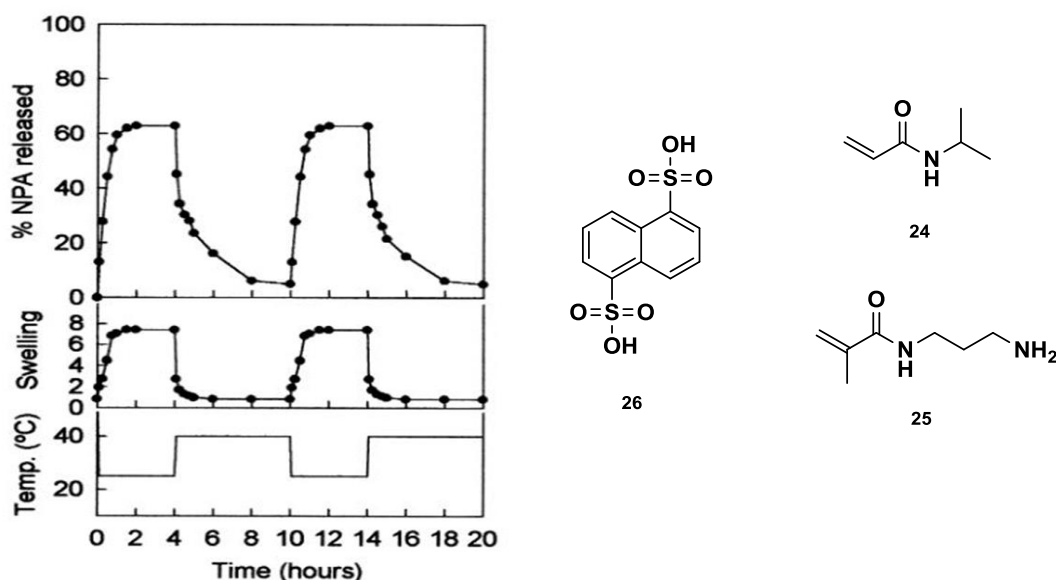
<sup>113</sup> Wang, C.; Javadi, A.; Ghaffari, M.; Gong, S.; A pH-sensitive molecularly imprinted nanospheres/hydrogel composite as a coating for implantable biosensors, *Biomaterials.* **2010**, *31*, 4944-4951.

<sup>114</sup> Li, N.; Qi, L.; Shen, Y.; Qiao, J.; Chen, Y., Novel Oligo (ethylene glycol)-Based Molecularly Imprinted Magnetic Nanoparticles for Thermally Modulated Capture and Release of Lysozyme, *ACS. Appl. Mater. Interfaces.* **2014**, *6*, 17289-17295.

<sup>115</sup> De las Heras Alarcon, C.; Pennadam, S.; Alexander, C., Stimuli-responsive polymers for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 276-285.

<sup>116</sup> Heskins, M.; Guillet, J. E., Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide), *J. Macromol. Sci. Part. A. Pure. Appl. Chem.* **1968**, *2*, 1441-1455.

<sup>117</sup> Pan, G.; Zhang, Y.; Guo, X.; Li, C.; Zhang, H., An efficient approach to obtaining water-compatible and stimuli-responsive molecularly imprinted polymers by the facile surface-grafting of functional polymer brushes via RAFT polymerization, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 976-982.



**Figure 19 : Influence de la température sur le gonflement/dégonflement et la libération de l'acide naphthalène-disulfonique (26) en utilisant le MIP synthétisé à partir du N-amino-propylméthacrylamide (25) comme monomère fonctionnel et le *N*-isopropylacrylamide (24) comme monomère fonctionnel thermosensible.<sup>118</sup>**

### III. Synthèse des polymères à empreinte moléculaire

La plupart du temps les MIPs sont synthétisés selon trois approches : covalente, non-covalente et semi-covalente. Ces approches sont mises en œuvre lors de l'étape de la formation du complexe de pré-polymérisation entre la molécule cible et les monomères fonctionnels. Ces approches nécessitent toutes d'optimiser le rapport stœchiométrique entre le template et les monomères fonctionnels. De même, les choix des ratios template/agent réticulant et solvants de synthèse sont primordiaux dans la formulation de pré-polymérisation d'un MIP.<sup>119,120</sup>

#### a) Approche non-covalente

L'approche non covalente a été mise en place par Mosbach en 1981,<sup>69</sup> et est devenue l'approche la plus utilisée en raison de sa facilité de conception. La formation du complexe de pré-polymérisation est basée sur les interactions de type non covalentes (liaison hydrogène, interaction hydrophobe, interaction électrostatique ou de type van der Waals) entre le template et un excès de monomères fonctionnels. Ces monomères sont de structures très variées et majoritairement disponibles commercialement.<sup>121</sup> Dans cette approche, les propriétés de reconnaissances des MIPs dépendent de la force d'interaction existante entre le template et le reste des réactifs lors de l'étape de complexation. Le bon choix des réactifs dans ce genre de situation permet d'augmenter la

<sup>118</sup> Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A., Reversible adsorption by a pH-and temperature-sensitive acrylic hydrogel, *J. Control. Release.* **2002**, *80*, 247-257.

<sup>119</sup> Santora, B. P.; Gagné, M. R.; Moloy, K. G.; Radu, N. S., Porogen and Cross-Linking Effects on the Surface Area, Pore Volume Distribution, and Morphology of Macroporous Polymers Obtained by Bulk Polymerization, *Macromolecules.* **2001**, *34*, 658-661.

<sup>120</sup> Piletsky, S. A.; Piletska, E. V.; Karim, K.; Freebairn, K. W.; Legge, C. H.; Turner, A. P. F., Polymer Cookery : Influence of Polymerization Conditions on the Performance of Molecularly Imprinted Polymers, *Macromolecules.* **2002**, *35*, 7499-7504.

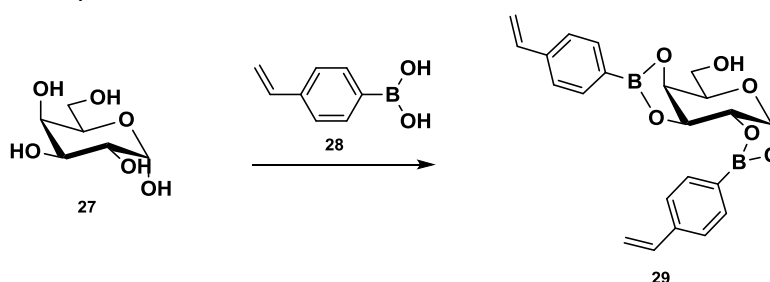
<sup>121</sup> Hwang, C. C.; Lee, W. C., Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods, *J. Chromatogr. A.* **2002**, *962*, 69-78.

sélectivité et la spécificité du MIP obtenu. Plusieurs techniques prédictives ont été mises en place pour étudier la force d'interaction entre le template et les monomères fonctionnels afin d'optimiser le choix du monomère et son nombre<sup>122</sup>. Par exemple Sellergren *et al.*<sup>123</sup> ont utilisé pour la première fois la titration <sup>1</sup>H RMN pour étudier l'interaction entre l'acide méthacrylique et la L-phénylalanine dans le complexe de pré-polymérisation formé.

L'approche non covalente est la plus utilisée pour les MIP-DDS car elle apporte au MIP une bonne spécificité qui permet d'avoir des systèmes montrant une libération prolongée du bioactif. Donc, le choix des monomères fonctionnels est un élément crucial pour la mise en œuvre d'une telle approche.

### b) Approche covalente

L'approche covalente a été, historiquement, la première à être développée. Elle a fait l'objet de la première publication dans le domaine en 1972 par Wulff *et al.*<sup>68</sup> L'approche covalente tire son nom de la formation d'une liaison covalente réversible entre la molécule cible et le monomère fonctionnel. Ainsi, le template et le monomère fonctionnel ne représente, au départ, qu'une seule molécule. Après la synthèse, la liaison covalente est clivée chimiquement et le template est extrait de la matrice. Au sein de la cavité, le groupement fonctionnel, capable de former à nouveau cette liaison, est donc placé idéalement pour l'étape de recapture. Le premier exemple a été publié par Wulff qui a complexé des diols-cis contenus dans des sucres tels que le fructose ou le galactose<sup>124</sup> par le biais de la formation d'esters boronate (Figure 20) Par la suite, cette méthode a été étendue à d'autres molécules telles que des nucléosides.<sup>125</sup>



**Figure 20 : Schéma de la complexation entre le galactose (27) et l'acide 4-vinylphényl boronique (28).**

L'avantage de cette approche est qu'elle permet une distribution homogène des sites actifs et minimise les interactions non spécifiques à l'intérieur des cavités. Cette approche est limitée aux molécules template possédant des groupements fonctionnels spécifiques pour établir des liaisons

<sup>122</sup>Karim, K.; Breton, F.; Rouillon, R.; Piletska, E. V.; Guerreiro, A.; Chianella, I.; Piletsky, S. A., How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers?, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1795-1808.

<sup>123</sup>Sellergren, B. ; Lepistoe, M. ; Mosbach, K., Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition, *J. Am. Chem. Soc* **1988**, *110*, 5853-5860.

<sup>124</sup> Wulff, G.; Schauhoff, S., Enzyme-analog-built polymers. 27. Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting. Selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus spatial requirements, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 395-400.

<sup>125</sup> Jégourel, D.; Delépée, R.; Breton, F.; Rolland, A.; Vidal, R.; Agrofoglio, L. A., Molecularly imprinted polymer of 5-methyluridine for solid-phase extraction of pyrimidine nucleoside cancer markers in urine, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8932-8939.

covalentes tel que les amines,<sup>126</sup> les aldéhydes,<sup>127</sup> les cétones,<sup>128,129</sup> les monoalcools<sup>130</sup> et les diols ou polyols ou saccharides.<sup>124</sup>

Cette approche n'est pas ou peu utilisée dans la synthèse de MIPs DDS, car le clivage des liaisons covalentes réversibles se fait généralement à des valeurs de pH inatteignables physiologiquement.

### c) Approche semi-covalente

L'approche semi-covalente est une approche hybride entre la covalente et la non-covalente et a été introduite par Selligren *et al.*<sup>131</sup> Elle consiste tout d'abord à additionner la molécule cible de façon covalente au monomère fonctionnel puis d'utiliser ce composé comme lors d'une approche de type covalente. Après la polymérisation, le composé subit un clivage chimique de la liaison et le template est enlevé. Puis, lors de l'étape de recapture la reconnaissance se fait par des interactions non covalentes entre les fonctions chimiques du monomère fonctionnel, qui se trouvent au bon endroit dans la poche, et celles présentes sur la molécule recherchée. Cette approche est illustrée à la Figure 21, par l'impression moléculaire de la p-aminophénylalanine éthyl ester grâce à l'utilisation de son dérivé diacrylate.

Cependant, il existe deux inconvénients à la méthode semi-covalente. Premièrement, il est difficile de créer plusieurs sites d'interaction au sein de la cavité pour une molécule de bioactif donnée. Ce qui n'est pas le cas de l'approche non covalente. Il s'ensuit alors une plus grande sélectivité du MIP synthétisé par voie non covalente. Deuxièmement, les contraintes stériques engendrées par le complexe covalent (template lié au monomère de façon covalente) qui sont formées lors de la polymérisation peuvent être assez différentes de celles requises pour la formation non covalente du complexe de recapture entre la molécule d'intérêt et le monomère au sein de la cavité. Cela peut alors diminuer les performances du MIP.

---

<sup>126</sup> Wulff, G.; Best, W.; Akelah, A., Enzyme-analogue built polymers, 17 Investigations on the racemic resolution of amino acids, *React. Polym.* **1984**, *2*, 167-174.

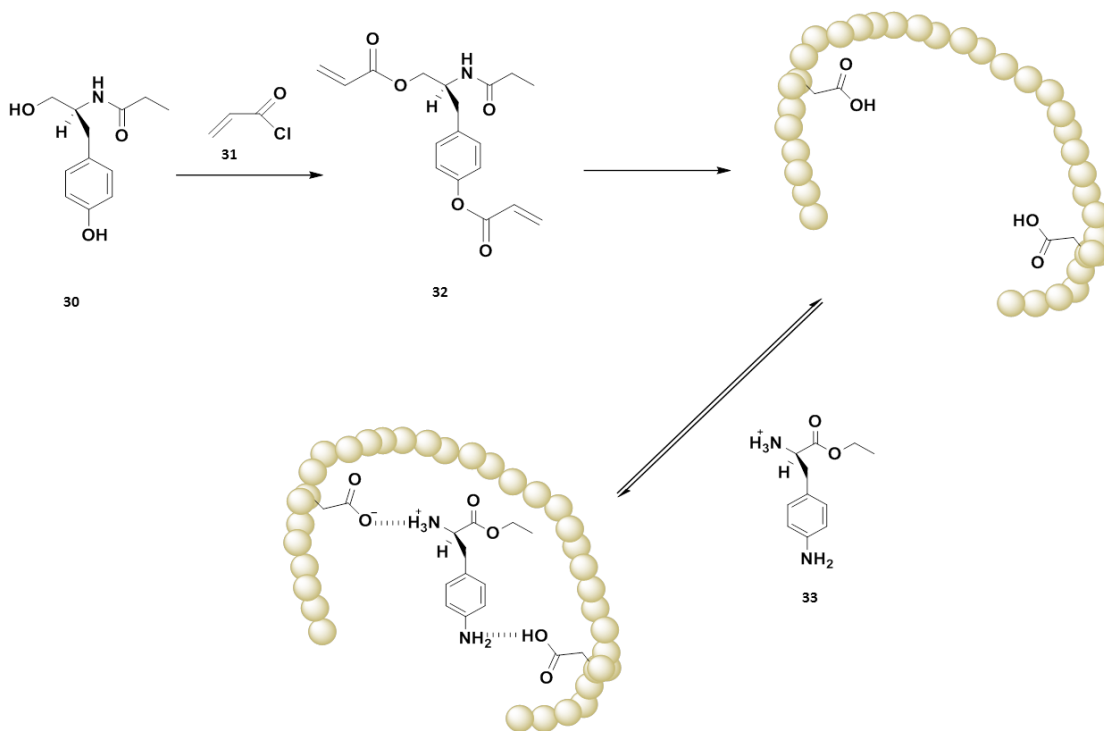
<sup>127</sup> Wulff, G.; Heide, B.; Helfmeier, G., Enzyme-analog built polymers. 20. Molecular recognition through the exact placement of functional groups on rigid matrixes *via* a template approach, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1089-109.

<sup>128</sup> Shea, K. J.; Sasaki, D. Y., On the control of microenvironment shape of functionalized network polymers prepared by template polymerization, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3442-3444.

<sup>129</sup> Shea, K. J.; Sasaki, D. Y., An analysis of small-molecule binding to functionalized synthetic polymers by <sup>13</sup>C CP/MAS NMR and FT-IR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4109-4120.

<sup>130</sup> Alexander, C.; Smith, C. R.; Whitcombe, M. J.; Vulfson, E. N., Imprinted Polymers as Protecting Groups for Regioselective Modification of Polyfunctional Substrates, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6640- 6651.

<sup>131</sup> Selligren, B.; Andersson, L., Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analog imprinting strategy, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3381-3383.



**Figure 21 : Illustration de l'approche semi covalente** lors de l'impression moléculaire de la p-aminophénylalanine éthyl ester (**33**) en utilisant son analogue le L-2-amino-3-(4-hydroxyphényl)-1-propanol (**30**) comme molécule template et l'acryloyl chloride (**31**) comme monomère.<sup>131</sup>

### III.1. Choix des réactifs pour la synthèse des MIPs

Pour la synthèse des MIP-DDS, l'approche non-covalente reste la plus appropriée. Pour l'utilisation de cette approche, les choix du template, du ou des monomères fonctionnels, de l'agent réticulant et du solvant porogène restent cruciaux.

#### III.1.1. La molécule cible ou template

Le template est la molécule cible qu'on cherche à imprimer dans le polymère ou l'un de ses dérivés. De nombreuses conditions sont nécessaires à la formation d'un MIP sélectif : la molécule template doit comporter un ou plusieurs groupements fonctionnels permettant de la complexer avec les différents monomères fonctionnels, et elle doit être non dégradable ou modifiable sous l'effet de la température ou le rayonnement UV lors du processus de polymérisation.<sup>132</sup> Ainsi, les groupements fonctionnels, mais aussi la forme et la taille, de la molécule template permettent de choisir les monomères fonctionnels les plus adaptés à la formation d'un complexe de pré-polymérisation stable.

Après la polymérisation, l'étape de lavage du polymère permet d'éliminer la molécule template de la matrice afin de laisser les cavités vides. Cette étape ne permet généralement pas d'extraire la totalité du template du polymère. Il est admis qu'environ 1 % de la molécule template peut rester lié à la matrice même après un lavage intense.<sup>133</sup> En effet, très peu de template reste

<sup>132</sup> Matsui, J.; Fujiwara, K.; Takeuchi, T., Atrazine-selective polymers prepared by molecular imprinting of trialkylmelamines as dummy template species of atrazine, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1810-1813.

<sup>133</sup> Lanza, F.; Sellaergren, B., The application of molecular imprinting technology to solid phase extraction. *Chromatographia.* **2001**, *53*, 599-611.

enfermé au sein de cavités qui ne possèdent aucune ouverture sur le réseau poreux du polymère, rendant ces cavités non accessibles au solvant de lavage. D'autres templates restent peu déplacés de la cavité où ils se trouvent car ils peuvent trop fortement interagir avec la cavité. Mais, au cours de l'étape de recapture et surtout lors du relargage final, le changement de solvant, le temps de contact ou par effet de compétition le template non lavé peut alors sortir de la matrice : on parle de « bleeding ». Alors, il faut trouver la meilleure technique d'extraction du template avant l'étape de recapture. La littérature permet de comparer les méthodes existantes afin de choisir la plus appropriée pour extraire le plus possible le template utilisé.<sup>134</sup> Il existe, aujourd'hui, une autre méthode qui permet de contourner le problème du bleeding que celle qui consiste à trouver la meilleure technique d'extraction. Elle est basée sur l'utilisation d'un analogue de la molécule d'intérêt appelé « dummy-template ». Ce « template factice » doit posséder une structure, une stéréochimie et des groupements fonctionnels similaires à ceux de la molécule d'intérêt. Cette méthode peut être aussi une bonne alternative lorsque la molécule d'intérêt présente une faible solubilité dans le solvant de polymérisation, ou une faible disponibilité commerciale, ou un prix excessivement élevé, ou une instabilité dans les conditions de polymérisation. De nombreux exemples de dummy-template sont donnés sur la Figure 22, aussi bien dans le domaine thérapeutique<sup>135,136</sup> qu'environnemental.<sup>132</sup>

Dans le cadre d'une utilisation des MIPs comme cargos, le problème du bleeding est peu important puisque le principe actif relargé est le même qui a servi à l'impression moléculaire, et le peu de bleeding attendu ne changera pas fondamentalement le taux de principe actif relargué en fonction du temps. Donc, il n'y a aura pas de problèmes de toxicité, en termes de doses libérées. L'intérêt d'utiliser un dummy-template pour créer des cargos polymériques imprimés réside dans l'amélioration de la solubilité de la molécule d'intérêt dans la formulation de pré-polymérisation. Mais, il faut que ce dummy-template soit un dérivé du principe actif qui ne soit pas toxique ou qui puisse redonner le principe actif après bleeding au sein des fluides biologiques (exemple de dérivé ester de nucléoside). Ce type de dérivé a déjà été utilisé dans la synthèse de MIPs, sélectif de la 7-méthylguanosine, en tant qu'adsorbant en extraction sur phase solide, afin de pouvoir utiliser le chloroforme comme solvant porogène.<sup>137</sup> Pour ce qui est de la ribavirine, l'utilisation de dérivés trialkylé du ribose de ce médicament a déjà été répertoriée dans la littérature comme non toxique chez la souris jusqu'à une concentration de 50 mg.kg<sup>-1</sup>.<sup>138</sup>

---

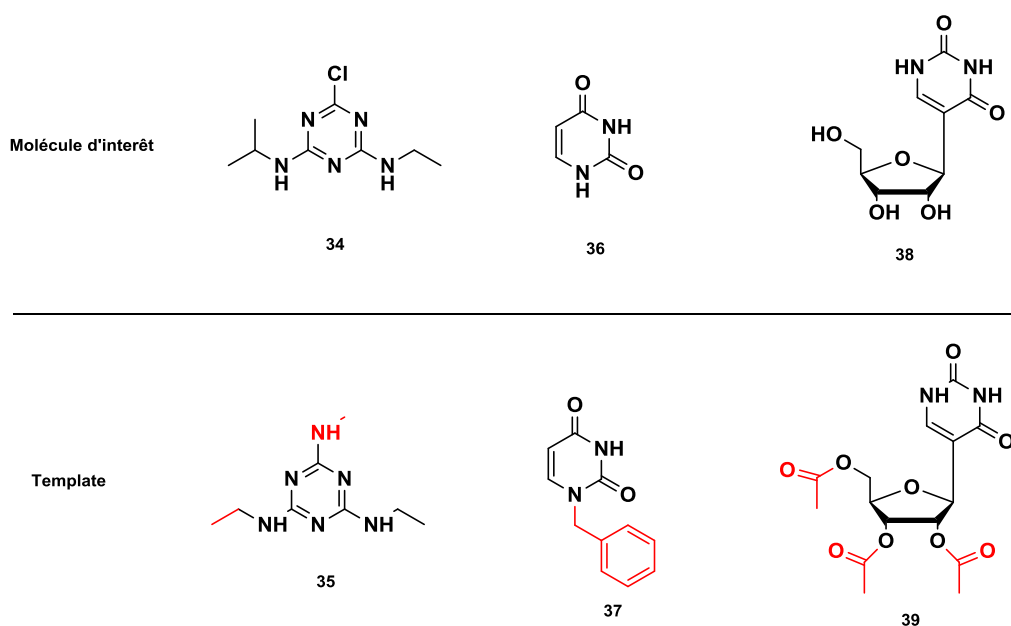
<sup>134</sup> Ellwanger, A.; Berggren, C.; Bayouduh, S.; Crecenzi, C.; Karlsson, L.; Owens, P. K.; Ensing, K.; Cormack, P.; Sherrington, D.; Sellergren, B., Evaluation of methods aimed at complete removal of template from molecularly imprinted polymers, *Analyst*. **2001**, *126*, 784-792.

<sup>135</sup> (a) Andersson, L. I.; Paprica, A.; Arvidsson, T., A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting, *Chromatographia*. **1997**, *46*, 57-62. (b) Manesiotes, P.; Hall, A. J.; Sellergren, B., Improved imide receptors by imprinting using pyrimidine-based fluorescent reporter monomers, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2729-2738.

<sup>136</sup> Krstulja, A.; Lettieri, S.; Hall, A. J.; Roy, V.; Favetta, P.; Agrofoglio, L. A., Tailor-made molecularly imprinted polymer for selective recognition of the urinary tumor marker pseudouridine, *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1700250.

<sup>137</sup> Krstulja, A.; Schutter, C. D.; Favetta, P.; Manesiotes, P.; Agrofoglio, L. A., Artificial receptors for the extraction of nucleoside metabolite 7-methylguanosine from aqueous media made by molecular imprinting, *J. Chromatogr. A*. **2014**, *1365*, 12-18.

<sup>138</sup> Bhagrath, M.; Sidwell, R.; Czako, K.; Seyda, K.; Anderson, W.; Bodor, N.; Brewster, M. E., Improved Delivery through Biological Membranes. Synthesis, Characterization and Antiviral Activity of a Series of Ribavirin Chemical Delivery Systems: 5 and Carboxamide Derivatives, *Antivir. Chem. Chemother.* **1991**, *2*, 265-286.



**Figure 22 : Exemples de dummy-templates utilisés dans le développement des MIPs : la trialkylmélamine (35) pour la recapture de l'atrazine (34)<sup>132</sup>, le N-benzyluracile (37) pour la recapture de l'uracile (36)<sup>135</sup>, et la 2',3',5'-tri-O-acétyl pseudouridine (39) pour la recapture de la pseudouridine (38)<sup>136</sup>.**

### III.1.2. Choix des monomères fonctionnels et stœchiométrie du complexe de pré-polymérisation

Le choix des monomères fonctionnels est très important dans la synthèse des MIPs. En effet, de ce choix dépend la stabilité du complexe de pré-polymérisation, ce qui a un impact direct sur la capacité de reconnaissance du MIP. De plus, étant donné que ces monomères vont servir à synthétiser des MIP-DDS, ils doivent être capables de créer des polymères ayant des profils de biocompatibilité et de toxicité acceptables. Les monomères fonctionnels doivent complexer le template *via* des interactions de type liaison hydrogène, ionique ou van der Waals. Il existe un grand nombre de monomères fonctionnels disponibles commercialement qui peuvent être utilisés<sup>104</sup> (Figure 23).

Le monomère fonctionnel le plus utilisé est le MAA pour ses propriétés donneur et accepteur de liaison hydrogène mais aussi pour sa capacité à développer des interactions ioniques à un pH supérieur à son pKa (4,7). Ce monomère a démontré son utilité dans la synthèse de MIPs pour la recapture des stéroïdes,<sup>139</sup> des nucléotides,<sup>140</sup> des peptides<sup>141</sup> et des acides aminés.<sup>142</sup> Cependant, pour certains templates, les MIPs ont montré une meilleure sélectivité en utilisant l'AAM (45) comme monomères fonctionnels.<sup>143</sup> En effet, l'aptitude de l'AAM (45) a développé des liaisons hydrogène plus forte que le MAA (19) a été largement démontré, notamment dans des solvants

<sup>139</sup> Dong, H.; Tong, A. J.; Li, L. D., Syntheses of steroid-based molecularly imprinted polymers and their molecular recognition study with spectrometric detection, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2003**, *59*, 279-284.

<sup>140</sup> Spivak, D. A.; Shea, K. J., Binding of nucleotide bases by imprinted polymers, *Macromolecules.* **1998**, *31*, 2160-2165.

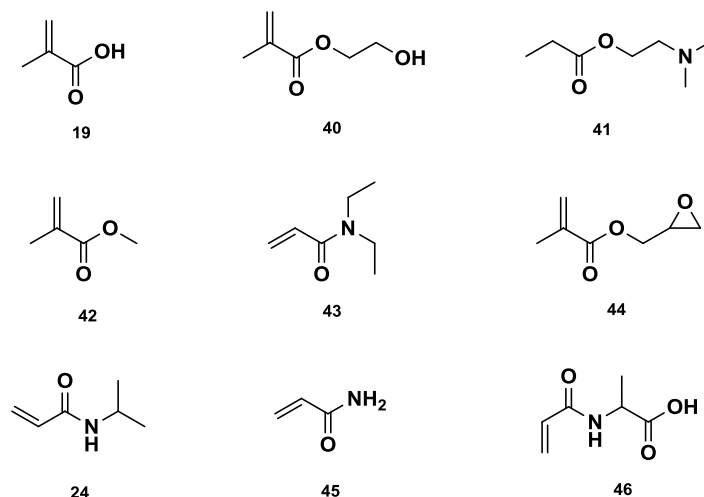
<sup>141</sup> Kempe, M., Oxytocin receptor mimetics prepared by molecular imprinting, *Lett. Pept. Sci.* **2000**, *7*, 27-33.

<sup>142</sup> Sellergren, B.; Ekberg, B.; Mosbach, K., Molecular imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers: Demonstration of substrate-and enantio-selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino acid derivatives. *J. Chromatogr. A.* **1985**, *347*, 1-10.

<sup>143</sup> Bunte, G.; Hürttlen, J.; Pontius, H.; Hartlieb, K.; Krause, H., Gas phase detection of explosives such as 2, 4,6-trinitrotoluene by molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *591*, 49-56.

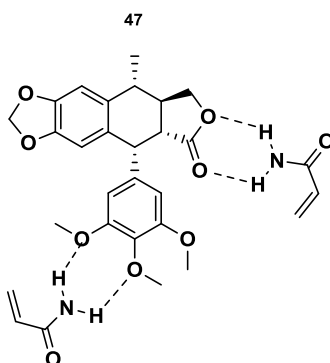


polaires ou protiques. Ce phénomène a été montré par Yu et Mosbach qui l'expliquent par les valeurs plus élevées de la constante diélectrique et du moment dipolaire du groupement amide par rapport au groupement carboxylique<sup>144</sup>. Un autre facteur pouvant favoriser l'emploi de l'AAM (**45**) est que sa fonction amide primaire peut complexer conjointement deux sites accepteurs d'hydrogène d'une molécule template. Ceci a été vu pour la podophyllotoxine (**47**) avec laquelle l'AAM forme un complexe plus stable qu'avec le MAA<sup>145</sup> (Figure 24).



**Figure 23 : Différents monomères fonctionnels utilisés dans la synthèse des MIP-DDS : (19) acide méthacrylique (MAA), (40) 2-hydroxyléthyl méthacrylate, (41) 2-(*N,N*-diméthylamino)éthyl méthacrylate, (42) méthyl méthacrylate, (43) *N,N*-diéthylacrylamide, (44) Glycidyl méthacrylate, (24) *N*-isopropylacrylamide (NIPAm), (45) acrylamide (AAM), (46) *N*-acryloylalanine.<sup>104</sup>**

En résumé, il existe beaucoup de monomères fonctionnels différents utilisés dans la littérature spécifique aux MIPS, mais le plus fréquemment choisi est le MAA. Celui-ci est souvent remplacé par l'AAM lorsque le milieu est polaire ou protique ou par le HEMA (**26**) lorsqu'il s'agit de l'impression des molécules hydrophiles.



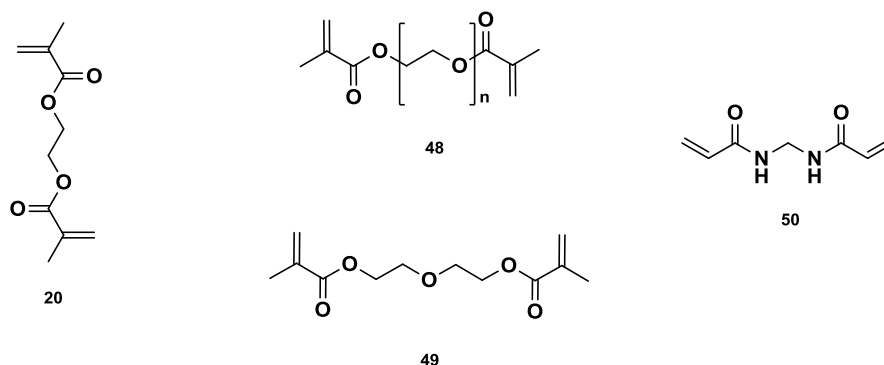
**Figure 24 : Structure donnée du complexe formé par l'AAM (**45**) et la podophyllotoxine (**47**).**

<sup>144</sup> Yu, C.; Mosbach, K., Molecular Imprinting Utilizing an Amide Functional Group for Hydrogen Bonding Leading to Highly Efficient Polymers, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4057-4064.

<sup>145</sup> Zhu, X.; Cao, Q.; Hou, N.; Wang, G.; Ding, Z., The preparation and the recognition property of molecularly imprinted polymer of podophyllotoxin, *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *561*, 171-177.

### III.1.3. Agents réticulants

Le choix de l'agent réticulant reste un élément qui a de l'importance dans la mesure où il présente 70 à 90 % de la masse finale des MIPs (à l'exception des hydrogels). L'agent réticulant permet de préserver la structure des sites de reconnaissances et confère au polymère une certaine rigidité. Il rend le polymère résistant aux conditions de température, de pression et participe à son inertie envers les acides et les bases.<sup>72</sup> Plusieurs agents réticulants permettant l'obtention de MIPs biocompatibles sont présentés dans la Figure 25.<sup>104</sup>



**Figure 25 : Différents agents réticulants utilisés dans la synthèse des MIP-DDS :** (20) éthylène glycol diméthacrylate, (48) poly (éthylène glycol) diméthacrylate, (49) diéthylène glycol diméthacrylate, (50) *N,N'*-méthylène bisacrylamide.<sup>104</sup>

La rigidité des MIPs est un paramètre important car elle permet d'avoir une bonne conservation et une bonne fidélité des sites de reconnaissance comme dans le cas des séparations chirales.<sup>146</sup> Plusieurs études indiquent que le pourcentage de réticulation optimal d'un polymère monolithique doit représenter 50 à 80 % de la masse de ce polymère, afin de garantir une bonne accessibilité aux cavités. De plus, la nature du monomère réticulant conditionne la mouillabilité du polymère. Il s'agit de la facilité avec laquelle une goutte de liquide s'étale sur la surface du polymère. L'agent réticulant le plus utilisé étant l'éthylène glycol diméthacrylate ou EGDMA (20), le polymère synthétisé possède plutôt une nature apolaire et sa surface n'a pas une grande mouillabilité. Aussi lorsqu'il s'agit de la synthèse des MIPs dans des solvants polaires tels que l'eau ou le méthanol, des agents réticulants hydrophiles tels que le le *N,N'*-méthylènebisacrylamide (50) ou MBA, les polyéthylène glycol diméthacrylate (48) ou le pentaérythritol triacrylate ou PETA sont généralement choisis<sup>147,148</sup>. Il est démontré, aussi, que l'agent de réticulation a un fort impact sur la porosité du polymère. Pour un pourcentage d'agent réticulant donné (35 %), il a été montré que plus la longueur de la chaîne carbonée contenue dans le cross-linker est courte plus on favorise la formation des macropores au sein de polyamides.<sup>148</sup> Ceci est varié surtout dans des solvants polaires

<sup>146</sup> Wulff, G.; Kemmerer, R.; Vietmeier, J.; Poll, H. G., Chirality of vinyl polymers - the preparation of chiral cavities in synthetic-polymers, *New. J. Chem.* **1982**, 6, 681-687.

<sup>147</sup> Suedee, R.; Seechamnanturakit, V.; Canyuk, B.; Ovatlarnporn, C.; Martin, G. P., Temperature sensitive dopamine-imprinted (*N,N'*-methylene-*bis*-acrylamide cross-linked) polymer and its potential application to the selective extraction of adrenergic drugs from urine, *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1114, 239-249.

<sup>148</sup> Shea, K. J.; Stoddard, G. J.; Shavelle, D. M.; Wakui, F.; Choate, R. M., Synthesis and characterization of highly crosslinked poly(acrylamides) and poly(methacrylamides). A new class of macroporous polyamides, *Macromolecules.* **1990**, 23, 4497-4507.

tels que l'eau ou le méthanol. Généralement, la surface spécifique et le volume de pore augmente tandis que la taille de pore diminue quand la densité en agent réticulant dans la formulation s'accroît. Plus le pourcentage de cross-linker est élevé plus il est généré de micro/mésopores au sein de la matrice polymérique.<sup>149</sup>

En résumé l'agent réticulant a un effet sur la rigidité, la mouillabilité et la porosité du polymère et permet de préserver la forme des cavités de reconnaissance spécifique après extraction du template. Mais, le solvant porogène joue aussi un rôle crucial dans la morphologie du polymère et plus spécifiquement dans la taille des pores et donc la surface spécifique du polymère.

### III.1.4. Le solvant porogène

Le solvant porogène ou solvant de polymérisation est très important dans la synthèse des MIPs puisqu'il a une influence sur les propriétés morphologiques et sélectives des MIPs. Tout d'abord, le solvant porogène, selon sa nature et sa proportion dans la formulation, a un effet direct sur la porosité du polymère. Rappelons qu'il existe trois types de pores, les micropores ( $\phi < 2$  nm), les mésopores ( $2 < \phi < 50$  nm) et les macropores ( $\phi > 50$  nm). Plusieurs études ont mis en évidence l'influence du solvant porogène sur la taille et le nombre des pores.<sup>150,151</sup> En général, une plus grande quantité d'un agent porogène dans lequel les constituants de la formulation sont très solubles augmente la surface et la microporosité, alors qu'une quantité plus élevée d'un agent porogène dans lequel ces mêmes constituants sont peu solubles augmente la macroporosité, ce qui diminue la surface spécifique.

Un autre paramètre à prendre en compte est ce qui est appelé l'effet de solvant. En effet, il a été montré que la reconnaissance d'un MIP envers son template est améliorée lorsque le solvant de recapture est identique à celui utilisé lors de la polymérisation.<sup>152</sup> Les origines de la spécificité dans le polymère imprimé sont possiblement issues du positionnement des groupes fonctionnels complémentaires qui sont ensuite bloqués de manière covalente au sein de la cavité pendant la polymérisation. Les propriétés de gonflement du solvant de synthèse peuvent donc jouer un rôle crucial en fixant la forme de la cavité et les distances intermoléculaires présentes au sein de la poche au cours de la formation du polymère. Afin de recréer et de maintenir ces formes et ces distances, il est possible que les conditions de recapture optimales exigent des conditions de gonflement identiques ou très proches de celles utilisées pour la polymérisation.

---

<sup>149</sup> Mane, S.; Ponrathnam, S.; Chavan, N., Effect of Chemical Cross-linking on Properties of Polymer Microbeads: A Review, *Can. J. Chem.* **2015**, *3*, 473-485.

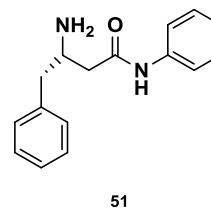
<sup>150</sup> Sellergren, B.; Shea, K. J., Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers, *J. Chromatogr. A.* **1993**, *635*, 31-49.

<sup>151</sup> Luliński, P.; Maciejewska, D., Impact of functional monomers, cross-linkers and porogens on morphology and recognition properties of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylamine imprinted polymers. *Mater. Sci. Eng. C.* **2011**, *31*, 281-289.

<sup>152</sup> Spivak, D.; Gilmore, M. A.; Shea, K. J., Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4388-4393.

**Tableau 3 : Exemple de la variation des tailles de pores en faisant varier le solvant porogène pour la synthèse d'un MIP spécifique de la L-phénylalanine anilide (51).**<sup>151</sup>

Solvant porogène	Taille moyenne des pores (nm)
Acétonitrile	9,4
Chloroforme	9,1
Benzène	7,8
Diméthylformamide	5,2
Tétrahydrofurane	5,2



Les paramètres du solvant porogène influent aussi sur la nature et la force des interactions entre la molécule template et les monomères fonctionnels lors de la formation du complexe de pré-polymérisation. Ces interactions mises en jeu dans la formation du complexe ne devraient pas, dans l'absolu, être rompues par compétition en interagissant avec le solvant porogène. Connaître les différents paramètres tel que la constante diélectrique  $\epsilon$ , le paramètre de solubilité représentant les forces de polarité de Keesom  $\delta_p$ , le paramètre de solubilité  $\delta_h$  correspondant aux forces de liaison hydrogène, et le paramètre de solubilité  $\delta_d$  qui représente les forces dites de « dispersion » de London, sont très importants dans le choix du solvant de polymérisation<sup>153</sup>. Dans le tableau 4 sont répertoriés les paramètres cités pour les solvants les plus utilisés dans la polymérisation de MIPs.

Le type d'interaction permettant des liaisons faibles entre les monomères et le template vont donc conditionner le choix du solvant. Si des liaisons hydrogène stabilise le complexe de pré-polymérisation, il sera judicieux de choisir un solvant ayant un  $\delta_h$  le plus faible possible. La limitation de ce raisonnement se trouve dans la solubilité des constituants du mélange avant polymérisation. Il faut bien sûr que le solvant ne soit pas une gêne pour la stabilité du complexe de pré-polymérisation mais qu'il soit capable de le solubiliser au même titre que l'agent de réticulation et l'initiateur.

De plus, le choix du solvant pour la synthèse des MIP-DDS n'est pas conditionné que par ses paramètres physico-chimiques mais aussi par sa toxicité. En effet, pour la synthèse de ce genre de MIPs, il est plus que souhaité de se limiter à des solvants « biocompatibles » comme l'eau, l'éthanol ou montrant une non toxicité à faible concentration comme l'acétonitrile ou le DMSO.

<sup>153</sup>Renkecz, T.; László, K.; Horváth, V.; Molecularly imprinted microspheres prepared by precipitation polymerization at high monomer concentrations, *Mol. Impr.* **2014**, 2, 1-17.

**Tableau 4 : Constantes diélectriques et paramètres de solubilité de différents solvants utilisés pour la synthèse des MIPs.<sup>154</sup>**

Solvant	$\epsilon$ (20°C)	$\delta_p$	$\delta_h$	Solvant	$\epsilon$ (20°C)	$\delta_p$	$\delta_h$
Eau	78,5	47,9	42,3	Toluène	2	18,2	2
Méthanol	32,7	29,7	22,3	Diméthylsulfoxyde	47	24,5	10,2
Ethanol	24,6	26	19,4	Diméthylformamide	37	24,8	11,3
Acétonitrile	37,5	24,3	6,1	Dichlorométhane	8,9	19,8	6,1
chloroforme	4,8	19	5,7	Tétrahydrofurane	7,6	18,6	8

### III.2. Les différentes formes des polymères imprimés.

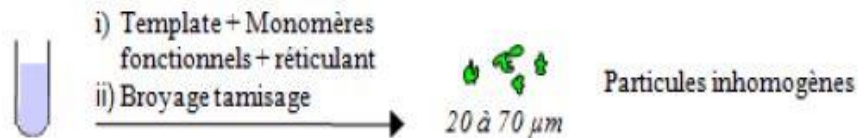
Selon les applications voulues, différentes formes de polymères imprimés peuvent être obtenues, par exemple, des monolithes, des micro/nanoparticules, des films, des fibres... C'est l'un des plus importants avantages de ce type de matériaux. Ces matériaux sont majoritairement créés par polymérisation radicalaire libre ou contrôlée selon différentes techniques telles que la polymérisation en masse ou bulk, en suspension, en émulsion, de type core-shell, par multi-step swelling ou par précipitation (Figure 26).

Pérez-Moral *et al.* ont comparé ces techniques de polymérisation pour l'impression moléculaire du propanolol (**38**) afin de les corrélérer avec la morphologie et la taille des particules obtenues.<sup>155</sup> Les résultats issus de leur article sont montrés sur la Figure 27.

<sup>154</sup> Rosset, R.; Caude, M.; Jardy, A., *Chromatographie en phase liquide et supercritique*, Elsevier / Masson : **1991**.

<sup>155</sup> Pérez-Moral, N.; Mayes, A. G., Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods, *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *504*, 15-21.

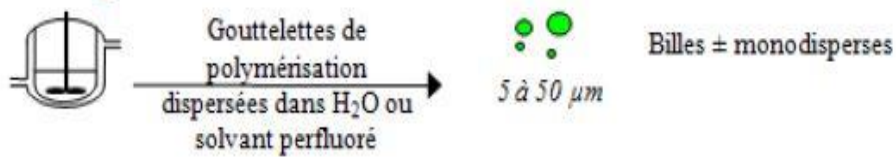
### 1- Polymérisation monolithique



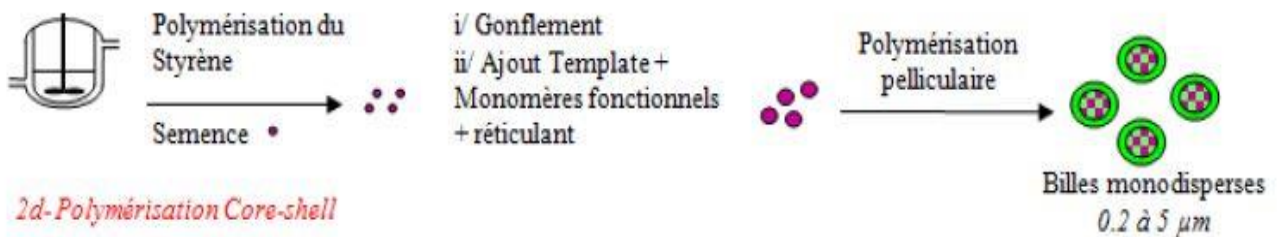
### 2a- Polymérisation en précipitation



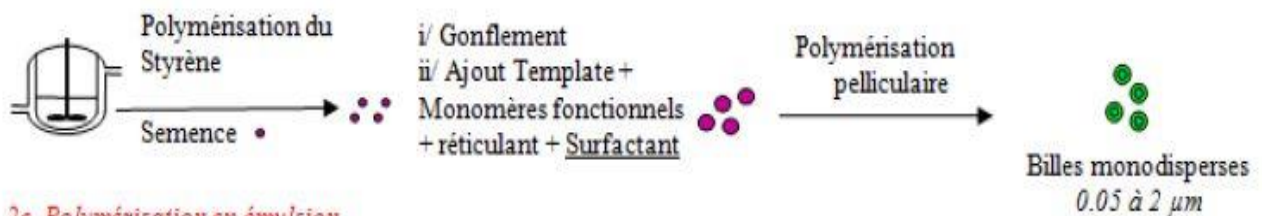
### 2b- Polymérisation en suspension



### 2c- Polymérisation multi-step swelling



### 2d- Polymérisation Core-shell



### 2e- Polymérisation en émulsion

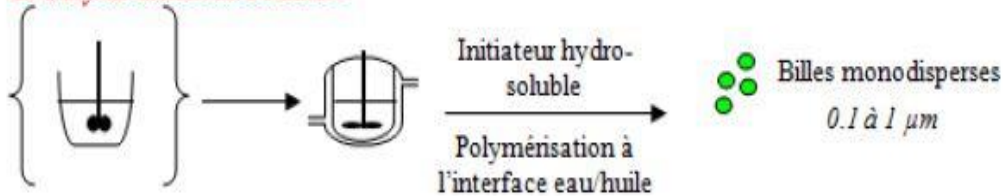
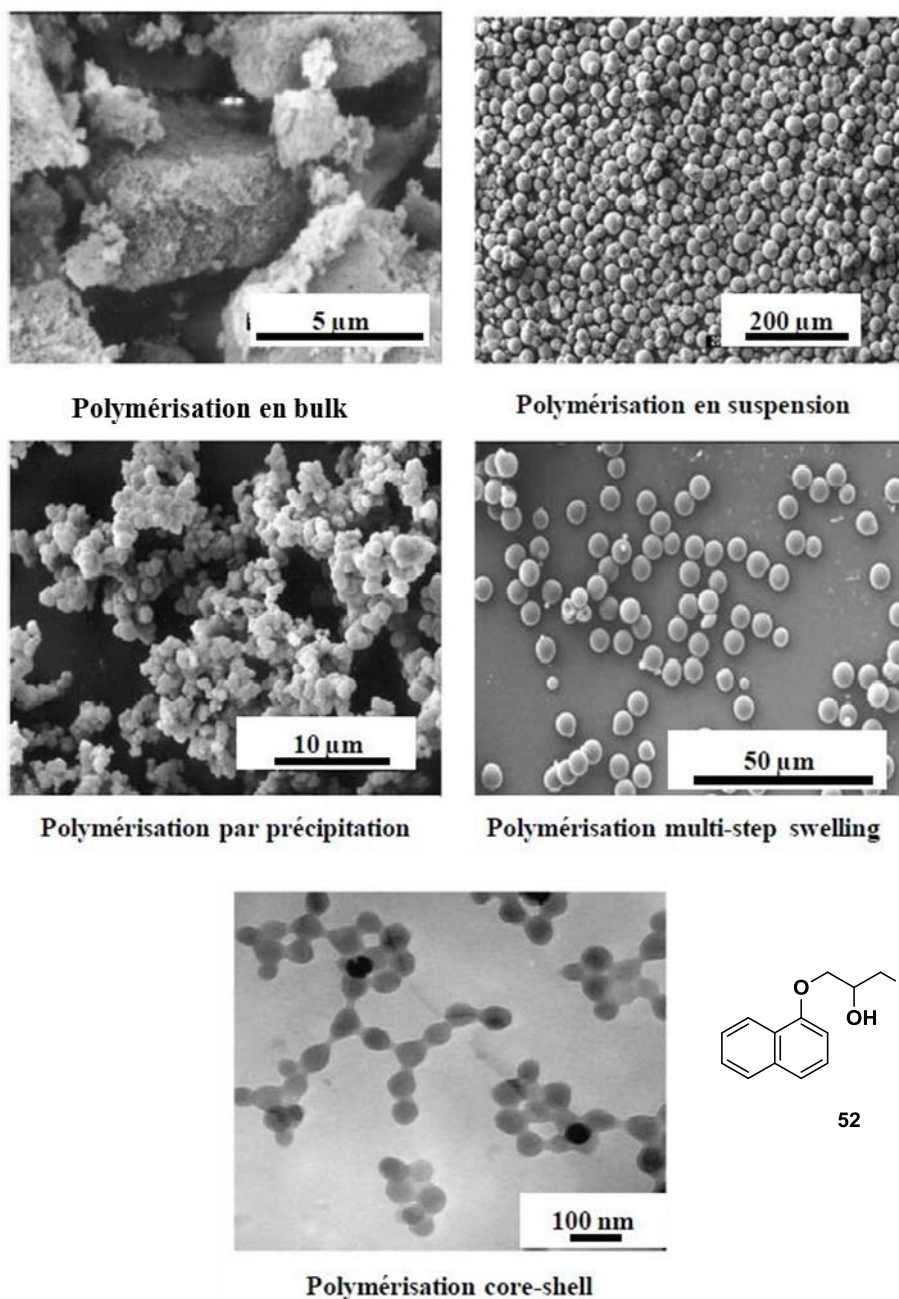


Figure 26 : Les différentes techniques de polymérisation pour l'obtention de polymères imprimés (Adapté de Jegourel, D).<sup>156</sup>

<sup>156</sup> Jegourel, D. Etude exploratoire de l'impression moléculaire polymère de l'uridine sous format monolithique et submicronique. Thèse de doctorat de l'Université d'Orléans, Orléans, 2008.



**Figure 27** : Clichés obtenus par microscope électronique à balayage (MEB) et microscope électronique à transmission (MET) des polymères imprimés pour le (*R,S*)-propranolol (**52**) suivant différentes techniques de polymérisation.<sup>155</sup>

### III.2.1. Polymère monolithique ou en bulk

La polymérisation monolithique dite en masse ou en bulk est la technique la plus ancienne et la plus utilisée pour la synthèse des MIPs du fait de sa simplicité de mise en œuvre. La procédure consiste à mélanger le template, les monomères fonctionnels, l'agent réticulant et l'initiateur dans un petit volume de solvant. Après la polymérisation, le polymère obtenu est broyé puis tamisé. L'étape de lavage qui vient après permet d'extraire la molécule template rendant ainsi le MIP prêt à être exploiter. Cette technique permet d'obtenir des particules micrométriques irrégulières et inhomogènes de taille moyenne comprise généralement entre 25 et 60  $\mu\text{m}$ . Mais les particules produites montrent une sélectivité et une capacité moindres que les particules sphériques. Car, en

raison du broyage et du tamisage du monolithe formé, les sites de reconnaissance ou cavités sélectives sont en partie irrémédiablement détruites par ces dommages physiques. Le mieux est donc de synthétiser des particules, principalement sphériques, directement sans passer par l'étape de broyage. C'est pour cela que d'autres stratégies de synthèse, empruntées à la chimie macromoléculaire, incluant la suspension, la dispersion et la précipitation, sont de plus en plus utilisées dans le domaine des MIPs.<sup>157</sup>

### III.2.2. Polymères sphériques

La synthèse des MIPs sphériques (nanosphères ou microsphères) permet l'obtention de particules homogènes (en termes de forme et de taille) nécessaires pour améliorer la répétabilité au niveau de la reconnaissance de l'analyte.

#### a) Polymérisation par précipitation

La polymérisation par précipitation<sup>158</sup> est une technique très semblable à la polymérisation monolithique. Cette technique consiste à polymériser les réactifs du mélange réactionnel dans un grand volume de solvant qui est beaucoup plus important que celui des réactifs. Les oligomères formés ont le temps de croître et au lieu de précipiter directement comme dans le cas des polymères monolithiques, ils s'agglutinent en formant des sphères. Les billes obtenues peuvent être de même taille, dites monodisperses ou de différentes tailles dites polydisperses. La taille des billes est contrôlée par plusieurs paramètres tel que la température, le volume et la nature du solvant porogène, la vitesse d'agitation... Plusieurs études ont montré l'efficacité de microsphères polymériques imprimées synthétisées par précipitation en termes de sélectivité et capacité.<sup>159,160</sup> Cette technique ne nécessite pas l'ajout d'un additif ou de stabilisants ce qui la rend une technique de choix pour la synthèse des MIP-DDS. Cependant, du fait de la dilution du template et des monomères fonctionnels, les interactions existantes au sein du complexe de pré-polymérisation sont affaiblies par cette méthode.

#### b) Polymérisation en émulsion

Cette technique peu utilisée consiste à polymériser le mélange dans une émulsion d'huile dans l'eau, avec l'huile (généralement une phase organique) contenant le template, les monomères fonctionnels et l'agent réticulant. L'initiateur se trouve généralement dans la phase continue, l'eau. Les gouttelettes formées sont stabilisées par des surfactants.<sup>161</sup> Ainsi, pour obtenir une émulsion, il est nécessaire de procéder à une agitation mécanique permettant d'homogénéiser le milieu. Cette technique permet généralement d'obtenir des sphères nanométriques. Plusieurs variétés de polymérisation en émulsion existent telles que la mini-émulsion,<sup>162,163</sup> la microémulsion,<sup>164,165</sup>

---

<sup>157</sup> Mayes, A. G., Chapter 12 Polymerisation techniques for the formation of imprinted beads. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Sellergren, B., Ed. Elsevier: **2000**, 23, 305-324.

<sup>158</sup> Kempe, H.; Kempe, M., Novel Method for the Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Bead Libraries, *Macromol. Rapid. Commun.* **2004**, 25, 315-320.

<sup>159</sup> Ye, L.; Cormack, P. A. G.; Mosbach, K., Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay, *Anal. Comm.* **1999**, 36, 35-38.

<sup>160</sup> Sambe, H.; Hoshina, K.; Moaddel, R.; Wainer, I. W.; Haginaka, J., Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization, *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1134, 88-94.

<sup>161</sup> Kumbar, S.; Laurencin, C.; Deng, M., *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. 2014: Elsevier Science.

<sup>162</sup> Asua, J. M., Miniemulsion polymerization, *Prog. Polym. Sci.* **2002**, 27, 1283-1346.



l'émulsion inverse<sup>79</sup> et l'émulsion core-shell.<sup>166</sup> Cependant, l'utilisation des surfactants et des stabilisants peut interférer dans le processus d'impression, polluer la surface du polymère et rendre le lavage du polymère long.

### c) Polymérisation en suspension

Cette technique consiste à créer une dispersion de gouttelettes, sous forte agitation, contenant le template, les monomères fonctionnels, l'agent réticulant, l'initiateur et le solvant porogène (solvant organique) dans une phase continue. Chaque gouttelette forme un microréacteur dans lequel se déroule la polymérisation. Ces gouttelettes sont stabilisées par des surfactants et la phase continue est généralement aqueuse. Cependant, dans le cas de l'approche non-covalente, l'eau peut être substituée par des solvants perfluorés afin d'éviter que l'eau n'interfère dans la stabilité du complexe de pré-polymérisation.<sup>167</sup> Mais, ces solvants fluorés, du type perfluoro(méthylcyclohexane), nécessitent souvent une étape de purification préalable à leur utilisation, car souvent de qualité technique. Leur utilisation reste très onéreuse.

Malgré ces quelques inconvénients, cette technique de polymérisation a permis de développer des méthodes assez originales pour, par exemple, synthétiser des billes magnétiques imprimées.<sup>168,169</sup> Cependant, cette technique est assez délicate à mettre en œuvre car elle nécessite d'optimiser les solvants, les surfactants et même l'initiateur pour obtenir des billes monodisperses.<sup>170</sup>

## III.2.3. Les hydrogels

Au cours des dernières années, de grands efforts ont été déployés pour développer des matrices imprimées dans le domaine des DDS avec une certaine flexibilité des chaînes. Jusque-là, la majorité des polymères imprimés rapportés possédaient un degré de réticulation élevé et donc une mobilité de chaîne limitée. Or, la technologie des MIPs voulant mimer les systèmes biologiques, où la reconnaissance se produit dans un environnement aqueux et résulte de nombreuses interactions non covalentes, il a été décidé d'apporter un certain degré de flexibilité aux MIPs. Le but était de transférer aux polymères à empreinte moléculaire une grande partie de la théorie concernant la mémoire conformationnelle dans les macromolécules biologiques, telles que les protéines. Ainsi, la conception de matrices imprimées avec une certaine mobilité des chaînes polymériques a amené à étudier les MIPs hydrogels.

---

<sup>163</sup> Capek, I.; Chern, C. S., Radical polymerization in direct mini-emulsion systems, *New Polymerization Techniques and Synthetic Methodologies*, Springer. **2001**, 101-165.

<sup>164</sup> Candau, F., Polymerization in microemulsions. Polymerization in organized media, **1992**, 215-282.

<sup>165</sup> Capek, I., Radical polymerization of polar unsaturated monomers in direct microemulsion systems, *Adv. Colloid. Interface. Sci.* **1999**, *80*, 85-149.

<sup>166</sup> Pérez, N.; Whitcombe, M. J.; Vulfson, E. N., Molecularly imprinted nanoparticles prepared by core-shell emulsion polymerization, *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *77*, 1851-1859.

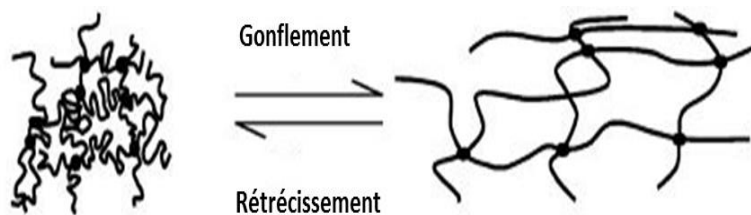
<sup>167</sup> Mayes, A. G.; Mosbach, K., Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3769-3774.

<sup>168</sup> J. Ansell, R.; Mosbach, K., Magnetic molecularly imprinted polymer beads for drug radioligand binding assay, *Analyst.* **1998**, *123*, 1611-1616.

<sup>169</sup> Lu, S.; Cheng, G.; Pang, X., Preparation of molecularly imprinted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/P(St-DVB) composite beads with magnetic susceptibility and their characteristics of molecular recognition for amino acid, *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *89*, 3790-3796.

<sup>170</sup> Ansell, R. J.; Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers by suspension polymerization in perfluorocarbon liquids with emphasis on the influence of porogenic solvent, *J. Chromatogr. A.* **1997**, *787*, 55-66.

Les hydrogels sont des réseaux de polymères hydrophiles qui ont suscité un grand intérêt dans le domaine de la recherche en tant que dispositifs à libération contrôlée en raison de leur structure physique et chimique tridimensionnelle réglable (Figure 28), de leurs propriétés mécaniques spécifiques, de leur forte teneur en eau et de leur biocompatibilité.<sup>171</sup>



**Figure 28 : Gonflement et rétrécissement des chaînes d'hydrogels sous l'effet de la solvation ou des stimuli.**<sup>172</sup>

Or, l'utilisation des MIPs comme DDS a apporté des restrictions croissantes dans l'utilisation des solvants organiques. Ce qui a conduit au développement de nouvelles méthodes plus écologiques pour la préparation des MIPs. Certains efforts ont été faits dans la synthèse de polymères imprimés en milieu aqueux. Cependant, il présente de nombreux problèmes car la concentration élevée de molécules d'eau affaiblit les interactions entre le template et les monomères dans le complexe de pré-polymérisation dans la matrice au cours de la recapture, diminuant la sélectivité du MIP pour la molécule modèle.<sup>173</sup> En choisissant judicieusement le type d'interactions, des MIPs hydrogels ont été synthétisés en utilisant des monomères fonctionnels susceptibles de stabiliser les complexes par des interactions hydrophobes, telles que les cyclodextrines,<sup>174</sup> la coordination de métaux<sup>175</sup> ou la création de paire d'ions.<sup>176</sup> Mais, il a été aussi démontré que des hydrogels imprimés avec une petite molécule organique polaire neutre montrent un facteur d'impression non négligeable. Ce fait est illustré par Parmpi *et al.* qui ont montré lors de l'impression d'un hydrogel, avec le glucose comme template, une bonne sélectivité par rapport à l'hydrogel non imprimé, une capacité très élevée pour le MIP et une spécificité plus importante envers le glucose que pour le fructose<sup>177</sup>. Le second écueil se présentant dans l'utilisation des hydrogels pour les MIPs DDS vient de la flexibilité du réseau polymérique de l'hydrogel. En effet, l'augmentation de la flexibilité des chaînes polymériques, induit par l'effet de gonflement et le peu de réticulation, déformerait les cavités créées par le template et ferait chuter la sélectivité du polymère comparativement aux MIPs hautement réticulés. Les fluctuations de densité dans le réseau de polymères créent des régions, ou des microgels, de réticulation localisée plus élevée, qui

<sup>171</sup> Langer, R.; Peppas, N. A., *Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology, AIChE. J.* **2003**, 49, 2990-3006.

<sup>172</sup> Byrne, M. E.; Salián, V., *Molecular imprinting within hydrogels II: Progress and analysis of the field, Int. J. Pharm.* **2008**, 364, 188-212.

<sup>173</sup> Yu, C.; Mosbach, K., *Insights into the origins of binding and the recognition properties of molecularly imprinted polymers prepared using an amide as the hydrogen-bonding functional group, J. Mol. Recogn.* **1998**, 11, 69-74.

<sup>174</sup> Asanuma, H.; Akiyama, T.; Kajiya, K.; Hishiya, T.; Komiyama, M., *Molecular imprinting of cyclodextrin in water for the recognition of nanometer-scaled guests, Anal. Chim. Acta.* **2001**, 435, 25-33.

<sup>175</sup> *Acta Biomaterialia* Volume 28, December **2015**, Pages 121-127.

<sup>176</sup> Hoshino, Y.; Ohashi, R. C.; Miura, Y., *Rational design of synthetic nanoparticles with a large reversible shift of acid dissociation constants: Proton imprinting in stimuli responsive nanogel particles, Adv. Mater.* **2014**, 26, 3718-3723.

<sup>177</sup> Parmpi, P.; Kofinas, P., *Biomimetic glucose recognition using molecularly imprinted polymer hydrogels, Biomaterials.* **2004**, 25, 1969-1973.

contiennent une zone d'impression efficace et une rigidité appropriée pour produire une spécificité de la reconnaissance adéquate.<sup>178</sup> Aujourd'hui, la présence de cavités spécifiques au sein d'hydrogels imprimés a été démontrée aussi bien pour des protéines comme l'hémoglobine,<sup>179</sup> que des polluants organiques<sup>180</sup> ou que des molécules pharmaceutiques.<sup>181</sup>

En résumé, même avec un faible taux de réticulation, les hydrogels présentent un intérêt pour la technique de l'impression moléculaire. Cette dernière est efficace même pour les molécules polaires dans un solvant aqueux. L'hydrogel permet d'augmenter l'accessibilité aux zones plus réticulées où se trouvent les sites de reconnaissance et ainsi accroître leur capacité par rapport à un MIP rigide. Ils ont aussi l'avantage de pouvoir mimer des conditions biologiques notamment au niveau de leur propriété d'adsorption, d'où leur utilisation pour des composés bioactifs. Cependant, malgré l'obtention d'hydrogels sélectifs et rétectifs, leur application à des niveaux industriels reste pour l'instant limitée du fait d'un format peu approprié.

## IV. Caractérisation des polymères imprimés

### IV.1. Stœchiométrie

Sans tenir compte de la procédure appliquée, la préparation des MIPs nécessite la copolymérisation de complexes template-monomères fonctionnels avec des proportions d'agents de réticulation, et l'élimination subséquente du template afin de créer des cavités réceptrices vacantes, disponibles pour la recapture du template et/ou des analogues structurellement apparentés. Il est donc important de choisir de manière adéquate les monomères fonctionnels, généralement des monomères à base d'acrylate, de styrène et de silane, en tenant compte de leur aptitude à interagir de manière réversible avec le template. La nature et la proportion des monomères et du solvant déterminent fortement l'efficacité de l'empreinte. Idéalement, toutes les molécules modèles devraient être « entourées » par les monomères fonctionnels en formant des complexes stables. Ainsi, toutes les cavités auront la même composition et par conséquent la même affinité de liaison. Cependant, cette idéalité n'est pas facile à atteindre dans la pratique. En effet, la littérature, en l'approche non covalente, rapporte majoritairement l'utilisation des monomères fonctionnels dans un ratio molaire de 4:1 par rapport à la molécule cible ou à un excès plus important. Ces ratios élevés conduisent à l'existence concomitante de complexes de stœchiométries différentes ; il y a ceux avec la stœchiométrie optimale, spécifique à chaque modèle de paire template:monomère fonctionnel, ceux dans lesquels le monomère est en excès et ceux avec un nombre de monomères insuffisant. Le résultat final est la coexistence dans le MIP d'un petit nombre de cavités ayant une affinité de liaison

---

<sup>178</sup> Byrne, M. E.; Park, K.; Peppas, N. A., Molecular imprinting within hydrogels, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 149-161.

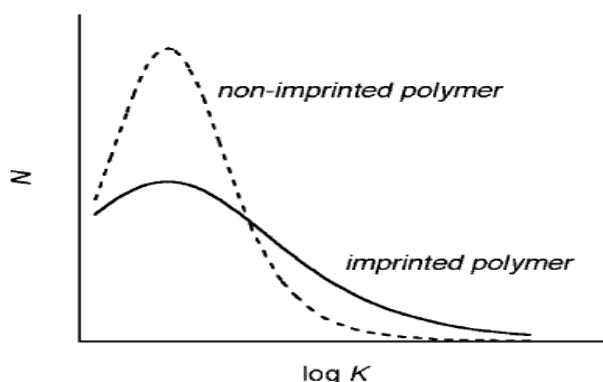
<sup>179</sup> Xia, Y. Q.; Guo, T. Y.; Song, M.D.; Zhang, B. H.; Zhang, B. I., Hemoglobin Recognition by Imprinting in Semi-Interpenetrating Polymer Network Hydrogel Based on Polyacrylamide and Chitosan, *Biomacromolecules*. **2005**, *6*, 2601-2606.

<sup>180</sup> Espinosa-García, B. M.; Argüelles-Monal, W. M.; Hernández, J.; Félix-Valenzuela, L.; Acosta, N.; Goycoolea, F. M., Molecularly Imprinted Chitosan-Genipin Hydrogels with Recognition Capacity toward *O*-Xylene, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3355-3364.

<sup>181</sup> Wang, B.; Liu, M. Z.; Liang, R.; Ding, S. L.; Chen, Z. B.; Chen, S. L.; Jin, S. P., MMTCA Recognition by Molecular Imprinting in Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Based on Poly(acrylic acid) and Poly(vinyl alcohol), *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 417-425.

moyenne élevée (probablement 0,5 à 1% des sites) et un plus grand nombre de cavités à faible affinité de liaison<sup>182,183</sup> (Figure 29). Cette hétérogénéité complique la performance du MIP.

Pour optimiser la qualité des cavités imprimées en évitant l'approche fastidieuse de l'approche « trial-and-error », les MIPs peuvent être conçus rationnellement en effectuant une analyse préliminaire des interactions des templates avec les monomères fonctionnels, dans les conditions auxquelles la synthèse du polymère se produira. Les simulations combinatoires et informatiques permettent un criblage rapide des monomères en bibliothèque ayant la plus grande énergie d'interaction<sup>184,185,186,92,187</sup>. Les techniques analytiques, telles que la spectroscopie Raman et RMN, la spectrophotométrie UV ou la microcalorimétrie, peuvent également fournir des informations sur l'efficacité du processus de complexation et sa stœchiométrie.<sup>188</sup>



**Figure 29 : Distributions des affinités** montrant la plus grande hétérogénéité des polymères imprimés (trait plein) par rapport aux polymères non imprimés (ligne discontinue).<sup>189</sup>

<sup>182</sup> Andersson, H. S.; Karlsson, J. G.; Piletsky, S. A.; Koch-Schmidt, A. C.; Mosbach, K.; Nicholls, I., Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers, II : Influence of monomer–template ratio and sample load on retention and selectivity, *J. Chromatogr. A.* **1999**, *848*, 39-49.

<sup>183</sup> Rampey, A. M.; Umpleby II, R. J.; Rushton, G. T.; Iseman, J. C.; Shah R. N.; Shimizu, K. D., Characterization of the Imprint Effect and the Influence of Imprinting Conditions on Affinity, Capacity, and Heterogeneity in Molecularly Imprinted Polymers Using the Freundlich Isotherm-Affinity Distribution, *Analysis. Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1123-1133.

<sup>184</sup> Batra, D.; Shea, K. J., Combinatorial methods in molecular imprinting, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 434-442.

<sup>185</sup> Dong, W. G.; Yan, M.; Zhang, M. L.; Liu, Z.; Li, Y. M., A computational and experimental investigation of the interaction between the template molecule and the functional monomer used in the molecularly imprinted polymer, *Anal. Chim. Acta.* **2005**, *542*, 186-192.

<sup>186</sup> Pavel, D.; Lagowski, J., Computationally designed monomers and polymers for molecular imprinting of theophylline and its derivatives, Part. I. *Polymer.* **2005**, *46*, 7528-7542.

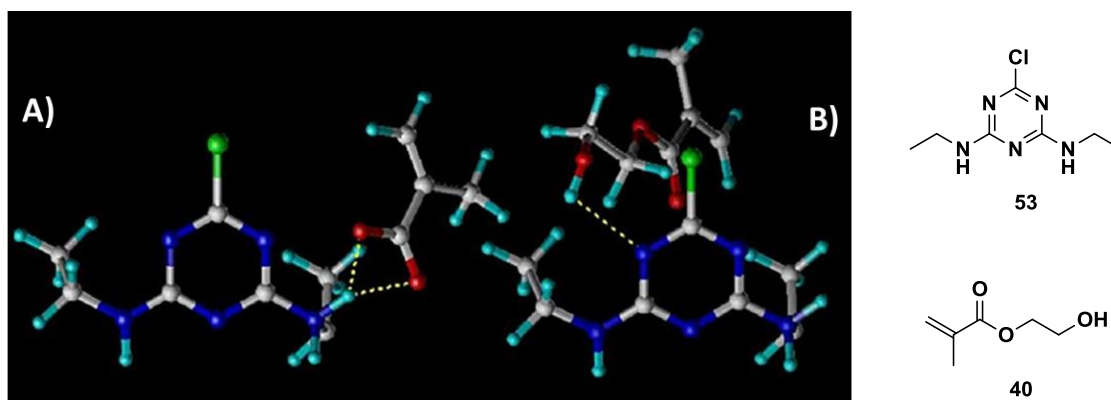
<sup>187</sup> Yanez, F.; Chianella, I.; Piletsky, S. A.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C., Computational modeling and molecular imprinting for the development of acrylic polymers with high affinity for bile salts, *Anal. Chim. Acta.* **2010**, *659*, 178-185.

<sup>188</sup> (a) Molinelli, A.; O'Mahony, J.; Nolan, K.; Smyth, M. R.; Jakusch, M.; Mizaikoff, B., Analyzing the Mechanisms of Selectivity in Biomimetic Self-Assemblies via IR and NMR Spectroscopy of Prepolymerization Solutions and Molecular Dynamics Simulations, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5196-5204. (b) McStay, D.; Al-Obaidi, A. H.; Hoskins, R.; Quinn, P. J., Raman spectroscopy of molecular imprinted polymers, *J. Opt. A. Pure. Appl. Opt.* **2005**, *7*, S340-S345. (c) Fish, W. P.; Ferreira, J.; Sheardy, R. D.; Snow N. H.; O'Brien, T. P., Rational Design of an Imprinted Polymer: Maximizing Selectivity by Optimizing the Monomer-Template Ratio for a Cinchonidine MIP, Prior to Polymerization, Using Microcalorimetry, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28*, 1-15. (d) O'Mahony, J.; Molinelli, A.; Nolan, K.; Smyth, M. R.; Mizaikoff, B., Towards the rational development of molecularly imprinted polymers: <sup>1</sup>H NMR studies on hydrophobicity and ion-pair interactions as driving forces for selectivity, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1884-1893. (e) Alvarez-Lorenzo, C.; Yanez, F.; Barreiro-Iglesias, R.; Concheiro, A., Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery systems, *J. Control. Release.* **2006**, *113*, 236-244.

<sup>189</sup> Umpleby II, R. J.; Baxter, S. C.; Rampey, A. M.; Rushton, G. T.; Chen, Y.; Shimizu, K. D., Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. B.* **2004**, *804*, 141-149.

### a) Modélisation moléculaire

Cette technique est utilisée depuis des années pour sélectionner à la fois le monomère fonctionnel adéquat, le ratio entre le template et le monomère fonctionnel, prévoir le comportement du complexe dans les différents solvants et modéliser les propriétés d'adsorption du polymère.<sup>190</sup> Généralement, deux méthodes sont employées, la théorie de la densité fonctionnelle (Density Functional Theory ou DFT) et dynamique moléculaire (Molecular Dynamics ou MD). La DFT calcule les forces atomiques et, au final, l'énergie du système en approximant l'équation de Schrödinger. La DFT est beaucoup plus complexe en terme calculatoire que la MD, et se trouve donc limitée à une taille de simulation plus petite que la MD. La DFT peut servir à prédire les propriétés structurales et électroniques des complexes formés par liaison hydrogène dans le vide ou dans le solvant de polymérisation<sup>191,92</sup> (Figure 30). La MD calcule les forces atomiques et l'énergie du système en prenant les atomes comme des particules classiques. Les potentiels sont généralement calculés à partir d'une relation semi-empirique telle que le potentiel de Lennard-Jones. Cette approche demande beaucoup moins de calculs intensifs que la DFT et permet de calculer l'évolution du système dans le temps. Mais, certaines propriétés importantes du système peuvent être omises en n'incluant pas les effets quantiques, en particulier la modélisation dans l'eau. Cette technique a déjà été maintes fois utilisée dans le cas des MIPs, et permet de calculer les interactions existantes entre les différents constituants du mélange de pré-polymérisation, template-monomère et template-agent de réticulation.<sup>192</sup>



**Figure 30 : Complexe de pré-polymérisation donnée par la modélisation moléculaire entre A) simazine (53) et MAA (19) et entre B) Simazine (53) et HEMA (40). Les lignes hachurées en jaune représentent les liaisons de type hydrogène entre la simazine et chacun des monomères fonctionnels.<sup>92</sup>**

### b) Titration <sup>1</sup>H RMN

Cette méthode consiste à mesurer les variations des déplacements chimiques du template au cours de sa mise en contact avec le monomère fonctionnel. Ce déplacement est étudié dans une

<sup>190</sup> Lv, Y. ; Lin, Z. ; Tan, T. ; Feng, W. ; Qin, P. ; Li, C., Application of molecular dynamics modeling for the prediction of selective adsorption properties of dimethoate imprinting polymer. *Sens. Actuator B-Chem.* **2008**, 133, 15-23.

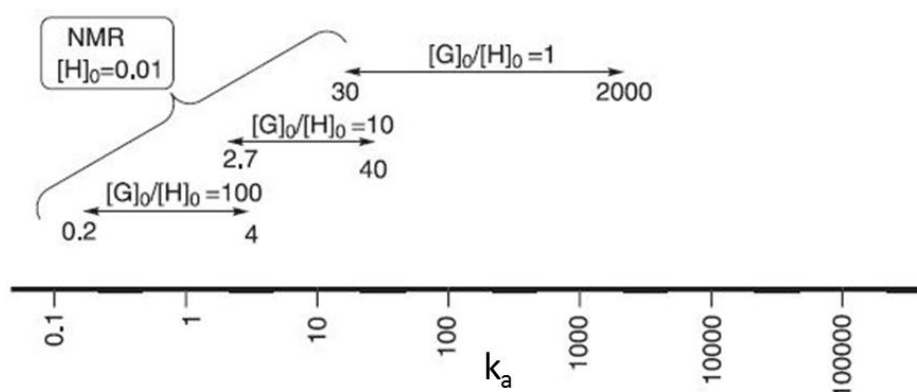
<sup>191</sup> Kazemi, S. ; Daryani, A. S. ; Abdouss, M. ; Shariatnia, Z., DFT computations on the hydrogen bonding interactions between methacrylic acid-trimethylolpropane trimethacrylate copolymers and letrozole as drug delivery systems. *J. Theor. Comput. Chem.* **2016**, 15, 02, 1650015.

<sup>192</sup> Cleland, D. ; Olsson, G. D. ; Karlsson, B. C. G. ; Nicholls, I. A. ; McCluskey, A., Molecular dynamics approaches to the design and synthesis of PCB targeting molecularly imprinted polymers: interference to monomer-template interactions in imprinting of 1,2,3-trichlorobenzene. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 844-853.

solution contenant le template ou *Host* en rajoutant successivement des quantités du monomère fonctionnel ou *Guest*. La variation du déplacement chimique est obtenue en suivant le déplacement d'un proton (ou carbone) de la molécule *Guest* à chaque ajout du *Host*. La variation du déplacement chimique permet de calculer la constante d'association du complexe de pré-polymérisation.<sup>193</sup> Ces variations de déplacement chimique sont tracées en fonction de la concentration de la molécule du *Guest* ajouté. Le modèle d'isotherme de complexation 1:1<sup>194</sup> est appliqué suivant l'équation 1 :

$$\Delta\delta = \frac{k_a \cdot [G]}{1+k_a \cdot [G]} \cdot \Delta_{HG} \quad \text{Eq. 1}$$

$\Delta\delta$  est la variation du déplacement chimique,  $[G]$  est la concentration de la molécule *Guest*,  $\Delta_{HG}$  est la variation du déplacement chimique pour une complexation totale et  $k_a$  est la constante d'équilibre. Cependant, selon la gamme de concentration du *Host*, la concentration initiale du *Guest* et le rapport  $[G]_0/[H]_0$ , la valeur de  $k_a$  peut varier fortement,<sup>195</sup> comme il est présenté sur la Figure 31.



**Figure 31 : Domaines de valeurs de  $K_a$  obtenus pour différentes combinaisons de  $[H]_0/[G]_0$  utilisées en RMN**

D'autre part, la détermination de la stœchiométrie du complexe peut être vérifiée par la méthode de Job en utilisant la titration  $^1H$  RMN mais en faisant varier la fraction molaire du *Guest*. La courbe, obtenue en traçant la variation du déplacement chimique en fonction de la fraction molaire du *Guest*, forme une cloche. Si le sommet de la courbe a pour abscisse 0,5, alors le complexe *Host* : *Guest* a une stœchiométrie 1:1. Cependant, le maximum de la courbe peut être trouvé pour une fraction molaire de 0,33 ou 0,66 et cela indiquera la formation d'un complexe *Host* : *Guest* 1:2 ou 2:1, respectivement.<sup>196</sup>

### c) Titration calorimétrique isotherme (ITC)

La titration par ITC est une méthode qui permet de suivre le profil thermodynamique de la formation du complexe de pré-polymérisation (Figure 32). Elle repose sur une mesure directe de la chaleur libérée ou absorbée lors de la complexation. La mesure du transfert thermique durant la

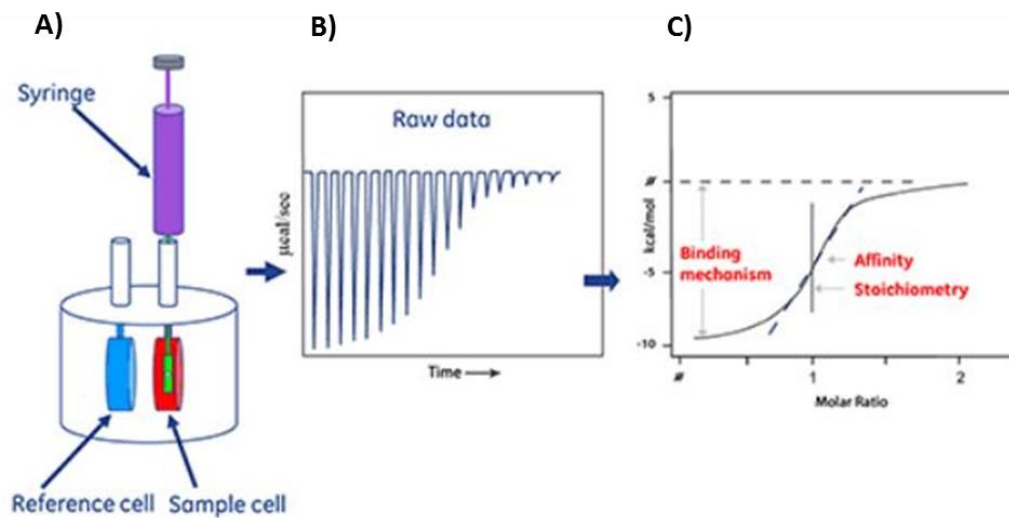
<sup>193</sup> Thordarson, P., Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305-1323.

<sup>194</sup> Connors, K. A., Binding constants: The measurement of molecular complex stability. John Wiley & Sons: New York, **1987**.

<sup>195</sup> Hirose, K., Determination of binding constants, Analytical methods in supramolecular chemistry, Christoph Schalley, **2012** Wiley-VCH edition.

<sup>196</sup> Job, P., Formation and stability of inorganic complexes in solution, *Annali. Di. Chimica.* **1928**, *9*, 113-203.

complexation permet une détermination précise des constantes de liaison ( $K_D$ ), de la stœchiométrie ( $n$ ), des variations de l'enthalpie ( $\Delta H$ ) et de l'entropie ( $\Delta S$ ) de la réaction de formation du complexe.



**Figure 32 : Les étapes de l'étude de complexation par ITC :** A) titration de la molécule réceptrice contenue dans la cellule (sample cell) par une solution de ligand (ou monomère fonctionnels) dans a seringue, ) La chaleur produite par la réaction exothermique pendant la formation du complexe récepteur-ligand est mesurée comme la différence entre l'échantillon et la cellule de référence donnant des pics de signal négatifs, C) l'intégration du signal permet de tracer la courbe donnant les différents paramètres de l'analyse.

## IV.2. Caractérisation morphologique des MIPs

Les études morphologiques servent à connaître la nature du polymère, sa surface spécifique et sa porosité. Ces études se basent généralement sur l'utilisation d'un microscope électronique à balayage (MEB) afin d'avoir une idée sur la taille des particules et leur homogénéité. Afin de déterminer la surface spécifique, la distribution et la taille des pores du polymère, des tracés d'adsorption d'un gaz inerte (généralement l'azote) par le polymère sont réalisés par la méthode de Brunauer Emmett et Teller (BET). Plusieurs études ont montré, par exemple, l'influence du solvant porogène<sup>150</sup> sur la taille et la distribution des pores dans le polymère, grâce à cette technique. Ces études morphologiques sont importantes car la morphologie du MIP a beaucoup d'influence sur la diffusion de la molécule cible à l'intérieur du polymère donc sur sa recapture mais aussi sur sa libération. Ce qui est un paramètre très important dans le cas où les MIPs sont utilisés comme DDS.

## IV.3. Étude des isothermes d'adsorption des MIPs

Un polymère imprimé est synthétisé afin de reconnaître sélectivement des molécules d'intérêt par le biais de ses cavités. Cette sélectivité ne peut être calculée que par rapport à un polymère référence, le polymère non imprimé, ou NIP, obtenu dans les mêmes conditions du MIP sans l'ajout du template. Plusieurs méthodes ont été décrites pour mettre en évidence les capacités de reconnaissance des MIPs.<sup>197</sup>

Les propriétés de reconnaissance et de recapture des MIPs dépendent de la qualité et le nombre de cavités spécifiques formées. L'évaluation de l'équilibre d'adsorption des molécules cibles peut être

<sup>197</sup> García-Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E., Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers, *Sens. Actuator. B-Chem.* **2007**, *123*, 1180-1194.

menée soit par une étude en batch, soit par analyse frontale. Les deux techniques permettent de mettre en évidence la relation existante entre la quantité adsorbée par le polymère en question et la quantité de l'analyte mis en contact.

### IV.3.1. Etude de la recapture par Batch

L'étude de la recapture par batch<sup>123</sup> est une méthode très utilisée. Cette méthode consiste à mettre une quantité de matériau (pour le MIP et le NIP) en contact avec différentes concentrations de template. Après incubation (à une température et une vitesse d'agitation constante), le surnageant est récupéré et analysé par HPLC afin de déterminer la quantité adsorbée par le polymère utilisé comme sur la Figure 33.



Figure 33 : Etude de la recapture par Batch.

Généralement, la quantité de matériau mis en contact est comprise entre 10 et 50 mg pour un volume de solution qui est entre 0,5 et 2 mL. De préférence, les solutions de template sont préparées dans le solvant de polymérisation pour être dans les mêmes conditions optimales du milieu de pré-polymérisation. Cependant, l'utilisation d'autres solvants peut être envisageable dans le cas où il favorise l'interaction avec les sites de reconnaissances et évite les interactions compétitives. La concentration libre mesurée (F) après équilibre sert à calculer la quantité adsorbée (Q en mol ou en g) par gramme de matériau à partir de la concentration mise en contact (C) selon l'équation 2. La quantité de polymère utilisée est notée  $m_{poly}$ .

$$Q = \frac{(C-F) \cdot V}{m_{poly}} \quad \text{Eq. 2}$$

### IV.3.2. Analyse frontale

L'analyse frontale<sup>198,199</sup> est connue pour être une technique quantitative, rapide et efficace en chimie analytique pour l'étude des interactions entre le soluté et une phase stationnaire poreuse. Cette technique a été transférée depuis à l'étude de la sélectivité des MIPs. Ainsi, des études font état de l'analyse frontale pour l'étude de la recapture et la reconnaissance d'énantiomères,<sup>200</sup> de bases puriques<sup>201</sup> et de vitamines.<sup>197</sup>

<sup>198</sup> Guiochon, G.; Shirazi, S. G.; Katti, A. M., *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press: **1994**.

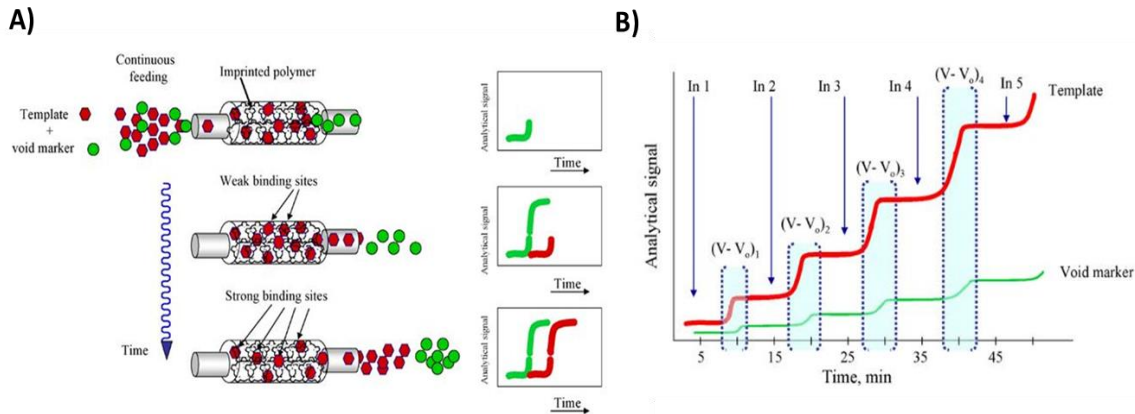
<sup>199</sup> Marchetti, N.; Cavazzini, A.; Pasti, L.; Dondi, F., Determination of adsorption isotherms by means of HPLC: adsorption mechanism elucidation and separation optimization, *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 727-741.

<sup>200</sup> Sajonz, P.; Kele, M.; Zhong, G.; Sellergren, B.; Guiochon, G., Study of the thermodynamics and mass transfer kinetics of two enantiomers on a polymeric imprinted stationary phase, *J. Chromatogr. A.* **1998**, *810*, 1-17.

<sup>201</sup> Manesiotis, P.; Kashani, S.; McLoughlin, P., Molecularly imprinted polymers for the extraction of imiquimod from biological samples using a template analogue strategy, *Anal. Methods.* **2013**, *5*, 3122-3128.



En analyse frontale, la phase mobile contenant le template traverse la colonne remplie du polymère imprimé ou non-imprimé avec un débit constant (Figure 34-A). La concentration du soluté dans la phase mobile augmente progressivement en escalier. Cette augmentation a lieu après l'obtention d'un plateau du signal. Ces plateaux indiquent la saturation des sites d'adsorption pour chacune des concentrations de template percolée par la phase mobile (Figure 34-B).



**Figure 34 : A) Procédure de l'analyse frontale, B) chromatographe obtenues suite à l'analyse frontale sous forme de marches d'escalier.**<sup>197</sup>

Les quantités adsorbées sont calculées en intégrant les différents paramètres extraits de chaque saturation pour une concentration donnée de la phase mobile et en utilisant l'équation 3:

$$q_{n+1} = q_n + \frac{(C_{n+1} - C_n) \cdot (t_{R,n+1} - t_0)}{t_0 \cdot D} \quad \text{Eq. 3}$$

Avec  $q_n$  et  $q_{n+1}$  les quantités de soluté adsorbées sur la colonne après les  $n^{\text{ième}}$  et  $(n+1)^{\text{ième}}$  plateau,  $D$  le débit de la phase mobile,  $C_n$  et  $C_{n+1}$  les concentrations du soluté dans la phase mobile au  $n^{\text{ième}}$  et  $(n+1)^{\text{ième}}$  plateau,  $t_{R,n+1}$  le temps de rétention du point d'inflexion du  $(n+1)^{\text{ième}}$  plateau, et  $t_0$  le temps mort de la colonne.

L'avantage de l'analyse frontale est qu'elle permet une analyse rapide et courte sur un grand intervalle de concentrations permettant de mieux tracer les isothermes d'adsorption. Cependant, quelques erreurs peuvent se présenter, engendrées par le système chromatographique.

### IV.3.3. Les modèles d'isotherme d'adsorption

L'application des modèles d'isotherme d'adsorption permet de fournir des informations importantes sur le nombre et la distribution des sites de reconnaissances, et les constantes d'association relatives. Les modèles d'isotherme d'adsorption sont classés en fonction de la nature (homogène ou hétérogène) de la surface du polymère avec des modèles discrets (Langmuir et Bi-Langmuir), continus (Freundlich) et hybrides (Freundlich-Langmuir).

Le modèle le plus simple est celui de **Langmuir**<sup>198</sup> (L). Ce modèle repose sur l'hypothèse que l'adsorption des molécules se fait sur des sites homogènes en énergie du polymère avec une adsorption monocouche. Ce modèle est exprimé par l'équation 4 :

$$Q = \frac{N \cdot K \cdot F}{1 + K \cdot F} \quad \text{Eq. 4}$$

Avec Q la quantité de template adsorbée, F la concentration libre (après équilibre) du template dans la solution, N le nombre de sites d'adsorption homogène et K la constante d'association qui a une valeur comparable pour tous les sites d'adsorption. Ce modèle s'applique pour des cas où les solutés présentent uniquement des interactions avec la surface du polymère et non entre eux.

Le modèle de **Bi-Langmuir**<sup>202</sup> (Bi-L) est dérivé du modèle de Langmuir et suppose que la surface du MIP comprenne un ensemble de deux types de sites (à forte et à faible affinité) possédant chacune une constante d'association spécifique. Ce modèle est exprimé par l'équation 5 qui montre une sommation de deux modèles de Langmuir définissant chacun un type de site.

$$Q = \frac{N_1 \cdot K_1 \cdot F}{1 + K_1 \cdot F} + \frac{N_2 \cdot K_2 \cdot F}{1 + K_2 \cdot F} \quad \text{Eq. 5}$$

Dans ce modèle, les sites de reconnaissance de forte affinité sont représentés par  $N_1$  avec une constante d'affinité  $K_1$  pour le template, et ceux de faible affinité sont donnés par  $N_2$  avec une constante d'affinité  $K_2$  pour le template. Généralement,  $K_1$  est plus grand que  $K_2$  et  $N_1$  est plus petit que  $N_2$ .

En raison de l'impression non-stœchiométrique (excès de monomères pour favoriser l'adsorption), les MIPs contiennent de multiples sites de liaison avec des énergies d'adsorption différentes. De ce fait, plusieurs autres modèles que ceux dérivés du modèle de Langmuir ont été utilisés. Par exemple, le modèle de Freundlich<sup>203,204</sup> (F) décrivant les hétérogénéités de surface et de distribution des sites de reconnaissances. Ce modèle est exprimé par l'équation 6, et décrit principalement la région de sous-saturation (Figure 29) contrairement au modèle de L ou Bi-L.

$$Q = a \cdot F^m \quad \text{Eq. 6}$$

Les paramètres **a** et **m** sont les paramètres propres au modèle. Le facteur a est un paramètre lié à la capacité d'adsorption ( $N_{K_{\min}-K_{\max}}$ ) et à la constante d'association moyenne ( $\bar{K}$ ). Ces deux paramètres peuvent être calculés en utilisant les équations d'approximations suivantes en tenant compte de l'intervalle de concentration utilisé pour établir les isothermes d'adsorption (la concentration libre utilisée du template est comprise entre  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  M ce qui nous donne un  $K_{\min}=10^3 \text{ M}^{-1}$  et  $K_{\max}=10^6 \text{ M}^{-1}$ ):

$$N_{K_{\min}-K_{\max}} = a \cdot (1 - m) \cdot (K_{\min}^{-m} - K_{\max}^{-m}) \quad \text{Eq. 7}$$

$$\bar{K} = \left( \frac{m}{m-1} \right) \cdot \left( \frac{K_{\min}^{(1-m)} - K_{\max}^{(1-m)}}{K_{\min}^{-m} - K_{\max}^{-m}} \right) \quad \text{Eq. 8}$$

Le facteur m est l'indice d'hétérogénéité avec une valeur qui varie entre 0 et 1. Plus ce paramètre est proche de 1 plus la distribution des sites est homogène, et plus elle se rapproche de 0 plus on a une hétérogénéité de distributions des sites actifs.

<sup>202</sup> Graham, D., The Characterisation of Physical Adsorption Systems. I. The Equilibrium Function and Standard Free Energy of Adsorption, *J. Phys. Chem. A.* **1953**, 57, 665-669.

<sup>203</sup> Umpleby li, R. J.; Baxter, S. C.; Bode, M.; Berch Jr, J. K.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D., Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterisation of molecularly imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta.* **2001**, 435, 35-42.

<sup>204</sup> Rushton, G. T.; Karns, C. L.; Shimizu, K. D., A critical examination of the use of the Freundlich isotherm in characterizing molecularly imprinted polymers (MIPs), *Anal. Chim. Acta.* **2005**, 528, 107-113.

Etant donné que le modèle de F ne permet pas de calculer le nombre de sites actifs réels ainsi que leurs constantes d'association, un modèle hybride (à la fois homogène et hétérogène) a été utilisé. Ce modèle est capable de décrire la totalité des sites se trouvant dans les régions de saturation et sous-saturation et est nommé modèle de **Freundlich-Langmuir**<sup>205,189</sup> (F-L). Ce modèle est décrit par l'équation 9 :

$$Q = \frac{N \cdot K^m \cdot F^m}{1 + K^m \cdot F^m} \quad \text{Eq. 9}$$

Ici, N est le nombre de sites de reconnaissance, K est la constante d'association moyenne et m est l'indice d'hétérogénéité comme décrit pour le modèle de Freundlich.

Afin de choisir le bon modèle d'isotherme d'adsorption, il faut regarder de près l'approche choisie pour la synthèse des MIPs (type d'interaction, monomère, stœchiométrie, solvant...), ainsi que le phénomène d'adsorption et la gamme de concentration choisie pour cette étude. Plusieurs exemples dans la littérature<sup>206</sup> ont évalué la distribution des sites pour chacun des modèles et leurs domaines d'étude (Figure 35).

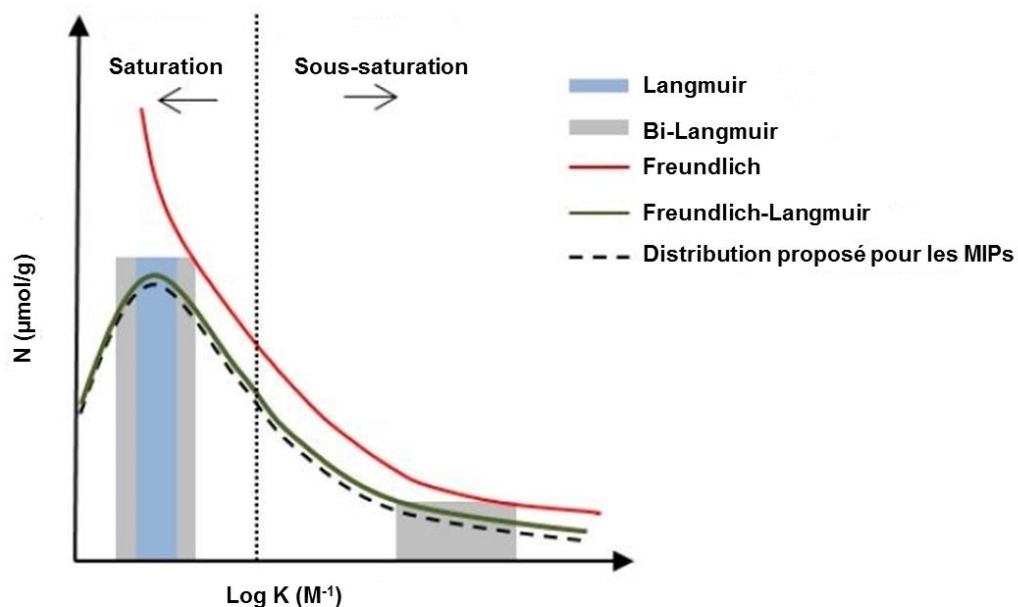


Figure 35 : Distribution des sites actifs proposés pour chaque modèle d'isotherme d'adsorption (figure adaptée de celle d'Umpleby *et al.*)<sup>Erreur ! Signet non défini.</sup>

## V. Mécanismes de libération contrôlée

Le profil de relargage d'un principe actif peut varier en fonction des mécanismes de libération propres au système de délivrance. Ainsi, la bonne connaissance du mécanisme de libération est une partie essentielle du processus de développement des MIPs-DDS. Les principaux mécanismes de libération sont la diffusion, le gonflement et l'érosion, qui impliquent soit la diffusion des

<sup>205</sup> Umpleby, R. J.; Baxter, S. C.; Chen, Y.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D., Characterisation of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir–Freundlich Isotherm, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4584-4591.

<sup>206</sup> Umpleby li, R. J.; Bode, M.; Shimizu, K. D., Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers, *Analyst.* **2000**, *125*, 1261-1265.

médicaments à travers les pores d'une matrice ou un gel, soit la dissolution d'un principe actif due à l'érosion.

### a) La diffusion

La diffusion joue un rôle majeur dans la plupart des systèmes de libération contrôlée. La diffusion est le processus par lequel le transfert de masse de molécules individuelles d'une substance est mené par un mouvement moléculaire aléatoire et associé à un gradient de concentration. Le transfert de la molécule de soluté est possible soit par simple perméation moléculaire, soit par déplacement à travers les pores du polymère. La diffusion est liée au déplacement de la molécule.<sup>207</sup> La diffusion est expliquée par les lois de la diffusion ou les lois de Fick. La première loi de Fick stipule que le flux diffusif passe d'une région de forte concentration à une région de faible concentration. Cette loi est donnée par l'équation 10 :

$$J = -D \left( \frac{dc}{dx} \right) \quad \text{Eq. 10}$$

Avec **J** est la quantité de bioactif ou substance passant perpendiculairement à travers une unité de surface par heure, **D** est la constante de diffusion et **dc/dx** est le gradient de concentration.

La deuxième loi de Fick indique que la variation de concentration en fonction du temps est proportionnelle à la variation du gradient de concentration spatiale ou dérivée seconde de la concentration par rapport à la distance. Cette équation est donnée par l'équation 11 :

$$\frac{dc}{dt} = D \left( \frac{d^2c}{dx^2} \right) \quad \text{Eq. 11}$$

Il existe certaines limitations dans la diffusion des principes actifs : l'hétérogénéité de structure du polymère, les conditions de mobilité, la diffusion non-fickienne et les espèces ioniques.

### b) Le gonflement

La libération contrôlée des bioactifs par gonflement du polymère est un processus qui a lieu en raison d'un changement morphologique du polymère lors de la mise en solution. Les systèmes de libération par gonflement ont été développés principalement à partir de cargos hydrosolubles comme par exemple le HPMC (hydroxypropylméthylcellulose).<sup>208</sup> Une fois en contact avec l'eau, le polymère gonfle et passe à un état gélifique dans lequel le principe actif dissous peut être transporté en raison de la mobilité des chaînes polymériques flexibles. La cinétique de libération peut être modifiée selon l'épaisseur de ce gel et la vitesse à laquelle il se forme.<sup>209</sup>

---

<sup>207</sup> Shaikh, H. K.; Kshirsagar, R. V.; Patil, S. G., Mathematical models for drug release characterization : a review, *W. J. P. R.* **2015**, *4*, 324-338.

<sup>208</sup> (a) Colombo, P., Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1993**, *11*, 37-57. (b) Narasimhan, B. Accurate models in drug delivery systems. In: Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology **2000**, 155-181.

<sup>209</sup> Kanjickal, D. G.; Lopina, S. T., Modeling of drug release from polymeric delivery systems-A review, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* **2004**, *21*, 345-386.

### Système de libération contrôlée par gonflement

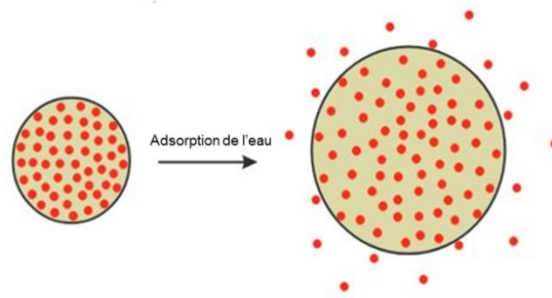


Figure 36 : Systèmes de libération contrôlée par le gonflement pour une matrice hydrophile.

#### c) L'érosion et la dégradation

Le terme érosion désigne habituellement une décomposition des polymères à un niveau moléculaire, c'est-à-dire un clivage de chaîne polymérique qui conduit à des produits de dégradation de haut poids moléculaire éliminés par le corps en toute sécurité. La dégradation est obtenue par modifications chimiques du polymère, telles que le clivage des liaisons covalentes, l'ionisation et la protonation du polymère. Dans les systèmes de libération par érosion, le principe actif est dispersé dans une matrice polymérique hydrophile. En contact avec l'eau ce système subit un gonflement suivi d'une dissolution du polymère et donc du bioactif.

## VI. Modèles mathématiques pour les études de la libération d'un bioactif

La libération d'un bioactif est un phénomène qui est décrit de différentes manières. Ce phénomène peut être instantané et cela nécessite plusieurs prises du médicament pour avoir une bonne efficacité. La libération peut être prolongée et contrôlée sur le temps ce qui implique des formes de matrice différente du premier cas. Elle permet de diminuer les fréquences de prises dans certains cas mais aussi de maintenir une dose thérapeutique constante sur le temps. L'étude de la libération d'un bioactif est très importante pour le développement de nouveaux médicaments. Pour cela plusieurs théories et modèles ont été utilisés pour décrire ces phénomènes de libération à partir de différentes matrices pharmaceutiques *in vitro*.<sup>210</sup>

Le but de l'application des modèles mathématiques est d'étudier les différents phénomènes de libération à partir de différentes formes thérapeutiques. Ces modèles permettent de prédire le comportement et la nature du relargage ainsi que l'effet de la matrice sur la cinétique de libération. Ces modèles permettent aussi d'anticiper les paramètres de relargage les plus importants pour mieux adapter la formulation des cargos polymériques et atteindre le but cinétique escompté. Ces modèles décrivent la quantité de bioactif libéré ( $M$ ) à partir d'une matrice ou capsule en fonction du temps ( $t$ ). Plusieurs modèles ont été utilisés comme l'ordre zéro, le premier ordre, Hixon-Crowell, Weibull, Higuchi, Baker-Lonsdale, Korsmeyer-Peppas<sup>211,212</sup>. Ainsi, ces modèles mathématiques permettent la conception de nouveaux systèmes de libération, prédire le taux de relargage,

<sup>210</sup> (a) Singhavi, G., Review : In vitro drug release characterization models, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2011**, 2, 77-84. (b) Costa, P., Modeling and comparison of dissolution profile, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, 13, 123-133

<sup>211</sup> Ramteke, K. H., Mathematical models of drug dissolution: a review, *sch. Acad. J. Pharm.* **2014**, 3, 388-396.

<sup>212</sup> Lokhandwala, H., Kinetic modeling and dissolution profiles comparison: An overview, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **2013**, 4, 728-737.

optimiser la cinétique de relargage, étudier les mécanismes physiques permettant de comparer les phénomènes de libération, prédire l'effet de la morphologie, la taille et la composition de la matrice sur le relargage et prévoir les profils de libération permettant d'améliorer l'efficacité thérapeutique des bioactifs.<sup>207,213</sup>

Le point important de l'application de ces modèles reste la compréhension des phénomènes physiques qui gèrent la libération du bioactif dont la dissolution, la diffusion, le gonflement, la relaxation et la dégradation de la matrice. Par exemple, la diffusion est un phénomène très important qui dépend généralement de la morphologie du polymère<sup>214</sup>. Généralement, la diffusion d'un principe actif hydrophile à partir d'une matrice est plus facile qu'un bioactif hydrophobe ou de faible solubilité dans l'eau. La libération des bioactifs hydrophobes est associée généralement à des phénomènes de gonflement et/ou de dégradation de la matrice.<sup>215</sup>

### VI.1. Le modèle cinétique d'ordre zéro

Le modèle cinétique d'ordre zéro décrit un taux de libération du principe actif indépendant de sa concentration. Ce modèle décrit la dissolution du principe actif de différents systèmes de libération comme ceux utilisés en transdermique ou enrobés sous forme de tablette.<sup>212</sup> Ce modèle est exprimé par l'équation 11 :

$$M = M_i * K_0 t \quad \text{Eq. 11}$$

Avec **M** est la quantité de principe actif libéré ou dissoute, **M<sub>i</sub>** la quantité initiale relarguée (**M<sub>i</sub>** est généralement faible) et **K<sub>0</sub>** la constante d'ordre zéro. Pour ce modèle, la libération du principe actif est fonction du temps et se déroule à une vitesse constante indépendamment de la concentration du principe actif.

### VI.2. Le modèle cinétique de premier ordre

Ce modèle a été utilisé pour décrire l'absorption et/ou l'élimination de différents principes actifs. Cependant, il est difficile de définir une cinétique de premier ordre en utilisant une théorie de base.<sup>212</sup> La libération qui suit la cinétique de premier ordre est exprimée par l'équation 12 :

$$\text{Log } M = \text{Log } M_i + \frac{K_1 t}{2.303} \quad \text{Eq. 12}$$

Avec **M** la quantité du bioactif libéré à l'instant **t**, **M<sub>i</sub>** la quantité initiale du bioactif dissoute et **K<sub>1</sub>** la constante cinétique du premier ordre. Cette relation peut être employée pour décrire la dissolution d'un bioactif hydrosoluble contenu dans des matrices poreuses<sup>216</sup>.

<sup>213</sup> Dash, S., Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery system, *Acta. Pol. Pharm.* **2010**, *67*, 217-223.

<sup>214</sup> Langer, R. S.; Peppas, N. A., Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: A review, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1983**, *C23*, 61-126.

<sup>215</sup> Agnes, E. J.; Ortega, G. G., Mathematical models and physicochemical of diffusion, *Pharmacy. Book.* **2003**, *19*, 9-19.

<sup>216</sup> Narsimhan, B.; Mallapragada S. K.; Peppas, N. A., Release Kinetics, Data Interpretation, *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, E. Mathiowitz (ed.), John Wiley & Sons, **1999**, 921-935.

### VI.3. Le modèle d'Higuchi

Le modèle d'Higuchi a été développé à partir de 1961. De nos jours, ce modèle mathématique reste l'un des plus connus et des plus utilisés pour décrire le taux de libération d'un principe actif à partir d'une matrice. Higuchi a étudié le taux de libération des principes actifs à partir d'un système planaire contenant ce dernier en suspension (1961),<sup>217</sup> la libération à partir des pommades (1962),<sup>218</sup> et enfin la libération d'un bioactif à action prolongé (1963).<sup>219</sup> Ces études ont permis de développer de nombreux modèles pour décrire la libération des principes actifs solubles et peu solubles à partir de matrices poreuses homogènes ou hétérogènes. L'équation 13 est le modèle simplifié d'Higuchi qui relie la concentration ou la quantité du principe actif à la racine carrée du temps.

$$M = K_H * t^{1/2} \quad \text{Eq. 13}$$

Avec  $K_H$  la constante cinétique d'Higuchi.

Afin d'utiliser le modèle d'Higuchi, plusieurs suppositions doivent être prises en considération telles que :<sup>220,221</sup>

- ❖ La matrice contient une concentration initiale du principe actif beaucoup plus élevée que sa valeur de solubilité ;
- ❖ La diffusion est unidirectionnelle (les effets de bords sont négligeables) ;
- ❖ L'épaisseur de la matrice est beaucoup plus grande que la taille des molécules du principe actif ;
- ❖ Le gonflement et la dissolution de la matrice sont négligeables ;
- ❖ La diffusivité du principe actif est constante ;
- ❖ Les conditions optimales du milieu de libération sont maintenues.

### VI.4. Le modèle de Korsmeyer-Peppas

Cette équation développée en 1983 par Korsmeyer, Peppas *et al.*<sup>222</sup> est semi-empirique. Elle décrit la libération d'un principe actif à partir d'une matrice polymérique. L'équation 14 est donnée par une relation entre la fraction du principe actif libéré et le temps.

$$\frac{M_i}{M_\infty} = K t^n \quad \text{Eq. 14}$$

Avec  $M_i$  la quantité du bioactif relargué à un temps  $t$ ,  $M_\infty$  la quantité totale libérée à l'équilibre (peut être assimilée à la quantité  $M_0$  initialement contenue dans la matrice),  $K$  la constante de vitesse de libération et  $n$  l'exposant de libération (exprime le phénomène qui régit la libération). Cette relation

<sup>217</sup> Higuchi, T., Rate of release of medicaments from ointments bases containing drugs in suspension, *J. Pharm. Sci.* **1961**, *50*, 874-875.

<sup>218</sup> Higuchi, W. I., Analysis of data on the medicament release from ointments, *J. Pharm. Sci.* **1962**, *51*, 802-804.

<sup>219</sup> Higuchi, T., Mechanism of sustained-action medication, *J. Pharm. Sci.* **1963**, *52*, 1145-1149.

<sup>220</sup> Omidian, H.; Park, K., Introduction to hydrogels. In R. M. Ottenbrite, K. Park, & T. Okano (Eds.), *Biomedical applications of hydrogels handbook*, **2010**, 1-16.

<sup>221</sup> Siepmann, J.; Peppas, N. A., Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 163-174.

<sup>222</sup> Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E. M.; Buri, P.; Peppas, N. A., Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* **1983**, *15*, 25-35.

est applicable sur les premiers 60 % de la fraction du principe actif libéré. En outre, lorsque le processus de libération se caractérise par une libération initiale instantanée, ou *burst*, l'équation 15 a été proposée pour caractériser ce phénomène :<sup>223</sup>

$$\frac{M_i}{M_\infty} = Kt^n + b \quad \text{Eq. 15}$$

Avec **b** le paramètre qui caractérise le *burst* ou le relargage instantané.

Ce modèle est très utile pour l'étude de libération d'un principe actif à partir d'une matrice polymérique lorsque le mécanisme de libération est inconnu ou lorsque plus d'un phénomène est impliqué dans la libération<sup>224</sup>. Selon la valeur de l'exposant *n*, il est possible d'établir une classification en fonction du type de comportement observé et de la géométrie de la matrice.

On peut classer ces mécanismes en deux catégories :

- Modèle fickien (transport cas I)
- Modèle non-fickien (transport irrégulier, transport cas II et super cas II)

**Tableau 5 : Interprétation des modèles de libération d'un principe actif à partir d'une matrice polymérique avec différentes géométries.**<sup>225,226</sup>

Mécanisme de libération	Géométrie	n	Temps en fonction de n
Diffusion fickienne (cas I)	Planaire (film mince)	0,5	$t^{0,5}$
	Cylindrique	0,45	$t^{0,45}$
	Sphérique	0,43	$t^{0,43}$
Transport irrégulier (anormale)	Planaire (film mince)	$0,5 < n < 1$	$t^{0,5 < n < 1}$
	Cylindrique	$0,45 < n < 0,89$	$t^{0,45 < n < 0,89}$
	Sphérique	$0,43 < n < 0,85$	$t^{0,43 < n < 0,85}$
Transport cas II	Planaire (film mince)	1	$t^{(a)}$
	Cylindrique	0,89	$t^{0,89}$
	Sphérique	0,85	$t^{0,85}$
Transport super cas II	Planaire (film mince)	$n > 1$	$t^{n > 1}$
	Cylindrique	$n > 0,89$	$t^{n > 0,89}$
	Sphérique	$n > 0,85$	$t^{n > 0,85}$

<sup>223</sup>Kim, H.; Fassihi, R., Application of binary polymer in drug release rate modulation. 2. Influence of formulation variables and hydrodynamic conditions on release kinetics, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 323-328.

<sup>224</sup> Peppas, N. A.; Narasimhan, B., Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems, *J. Control. Release.* **2014**, *190*, 75-81.

<sup>225</sup> Peppas, N. A., Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers, *Pharm. Acta. Helv.* **1985**, *60*, 110-111.

<sup>226</sup> Kosmidis, K.; Argyrakakis, P.; Macheras, p., Fractal kinetics in drug release from finite fractal matrices, *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 6373-6377.



Dans le **modèle fickien (cas I)**, la libération est gouvernée par la diffusion. Le taux de médicament relargué par diffusion est plus important que par un phénomène de relaxation du polymère. Ce profil est caractérisé par la diffusivité du principe actif.

Pour le **modèle non-fickien** plusieurs cas de figure existent. Lorsque  $n = 1$  (transport cas II), le taux de libération correspond à la cinétique d'ordre zéro et, dans ce cas, la libération du principe actif obéit au gonflement ou à la relaxation des chaînes polymériques. Lorsque  $0,5 < n < 1$  (transport irrégulier), le mécanisme de relargage est gouverné par la diffusion et le gonflement de la matrice polymérique. Ces deux phénomènes sont comparables. En effet le réarrangement des chaînes polymériques a lieu lentement et la diffusion se passe d'une façon simultanée, dépendante du temps. Enfin, le transport super cas II est caractérisé par  $n > 1$ , constitue un transport extrême. En effet, pendant ce processus, il se produit une tension et une fissuration du polymère par le solvant. La couche externe du polymère empêche le gonflement axial produisant ainsi une tension puis une fissuration du polymère. Ce genre de transport est observé pour des solvants ayant une grande affinité avec la matrice.

## VI.5. Le modèle de Baker-Lonsdale

Baker et Lonsdale<sup>227</sup> ont développé en 1974 un modèle mathématique en se basant sur le modèle d'Higuchi. Ce modèle permet d'étudier la libération contrôlée d'un principe actif à partir d'une matrice sphérique. Ce modèle peut être exprimé par l'équation 16 :

$$\frac{3}{2} \left[ 1 - \left( 1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = Kt \quad \text{Eq. 16}$$

Avec  $M_t$  la quantité du bioactif relargué à un temps  $t$ ,  $M_\infty$  la quantité totale libérée à l'équilibre (peut être assimilé à la quantité  $M_0$  initialement contenue dans la matrice) et  $K$  la constante cinétique de relargage de ce modèle.

Finalement plusieurs autres modèles tel que le modèle de Hixon-Crowell,<sup>228</sup> le modèle de Weibull,<sup>229</sup> le modèle de Hopfenberg,<sup>230</sup> le modèle de Peppas-Sahlin<sup>231</sup> permettent de mieux comprendre profondément les mécanismes de libération des principes actifs selon sa nature, à partir de différents types de matrices.

En conclusion, le choix du modèle cinétique doit se baser sur la nature et la morphologie du matériau. En effet, chaque modèle possède certaines limitations comme par exemple le modèle d'Higuchi est applicable quand le phénomène de gonflement est négligeable. Aussi le modèle de Lonsdale-Baker n'est considéré que lorsque notre matériau est sous forme sphérique. Cependant, le modèle de Korsmeyer-Peppas reste de nos jours le plus utilisés car il est capable de traiter différents

<sup>227</sup> Baker, R. W.; Lonsdale, H. S., Controlled release: mechanisms and rates. In A. C. Taquary, & R. E. Lacey (1<sup>st</sup> Eds.), *Controlled release of biologically active agents*, 1974, (pp. 15–71). New York: Plenum.

<sup>228</sup> Hixon, A. W.; Crowell, J. H., Dependence of reaction velocity upon surface and agitation: I-Theoretical consideration, *Ind. Eng. Chem.* 1931, 23, 923-931.

<sup>229</sup> Weibull, W., A statistical distribution function of wide applicability, *J. Appl. Mech.* 1951, 18, 293-297.

<sup>230</sup> Katzhendler, I.; Hofman, A.; Goldberger, A.; Friedman, M., Modeling of drug release from erodible tablets, *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 110-115.

<sup>231</sup> Peppas, N. A.; Sahlin, J. J., A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation, *Int. J. Pharm.* 1989, 57, 169-172.

phénomènes tel que la relaxation du matériau, le gonflement, la diffusion mais aussi ce modèle prend en considération les formes géométriques du matériau (sphérique, membranaire, particulaire...).



# **Chapitre 3 : Synthèse des Hydrogels imprimés pour la libération de la Ribavirine**



## I. Introduction

Malgré les recherches avancées dans le domaine médical, quelques principes actifs réussissent à dépasser la problématique de la biodisponibilité.<sup>232</sup> Les systèmes de libération contrôlée constituent une bonne alternative pour surmonter la problématique de la biodisponibilité d'une forme posologique conventionnelle. De ce fait, plusieurs systèmes de libérations contrôlés des principes actifs ont été explorés tels que les liposomes, les dendrimères, les particules polymériques. Ces systèmes ont été retenus du fait de leurs capacités de libérer le principe actif d'une façon prolongée permettant de maintenir une dose thérapeutique efficace mais aussi de leur capacités de protéger ce dernier de son milieu environnant. Les hydrogels ont montré les caractéristiques d'un système d'administration de médicaments intelligent.<sup>233</sup> Ces matériaux sont des polymères hydrophiles, flexibles et très peu réticulés capables d'absorber une grande quantité d'eau.<sup>234</sup> Depuis plusieurs années les hydrogels ont montré leurs efficacité dans plusieurs domaine tel que le domaine pharmaceutique et biomédicales comme vecteurs pour des médicaments incluant les lentilles de contact, les pansements, des revêtements.<sup>235</sup> En raison de leurs propriétés chimiques, y compris la biocompatibilité potentielle et la réponse aux stimuli, les hydrogels sont devenus des matériaux souhaitables pour les applications biomédicales. Des études récentes ont montré que des hydrogels peuvent être imprimés avec des molécules cibles sélectionnées, ou des produits pharmaceutiques, pour créer des sites de reconnaissance spécifiques pouvant influencer sur la libération du principe actif.<sup>236,237</sup>

De ce fait nous avons choisi de commencer par mettre en place différents formulations d'hydrogels imprimés biocompatibles pour la libération contrôlée de la ribavirine sous divers stimuli.

### I.1. Choix du template

Dans ce chapitre, nous allons détailler la synthèse d'un MIP sous forme hydrogel basée sur une approche non-covalente, favorisant des interactions de type liaison hydrogène, en utilisant la ribavirine comme template.

En 2012, l'équipe de *Li Xu et al.*<sup>238</sup> a développé un MIP greffé sur des nanotubes de carbone sélectif de la ribavirine dans l'eau. Les nanotubes étaient utilisés pour apporter aux composites (MIP-Nano) une surface spécifique très élevée. Dans cette étude, l'évaluation du MIP à base d'AAM-co-MBA a montré une bonne reconnaissance de la ribavirine dans l'eau, avec un facteur d'impression

---

<sup>232</sup> Kidane, A.; Bhatt, P. P., Recent advances in small molecule drug delivery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 347-351.

<sup>233</sup> Yoshida, R.; Sakai, K.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Pulsatile drug delivery systems using hydrogels, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1993**, *11*, 85-108.

<sup>234</sup> Bates, J.; Magda, J., pH-Responsive Hydrogels and their Applications in Chemomechanical Sensors, *ScienceJet.* **2014**, *4*, 128.

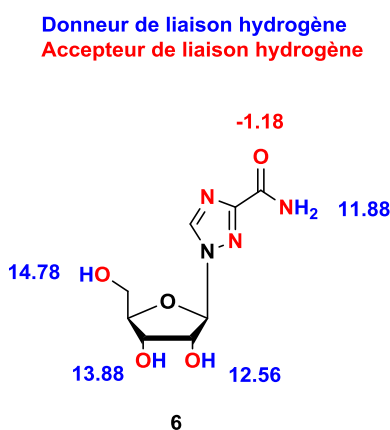
<sup>235</sup> Mishra, B.; Upadhyay, M.; Reddy Adena, S. K.; Vasant, B. G.; Muthu, M. S., Hydrogels : An Introduction to a Controlled Drug Delivery Device, Synthesis and Application in Drug Delivery and Tissue Engineering, *Austin. J. Biomed. Eng.* **2017**, *4*, 1037.

<sup>236</sup> Hiratani, H.; Lorenzo, C. A., The nature of backbone monomers determines the performance of imprinted soft contact lenses as timolol drug delivery systems, *Biomaterials.* **2004**, *25*, 1105-1113

<sup>237</sup> Bates, J. S.; Whitson, L. R.; Albertson, K. M.; Hickerson, N. S.; Nichols, P. E.; Larson, B. E.; Sparks, T. D., Molecular Imprinted Hydrogels in Drug Delivery Applications, *MRS. Proceedings.* **2015**, 1797, mrs15-2132190.

<sup>238</sup> Xu, L.; Xu, Z., Molecularly imprinted polymer based on multiwalled carbon nanotubes for ribavirin recognition, *J. Polym. Res.* **2012**, *19*, 9942.

de 1,65. Mais, l'article ne mentionne nulle part la mesure de la surface spécifique des composites. De plus, le polymère imprimé formé sur les nanotubes représente plus de 70% de la masse totale du composite MWNTs (multiwalled carbon nanotubes)/MIPs. Il se pourrait donc que l'apport des MWNTs dans le facteur d'impression soit négligeable. Le MIP ne devrait sa qualité de reconnaissance de la ribavirine qu'à sa formulation propre et non à l'ajout des MWNTs. Donc, cette étude montre qu'il est possible d'obtenir un MIP sélectif aux composés hydrosolubles dans un milieu aqueux, avec une formulation assez simple. Nous avons donc choisi de nous baser sur cet article pour choisir les différents composés de notre formulation. Ainsi, la ribavirine sera utilisée directement comme molécule template.



**Figure 37 : Structure de la ribavirine** ou 1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxyméthyl)oxolan-2-yl]-1,2,4-triazole-3-carboxamide (**6**) avec les pKa de chaque groupement fonctionnel.

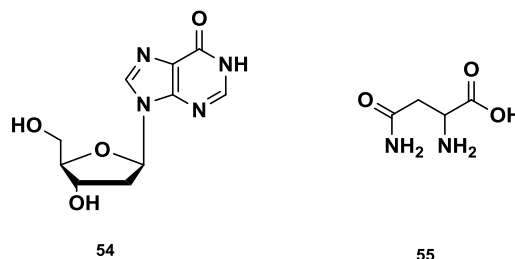
## I.2. Choix des monomères fonctionnels

Le but de cette étude est d'élaborer un MIP pour la libération de la ribavirine par voie pulmonaire. La première condition pour la validation d'un telle MIP est que ce dernier soit biocompatible et inoffensif pour le corps humain et ses différents organes. De ce fait, le choix des monomères fonctionnels devient restreint. Plusieurs monomères ont montré que malgré leurs toxicités élevées à l'état moléculaire comme l'acrylamide (Cancérogène, mutagène, reprotoxique), sous forme de polymère, ils deviennent totalement inoffensifs et biocompatibles. Différentes études ont démontré l'existence d'une vaste gamme de monomères biocompatibles utilisés pour l'encapsulation et la libération contrôlée de bioactifs parmi lesquels on peut citer l'exemple de l'acrylamide, l'acide méthacrylique, méthyl méthacrylate, le *N*-isopropylacrylamide.<sup>104</sup>

La ribavirine a été synthétisée pour être un analogue nucléosidique de la guanosine. Sa structure chimique comporte un ribose et un noyau triazole qui se rapproche du noyau imidazole des bases puriques et du noyau des bases pyrimidiques. Or, il a été démontré que les petits monomères de type acrylamide ou acide méthacrylique pouvaient être utilisés dans la conception de MIPs sélectifs aux ribonucléosides.<sup>239,125</sup>

<sup>239</sup> Scorrano, S.; Longo, L.; Vasapollo, G., Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of 1-methyladenosine from human urine, *Anal. Chim. Acta.* **2010**, 659, 167-171.

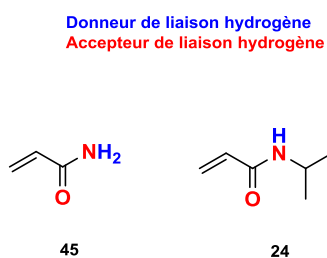
De plus, une étude structurale menée sur le site de liaison de la purine nucléoside phosphorylase<sup>240</sup> a mis en évidence le rôle d'un résidu d'acide aminé de type asparagine (Asn ; **55**) dans la reconnaissance du substrat. Ce résidu interagit avec l'azote en position 7 du 2'-deoxy-Inosine (**54**), Etant donné que l'AAM possède la même fonction amide que cet acide aminé, cela le rend intéressant pour créer une interaction de type liaison hydrogène avec l'azote du groupement carboxyamide de la ribavirine, notre template.



**Figure 38 : Structure du 2'-deoxy-inosine (54) et de l'asparagine (55).**

Un autre facteur pouvant jouer en faveur de l'emploi de l'AAM, par rapport à d'autres monomères, provient de sa structure même. En effet, grâce à sa fonction amide primaire, l'AAM peut former conjointement deux liaisons non-covalentes avec un template accepteur de liaisons hydrogène.<sup>145</sup> Ceci augmente la stabilité du complexe formé. Donc, cela appuie le fait de nous orienter vers l'utilisation de l'acrylamide (AAM) comme monomère fonctionnel.

Un dérivé de l'acrylamide peut être aussi utilisé comme monomère fonctionnel. Il s'agit de l'isopropylacrylamide ou NIPAm. L'intérêt de l'utilisation du NIPAm est d'apporter un caractère thermosensible au polymère.<sup>241</sup> En effet, un polymère constitué de NIPAm, ou polyNIPAm, en milieu aqueux, subit une transition réversible autour de 32 °C. Cette température est appelée température critique inférieure de solubilité ou LCST (lower critical solution temperature). En-dessous de cette LCST, le polyNIPAm est hydrophile et gonflé, alors, qu'au-dessus, il devient hydrophobe et se rétracte en se repliant sur lui-même. Ce comportement peut avoir potentiellement un rôle sur le profil de libération de la ribavirine.<sup>242</sup>



**Figure 39: Structure des monomères fonctionnels choisis : acrylamide (45), N-isopropylacrylamide (24).**

<sup>240</sup> Erion, M. D.; Stoeckler, J. D.; Guida, W. C.; Walter, R. L.; Ealick, S. E., Purine Nucleoside Phosphorylase. 2. Catalytic mechanism. *Biochemistry*. **1997**, *36*, 11735-11748.

<sup>241</sup> Bawa. P.; Pillay. V.; Choonara. Y. E.; du toit. L. C, Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery, *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 022001.

<sup>242</sup> Okuyama, Y.; Yoshida, R.; Sakai, K.; Okano, T.; Sakurai, Y, Stimuli-responsive polymers and their applications in drug, *J. Biomater. Sci. Polym.* **1993**, *4*, 545-556.



### I.3. Choix de l'agent de réticulation

L'agent réticulant, comme a été décrit dans le chapitre précédent, permet de préserver la structure des sites de reconnaissances et confère au polymère une certaine rigidité. Il permet aussi de figer le complexe de pré-polymérisation lors de l'étape de polymérisation afin de conserver la forme et la taille de la cavité de reconnaissance créé. Cependant, la synthèse d'un hydrogel pour imprimer des molécules hydrophiles dans des solvants polaires nécessite des agents réticulants hydrophiles à base de bis(acrylamide) comme le N,N'-méthylènebis(acrylamide) (**36**) ou le bis(méthacrylamide)<sup>147,148,243</sup>. D'un autre côté, étant donné que l'agent de réticulation présente un pourcentage important dans la formulation du MIP finale, ce dernier doit aussi permettre l'obtention d'un polymère finale biocompatible. Pour ce faire, plusieurs agents de réticulation ont été utilisés dont les plus connus sont le N,N'-méthylènebis(acrylamide) (**50**) ou l'éthylène glycol diméthacrylate (**20**) ou le diéthylène glycol diméthacrylate (**49**).<sup>104</sup>

En se basant à nouveau sur l'article de Xu et al.<sup>238</sup> nous allons utiliser le N, N'-méthylènebis(acrylamide) (**50**) comme agent réticulant. Ce dernier est majoritairement utilisé dans les études sur les MIPs sélectifs à des molécules hydrophiles.<sup>147,148</sup> De plus, cet agent de réticulation a la capacité de générer des macropores au sein de la matrice polymérique qui permettent de faciliter l'adsorption de la molécule recherchée. Cet agent réticulant est hydrophile et permettent de transmettre ce caractère aux cavités de reconnaissance permettant ainsi d'améliorer l'adsorption du template.

### I.4. Choix du solvant de polymérisation ou solvant porogène

La ribavirine est un analogue de nucléoside très polaire comme le montre son Log P égal à -2,7.<sup>244</sup> Cette molécule est donc insoluble dans des solvants organiques aprotiques, limitant ainsi le choix du solvant porogène. Pour sélectionner le meilleur solvant dans lequel aura lieu la synthèse, nous avons procéder à une étude de solubilité de notre molécule cible dans les solvants les plus utilisés dans la synthèse de MIPs. Le solvant porogène doit remplir certaines conditions : il doit être, dans notre cas, biocompatible ou au moins montrer une faible toxicité, il doit pouvoir être éliminé facilement dans l'étape de lavage ou à l'évaporation et, le plus important, il doit être capable de solubiliser tous les composés de la formulation de pré-polymérisation.








Cette étude a eu pour but de trouver le volume de solvant qui permettait de solubiliser 1 mg de notre template, en augmentant progressivement la quantité de solvant. Les concentrations molaires obtenues ont été reportées dans le tableau suivant :

---

<sup>243</sup> Matsunaga, T.; Hishiya, T.; Takeuchi, T., Optimization of Functional Monomer Content in Protein-Imprinted Polymers, *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 2633-2640.

<sup>244</sup> Logiciel MarvinSketech 6.3.0 ChemAxon

Tableau 6 : Solubilité de la ribavirine dans différents solvants utilisés dans la synthèse de MIPs<sup>245</sup>

Solvant	Température (°C)		$\delta_p$	$\delta_h$	$\epsilon$	Solubilité (mM)
Acétonitrile	25		18	6,1	37,5	IS
Chloroforme			3,1	5,7	4,81	IS
Dichlorométhane			7,3	7,1	8,93	IS
Diméthylformamide			13,7	11,3	36,71	< 7
Diméthylsulfoxyde			<b>16,4</b>	<b>10,2</b>	<b>46,68</b>	<b>&lt; 15</b>
Eau			<b>16</b>	<b>42,3</b>	<b>15,5</b>	<b>&lt; 35</b>
Ethanol			8,8	19,4	15,8	< 9
Méthanol			12,3	22,3	33	< 5
Tétrahydrofurane			5,7	8	7,5	IS
Toluène			1,4	2	2,4	IS

$\delta_p$  : paramètres de solubilité,  $\delta_h$  : paramètres de solubilité partiel,  $\epsilon$  : la constante diélectrique, IS : insoluble ou très faiblement soluble

Du fait que la ribavirine soit insoluble dans le chloroforme, le dichlorométhane, le méthanol, le tétrahydrofurane (THF) et le toluène et qu'ils soient classés CMR, ces cinq solvants ont été exclus de notre choix. Le diméthylformamide (DMF) solubilise légèrement la ribavirine, mais il n'a pas été retenu car il est classé CMR. L'éthanol n'est pas toxique, mais il ne propose pas une solubilité suffisante envers la ribavirine pour le retenir comme solvant de polymérisation en bulk. Finalement, le DMSO qui est proche du DMF en terme de polarité sera retenu, car du point de vue de sa toxicité, cette substance est non classée au regard de la réglementation européenne actuellement en vigueur.<sup>245</sup> De même, l'eau (H<sub>2</sub>O) est sélectionnée comme solvant porogène car c'est le solvant le moins toxique pour l'Homme et l'environnement. Bien que ce dernier soit protique et risque de déstabiliser le complexe de pré-polymérisation basé sur des interactions de type liaison hydrogène, Xu *et al.*<sup>238</sup> ont montré que leur MIP était sélectif à la ribavirine dans un solvant comme l'eau. D'autres études ont aussi montré qu'en ayant le bon ratio template/monomères fonctionnels, un MIP avec de bonne capacité et avec une bonne sélectivité pour le template pouvait être synthétisé dans l'eau, malgré son caractère protique très prononcé. De plus, l'eau est capable de solubiliser tous les réactifs de polymérisation comme l'acrylamide ou le MBA (20 g/L à 20°C).

<sup>245</sup> [http://www.inrs.fr/publications/bdd/doc/solvant.html?refINRS=SOLVANT\\_67-68-5](http://www.inrs.fr/publications/bdd/doc/solvant.html?refINRS=SOLVANT_67-68-5).

## II. Etude des interactions template-monomères fonctionnels

Il apparaît que la nature du template et des monomères, ainsi que la réaction de polymérisation elle-même, déterminent la qualité et la performance du polymère produit. De plus, la quantité et la qualité des sites de reconnaissance exprimés dans le polymère à empreintes moléculaires sont une fonction directe du nombre et de la force des interactions template-monomère présentés dans le mélange de pré-polymérisation.<sup>122</sup> Ainsi, pour obtenir des sites de liaison avec une fidélité élevée dans les particules polymériques, il est important de maintenir un complexe template-monomère stable dans les solutions de pré-polymérisation. Ce fait est soutenu par des études théoriques basées sur des calculs de chimie quantique et des simulations de mécanique moléculaire,<sup>246</sup> L'influence critique de la stabilité du complexe sur l'effet d'impression a été expérimentalement étudiée en utilisant les techniques UV-Visible,<sup>247</sup> FT-IR<sup>248</sup> et la RMN<sup>123,249</sup> en solution.

En terme général, les études d'interactions entre le template (T) et des monomères fonctionnels (MF) permettent d'abord de sélectionner le ou les ligands montrant les affinités les plus élevées envers la molécule d'intérêt. La titration RMN permet de calculer la constante d'association qui existe dans un complexe de pré-polymérisation de type T : MF 1 : 1 et de connaître simultanément quelle est la fonction chimique du template qui interagit avec le ligand. Deux autres types de titration spectrométriques auraient pu être menés, la titration en spectrophotométrie UV-visible et en spectrofluorimétrie. Mais, la ribavirine et les monomères choisis absorbent en UV dans le même domaine (chevauchement des spectres d'absorption) et ne montrent aucune fluorescence intrinsèque, ce qui a rendu ces types de titration impossibles. De même, le solvant utilisé, le DMSO, possède un cut-off en UV à 268 nm, ce qui masque complètement le spectre UV de la ribavirine, du AAM et du NIPAm.

---

<sup>246</sup> (a) Karlsson, B. C. G.; O'Mahony, J.; Karlsson, J. G.; Bengtsson, H.; Eriksson, L. A.; Nicholls, I. A. Structure and dynamics of monomer-template complexation: an explanation for molecularly imprinted polymer recognition site heterogeneity, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13297-13304. (b) Nicholls, I. A.; Andersson, H. S.; Charlton, C.; Henschel, H.; Karlsson, B. C. G.; Karlsson, J. G.; O'Mahony, J.; Rosengren, A. M.; Rosengren, K. J.; Wikman, S., Theoretical and computational strategies for rational molecularly imprinted polymer design, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 543-552. (c) O'Mahony, J.; Karlsson, B. C. G.; Mizaikoff, B.; Nicholls, I. A., Correlated theoretical, spectroscopic and X-ray crystallographic studies of a non-covalent molecularly imprinted polymerisation system, *Analyst.* **2007**, *132*, 1161-1168.

<sup>247</sup> Svensson, J.; Andersson, H. S.; Piletsky, S. A.; Nicholls, I. A., Spectroscopic studies of the molecular imprinting self-assembly process, *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 83-886.

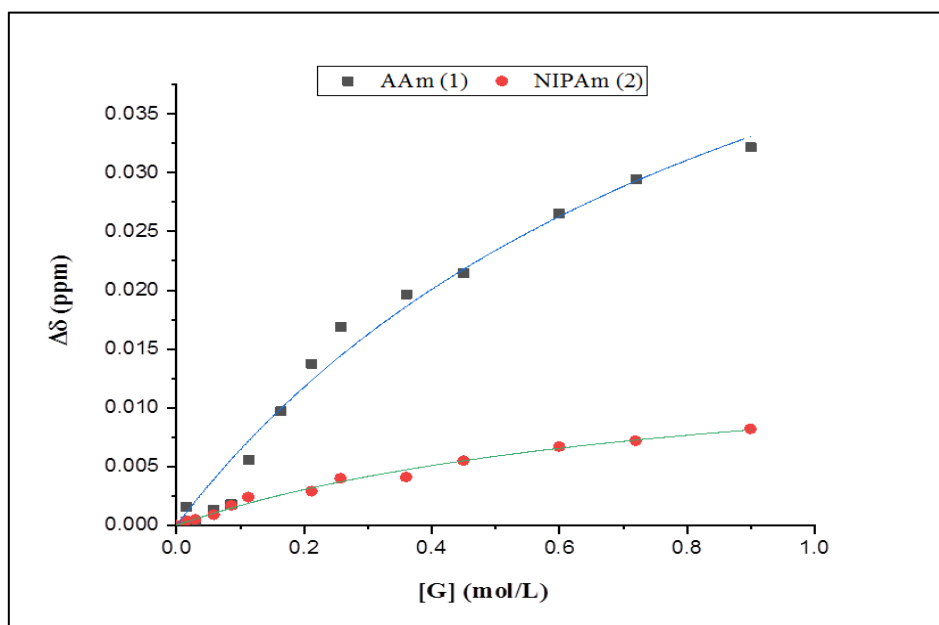
<sup>248</sup> Osmani, Q.; Hughes, H.; Flavin, K.; Hedin-Dahlström, J.; Allender, C. J.; Frisby, J.; McLoughlin, P., The use of FTIR and NMR spectroscopies to study prepolymerisation interactions in nitrogen heterocycles, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1229-1236.

<sup>249</sup> (a) Lübke, C.; Lübke, M.; Whitcombe, M. J.; Vulfson, E. N., Imprinted polymers prepared with stoichiometric template-monomer complexes: efficient binding of ampicillin from aqueous solutions, *Macromolecules.* **2000**, *33*, 5098-5105. (b) Hall, A. J.; Manesiotis, P.; Engenbroich, M.; Quaglia, M.; De Lorenzi, E.; Sellergren, B., Urea host monomers for stoichiometric molecular imprinting of oxyanions, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1732-1736. (c) Wei, S.; Jakusch, M.; Mizaikoff, B., Investigating the mechanisms of 17 $\beta$ -estradiol imprinting by computational prediction and spectroscopic analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 423-431 (d) Ansell, R. J.; Wang, D.; Kuah, J. K. L., Imprinted polymers for chiral resolution of ( $\pm$ )-ephedrine. Part 2: probing pre-polymerisation equilibria in different solvents by NMR, *Analyst.* **2008**, *133*, 1673-1683. (e) Ansell, R. J.; Wang, D., Imprinted polymers for chiral resolution of ( $\pm$ )-ephedrine. Part 3: NMR predictions and HPLC results with alternative functional monomers, *Analyst* **2009**, *134*, 564-576.

### a) Titration $^1\text{H}$ -RMN

La titration  $^1\text{H}$ -RMN de la complexation entre le template et le monomère fonctionnel a été étudiée. Le but est d'appréhender l'affinité entre la ribavirine et chacun des deux monomères choisis : l'AAm (**45**) et le NIPAm (**24**). Cette étude pourra nous aider à avoir une idée sur la force d'interaction entre le template et les monomères choisis.

Les deux monomères possèdent des sites donneurs et accepteurs d'hydrogène (cf. Figure 39) qui peuvent participer à la création de liaison hydrogène avec les sites donneurs et accepteurs d'hydrogène de la ribavirine (cf. Figure 37). Cette étude a été faite dans le DMSO- $d_6$  en raison de la faible solubilité de la ribavirine dans d'autres solvants deutérés. Nous avons préféré utiliser le DMSO- $d_6$  car ce solvant est reconnu être stable dans le temps avec une variabilité inter-lot très faible.<sup>250</sup> Du fait que le DMSO est un solvant aprotique, il permet de favoriser les interactions de type Liaison Hydrogène entre les molécules en solution, ce qui permet un classement plus aisé des monomères fonctionnels utilisés dans cette étude en termes de constante d'association. Cette association a été suivie en se basant sur la différence de déplacement chimique ( $\Delta\delta$ ) du proton du groupement amide ( $-\text{NH}_2$ ) de la ribavirine. Pour cela une concentration constante du template  $[\text{H}]$  a été titrée avec des concentrations progressives du monomère fonctionnel  $[\text{G}]$ . Nous avons tracé la différence de déplacement chimique ( $\Delta\delta$ ) en fonction de la concentration du  $[\text{G}]$ . Nous avons appliqué le modèle de régression non linéaire pour un complexe 1:1 afin d'obtenir les valeurs prédictives des constantes d'association. Afin de pouvoir observer le déplacement chimique, nous avons augmenté la concentration initiale du  $[\text{G}]$ . Comme expliqué précédemment, selon les valeurs de  $[\text{H}]_0$ ,  $[\text{G}]_0$  et le rapport de  $[\text{G}]_0/[\text{H}]_0$ , la valeur de la constante d'association apparente ou  $K_{\text{app}}$  sera comprise dans un intervalle prédéfini de valeurs.<sup>195</sup> Dans notre cas,  $K_{\text{app}}$  appartiendra à l'intervalle  $0,2 - 4 \text{ M}^{-1}$ .



**Figure 40 : Isotherme d'association obtenue par titration  $^1\text{H}$ -RMN de la ribavirine (**6**) par l'acrylamide (**45**) ( $\blacksquare$ ) et le *N*-isopropylacrylamide (**24**) ( $\bullet$ ) dans le DMSO- $d_6$ . Les lignes représentent les points obtenus avec le modèle de régression non linéaire pour chacune des deux titrations en utilisant le modèle 1:1.**

<sup>250</sup> Pauli, G. F.; Gödecke, T.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C., Quantitative  $^1\text{H}$  NMR: Development and Potential of an Analytical Method – an Update, *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 834-851.

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 7. Les valeurs de  $K_{app}$  obtenues nous permettent de voir lesquels des deux monomères a plus d'affinité pour le template.

**Tableau 7 : Les valeurs résultats de la titration RMN obtenues par le modèle de régression non linéaire 1:1.**

Complexe	$K_{app}$ [ $M^{-1}$ ]	$\Delta_{HG}$ [ppm]
Ribavirine/AAm	1,312	0,077
Ribavirine/NIPAm	1,21	0,015

**Les valeurs de  $K_{app}$  montrent que l'acrylamide (45) a plus d'affinité que le NIPAm (24) envers la ribavirine (6).** Cela peut être liée au groupement *isopropyle* porté par l'amide du NIPAm qui rend beaucoup moins aisée la formation de la liaison hydrogène entre le -NH- du NIPAm et le C=O de l'amide de la ribavirine. En ce qui concerne l'AAm, on peut penser que le groupement amide primaire de l'acrylamide se place sans difficulté en vis-à-vis de la fonction amide primaire de la ribavirine (2 liaisons -C=O---H-N-) augmentant ainsi la constante d'association qui en résulte. On peut penser, au vu de ces résultats, que le polymère synthétisé avec le monomère AAm (45), du fait que la ribavirine interagira plus avec lui, retiendra plus longtemps l'antiviral et donc prolongera son temps de libération par rapport à un polymère contenant le NIPAm.

Malgré tout, les deux monomères choisis précédemment seront gardés dans la suite de l'étude, car les valeurs de  $K_{app}$  calculées envers la ribavirine ne sont pas très éloignées et surtout, le NIPAm est connu pour changer drastiquement la morphologie du polymère qu'il constitue en fonction de la température, ce qui peut jouer fortement sur le profil de relargage du médicament.

Maintenant que nous connaissons quelle est la fonction chimique essentielle qui sera sollicitée en premier lieu lors de la formation du complexe ribavirine-monomère fonctionnel et que nous savons que l'AAm montre *à priori* une association plus forte que le NIPAm avec l'antiviral, il nous faut essayer d'optimiser le ratio T : MF. En effet, l'étude menée par RMN a donné des résultats pour des complexes de type 1 : 1, mais la ribavirine montre plus d'un emplacement capable d'interaction de type liaison hydrogène potentielle (cf. Figure 37). De ce fait, et de façon générale dans l'approche non-covalente, l'augmentation de la concentration de monomère utilisée dans la polymérisation améliorera le facteur d'empreinte du MIP.<sup>251</sup> Evidemment, cette règle admet un ratio optimum au-dessous duquel la stabilité du complexe n'est pas maximale, et le facteur d'empreinte est faible, et au-dessus duquel les interactions non-spécifiques deviennent prépondérantes et le facteur d'empreinte décroît à nouveau. Le ratio le plus retenu dans la littérature, jusqu'à ce jour, dans le cas des interactions non-covalentes, est le ratio 1 : 4, car il a souvent conduit à une meilleure sélectivité du MIP.<sup>182</sup> Malheureusement, dans certaines études, ce ratio est choisi sans qu'il soit montré que ce ratio soit le meilleur pour le MIP cherché. De plus, ce choix du ratio template : monomère est dicté par la recherche d'un facteur d'impression le plus élevé possible au détriment de la simple capacité du MIP. En effet, les études portant sur la synthèse de MIPs sont majoritairement effectuées dans le domaine de la chimie analytique où les auteurs cherchent à être le plus sélectif possible dans un

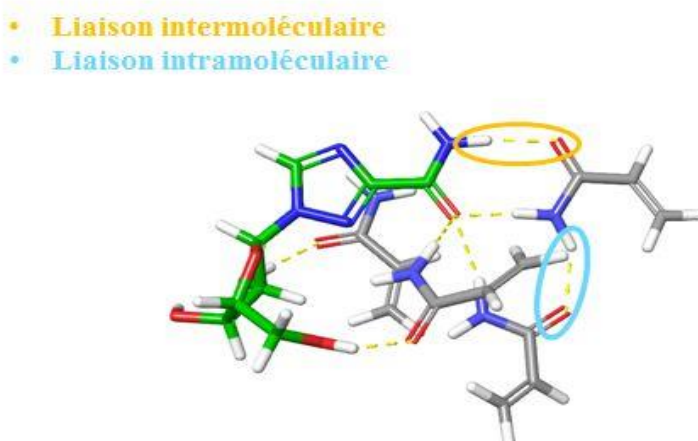
<sup>251</sup> Tom, L. A.; Schneck, N. A.; Walter, C., Improving the imprinting effect by optimizing template:monomer:cross-linker ratios in a molecularly imprinted polymer for sulfadimethoxine, *J. Chromatogr. B.* **2012**, *909*, 61-64

domaine de concentration du template équivalent à l'état de traces. Or, ici, le but est de pouvoir créer un cargo polymérique à empreintes moléculaires qui montrerait, certes, un facteur d'impression intéressant, mais qui posséderait aussi, par unité de masse, une charge de médicament suffisante pour véhiculer au sein des poumons humains une dose de ribavirine capable de montrer une activité antivirale. Il est donc primordial de chercher à optimiser le ratio T : M, entre deux limites choisies, 1/2 et 1/8, pour chacun des solvants porogènes retenus. Pour cela nous avons fait appel à la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT, sigle pour Density Functional Theory) pour calculer l'énergie des différents complexes de pré-polymérisation.

### b) Modélisation moléculaire: Density Functional Theory (DFT)

La modélisation moléculaire (en collaboration avec Dawid Warszycki, Polish Academy of Sciences, Krakow, Pologne) nous permet de prédire la stabilité du complexe de pré-polymérisation dans différents solvants par le calcul de la constante de complexation et donc l'énergie libre de la réaction de complexation. Cette énergie est calculée en fonction des interactions mises en jeu dans le complexe entre monomères et template, et entre monomères eux-mêmes. La minimisation de cette énergie permet de trouver le rapport T/M adéquat et, par anticipation, de prévoir les propriétés de reconnaissance du polymère.<sup>252</sup> Ces calculs sont effectués pour des ratios ribavirine et AAm ou NIPAm compris entre 2 et 8. La stabilité du complexe est calculée dans les différents solvants, eau, DMSO et mélange MeCN/Eau (87/13, v/v). Ce dernier mélange possède le même caractère aprotique que le DMSO avec un  $\delta_h \sim 10,8$ , et est capable de solubiliser la ribavirine (< 15 mM). Le protocole utilisé pour mener à bien ces calculs est décrit dans la partie expérimentale.

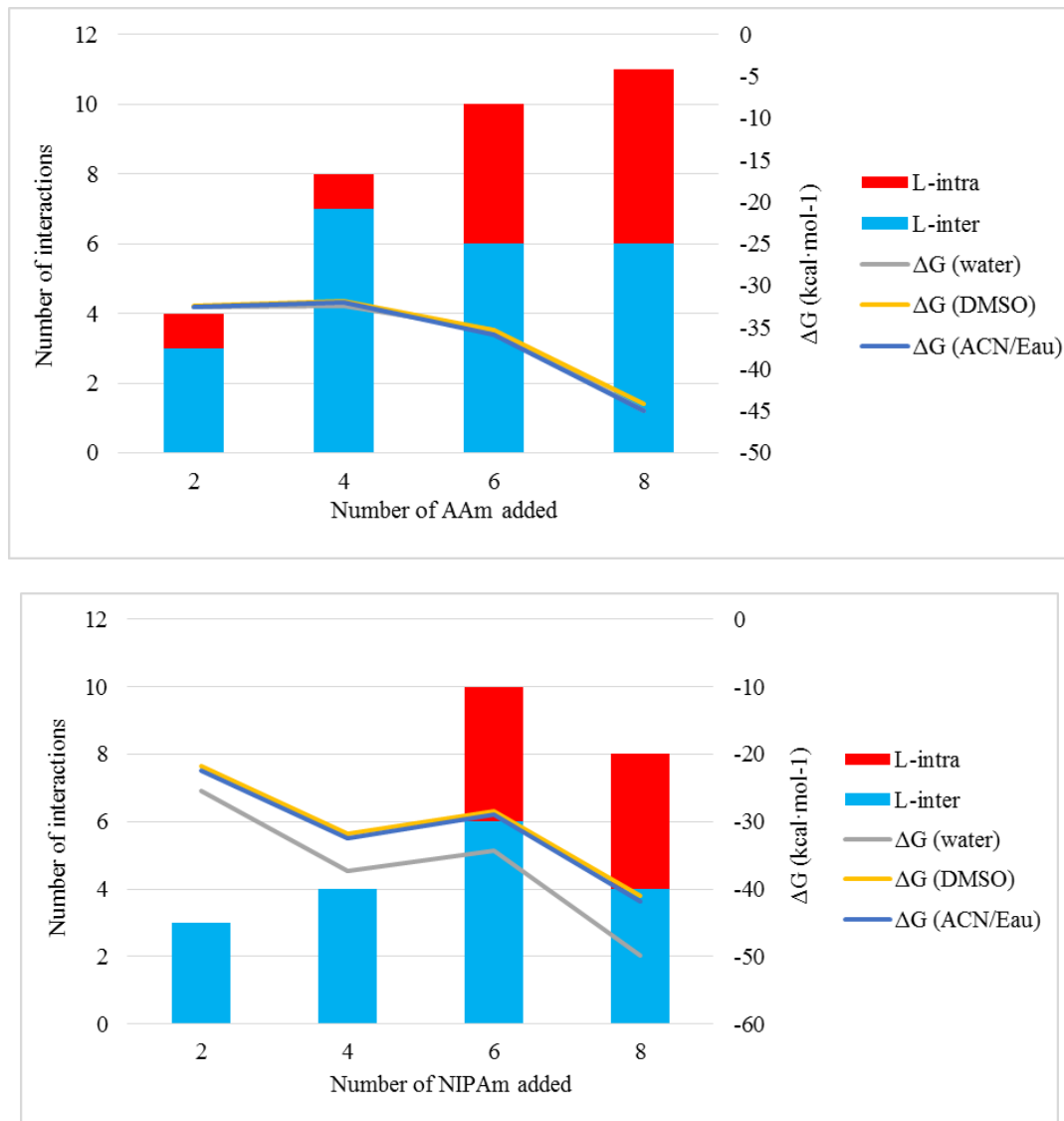
Lors de la complexation de la ribavirine avec le monomère fonctionnel, des liaisons hydrogènes sont formées entre les deux molécules (liaison intermoléculaire), permettant dans un premier temps d'encager la molécule cible. Puis au fur et à mesure que le ratio template : monomère augmente, les monomères forment entre eux des interactions de type liaison hydrogène afin de stabiliser la structure pré-formée (liaison intramoléculaire). Ce phénomène est montré sur la Figure 41.



**Figure 41 : Schéma montrant le complexe formé entre la molécule de ribavirine (squelette carboné en vert) et 4 molécules d'acrylamide (squelette carboné en gris)**

<sup>252</sup> Lv, Y.; Lin, Z.; Tan, T.; Feng, W.; Qin, P.; Li, C., Applications of molecular dynamics modeling for the prediction of selective adsorption properties of dimethoate imprinting polymer, *Sens. Actuators. B: Chemical.* **2008**, *133*, 15-23

Le nombre de liaisons intermoléculaires formées entre le template et les molécules de monomère ainsi que les liaisons intramoléculaires établies entre les monomères ajoutés, ont été comptées (Annexes 1). Ces nombres ainsi que les valeurs de  $\Delta G$ , calculées dans les différents solvants, ont été reportés sur la Figure 42. Plus la valeur absolue du  $\Delta G$  est grande plus la stabilité du complexe de pré-polymérisation est élevée.



**Figure 42 : Nombre de liaisons intermoléculaires (template-monomère) (bleu) et de liaisons intramoléculaires (monomère-monomère) (rouge) en fonction du ratio template/monomère. Les valeurs de  $\Delta G$  en kcal/mol sont représentées en fonction du ratio (template-monomère) dans les différents solvants.**

Le nombre d'interactions intermoléculaires nous permet de voir le nombre de monomère qui se lie directement au template. Pour l'acrylamide, ce nombre augmente puis se stabilise à 6 dès que le ratio atteint 1 : 6. Au-delà de ce ratio, ce sont les interactions intramoléculaires qui continuent à augmenter. Pour le NIPAm, le nombre d'interactions intermoléculaires mises en jeu au sein du complexe diminue au-delà du ratio 1 : 6. Il semble que la gêne stérique engendrée par le groupement isopropyle joue un rôle important en ce qui concerne l'accessibilité au template des monomères. Le ratio 1 : 6 semble être un ratio intéressant car à partir de lui, le nombre d'interactions intramoléculaires est soit favorisé, soit le nombre d'interactions intermoléculaires est défavorisé. De ce fait, le ratio 1 : 6 (T : MF) apparaît comme étant le plus approprié pour nos

formulations. Le ratio 1 : 4 n'est pas retenu pour l'acrylamide car l'énergie libre est plus basse pour le complexe formé avec 6 monomères, quel que soit le solvant. En ce qui concerne le NIPAm, le ratio 1 : 4 montre une valeur du  $\Delta G$  plus faible que le ratio 1 : 6, mais le nombre de liaisons intermoléculaires est plus grand avec le 1 : 6. Au cours de la polymérisation les arrangements tridimensionnels calculés seront en partie bouleversés. Il semble naturel de rechercher un nombre de liaisons intermoléculaires le plus élevé possible pour qu'une partie d'entre elles puissent encore être effective au sein du polymère final. Ainsi, la reconnaissance des fonctions chimiques de la ribavirine jouera encore son rôle au sein des cavités formées.

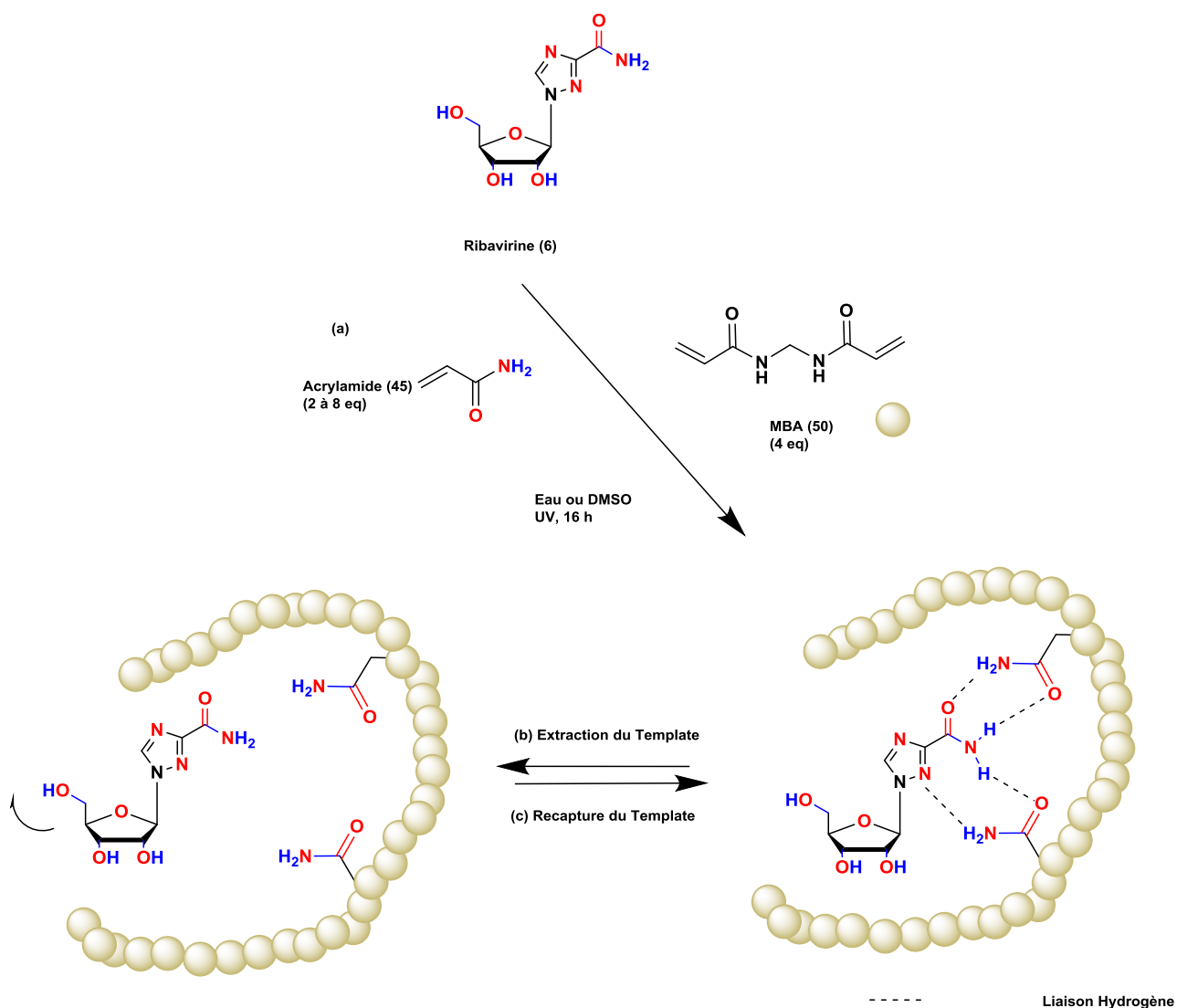
La valeur de  $\Delta G$  calculée *in silico* permet d'avoir une idée sur la stabilité du système pour chaque ratio d'un monomère dans un solvant donné. Dans le cas de l'AAM, la différence d'énergie du complexe est non significative (-35,31 kcal.mol<sup>-1</sup> dans l'eau ; -35,34 kcal.mol<sup>-1</sup> dans le DMSO et -35,9 kcal.mol<sup>-1</sup> dans le mélange MeCN/Eau). Contrairement au NIPAm, pour lequel le complexe le plus stable sera formé dans l'eau avec un  $\Delta G$  de -34,36 kcal.mol<sup>-1</sup>. Les interactions de type hydrophobe semblent donc jouer un rôle important dans la stabilité de ce complexe en phase aqueuse. La présence du groupement isopropyle, apolaire, au sein du monomère NIPAm semble en être la cause.

**En conclusion, d'après ces résultats prédictifs, le ratio 1/6 (T/M), avec les monomères AAM et NIPAm, semble être le meilleur ratio pour la synthèse de MIPs sélectifs de la ribavirine.**

### III. Synthèse des polymères imprimés

Afin de confirmer le ratio retenu par des études prédictives *in silico*, une recherche du ratio optimal sera menée en synthétisant les polymères à base d'AAM ou de NIPAm en bulk en faisant varier le ratio ribavirine : monomère fonctionnel. Le ratio T : MF varie entre 1 : 2 et 1 : 8.





**Figure 43 : Exemple d'un schéma de synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires pour la reconnaissance de la ribavirine (6) :** (a) formation du complexe de polymérisation de ratio 1:2 (T : MF) en faisant varier le ratio du (45) et polymérisation, (b) extraction du template afin d'obtenir des cavités spécifiques pour ce dernier, (c) recapture de la ribavirine dans le milieu aqueux.

Pour ce faire, 1 mmol de ribavirine est dissoute dans deux solvants différents, l'eau (voir Tableau 8) et le DMSO (voir Tableau 14 dans la partie expérimentale), puis les monomères fonctionnels sont ajoutés pour obtenir les ratios désirés. Après une dissolution complète du mélange, Le MBA (agent de réticulation) et le VA-044 (initiateur) sont ajoutés. Le mélange est dégazé par un flux d'azote pendant 5 min dans la solution. Ensuite, la polymérisation est induite et maintenue par voie photochimique pendant 16h. Le polymère obtenu est broyé grossièrement et lavé avec un mélange méthanol/acide acétique (8/2, v/v). Puis, les particules sont réduites en taille par broyage et tamisage jusqu'à obtenir des particules irrégulières de taille comprise entre 25 et 60  $\mu\text{m}$ .

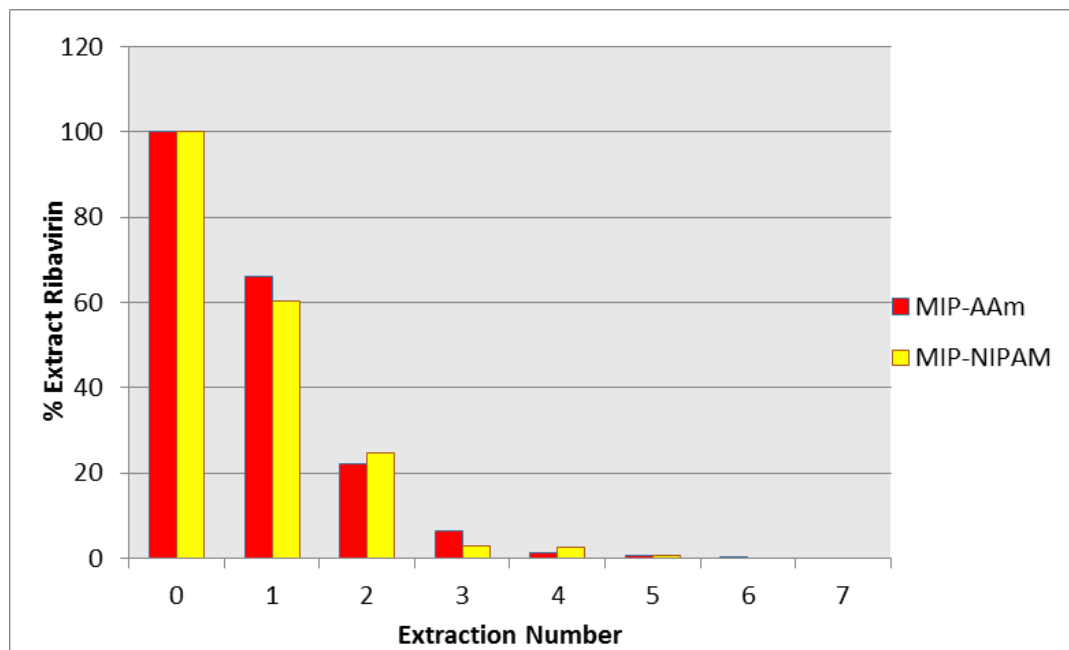
**Tableau 8 : Formulations des polymères imprimés synthétisés avec l'AAm (45) et le NIPAm (24) dans l'eau.**

	Template	Monomère	Ratio	MBA	VA-044	Eau
<b>MIP-01</b>	0,244 g	<b>(45)</b> 0,142 g	1/2	0,616 g	10 mg	12 mL
<b>MIP-02</b>	0,244 g	<b>(45)</b> 0,284 g	1/4	0,616 g	10 mg	12 mL
<b>MIP-03</b>	0,244 g	<b>(45)</b> 0,426 g	1/6	0,616 g	10 mg	12 mL
<b>MIP-04</b>	0,244 g	<b>(45)</b> 0,568 g	1/8	0,616 g	10 mg	12 mL
<b>MIP-05</b>	0,244 g	<b>(24)</b> 0,227 g	1/2	0,616 g	10 mg	12 mL
<b>MIP-06</b>	0,244 g	<b>(24)</b> 0,452 g	1/4	0,616 g	10 mg	12 mL
<b>MIP-07</b>	0,244 g	<b>(24)</b> 0,678 g	1/6	0,616 g	10 mg	12 mL
<b>MIP-08</b>	0,244 g	<b>(24)</b> 0,905 g	1/8	0,616 g	10 mg	12 mL

Pour chaque polymère imprimé synthétisé, un polymère non imprimé ou NIP (Non-Imprinted Polymer) est synthétisé. Le polymère non imprimé (NIP), ou polymère référence, est obtenu de la même façon que le MIP sans l'ajout de la molécule empreinte (ribavirine) à la formulation. Le NIP va jouer le rôle de témoin pour mettre en évidence les empreintes créées.

#### **a) Optimisation de l'extraction du template**

L'étape de lavage après la polymérisation pour les MIPs permet d'éliminer les résidus de réactifs (monomères, réticulants...), de solvant, et, le plus important, d'extraire la molécule empreinte. Dans la littérature, plusieurs méthodes de lavage ont été mises en place dont la plus connue est celle du lavage par Soxhlet.<sup>134</sup> Cette technique permet d'extraire le template du polymère plusieurs fois de suite de manière continue, sans changer le solvant d'extraction. L'une des limitations de cette technique est le temps de lavage qui peut aller jusqu'à 24 h, voire même plus. De ce fait, nous avons choisi d'optimiser ce mode d'extraction en utilisant les ultrasons et en changeant la phase de lavage toutes les heures. Pour cela, le MIP est mis en suspension dans 40 mL d'un mélange MeOH/AcOH (8/2, v/v) et le mélange est soumis aux ultrasons dans un bain à ultrason (50 °C, 37 Hz). Toutes les heures, le tube est centrifugé et le liquide de lavage est changé par 40 mL d'une nouvelle solution de lavage. Quelques microlitres du surnageant ont été injectés en HPLC afin de déterminer la quantité extraite de ribavirine chaque heure (Figure 44).



**Figure 44 : Le pourcentage d'extraction de la ribavirine en fonction du nombre de lavage, pour chacun des MIP-AAm (rouge) et MIP-NIPAM (jaune).**

Les résultats obtenus montrent que l'extraction de la ribavirine n'évolue plus au bout du 6<sup>ème</sup> lavage (6h). Pour le MIP-AAm, 236,5 mg (96,8 %) de ribavirine ont été extraits, et pour le MIP-NIPAM, 222,4 mg (92 %) de ribavirine ont été extraits sur une masse totale de 244,2 mg. A partir du 6<sup>ème</sup> lavage, aucune trace de ribavirine n'a été détectée dans le surnageant du lavage. **Ainsi, la technique d'extraction de la ribavirine par ultrasons permet de ramener le temps de l'étape de lavage à 6 heures.**

Le pourcentage de ribavirine (< 7 %) non quantifiée, a pu être en partie perdu lors de la récupération du polymère et de son broyage grossier, et est dû aussi à la ribavirine qui reste incorporée profondément dans la matrice et devient inaccessible au solvant de lavage même après une extraction longue du MIP.<sup>133</sup>

### **b) Etude de ratio T/MF**

Nous avons comparé les MIPs et les NIPs obtenus avec les ratios T : MF égaux à 1:2, 1:4, 1:6 et 1:8. Dans la littérature, le paramètre omniprésent pour décrire la qualité d'un MIP par rapport à son NIP est le facteur d'impression. Historiquement, ce facteur d'impression a été appelé ainsi par les groupes de recherche de *I. Karube*,<sup>253</sup> *C. Baggiani*<sup>254</sup> et *J. A. Tarbin*,<sup>255</sup> suite à des études comparatives de la rétention du template sur une colonne MIP par rapport à une colonne NIP. Ce concept de description de l'efficacité d'impression des colonnes analytiques a ensuite été transféré à

<sup>253</sup> Levi, R.; McNiven, S.; Piletsky, S. A.; Cheong, S. H.; Yano, K.; Karube, I., Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2017–2021.

<sup>254</sup> Baggiani, C.; Trotta, F.; Giraudi, G.; Giovannoli, C.; Vanni, A., A molecularly imprinted polymer for the pesticide bentazone, *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 263–266.

<sup>255</sup> Tarbin, J. A.; Sharman, M., Synthesis and preliminary evaluation of a molecularly imprinted polymer selective for artificial phenolic estrogenic compounds, *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 105-107.

d'autres applications telles que les expériences d'incubation par batch<sup>256</sup>. Or, dans ce cas le facteur d'impression dépend de la concentration libre du template utilisée. Par conséquent, il est évident que des facteurs d'impression différents pourraient être calculés pour le même polymère à différentes concentrations d'incubation. De plus, lors des évaluations chromatographiques, le facteur d'impression peut ne pas convenir dans le cas d'une évaluation des colonnes MIP chromatographiques en régime non linéaire<sup>257</sup>. En dépit de cette considération, le facteur d'impression est toujours le plus souvent utilisé pour donner une première impression sur la qualité d'un polymère nouvellement synthétisé. Nous avons donc choisi de ne pas comparer les polymères synthétisés en fonction de leur Imprinting Factor, mais en fonction de leur capacité de liaison ou Binding Capacity. En effet, le *Binding Capacity* décrit le rapport des quantités adsorbées sur le MIP et le NIP à une concentration d'incubation donnée. Les quantités étant définies en mole ou en masse d'analyte pouvant être liées par unité de masse de polymère séché. Ce paramètre est généralement déterminé par des incubations de type batch.<sup>258,239</sup> La capacité de liaison n'est pas nécessairement égale à la quantité de molécules de gabarit utilisées pour générer l'empreinte, car toutes les molécules de template ne créent pas un emplacement d'adsorption spécifique, donnant ainsi lieu à des sites de liaison non spécifiques dans chaque matrice polymère. Le « *binding capacity* » a été calculé pour une solution de ribavirine de 1mM, pour chaque ratio T : MF, selon l'équation suivante :

$$\text{Binding capacity} = \frac{Q_{\text{Rib ads MIP}}}{Q_{\text{Rib ads NIP}}} \quad \text{Eq. 17}$$

Pour cela, une masse de 20 mg de polymère est placée dans un eppendorf et mise en contact avec une solution aqueuse de ribavirine (1 mM). Les eppendorfs sont incubés dans un Thermomixer® C (25 °C, 700 rpm) pendant 16 heures. Puis la suspension est centrifugée, le surnageant prélevé et directement analysé en HPLC. Les incubations ont lieu dans l'eau quel que soit le solvant utilisé dans la synthèse (DMSO ou eau). En effet, l'incubation n'a pu être menée dans le DMSO car ce solvant est beaucoup trop visqueux pour être prélevé avec précision et injecté en HPLC.

**Les premiers résultats obtenus montrent que les quantités adsorbées par les polymères synthétisés dans le DMSO sont beaucoup plus faible que celles obtenues par des polymères synthétisés dans l'eau.** Cet effet de solvant a été démontré dans plusieurs études. Il a été observé que les MIPs montrent une meilleure reconnaissance lorsque les tests sont effectués dans le même solvant que celui de synthèse<sup>152,259</sup> qui est le solvant porogène. Le polymère suspendu dans le solvant de polymérisation reprendrait la même structure microscopique, du fait d'une solvataion

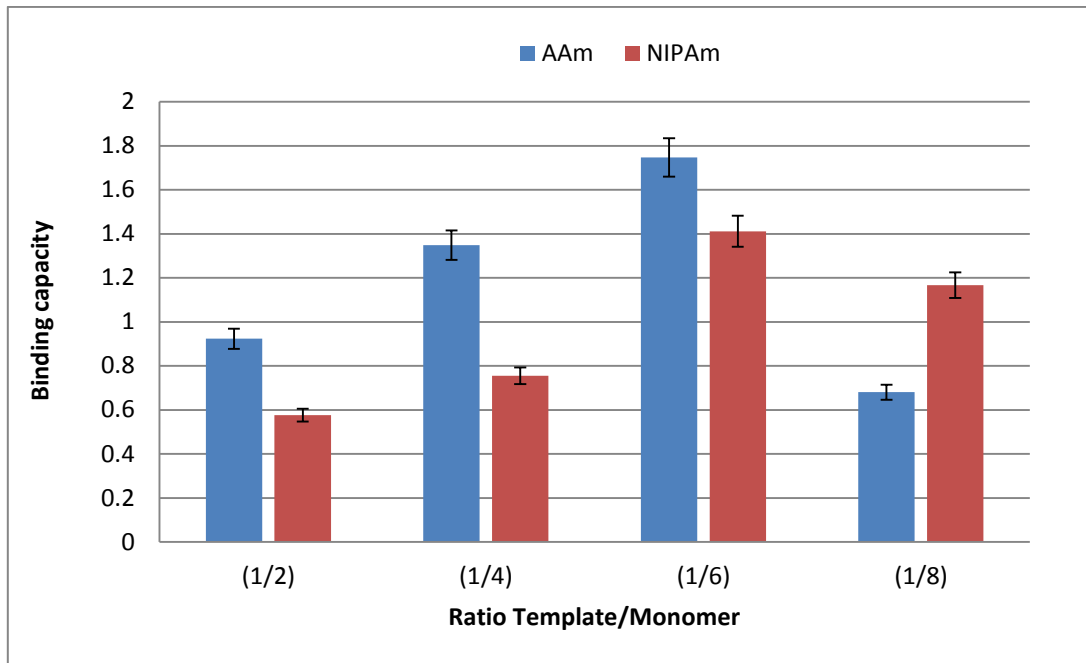
<sup>256</sup> Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A.; Piletska, E. V.; Chen, B.; Karim, K.; Turner, A. P. F., "Bite-and-Switch" approach using computationally designed molecularly imprinted polymers for sensing of creatinine, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 631-637.

<sup>257</sup> Tóth, B.; Pap, T.; Horvath, V.; Horvai, G., Nonlinear adsorption isotherm as a tool for understanding and characterizing molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1119, 29-33.

<sup>258</sup> (a) Zhu, Q. Z.; Haupt, K.; Knopp, D.; Niessner, R., Molecularly imprinted polymer for metsulfuron-methyl and its binding characteristics for sulfonylurea herbicides, *Anal. Chim. Acta.* **2002**, 468, 217-227. (b) Moein, M. M.; Javanbakht, M.; Akbari-adergani, B., Molecularly imprinted polymer cartridges coupled on-line with high performance liquid chromatography for simple and rapid analysis of dextromethorphan in human plasma samples, *J. Chromatogr. B.* **2011**, 879, 777-782.

<sup>259</sup> (a) Muldoon, M.T.; Stanker, L.H., Molecularly imprinted solid phase extraction of atrazine from beef liver extracts, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 803-808. (b) Sharma, A. C.; Borovik, A. S., Design, Synthesis, and Characterization of Templated Metal Sites in Porous Organic Hosts: Application to Reversible Dioxxygen Binding, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8946-8955.

identique à celle adoptée au cours de la synthèse. Ainsi, les interactions établies entre la molécule cible et les monomères au cours de la synthèse du MIP se formeraient de la même façon. Certains auteurs parlent d'effet d'impression du solvant porogène<sup>260</sup> pour exprimer son influence sur le comportement du polymère (comme le gonflement). Le choix de l'eau dans le test de recapture ne perturbe pas la solubilité de la ribavirine, car celle-ci est très soluble en phase aqueuse comme dans le DMSO. Ces résultats (Figure 45) nous ont orientés vers l'utilisation des polymères imprimés synthétisés dans l'eau.



**Figure 45 : Le *binding capacity* obtenu pour les polymères à base d'AAm (bleu) et du NIPAm (rouge) synthétisés dans l'eau, en faisant varier le ratio T/MF.**

La Figure 45 montre que le meilleur ratio T : MF est le 1 : 6 avec un BC de 1,7 pour le **MIP-03** et un BC de 1,4 pour le **MIP-07** pour une solution de ribavirine à 1 mM. **Ces résultats expérimentaux corrént très bien avec le ratio retenu après l'étude prédictive du ratio optimum par DFT.**

### III. Caractérisation morphologique des MIP

Des études morphologiques des polymères ont été réalisées afin de déterminer la porosité et la surface spécifique du polymère (MEB et BET) et son taux de gonflement.

#### a) Etude du Taux de gonflement du polymère

Les polymères imprimés/non imprimés ont été synthétisés en utilisant le MBA comme agent réticulant. Cet agent réticulant étant hydrophile et ajouté en faible proportion à la formulation (ratio template : cross-linker 1 : 4) avec un taux de réticulation de 40%, a permis d'obtenir un hydrogel ; c'est-à-dire un polymère non rigide. Cet hydrogel est capable d'absorber une grande quantité d'eau lui permettant d'augmenter sa taille : c'est le phénomène de gonflement selon l'équation suivante :

<sup>260</sup> Nomachi, M.; Kubo, T.; Hosoya, K.; Kaya, K., Solvent effects in the preparation of molecularly imprinted polymers for melatonin using *N*-propionyl-5-methoxytryptamine as the pseudo template, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 1291-1296.

$$\text{Taux de gonflement (g/g)} = \frac{\text{masse polymère gonflé}}{\text{masse du polymère sec}} \quad \text{Eq. 18}$$

Le taux de gonflement a été étudié en mettant en contact 10 mg de polymère avec 1 mL d'eau pendant 24 h. Les résultats sont présentés dans le Tableau 9.

**Tableau 9 : Les valeurs de taux de gonflement (g/g) pour les différents MIP/NIP-03 (Poly (AAM-co-MBA)) et MIP/NIP-07 (Poly (NIPAm-co-MBA)) à 25 et 40°C.**

	Poly (AAM-co-MBA)		Poly (NIPAm-co-MBA)	
	25°C	40°C	25°C	40°C
<b>MIP</b>	16 ± 1,92	18 ± 1,13	14 ± 1,56	10 ± 1,01
<b>NIP</b>	14 ± 1,34	16 ± 0,56	12 ± 1,29	8 ± 0,78

Ces valeurs montrent que malgré un taux de réticulation assez conséquent pour un hydrogel, on arrive à obtenir des polymères montrant des taux de gonflement assez importants.

- Le poly (AAM-co-MBA) possède un taux de gonflement assez important qui augmente légèrement avec la température.
- Le poly (NIPAm-co-MBA) montre un taux de gonflement plus faible que le poly (AAM-co-MBA).

Cela s'explique par le fait que l'AAM qui est un monomère plus hydrophile que le NIPAm, grâce à sa fonction amine primaire, rend le polymère plus hydrophile, facilitant ainsi la pénétration de l'eau dans ses mailles.<sup>261,262</sup>

En ce qui concerne le comportement du poly (NIPAm-co-MBA) avec la température, son taux de gonflement est plus faible à 40 °C qu'à 25 °C. Cette décroissance est due essentiellement au NIPAm, qui est un monomère thermosensible. Ce dernier permet au polymère de passer d'un état hydrophile à un état hydrophobe à partir de 32 °C. Ce qui a pour conséquence, en milieu aqueux, un repliement du polymère sur lui-même par effet hydrophobe. La taille du polymère va diminuer ainsi que la taille de ses pores. La pénétration de l'eau au sein de la matrice polymérique est rendue plus difficile.<sup>263,262</sup> L'inconvénient d'un tel comportement est que ce changement de caractère hydrophile peut gêner l'adsorption de la ribavirine à 40 °C. La charge du polymère en principe actif ne devra pas être effectuée à température élevée. Par contre, l'avantage d'un tel comportement morphologique peut avoir une influence positive sur la libération de la molécule en augmentant le temps de diffusion.

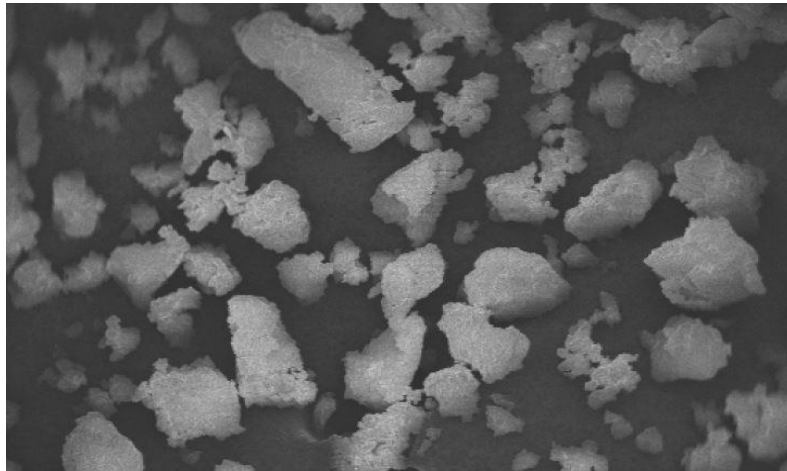
## b) Microscopie électronique à balayage

<sup>261</sup> Abraham, A. A.; Sen, A. K., Thermal and swelling studies of hydrophobically modified polyacrylamide hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *117*, 2795-2802

<sup>262</sup> Seddiki, N.; Aliouche, D., Synthesis, rheological behavior and swelling properties of copolymer hydrogels based on poly(*N*-isopropylacrylamide) with hydrophilic monomers, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2013**, *27*, 447-457.

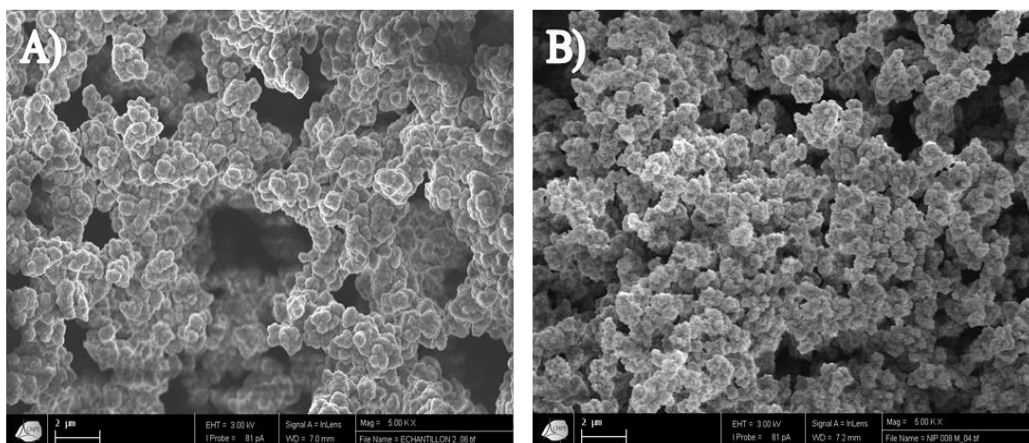
<sup>263</sup> Shekhar, S.; Mukherjee, M.; Sen, K., Studies on thermal and swelling properties of Poly (NIPAM-co-2-HEA) based hydrogels, *Adv. Mater. Res.* **2012**, *1*, 269-284.

Une étude par microscope électronique à balayage (MEB) a été réalisée afin de déterminer la structure des polymères. Comme le montre la Figure 46, des particules de taille non homogène comprise entre 25 et 60  $\mu\text{m}$  ont été obtenues après le broyage et le tamisage.



**Figure 46 : Exemple d'un cliché par MEB de particules de MIP-03 (grossissement : 200 x) montrant des formes et des tailles irrégulières comprises entre 25 et 60  $\mu\text{m}$ .**

Une particule de chaque polymère lavé (après extraction) a été observée au MEB en augmentant le grossissement. Comme nous pouvons le voir sur la figure 10, la surface des particules du MIP-03 a une forme dite de « chou-fleur » et montre une forte densité de macropores ( $\phi > 50 \text{ nm}$ ). Cette structure macroporeuse est obtenue grâce à l'emploi d'un solvant porogène très polaire et protique : l'eau. En effet, il a été montré dans la littérature que les solvants polaires et protiques conduisent généralement à une structure macroporeuse des polymères, et donc à de plus faibles capacités que les polymères synthétisés dans les solvants apolaires<sup>264</sup>. Les images obtenues de la surface de particules polymériques issues du MIP-07 montrent la même structure en « chou-fleur » mais la taille moyenne des pores est plus petite que pour le MIP-03.



**Figure 47 : Surface des particules du MIP-03 (A) et du MIP-07 (B) obtenues par MEB (échelle 2  $\mu\text{m}$ )**

<sup>264</sup> Luliński, P.; Maciejewska, D., Impact of functional monomers, cross-linkers and porogens on morphology and recognition properties of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylamine imprinted polymers, *Mater. Sci. Eng. C* **2011**, *31*, 281-289.

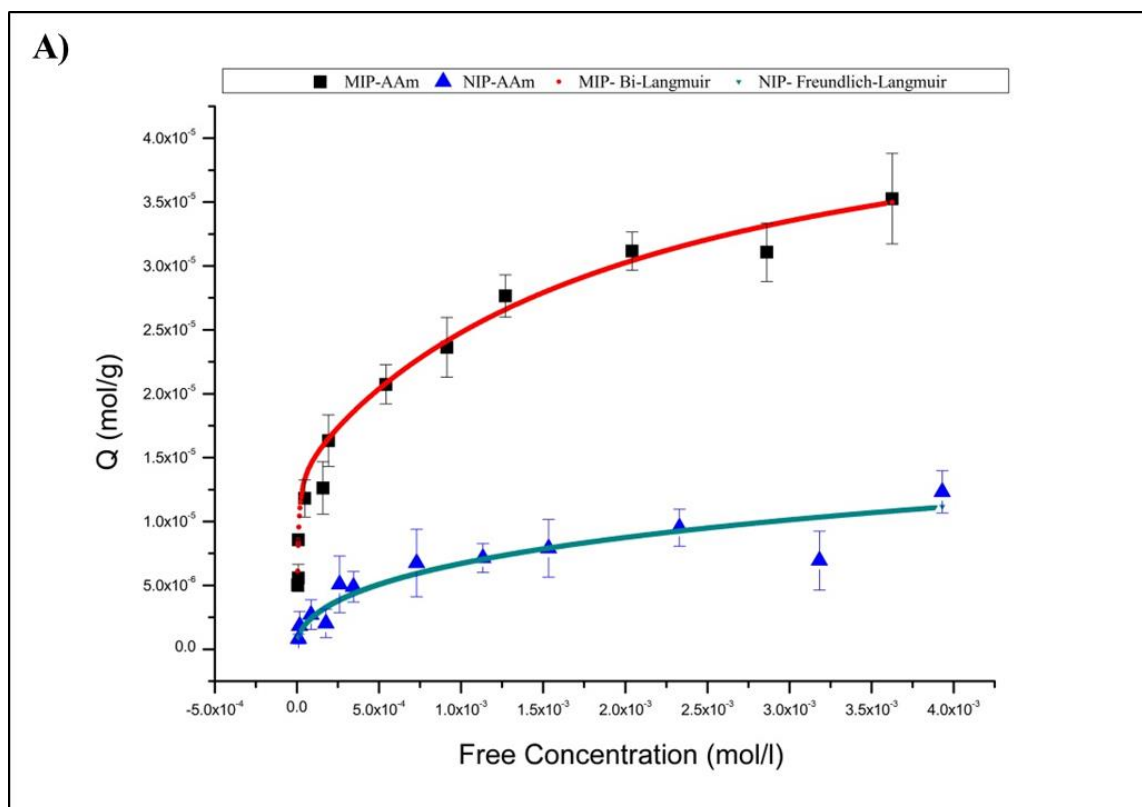
#### IV. Etude et caractérisation de l'adsorption de la ribavirine

Le facteur d'impression ou le Binding capacity est le paramètre utilisé pour caractériser la qualité relative du MIP par rapport au NIP. Or, celui-ci ne peut être calculé que pour un seul point de concentration de l'analyte. Par conséquent, pour une caractérisation exhaustive du comportement de liaison du MIP, des isothermes d'adsorptions tracées pour le MIP et le NIP doivent être rapportés, comme proposé par le groupe de C. Allender.<sup>265</sup> Le tracé de ces isothermes se basera sur des données provenant d'analyse en batch des différents polymères synthétisés. De ces isothermes nous caractérisons l'affinité et la capacité maximale des MIP/NIP.<sup>123</sup> Les quantités adsorbées de ribavirine (mole) par nos matériaux en faisant varier la concentration (mol/L) des solutions mises à leur contact sont obtenues grâce à l'équation suivante :

$$B = \frac{F - C_{sur}}{m} * V \quad \text{Eq. 19}$$

**B** est la concentration adsorbée (**Bound**) de ribavirine en mol/g, **C<sub>sur</sub>** est la concentration de ribavirine dans le surnageant (à l'équilibre) en mol/L, **F** la concentration libre (**Free**) de la ribavirine mise en contact (mol/L), **V** est le volume de la solution de ribavirine (L) et **m** est la masse totale du polymère (g). Ici, la concentration en ribavirine varie entre 0,02 et 4 mM et la masse du polymère est de 20 mg.

Les résultats obtenus permettent de tracer les quantités de ribavirine adsorbées (mol/g) en fonction de la concentration des différentes solutions de ribavirine mises en contact (mol/L). Ces tracés permettent de visualiser la différence d'adsorption de la ribavirine pour chacun des MIP et des NIP.



<sup>265</sup> Castell, O. K.; Barrow, D. A.; Kamarudin, A. R.; Allender, C. J., Current practices for describing the performance of molecularly imprinted polymers can be misleading and may be hampering the development of the field. *J. Mol. Recognit.* **2011**, *24*, 1115-1122.



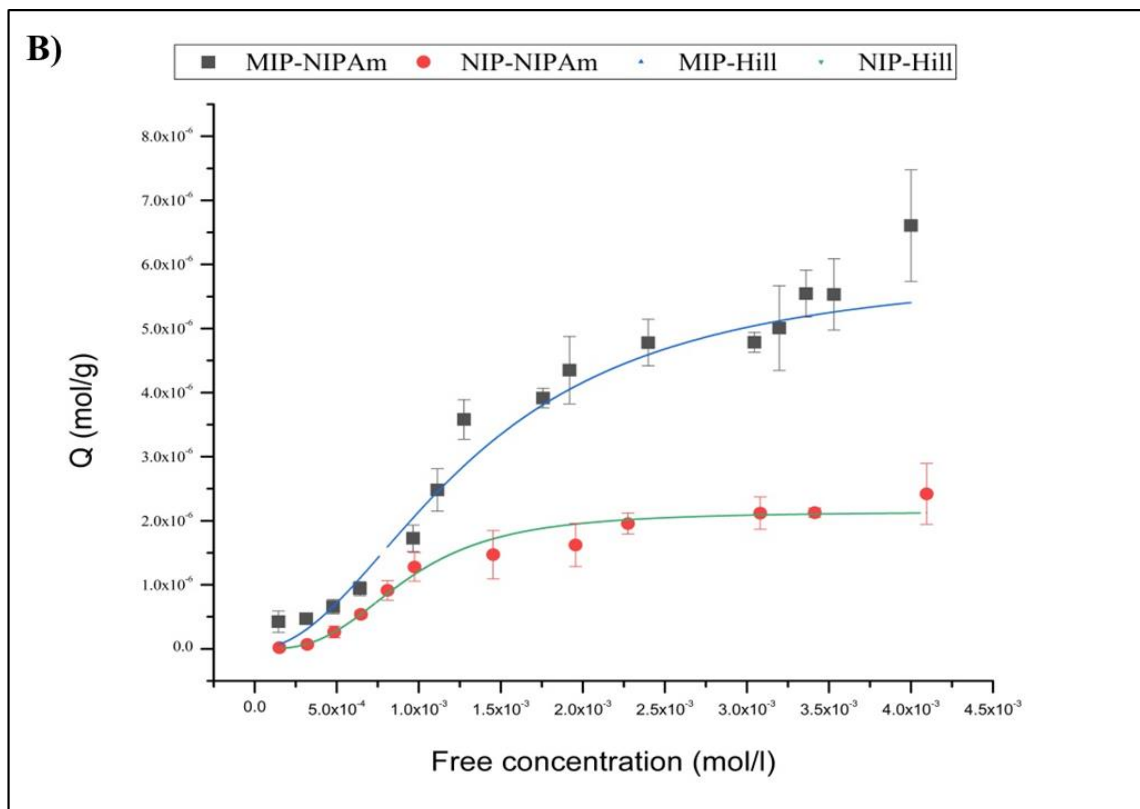


Figure 48: Isothermes d'adsorption de la ribavirine pour les MIPs et NIPs à base d'AAM (MIP/ NIP-03) (A) et de NIPAm (MIP/NIP-07) (B). Les courbes correspondent aux tracés issus des modèles de régression non linéaire répertoriés dans le tableau 10.

Afin de déterminer les paramètres caractéristiques de chacun des MIP et NIP, à savoir la constante d'association  $K_a$  entre la ribavirine et le polymère et la capacité maximale  $N$ , en mole de ribavirine par gramme de polymère, nous avons appliqué les modèles d'isotherme d'adsorption cités dans la littérature spécialisée.<sup>197</sup> Les modèles les plus connus sont le modèle de Langmuir (L), de Bi-Langmuir (B-L), de Freundlich (F) et de Freundlich-Langmuir (F-L).

D'après la Figure 48, les courbes représentant les capacités d'adsorption  $Q$  des MIPs et NIPs s'éloignent l'une de l'autre au fur et à mesure que la concentration de ribavirine libre augmente. Cela montre qu'il y a bien un comportement d'adsorption vis-à-vis de la ribavirine différent entre un polymère dont la formulation contenait cette molécule et un polymère dont la formulation était identique mais sans ribavirine. Cet excès de capacité montré par le premier polymère est communément accepté comme provenant d'une population de cavités formée en surface de ce polymère plus ou moins spécifique du template. D'où la mise en évidence de l'impression moléculaire de notre matériau. Quant au NIP, il permet ainsi de quantifier les interactions non spécifiques présentes naturellement à sa surface. Il devient le polymère référence ou non imprimé.

Les courbes obtenues par les données expérimentales montrent que le **MIP-03** semble suivre l'isotherme de type « L », indiquant une saturation progressive des sites d'absorption du polymère. En revanche, pour les **MIP-07** et **NIP-07**, l'allure des courbes est un peu particulière et correspond au type « S ».<sup>266</sup> Afin de chercher les paramètres d'intérêt,  $N$  et  $K$ , il faut recouvrir du mieux possible les

<sup>266</sup> Limousin, G.; Gaudet, J. P.; Charlet, L.; Szenknect, S.; Barthès, V.; Krimissa, M., Sorption isotherms : A review on physical bases, modeling and measurement, *Appl. Geochem.* **2007**, 22, 249-275.

données expérimentales avec celles calculées par les modèles d'isotherme. Pour ce faire, la régression non linéaire est utilisée. Le choix du meilleur modèle se base sur l'ajustement des résultats expérimentaux avec le tracé donné par chacun des isothermes. Afin de déterminer la bonne adéquation entre le modèle théorique et expérimental, plusieurs tests statistiques ont été pris en compte tel que le coefficient de détermination  $R^2$ , ainsi que le test de Fisher  $F_{value}$ , comme il est préconisé dans l'article de Ncibi et al.<sup>267</sup> Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 10 : Valeurs des constantes d'affinités ( $K_a$  ;  $L.mol^{-1}$ ), nombre de site actif ( $N$  ;  $mol.g^{-1}$ ), coefficient de détermination ( $R^2$ ), valeur du test statistique de Fisher ( $F_{value}$ ) obtenus en appliquant les différents modèles d'isotherme d'adsorption aux MIP/NIP-03 et MIP/NIP-7**

MIP-03						NIP-03				
Modèle	N	$K_a$	m	$R^2$	$F_{value}$	N	$K_a$	m	$R^2$	$F_{value}$
Langmuir	$2,48.10^{-5}$	$61.10^3$	-	0,853	$1,3.10^3$	$1,11.10^{-5}$	$2,1.10^3$	-	0,913	$0,09.10^3$
Bi-Langmuir	$3,25.10^{-5}$	$0,4.10^3$	-	0,977	$3,5.10^3$	$1,23.10^{-5}$	$0,63.10^3$	-	0,954	$0,07.10^3$
	$1,4.10^{-5}$	$173.10^3$				$2,12.10^{-6}$	$62.10^3$			
Freundlich	$2,34.10^{-5}$	$6,02.10^3$	0,22	0,948	$3,9.10^3$	$8,61.10^{-6}$	$4,13.10^3$	0,41	0,954	$0,19.10^3$
Freundlich - Langmuir	$5,8.10^{-3}$	$5,82.10^{-8}$	0,23	0,948	$2,3.10^3$	$3,79.10^{-5}$	$0,041.10^3$	0,47	0,955	$0,11.10^3$
MIP-07						NIP-07				
Modèle	N	$K_a$	m	$R^2$	$F_{value}$	N	$K_a$	m	$R^2$	$F_{value}$
Langmuir	$2,6.10^{-5}$	$0,08.10^3$	-	0,950	$0,25.10^3$	4,26	$1,46.10^{-4}$	-	0,950	$0,06.10^3$
Bi-Langmuir	N/D	N/D	-	N/D	N/D	N/D	N/D	-	N/D	N/D
	N/D	N/D				N/D	N/D			
Freundlich	$4,6.10^{-7}$	$1,4.10^3$	0,93	0,943	$0,22.10^3$	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Freundlich - Langmuir	$5,9.10^{-6}$	$0,75.10^3$	2,05	0,981	$0,42.10^3$	$2,14.10^{-6}$	$1,08.10^3$	3,08	0,997	$1,21.10^3$
Hill	$5,98.10^{-6}$	$694.10^3$	2,03	0,981	$0,42.10^3$	$2,14.10^{-6}$	$2,05.10^9$	3,06	0,997	$1,21.10^3$

Le co-polymère imprimé AAm-co-MBA, ou **MIP-03**, suit le modèle de Bi-Langmuir. Ce modèle se repose sur une distribution homogène des sites de reconnaissance en mettant en avant théoriquement l'existence de deux types de sites de reconnaissances (haute et basse affinité) dans le MIP. Ces deux types de populations sont formés d'une part par les cavités créées spécifiques de la ribavirine, et d'autre part par les interactions non spécifiques situées en surface du polymère. **Ces**

<sup>267</sup> Ncibi, M. C., Applicability of some statistical tools to predict optimum adsorption isotherm after linear and non-linear regression analysis, *J. Hazard. Mater.* **2008**, *153*, 207-212.

deux types de population possèdent chacune une constante d'association et une capacité différentes. La population la plus représentée,  $3,25 \cdot 10^{-5}$  mol/g, montre l'affinité la plus faible,  $K_a = 0,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ , tandis que la population la moins représentée,  $1,4 \cdot 10^{-5}$  mol/g, montre l'affinité la plus forte,  $K_a : 173 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Ces résultats montrent que, malgré une synthèse effectuée dans l'eau, l'acrylamide est capable de former un complexe stable avec la ribavirine, template très polaire, et donner naissance à des cavités spécifiques de la ribavirine avec une affinité assez élevée. Par contre, la quantité retenue d'antiviral par ces sites sélectifs reste dans l'absolu plus faible que celle retenue par les interactions non spécifiques.

Pour le polymère NIPAm-co-MBA, le **MIP-07**, on obtient une meilleure adéquation avec le modèle théorique de Freundlich-Langmuir. Ici, en plus du modèle de Langmuir ou de Bi-Langmuir, il y a un paramètre supplémentaire, **m**, qui caractérise l'hétérogénéité de distribution des sites, et qui est compris entre 0 et 1.<sup>268</sup> Or, suite aux calculs effectués, la valeur de **m**, pour ce modèle est trouvée supérieure à 1. Ce phénomène est caractéristique de la présence d'un effet de coopérativité. Le fait de travailler avec un hydrogel qui présente un fort taux de gonflement en milieu aqueux, n'est pas étranger à la présence de cette coopérativité positive. Le modèle d'isotherme d'adsorption qui permet de prendre en compte ces valeurs de **m** et sur lequel le modèle de Freundlich-Langmuir est basé, est un modèle issu de la biochimie et est connu comme étant le modèle de Hill. Ce modèle a déjà été appliqué pour la caractérisation de polymères imprimés.<sup>269</sup>

Ce modèle de Hill s'applique aussi bien au **MIP** qu'au **NIP-07**. La valeur de **m** est trouvée supérieure à 1 pour ces deux polymères. Cela indique la présence de phénomène de coopérativité positive au niveau de l'adsorption de la molécule cible. Ce phénomène montre que plus d'une molécule cible peuvent loger dans les cavités de reconnaissances spécifiques. Soit les molécules de ribavirine s'agrègent avant de pénétrer dans la cavité, soit les molécules viennent se caler les unes après les autres dans le site, la première formant des interactions avec la seconde. Ce phénomène peut être induit par le gonflement de notre matériau qui conduit à un élargissement de la cavité permettant l'insertion et l'interaction de plus d'une molécule à l'intérieur de cette empreinte. Donc, dans ce cas le paramètre **m** pour le modèle de Hill peut nous donner le nombre moyen de molécules présentes dans un site actif.<sup>269,270</sup> **D'après les résultats obtenus, le modèle de Hill, indique que le MIP-07 possède une capacité de  $5,98 \cdot 10^{-6}$  mol/g et une constante d'affinité très élevée égale à  $694 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Au contraire, le NIP-07 a une capacité plus faible, égale à  $2,14 \cdot 10^{-6}$  mol/g, mais montre une constante d'affinité plus élevée, égale à  $2,05 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ .**

La comparaison des deux MIPs montre que la quantité adsorbée par le **MIP-07** reste plus faible que celle adsorbée par le **MIP-03**. Cela peut être expliqué par la diminution de l'hydrophilie.<sup>145</sup> cette diminution provient principalement de l'utilisation du NIPAm (**24**) comme monomère fonctionnel qui est moins polaire que l'acrylamide (**45**).

<sup>268</sup> Umpleby, R. J.; Baxter, S. C.; Chen, Y.; Shah R. N.; Shimizu, K. D., Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4584-4591.

<sup>269</sup> Lavignac, N.; Brain, K. R.; Allender, C. J., concentration dependent atrazine-atrazine complex formation promotes selectivity in atrazine imprinted polymers, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 138-144.

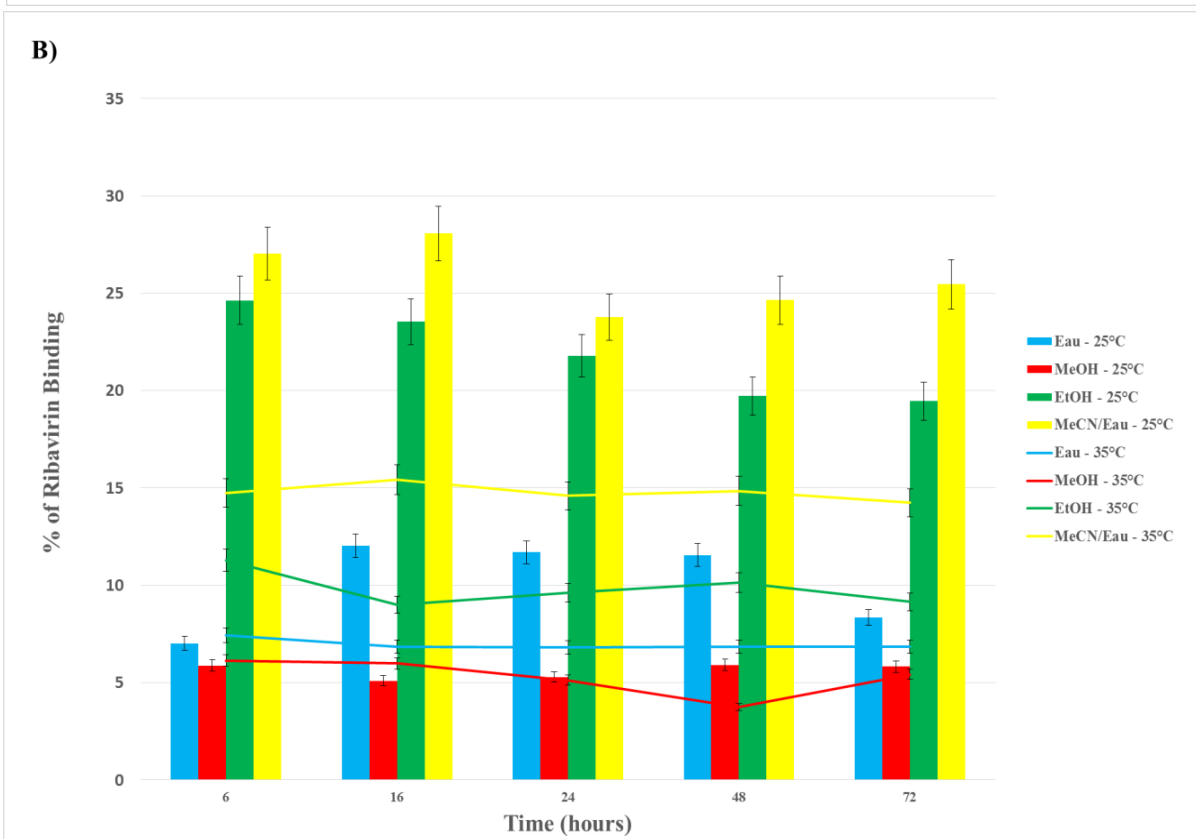
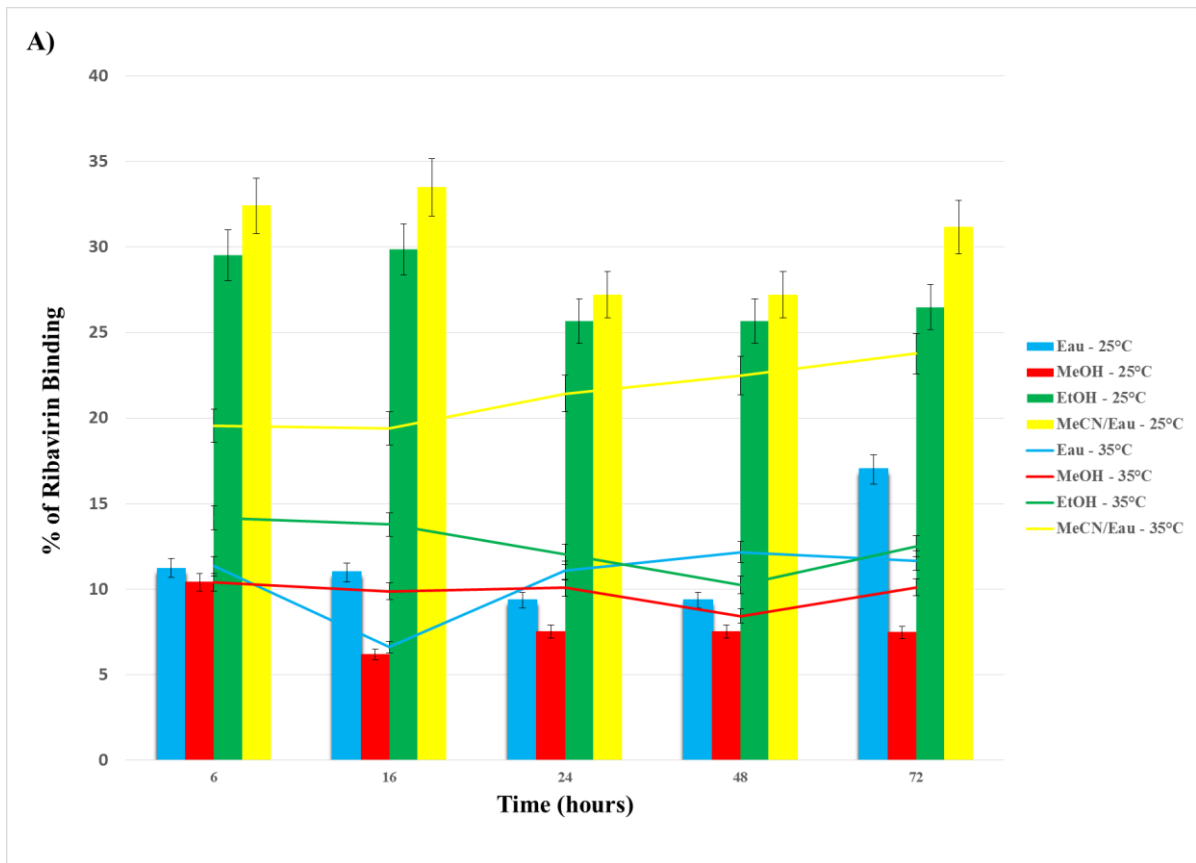
<sup>270</sup> Kadhivel, P.; Azenha, M.; Shinde, S.; Schillinger, E.; Gomes, P.; Sellergren, B.; Silva, A. F., Imidazolium-based functional monomers for the imprinting of the anti-inflammatory drug naproxen: Comparison of acrylic and sol-gel approaches, *J. Chromatogr. A.* **2013**, *1314*, 115-123.

## IV.1. Optimisation de l'adsorption de la ribavirine

Grâce au tracé des isothermes d'adsorption mené précédemment, il apparaît que les polymères synthétisés avec la ribavirine montrent une capacité d'adsorption de cette même molécule plus grande que les polymères non imprimés. Ainsi, les MIPs créés remplissent la condition *sine qua non* de leur utilisation en tant que cargos, qui est d'avoir une capacité plus élevée que leur polymère de référence. La seconde condition est de montrer que la ribavirine engagée dans ses sites sélectifs est libérée de façon retardée par rapport à celle seulement retenue par des interactions non spécifiques sur les polymères de référence. Cette étude fera l'objet du paragraphe suivant. Avant cela, il nous est apparu intéressant de savoir si nous pouvions augmenter la capacité des polymères en jouant sur le solvant de recapture. Le but étant de pouvoir apporter au patient une quantité d'antiviral suffisante pour combattre l'infection pulmonaire tout en diminuant la quantité de polymère inhalé.

Les valeurs de N précédemment calculées l'ont été avec une recapture effectuée dans l'eau. L'eau a été choisie pour sa capacité de solubiliser tous les réactifs (solvant polaire), principalement la ribavirine qui est un antiviral très polaire, dont le Log P est égal à -2,7. Cependant, lors de l'étape de recapture, il se peut que la pénétration de la ribavirine dans le polymère soit un peu perturbée par les interactions du solvant fortement protique ( $\delta_h \sim 42$ ).<sup>89</sup> Ces interactions compétitives développées par le solvant peuvent diminuer les interactions de la molécule avec les cavités de reconnaissance et ralentir l'équilibre thermodynamique d'adsorption.

Afin d'optimiser l'étape de charge des polymères avec la ribavirine, nous avons fait varier le solvant de recapture. Les solvants ont été choisis parmi les solvants capables de solubiliser la ribavirine et qui soient moins protique que l'eau. Etant donné que cette optimisation va servir à charger notre MIP-DDS, le solvant doit être d'une toxicité faible ou capable d'être évaporé facilement. Notre choix s'est porté sur l'éthanol (EtOH), le méthanol (MeOH), et le mélange acétonitrile/eau 87/13 (v/v) qui mime le DMSO avec un  $\delta_h \sim 10,8$ . L'eau a été gardée et prise comme référence. Pour compléter cette étude, nous avons aussi étudié le temps de recapture en le faisant varier de 6 à 72h. De plus, cette étude a été menée à deux températures différentes : 25 et 35 °C. Les résultats sont montrés à la Figure 49.



**Figure 49 : Pourcentage de recapture de la ribavirine par le A) MIP-03 et le B) MIP-07 en faisant varier la température (25 et 35°C), le temps d'équilibre (6, 16, 24, 48 et 72 heures) et les solvants de recapture : eau (bleu), MeOH (rouge), EtOH (vert) et MeCN/Eau (jaune), [ribavirine]= 1mM, m(polymère) = 20 mg.**

Les résultats obtenus montrent clairement que les pourcentages de recapture les plus élevés sont obtenus avec le mélange MeCN/Eau (87/13, v/v). Cela s'explique par le fait que c'est le solvant le plus aprotique des quatre choisis avec un  $\delta_h \sim 10,8$  (Tableau 6) Ce qui permet de diminuer la compétition qui peut s'établir entre le solvant polaire et la ribavirine dans l'établissement de liaison hydrogène avec les sites spécifiques du polymère.<sup>89</sup> Cependant, bien qu'il soit plus aprotique que l'eau, le MeOH montre un pourcentage de recapture plus faible. Ce résultat peut s'expliquer par le gonflement du polymère qui est moindre dans le MeOH que dans l'eau. Les mailles de l'hydrogel étant plus resserrées dans le MeOH que dans l'eau, la surface accessible à la ribavirine sera plus faible et sa quantité adsorbée aussi.

Concernant le temps d'adsorption, les résultats montrent que l'équilibre thermodynamique est atteint rapidement pour les meilleurs solvants, l'EtOH et le mélange MeCN/eau. Car les pourcentages de ribavirine ne changent pas de façon drastique sur le domaine choisi de temps. Par contre, pour la suite de l'étude, le temps de charge sera de 16h, car les valeurs les plus élevées sont tout de même trouvées pour cette durée de contact. Au niveau de la température, nous remarquons que le **MIP-03** voit pour le meilleur solvant sa capacité diminuer avec l'augmentation de la température. Pourtant, il a été constaté que son gonflement augmentait avec la température et que la ribavirine pouvait potentiellement accéder plus profondément dans la matrice polymérique (mais ceci est constaté avec l'eau et non avec le mélange MeCN/eau). Or, à 35 °C, la température doit sûrement désorganiser les complexes formés entre les fonctions amide de la cavité et la ribavirine, les rendant moins stables qu'à 25 °C. La solubilité de la ribavirine est accrue et les coefficients de diffusion sont aussi plus élevés. Ce qui peut en partie expliquer ce comportement. De même, pour le **MIP-07**, une diminution du pourcentage de recapture de la ribavirine à 35 °C a lieu pour tous les solvants. Cela s'explique qu'à 35 °C, le polymère gonfle moins qu'à 25 °C et que le nombre de sites accessibles est moins élevé. En effet, comme décrit précédemment, le poly (NIPAm-co-MBA) devient hydrophobe en se repliant sur lui-même. Ce qui rend l'accès de la ribavirine vers les sites un peu plus difficiles et minimise aussi les interactions non spécifiques.<sup>241</sup>

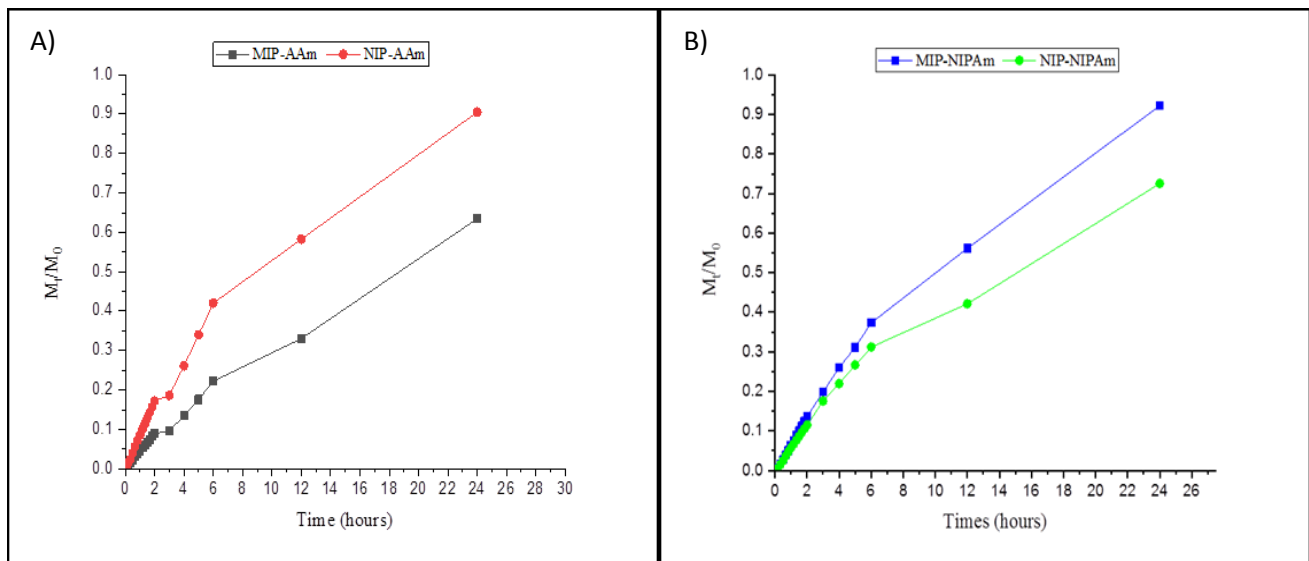
**En conclusion, l'utilisation du mélange MeCN/Eau (87/13, v/v) parait la plus intéressante pour avoir une charge optimale des polymères. Le temps d'adsorption peut être limité à 16h ce qui permet d'atteindre le bon équilibre thermodynamique. Cette adsorption sera effectuée à 25 °C afin d'éviter tout changement de morphologie qui pourrait influencer le taux de recapture de la ribavirine (cas du MIP-07 particulièrement).**

## V. Etude cinétique du relargage de la ribavirine

Etant donnée l'objectif final de la synthèse d'hydrogels imprimés, une étude cinétique de la libération de la ribavirine a été effectuée sur nos matériaux. Pour cela, chacun des matériaux synthétisés (MIP/NIP-03 et MIP/NIP-07), 50 mg, ont été chargés en utilisant une solution de ribavirine à 10 mM dans le mélange MeCN/Eau (87/13, v/v).

Cette étude de relargage a été menée dans l'eau et dans une solution aqueuse tamponnée à pH 7,4 (0.01 M) avec du PBS (Tampon phosphate salin), à deux températures, 25° et 40 °C. Cette dernière température mime la température corporelle d'un sujet souffrant de la forme grave de la grippe. Le relargage a été suivi sur 24h.

Les résultats sont donnés sous la forme du rapport entre la masse relarguée de ribavirine ( $M_t$ ) sur la masse initiale de ribavirine contenue dans le polymère ( $M_0$ ) en fonction du temps. La Figure 50 présente les résultats obtenus pour le relargage dans l'eau à 25°C.



**Figure 50 : Relargage de la ribavirine (exprimé sous forme  $M_t/M_0$ ) en fonction du temps dans l'eau à 25°C pour chacun des MIP/NIP 03 (AAm) et 07 (NIPAM)**

Les courbes obtenues montrent une différence dans les profils de relargage entre les hydrogels imprimés et les non imprimés quelle que soit la formulation. Pour la formulation à base d'AAm (Figure 50, A), cette dernière montre un léger plateau au bout de deux heures. Ce phénomène peut être lié à l'hydratation du polymère.<sup>271</sup> Dans un premier temps, la ribavirine libérée fait partie de celle retenue par des interactions non spécifiques sur la surface externe des particules. Ce qui est communément appelé burst ou fuite. Puis, la cinétique de gonflement (hydratation en profondeur) du polymère atteint un seuil critique qui permet de relarguer la ribavirine retenue plus en profondeur qui met un certain temps à atteindre la solution en fonction du coefficient de diffusion intra particulaire. Le burst est plus élevé pour le NIP-03, car la ribavirine n'est retenue que par des interactions non spécifiques. De même, après le gonflement du polymère non imprimé, la pente de la courbe est plus élevée que celle du MIP-03. La libération de la ribavirine provenant des profondeurs des particules est plus rapide car celle-ci est moins bien retenue que celle située dans des cavités spécifiques du MIP.

Concernant la formulation contenant le NIPAm, on peut distinguer une différence de relargage entre le **MIP-07** et le **NIP-07**. Néanmoins, le **NIP-07** relargue moins vite sa quantité chargée que le **MIP-07** (72 % pour le **NIP-07** au bout de 24h et 92 % pour le **MIP-07**). Cela peut s'expliquer par la différence entre la moyenne des constantes d'association. Etant donné que cette dernière est plus faible pour le MIP, la dissociation sera plus facile et plus rapide ( $K_d = 1/K_a$ ).

<sup>271</sup> Batycky, R. P.; Hanes, J.; Langer, R.; Edwards, D. A., A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres, *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1464-1477.

### a) Influence du milieu sur la libération de la ribavirine

Nous avons étudié l'influence du milieu sur la libération de la ribavirine. Pour cela nous avons utilisé un milieu capable de donner les mêmes propriétés que le milieu physiologique retrouvé sur la paroi cellulaire interne des poumons. Nous avons utilisé un tampon phosphate PBS à pH égal à 7,4 à une concentration de 0,01 M (0,0027 M en KCl et 0,137 M en NaCl). Les résultats obtenus à 25 °C sont montrés sur la Figure 51.

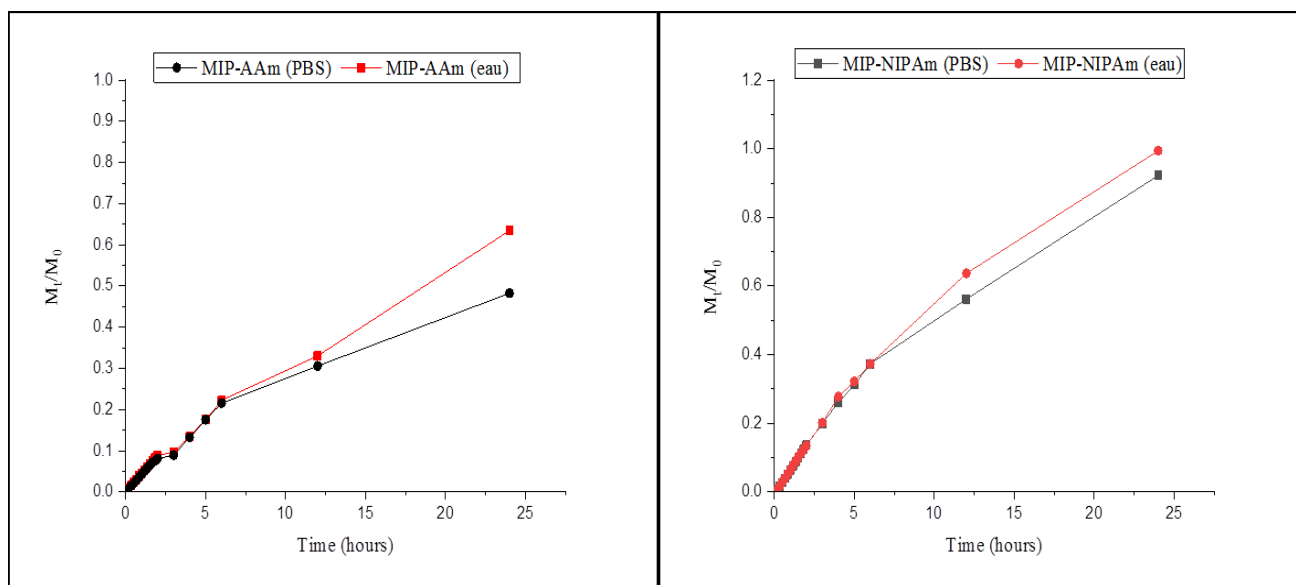


Figure 51 : Relargage de la ribavirine (exprimé sous forme  $M_t/M_0$ ) en fonction du temps dans l'eau et le PBS à 25°C pour chacun des MIP/NIP 03 (AAM) et 07 (NIPAM)

Les résultats obtenus montrent une légère différence entre les profils de relargage dans l'eau et dans le PBS. Cette différence n'est visible qu'à partir de la 12<sup>ème</sup> heure. Cela peut s'expliquer par la différence de concentration en sels des deux milieux et la diminution du taux de gonflement dans le PBS comme le montre *Sabbagh et al.*<sup>272</sup> et *Sivanantham et al.*<sup>273</sup> Le milieu tamponné contient une concentration assez élevée en différents éléments, ce qui pourrait diminuer la diffusion de l'antiviral au sein de cette solution retardant légèrement le profil de libération du principe actif.

### b) Influence de la température sur la libération de la ribavirine

Les propriétés de libération de nos matrices polymériques en fonction de la température ont été étudiées. Pour cela, nous avons placés les **MIP-03** et **MIP-07** dans un milieu contenant du PBS à 40 °C.

<sup>272</sup> Sabbagh, F.; Muhamad, I. I., Acrylamide-based Hydrogel Drug Delivery Systems: Release of Acyclovir from MgO nanocomposite hydrogel, *J. Taiwan. Inst. Chem. Eng.* **2017**, *72*, 182-193.

<sup>273</sup> Sivanantham, M.; Tata, B. V. R., Swelling/deswelling of polyacrylamide gels in aqueous NaCl solution: Light scattering and macroscopic swelling study, *Pramana - Journal of Physics.* **2012**, *79*, 457-469.



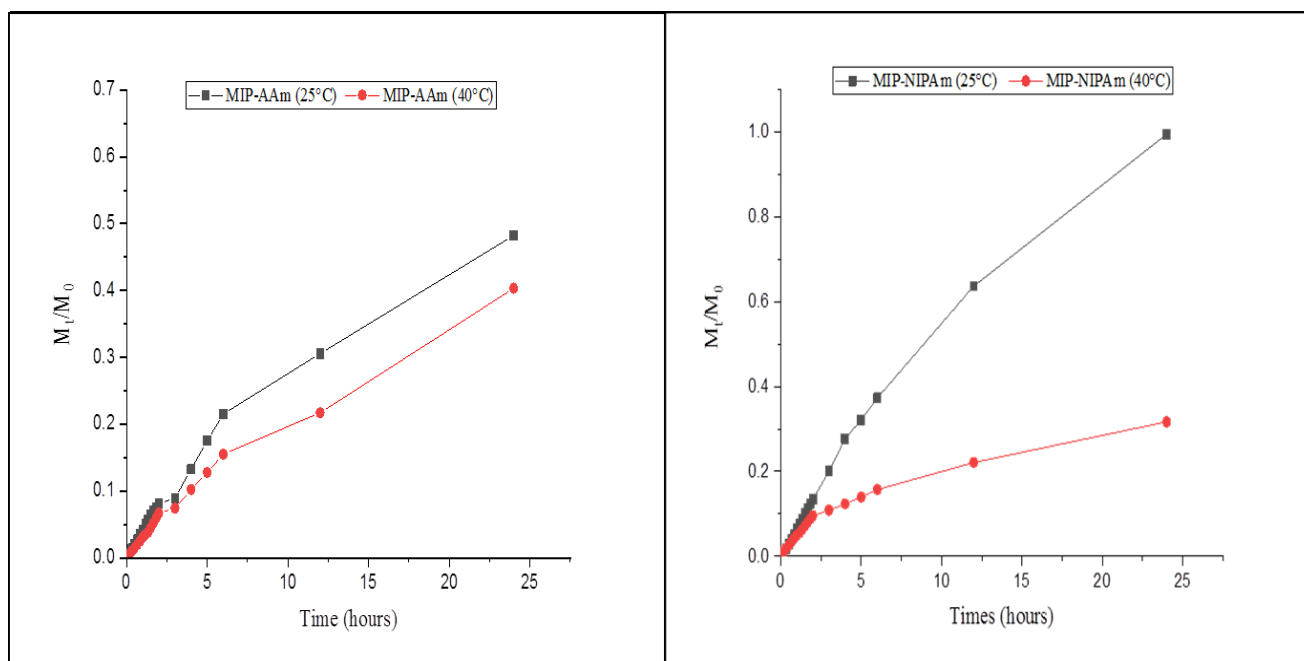


Figure 52 : Relargage de la ribavirine (exprimé sous forme  $M_t/M_0$ ) en fonction du temps dans le PBS à 25°C et 40°C pour chacun des MIP/NIP 03 (AAm) et 07 (NIPAm)

Les résultats obtenus, montrent en premier lieu pour le **MIP-03**, une diminution du relargage de la ribavirine au cours du temps. Cette diminution peut être liée à la diminution du taux de gonflement du polymère à 40°C. Bien que cette diminution du taux de gonflement n'est pas aussi importante. Néanmoins, elle intervient sur la diffusion de la molécule dans le milieu environnant rendant ainsi le temps de relargage légèrement plus lent.

Cependant, la différence de température joue un rôle très important dans le relargage de la ribavirine à partir d'un MIP contenant du NIPAm (**MIP-07**). Ce dernier est thermosensible et donc change de morphologie à une température supérieure à 32°C. Ici, à 40°C, la température étant plus élevée que sa LCST, le poly(NIPAm-co-MBA) gonfle moins qu'à 25°C et a tendance à se recroqueviller. Les chaînes de polymères commencent à interagir entre elles par la force de liaison hydrophobe poussant le polymère à se replier sur lui-même. Seule la ribavirine qui est sur la surface va être libérée facilement. Le reste se retrouve piégé à l'intérieur de la matrice et sa diffusion vers le milieu externe va être ralentie.<sup>274</sup>

### c) Détermination du mode de libération de la ribavirine

Plusieurs phénomènes interviennent dans la libération d'un principe actif d'une matrice polymérique. Pour mieux définir ces phénomènes, nous avons eu recours à plusieurs modèles mathématiques. Ces modèles possèdent certaines limitations et dépendent de la nature de notre matrice.<sup>219,275</sup> Compte tenu du fait que nos matériaux possèdent un taux de gonflement qui n'est pas négligeable et une diffusion lente, nous avons choisi d'appliquer le modèle de Korsmeyer-

<sup>274</sup> Zhang, J. T.; Huang, S. W.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X., Preparation and properties of Poly (*N*-isopropylacrylamide)/Poly (*N*-isopropylacrylamide) interpenetrating polymer networks for drug delivery, *J. Poly. Sci. Part. A. Poly. Chem.* **2004**, *42*, 1249-1256.

<sup>275</sup> Lokhandwala, H.; Deshpande, A.; Deshpande, S., Kinetic modeling and dissolution profiles comparison : an overview, *Int. J. Pharm Bio Sci.* **2013**, *4*, 728-737.

Peppas.<sup>276</sup> Dans ce modèle, la variable **n** caractérise le mode de libération et dépend de la nature et la forme du matériau. Ce modèle a été appliqué sur les valeurs expérimentales de  $M_t/M_0$  inférieures ou égales à 60%, comme le demande la littérature.

Le tableau suivant donne les paramètres caractéristiques du modèle de Korsmeyers-Peppas tels que la variable **n** qui caractérise la libération et **k** la constante de vitesse.

**Tableau 11 : Paramètres obtenus suite à la régression non linéaire selon le modèle Korsmeyer-Peppas.** Les paramètres sont extraits de la régression non linéaire effectuée sur 60% de la libération.

	MIP-03						MIP-07					
	25°C			40°C			25°C			40°C		
	R <sup>2</sup>	k	n	R <sup>2</sup>	k	n	R <sup>2</sup>	k	n	R <sup>2</sup>	k	n
<b>Eau</b>	0,988	0,048	0,786	0,99	0,071	0,668	0,986	0,077	0,816	0,986	0,074	0,539
<b>PBS</b>	0,99	0,049	0,723	0,993	0,034	0,773	0,996	0,067	0,968	0,989	0,056	0,55

**Les valeurs de n obtenues sont comprises entre 0,5 et 1.** Cette information nous permet de conclure que le mode de libération est non-fickien ou anormal. C'est-à-dire que ce mécanisme de libération est régi simultanément par la diffusion de la ribavirine dans le milieu et la relaxation du polymère (gonflement). Les taux de diffusion et de gonflement sont comparables. Le réarrangement des chaînes polymériques qui se produit lentement ajouté au processus de diffusion provoquent simultanément les effets anormaux dépendant du temps<sup>277</sup>. Cependant, dans le cas du NIPAm, le phénomène de relaxation est prépondérant.

**En conclusion, les deux formulations présentent des systèmes de libération prolongée qui dépendent de la morphologie du polymère (hydrogel) mais aussi de la nature des monomères qui le constitue (cas du NIPAm). Ces deux systèmes montrent des profils de libération de la ribavirine différents mais tous retardés.**

**Tableau 12 : Pourcentages de ribavirine libérés et quantités relarguées ( $\mu\text{mol}$ ) au bout de 24h dans l'eau et le PBS à 25 et 40 °C**

	MIP-03				MIP-07			
	25°C		40°C		25°C		40°C	
	% libéré	$\mu\text{mol}$	% libéré	$\mu\text{mol}$	% libéré	$\mu\text{mol}$	% libéré	$\mu\text{mol}$
<b>Eau</b>	63	1,69	58	1,56	92	1,25	40	0,54
<b>PBS</b>	48	1,28	40	1,07	99	1,35	31	0,42

<sup>276</sup> Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A., Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* **1983**, *15*, 25-35.

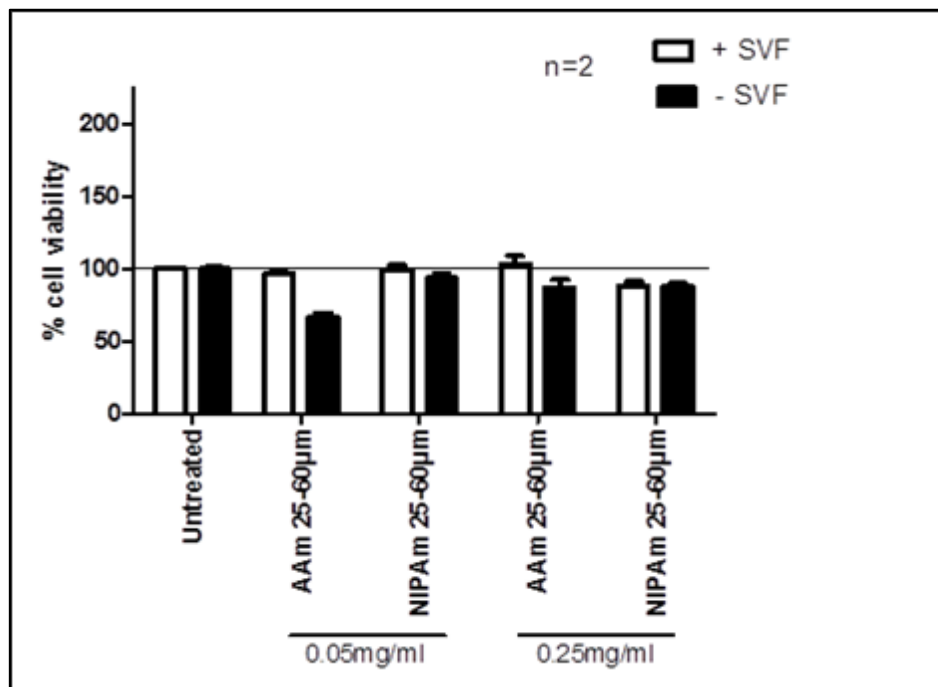
<sup>277</sup> Bruschi, M. L., Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, chapitre 5, **2015**, 74-76.

## VI. Etude Biologique des matériaux pour la libération de la ribavirine dans les poumons

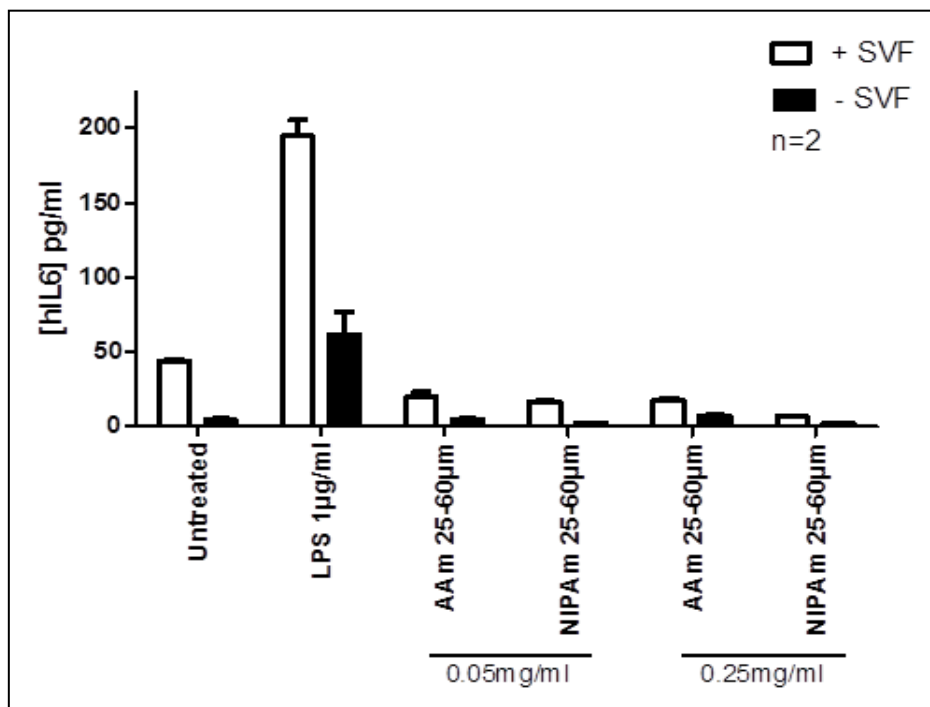
### VI.1. Etude de la cytotoxicité et d'immunogénicité des matériaux

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec l'équipe du DR.Si-Tahar (INSERM, Tours). Ces matériaux imprimés vont jouer le rôle de cargos polymériques pour la ribavirine (antiviral) d'où la nécessité d'avoir un polymère biocompatible. Comme décrit précédemment, les choix des monomères fonctionnels ainsi que de l'agent réticulant ont été basés sur des molécules qui permettent l'obtention d'un polymère biocompatible.<sup>104</sup> Néanmoins, une vérification de la cytotoxicité des polymères est nécessaire.

Pour cela, nous avons utilisé comme modèle, des cellules épithéliales bronchiques humaines (Beas-2B). Nous les avons mises en contact avec les microparticules de polymères non imprimés à deux concentrations différentes, 0,05 mg/mL et 0,25 mg/mL, dans du PBS. Cette étude a été menée en présence ou non d'un sérum de veau fœtal (SVF) afin de mimer les conditions dans l'espace pulmonaire. De plus, nous avons vérifié l'immunogénicité nos matériaux. Pour cela, la production d'interleukine-6 (IL6) a été quantifiée. L'IL6 est une cytokine pro-inflammatoire produite par les phagocytes (macrophages et cellules dendritiques) et les cellules endothéliales en cas d'inflammation. Comme contrôle positif, nous avons utilisé 1 $\mu$ g/mL de lipopolysaccharide (LPS, de la paroi des bactéries gram-), médiateur d'une réponse inflammatoire. Le pourcentage de cellules viables ainsi que la concentration de l'IL-6 sont mesurés après 24h d'exposition des cellules Beas-2B aux microparticules polymériques.



**Figure 53 :** Pourcentage de viabilité cellulaire pour chacun des matériaux : poly (AAM-co-MBA) (AAM) et poly (NIPAM-co-MBA) (NIPAM), pour deux concentrations différentes de matériaux : 0,05mg/mL et 0,25mg/mL, en présence (+SVF) ou non (-SVF) de sérum de veau fœtal.



**Figure 54 : Concentration de l'interleukine-6 en pg/mL pour chacun des matériaux : poly (AAm-co-MBA) (AAm) et poly (NIPAm-co-MBA) (NIPAm), pour deux concentration différentes de matériaux: 0,05mg/mL et 0,25mg/mL, en présence (+SVF) ou non (-SVF) de sérum de veau fœtal. LPS indique une culture cellulaire où le lipopolysaccharide à 1 µg/mL a été ajouté (témoin).**

Les résultats obtenus montrent une excellente viabilité cellulaire après 24 h de contact avec les matériaux à base d'AAm ou de NIPAm et cela même à des concentrations différentes, en comparaison avec des cellules saines non traitées. D'autre part, la quantité de l'IL-6 est faible, voire même inexistante, en comparaison avec des cellules non traitées et des cellules en présence de 1 µg/mL de LPS. Ce qui prouve que ces matériaux ne provoquent pas de réponse pro-inflammatoire.

**Ces résultats nous permettent de conclure que les matériaux synthétisés avec les formulations optimisées au laboratoire sont biocompatibles et ne provoquent aucune réponse immunogène. Cela permet de valider leur utilisation potentielle comme cargos polymériques pour la suite de notre étude.**

## VI.2. Etude virologique

Afin de déterminer l'efficacité de ces nouveaux systèmes de libération, nous avons effectué des études virologiques sur des cellules infectées par le Virus Influenza A (IAV ; H3N2).<sup>278</sup> Ces études ont été menées afin de déterminer l'effet antiviral de ces cargos suite à la libération de ribavirine dans un milieu cellulaire infecté. Pour cela, les cellules Beas-2B ont été mises en contact avec 1 mL du virus à une MOI (multiplicity of infection) de 2 :1 pendant 1h. Ensuite, le surnageant a été éliminé et nous avons rajouté 0,25mg/mL de notre matériau imprimé chargé en ribavirine. Les cellules ont été incubées pendant 18h. Nous avons ensuite procédé à la quantification virale en comptant les plages de lyses (PFU/mL) avec PFU (Plaque-forming unit) est le nombre de plages formées. Il s'agit dans ce

<sup>278</sup> Guillot, L.; Le Goffic, R.; Bloch, S.; Escriou, N.; Akira, S.; Chignard, M ; Si-Tahar, M., Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5571-5580.

cas de la technique de plage de lyse.<sup>279</sup> Les résultats montrent que le matériau vide, ou non chargé, n'a aucun effet sur l'infection. La quantité de PFU/mL reste égale à celle d'une culture cellulaire infectée

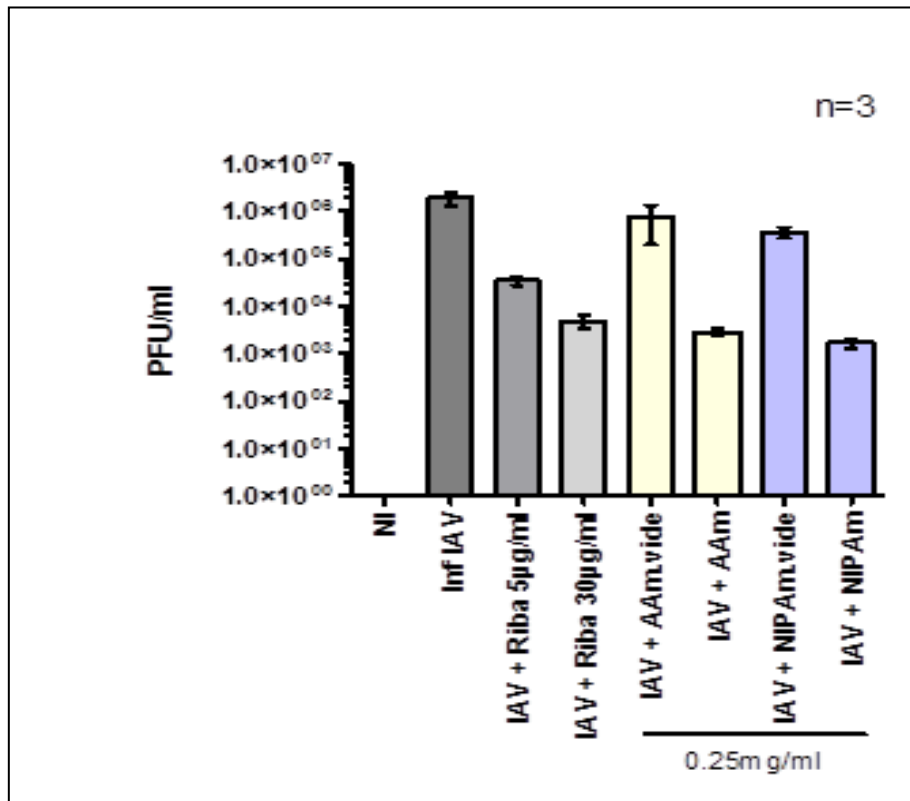


Figure 55 : Résultats de la quantification virale en unité formant des plaques (PFU/mL) pour chacun des matériaux : poly (AAM-co-MBA) vide (IAV + AAm vide) et chargé (IAV + AAm), poly (NIPAm-co-MBA) vide (IAV + NIPAm vide) et chargé (IAV + NIPAm). Cellule

Selon les résultats obtenus dans l'étude cinétique de la libération de la ribavirine, on a le **MIP-03 (MIP-AAm)** libéré 32% de sa quantité maximale chargée et le **MIP-07 (MIP-NIPAm)**, 41% de sa quantité maximale chargée. Ces pourcentages montrent que la quantité libérée varie entre 1 et 3 µg de ribavirine libérée. Les résultats donnés par l'étude virologique montrent que le taux de libération de ces deux MIPs au bout de 18h environ permet d'obtenir le même effet qu'avec 30 µg de ribavirine. Cet effet est obtenu par la diffusion prolongée du système qui permet d'avoir une concentration constante dans le milieu, ce qui facilite la pénétration de cette dernière dans la cellule.

<sup>279</sup> Matrosovich, M.; Matrosovich, T.; Garten, W.; Klenk, H., New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays, *Virology*. **2006**, *3*, 63.

## VII. Conclusion

Cette étude décrit la synthèse et l'évaluation de différents hydrogels imprimés en utilisant la ribavirine (antiviral) comme molécule template (**6**). Le choix des monomères fonctionnels a été optimisé pour stabiliser au mieux le complexe de pré-polymérisation et pour synthétiser des polymères biocompatibles. Plusieurs conclusions peuvent être déduites des résultats obtenus :

- En utilisant la modélisation moléculaire, la quantification des liaisons intermoléculaires (liaison hydrogène entre monomère et template) nous a permis de choisir le bon ratio template : monomère afin de stabiliser le plus possible le complexe formé. Ceci a conduit à l'obtention d'une cavité la plus sélective possible.
- Les études prédictives ainsi que les études expérimentales de ratio ont permis de conclure de façon identique que le meilleur ratio T : MF pour avoir un MIP sélectif de la ribavirine dans l'eau est le 1 : 6.
- L'extraction de la ribavirine du polymère en bulk peut être finalisée en 6h en utilisant l'extraction par ultrasons et en changeant la solution de lavage toutes les heures. La solution de lavage est formée d'un mélange MeOH/AcOH (4/1, v/v)
- Les résultats d'adsorption montrent que le **MIP-03** suit le modèle de Bi-Langmuir où la première population de sites actifs est de l'ordre de  $3,25 \cdot 10^{-5}$  mol/g avec une faible affinité ( $K_a : 0,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) et la deuxième population de cavités est de  $1,4 \cdot 10^{-5}$  mol/g mais avec une forte affinité ( $K_a : 173 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ). Par contre, le **MIP-07**, possède une distribution hétérogène des sites actifs. Le modèle de Hill permet de déterminer le phénomène de coopérativité positive présent sur ce MIP. Ce modèle permet de déterminer une capacité de  $5,98 \cdot 10^{-6}$  mol/g et une constante d'affinité de  $694 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ .
- L'utilisation du mélange MeCN/Eau (87/13, v/v) comme solvant de charge (25 °C, 16 h) a conduit à l'obtention d'un taux de recapture maximal de la ribavirine dans les matériaux.
- Le relargage de la ribavirine est retardé pour les polymères imprimés par rapport aux polymères non imprimés. Cet effet est obtenu grâce aux empreintes moléculaires créées qui ont plus d'affinité pour la ribavirine que les interactions non spécifiques sur la surface libre du polymère non imprimé. La libération de la ribavirine est obtenue par un mécanisme non-fickien. Ce dernier indique que les phénomènes de relaxation du polymère ainsi que la diffusion régissent ce relargage.
- Les hydrogels obtenus sont biocompatibles avec les cellules Beas-2B. La viabilité cellulaire ainsi que l'immunogénicité sont excellents dans les différentes conditions testées.
- Grâce aux systèmes de libérations lents, nous avons pu obtenir avec une diffusion plus faible de la ribavirine dans le milieu cellulaire, un même effet sur l'infection qu'un milieu contenant 30 µg/mL de cet antiviral. Cela montre l'importance d'une libération prolongée sur le temps

Finalement, nous avons obtenu deux systèmes de libération retardés/contrôlés de la ribavirine sous la forme d'hydrogels imprimés biocompatibles. Ces deux systèmes possèdent deux capacités de charge différentes et deux profils de relargage différents. Cependant et malgré leur efficacité, nous avons décidé de mettre en place des DDS de type MIP rigide, à base d'acrylate dans des solvants aprotiques. Pour cela nous allons utiliser la technique de « Dummy template » pour l'impression moléculaire.

## VIII. Partie experimentale

### VIII.1. Apparatus and reagents

Ribavirin was purchased from Carbosynth, Berkshire, UK. *N*-isopropylacrylamide (>99%, NIPAm), Acrylamide (≥99%, HPLC, AAm), *N,N'*-Methylenebis(acrylamide) (99%, MBA), phosphate buffered saline tablet (0.01M, pH 7.4) was purchased from Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France. 1,2-Bis(2-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)propan-2-yl)diazene dihydrochloride (95% purity, VA-044) was purchased from Fluorochem, Hadfield, United-Kingdom. Ultra-High Quality water (18 MΩ.cm) was produced from an Elga apparatus, Villeurbanne, France. Acetic acid Glacial (AcOH), Dimethylsulfoxide (analytical grade, DMSO), Methanol (analytical grade, MeOH), Ethanol (analytical grade, EtOH), Dimethylformamide (analytical grade, DMF), Tetrahydrofuran (analytical grade, THF), Toluene (analytical grade), Acetonitrile (analytical grade, MeCN), Dichloromethane (analytical grade, Dichlo) and Chloroform (analytical grade) was purchased from FisherScientific, Illkirch, France.

HPLC analyses were performed using an Agilent 1260 Infinity HPLC chromatograph (Agilent Technologies, Les Ulis, France). The chromatograph was equipped with a 1260 binary pump (G1311B), a 1260 standard autosampler (G1329B), a 1260 thermostated column compartment (G1316A) and a 1260 diode array detector (G4212B) with a Max-Light cartridge cell (1 μL volume, 10 mm cell path length). Porous graphitic carbon (PGC, Hypercarb™) HPLC column (particle size : 5 μm ; pore size : 250 Å) was used (mobile phase : water/MeCN ; 85/15 : v/v).

The <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on Bruker Avance DPX 250 (Freq : 250,135 MHz). Chemical shifts are reported in ppm on the δ scale relative to TMS as internal standard or to the solvent signal used.

### VIII.2. Molecular modeling of template-monomere interactions

All the density functional theory (DFT) computations were performed on the Beowulf cluster at the Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences (IPPAS) in Cracow (Poland). The B3LYP (Becke-Style 3-Parameter DFT using the Lee–Yang–Parr correlation function) with 6-31+G(d,p) basis set was used for geometry optimization to obtain minimum energy structures. In order to avoid the basis-set superposition error (BSSE) related with intermolecular interactions theory, the counterpoise (CP) correction was applied to complex calculations in order to obtain accurate computation of molecular interactions Gibbs free energies by DFT methods<sup>280</sup>. Interaction Gibbs free energies of complexes were calculated using Eq. 20

$$\Delta G = G_{\text{template-monomer complex}} - [G_{\text{template}} + G_{\text{monomer}}] \quad \text{Eq. 20}$$

Where ΔG is the change in Gibbs free energy on the formation of template–monomer complex,  $G_{\text{template-monomer complex}}$  is the Gibbs free energy of template–monomer complex,  $G_{\text{template}}$  is the Gibbs free energy of template and  $G_{\text{monomer}}$  is the Gibbs free energy of monomer molecules. Next ΔG were recalculated to binding constant, using Eq. 21

$$K = e^{-\Delta G/RT} \quad \text{Eq. 21}$$

<sup>280</sup> J. Frank, Introduction to Computational Chemistry, second ed., John Wiley & Sons Inc., Chichester, England, 2007.

All calculations were performed in Jaguar.<sup>281,282</sup> Calculations were performed for different templates, monomers and solvents.

Table caption. Calculated interaction Gibbs free energy ( $\Delta G$ ) and binding constants for the template-monomer complex formation at B3LYP/6-31+G(d,p) level.

Figure captions. Optimized complexes generated at B3LYP/6-31+G(d,p) model chemistry. Complex is rendered as a ball and stick representation, monomer's carbon atoms are colored in green. Hydrogen bonds between template and monomer are labelled as red.

### VIII.3. NMR titration studies

The titration studies were performed in deuterated Dimethylsulfoxide (DMSO- $d_6$ ) following the Complexation Induced Shift (CIS) of the amide protons of template (**6**) (from 7.63116 to 6.96497 ppm). Thus, different volumes of the 1.8 M stock solutions of monomers 2 or 3 were added stepwise to the 0.6 mL of 0.09 M solution of the template **6**. The  $^1\text{H}$ -NMR (250 MHz) spectra were obtained at 20°C making 128 scans for each analysis. The study was performed in one tube adding different volume amounts of monomer which corresponded to different concentration equivalents of the template. The dilution of the concentration was avoided by preparing the monomer stock solution using the template solution. In the Table 8, the exemple of composition of the prepared samples is presented. The [Guest] and [Host] correspond to the standard solutions of the monomer (**1**) and template (**1**), respectively

**Tableau 13** : Example of composition of the  $^1\text{H}$ -NMR titration steps with the corresponding shift (-NH of **1**) observed and calculated CIS in each step for monomer **45** [G] when titrating to template **6** [H], as used in this chapter.

total added G (uL)	equiv.	[Host] (M)	[Guest] (M)	Shift (ppm)	CIS (ppm)
<b>0</b>	0.0000	0.090	0.00000	7.6116	0.0000
<b>5</b>	0.1655	0.090	0.01487	7.6090	0.0025
<b>10</b>	0.3282	0.090	0.02950	7.6129	0.0014
<b>20</b>	0.6459	0.090	0.05805	7.6140	0.0024
<b>30</b>	0.9535	0.090	0.08569	7.6133	0.0018
<b>40</b>	1.2514	0.090	0.11247	7.6184	0.0068
<b>60</b>	1.8203	0.090	0.16359	7.6238	0.0123
<b>80</b>	2.3556	0.090	0.21171	7.6275	0.0159
<b>100</b>	2.8604	0.090	0.25707	7.6321	0.0205
<b>150</b>	4.0046	0.090	0.35990	7.6362	0.0246
<b>200</b>	5.0057	0.090	0.44987	7.6367	0.0251
<b>300</b>	6.6743	0.090	0.59983	7.6426	0.0311
<b>400</b>	8.0091	0.090	0.71980	7.6468	0.0352
<b>600</b>	10.0114	0.090	0.89975	7.6497	0.0381

<sup>281</sup> Jaguar, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.

<sup>282</sup> Bochevarov, A. D.; Harder, E.; Hughes, T. F.; Greenwood, J. R.; Braden, D. A.; Philipp, D. M.; Rinaldo, D.; Halls, M. D.; Zhang, J.; Friesner, R. A., Jaguar: A high-performance quantum chemistry software program with strengths in life and materials sciences, *Int. J. Quantum. Chem.* **2013**, *113*, 2110-2142.



#### VIII.4. Polymer preparation

1 mmol of template (6) was first dissolved in water (or DMSO), and different equivalents of each functional monomer (45 or 24) was added and the solution was sonicated for 1h in ultrasonic bath until all the components were solubilized. Then 4 mmol (0.616 g) of MBA (50) and the initiator VA-044 (10mg) was introduced to a borosilicate polymerization tube and degassed for 5 min with nitrogen in order to remove dissolved oxygen. After the tube was then sealed and the polymerization takes place under UV overnight after the tubes were removed, broken with a hammer and the monolithic polymers recovered. The resulting monoliths were lightly crushed to give smaller particle and sieved to 25-60  $\mu\text{m}$ . Non-imprinted polymer (NIP) was prepared in the same manner, but with the omission of a template species.

**Tableau 14 : Polymer formulations used in synthesis of MIPs in DMSO.**

	Template	Monomer	Ratio	MBA	VA-044	DMSO
<b>MIP-01'</b>	0.244 g	(2) 0.142 g	1/2	0.616 g	10 mg	7 mL
<b>MIP-02'</b>	0.244 g	(2) 0.284 g	1/4	0.616 g	10 mg	7 mL
<b>MIP-03'</b>	0.244 g	(2) 0.426 g	1/6	0.616 g	10 mg	7 mL
<b>MIP-04'</b>	0.244 g	(2) 0.568 g	1/8	0.616 g	10 mg	7 mL
<b>MIP-05'</b>	0.244 g	(3) 0.227 g	1/2	0.616 g	10 mg	7 mL
<b>MIP-06'</b>	0.244 g	(3) 0.452 g	1/4	0.616 g	10 mg	7 mL
<b>MIP-07'</b>	0.244 g	(3) 0.678 g	1/6	0.616 g	10 mg	7 mL
<b>MIP-08'</b>	0.244 g	(3) 0.905 g	1/8	0.616 g	10 mg	7 mL

#### VIII.5. Extraction and quantification of ribavirin

Extraction of Ribavirin was optimized by replacing the Soxhlet with a long washing time (20-24 hours of washing) with consecutive ultrasound washings, using a mixture of MeOH and acetic acid (8/2, v/v) for 1 h at 50 °C. The washing solution is replaced every hour by a fresh one. The recovered Ribavirin was quantified with an HPLC system (mobile phase: water/MeCN ; 85/15 : v/v) in order to follow the extraction and to know how much Ribavirin remained trapped in the polymer.

#### VIII.6. Swelling ratio

In order to better elucidate the difference between the dry and swollen state of the polymers, swelling tests were performed in water in two different temperatures (25° and 40 °C). Swelling was measured in Eppendorf tube by allowing a known weight of dry polymer to equilibrate

in water, where after the weight of the swollen polymer was measured. The swelling ratio, given as the mass of the swollen polymer to the mass of dry polymer, was read after 24 h.

### **VIII.7. Optimization of Ribavirin Reloaded**

In order to improve the adsorption of ribavirin in the imprinting polymer, we decided to optimize these using three different parameters: the solvent, the adsorption time and the temperature. For this we choose different solvent such as water, MeOH, EtOH and MeCN/ Water (solvent that mimics DMSO with a  $\delta H = 10.2$ ). The choice was focused on these different solvents because they are not or little toxic but also we can easily evaporate them in a total way (verification by  $^1H$ -NMR). In the end the time was varied between 6 h and 72 h. Two temperatures were chosen: 25 and 40 ° C.

### **VIII.8. Kinetic study of Ribavirin release**

The kinetic study of Ribavirin release from polymers was conducted by placing a single charged polymer monolith (50 mg) in dialyze tubes putted in 40 mL of distilled water or PBS which was shaken gently, by a mechanical shaker. In this kinetic study, the release solution is changed for each sample. The study was induced at two different temperatures (25 and 40 °C)

### **VIII.9. Biological study**

#### **a) Cell culture**

Human bronchial epithelial BEAS-2B cells, obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA), were grown in Ham's F-12 Nutrient Mix, GlutaMAX™ Supplement (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin (PAN BioTech) at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>.

Lipopolysaccharides from Escherichia coli (LPS) serotype O111:B4 were obtained from Sigma-Aldrich.

#### **b) Particle exposure**

BEAS-2B was seeded in 96-well plates (200  $\mu$ L/well) at a density of  $5 \times 10^4$  cells/mL for cytotoxicity assay and cytokine detection, for 48 h prior to treatment. Polymers were suspended in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) (Gibco) at 0.5 mg/mL, then diluted in Ham's F-12 Nut Mix-GlutaMAX and mixed thoroughly for 15s before being added to the cells. Cells were exposed to polymers at 0.25 mg/mL or 0.05 mg/mL for 24 h. Stimulation was performed in culture medium with or without 10% FBS. We performed 3 independent experiments for each doses of polymers.

#### **c) Influenza virus infection assay**

Influenza A/Scotland/20/74 (H3N2) viruses (IAV) have been described previously.<sup>278</sup> BEAS-2B cells were infected with 1 mL of active viruses (MOI = 2) for 1 h at 37°C. Culture medium was then discarded, cells were washed twice with Ham's F12 medium with 1% Pen/Strep and incubated for 18 h in 1 mL of fresh Ham's F12 medium with 1% Pen/Strep  $\pm$  polymers charged or not with ribavirin. After 18h, culture medium was centrifuged (500g, 5min), supernatants were collected and stored at

-20°C until use. Virus titers were determined on cell-free supernatant by using a modified plaque assay method, as previously described<sup>279</sup>.

**d) Cytotoxicity test (MTS)**

Cell viability after exposure to LPS (1µg/mL) as a positive control, polymers was assessed using the CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 24h after exposure to LPS or polymers, BEAS-2B cells were treated with 120 µL of MTS reagent per well and incubated at 37°C for 1 h. The absorbance was quantified by a microplate spectrophotometer (VersaMax) at a wavelength of 490 nm. Cell viability was calculated as a percentage of untreated cells, which was assumed to be 100 %.

**e) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

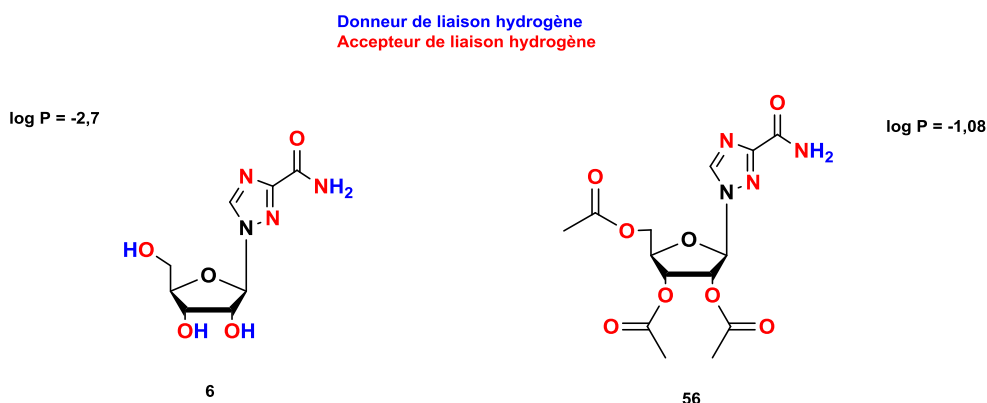
IL-6 levels in cell-free supernatants were measured using human IL-6 DuoSet® ELISA kits (R&D systems, Minneapolis, Lille, France) according to the manufacturer's instructions.

# **Chapitre 4 : Synthèse des polymères imprimés rigides pour la libération contrôlée de la ribavirine**



## I. Introduction

Selon les résultats obtenus dans le chapitre précédent, nous avons observé que l'utilisation de la ribavirine comme molécule template nous limite dans le choix du solvant de polymérisation. En effet, sa polarité élevée ne la rend très soluble que dans un nombre réduit de solvants, comme le diméthylsulfoxyde, la diméthylformamide et, bien sûr, l'eau. Premièrement, ce solvant porogène doit assurer la formation, dans la matrice, de pores ouverts assurant la communication avec les éventuelles cavités internes formées au cours de la synthèse. Mais aussi, le solvant de polymérisation influence fortement le complexe de pré-polymérisation par sa polarité et sa propriété de créer des liaisons hydrogène. Ainsi, dans le cas d'une approche non covalente le solvant utilisé est généralement un porogène aprotique non polaire, tel que le toluène ou le chloroforme, ou un porogène aprotique polaire comme l'acétonitrile ou le tétrahydrofurane.<sup>283</sup> Or, dans ce type de solvant, la ribavirine est insoluble. Une des solutions qui permet de contourner cette difficulté est d'utiliser la méthode du « *dummy-template* » ou sélectophore.<sup>284</sup>



**Figure 56 : Molécule cible (6) et son dummy-template (56) :** la 2',3',5'-tri-O-acétylribavirine avec leurs log P respective indiquant la diminution de la polarité de la ribavirine suite à la peracétylation.

Ces pseudo-templates sont des molécules qui présentent des fonctionnalités et géométries chimiques similaires à l'analyte, mais présentant une solubilité différente de celui-ci dans le solvant porogène, et qui vont permettre de créer des cavités capables de reconnaître sélectivement l'analyte, d'où le nom de sélectophore. Cette méthode a déjà été employée dans la synthèse de MIPs sélectifs aux nucléotides, nucléosides ou bases nucléiques. Historiquement, c'est l'équipe de D.A. Spivak qui a eu l'idée d'introduire un analogue de nucléoside, la 9-éthyladénine, plutôt que l'adénine elle-même dans le mélange de pré-polymérisation.<sup>285</sup> Ce dérivé va permettre d'utiliser le chloroforme comme solvant porogène sans être limité par la solubilité de l'adénine. Un autre exemple d'utilisation d'un dérivé de nucléoside plutôt que le nucléotide lui-même a été rapporté par Lakka *et al.*<sup>286</sup> En effet, la tri-O-acétyladénosine a été utilisée pour synthétiser un MIP sélectif de l'adénosine triphosphate. Ainsi, l'acétonitrile et le toluène ont pu être utilisés comme solvants

<sup>283</sup> Wu, L.; Zhu, K.; Zhao, M.; Li, Y., Theoretical and experimental study of nicotinamide molecularly imprinted polymers with different porogens, *Anal. Chim. Acta.* **2005**, *549*, 39-44.

<sup>284</sup> Widstrand, C.; Yilmaz, E.; Boyd, B.; Billing, J.; Rees, A., Molecularly imprinted polymers: A new generation of affinity matrices, *Am. Lab.* **2006**, *38*, 12-14.

<sup>285</sup> Shea, J. K.; Spivak, D. A.; Sellergren, B., Polymer complements to nucleotide bases. Selective binding of adenine derivatives to imprinted polymers, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3368-3369.

porogènes dans cette étude<sup>286</sup> afin de favoriser la création de liaisons hydrogènes au sein du complexe de pré-polymérisation. Plus récemment, notre groupe a décrit l'évaluation de MIPs sélectifs à l'uridine synthétisés avec des dummy-templates de type 2',3',5'-*O*-triacyluridine. Ces MIPs ont été synthétisés en utilisant une approche non covalente avec la 2,6-bis-acrylamidopyridine comme monomère fonctionnel, le diméthacrylate d'éthylène glycol en tant qu'agent de réticulation et le chloroforme comme porogène. Les résultats obtenus suggèrent que l'uridine est liée spécifiquement aux polymères par des interactions de type liaison hydrogène entre le monomère fonctionnel et la base nucléosidique uracile. Les MIPs ont montré des facteurs d'impression relativement élevés envers les 2',3',5'-tri-*O*-acyluridines, alors qu'ils ne présentaient aucune capacité de liaison pour les autres nucléosides dépourvus de la fonction imide sur leur base. La plus grande valeur de facteur d'impression pour l'uridine en milieu aqueux, égale à 12, a été générée par le MIP synthétisé avec le dérivé dont la longueur de chaîne de l'ester était la plus courte, donc la 2',3',5'-tri-*O*-acétyluridine. En se basant sur ces derniers résultats, nous avons décidé de créer des MIP-DDS sélectifs de la ribavirine, qui est un analogue de nucléoside, en utilisant son dérivé triacétylé comme dummy-template (Figure 56). Cette approche permettra de solubiliser ce dérivé de la ribavirine dans des solvants porogènes aprotiques en diminuant sa polarité. Ainsi, dans une approche non covalente, cette technique de dummy-template pourrait augmenter l'énergie de liaison entre le monomère fonctionnel et la ribavirine et, donc, la stabilité du complexe de pré-polymérisation. Induisant des cavités plus affines envers la ribavirine et une capacité plus élevée que celle générée par les MIPs synthétisés dans un solvant protique.

### I.1. Choix des monomères fonctionnels

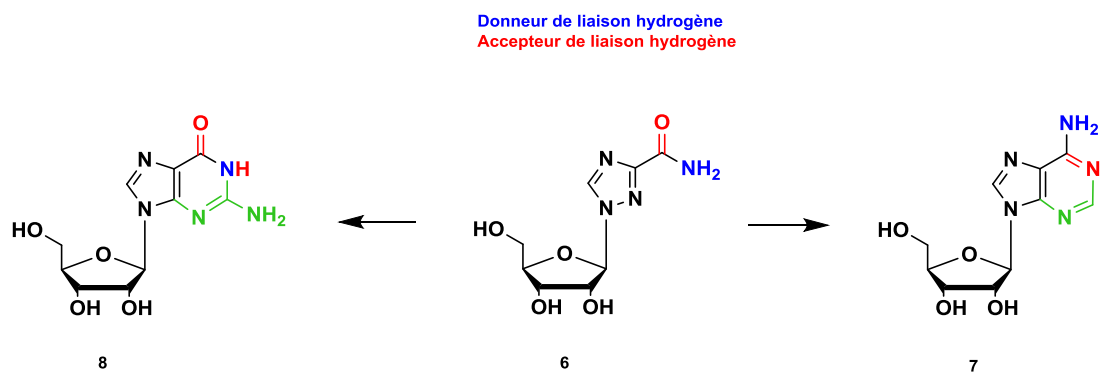
La ribavirine est un antiviral de type analogue ribonucléosidique qui est un inhibiteur de la phase d'expression et de réplication du génome viral. Son activité antivirale s'exerce de manière générale pour tous les virus à ARN. Le mode d'action de la ribavirine a plus particulièrement été étudié dans le cas des virus grippaux. Sous sa forme triphosphate, il inhibe l'addition de la coiffe des ARN messagers, en agissant par inhibition compétitive de la mARN (guanine-N7-)-méthyl transférase. Il pourrait également exercer un effet inhibiteur de l'ARN polymérase du virus grippal, probablement en agissant comme analogue de substrat.<sup>287</sup> La ribavirine mime au sein de ces enzymes la guanosine. Elle peut aussi, par rotation de son groupement carboxamide, mimer la structure de l'adénosine<sup>288</sup> (Figure 57).

---

<sup>286</sup> Lakka, A.; Tsakalof, A., Molecular Imprinting of Tri-*O*-Acetyladenosine for the Synthetic Imitation of an ATP-Binding Cleft in Protein Kinases, *ChemPlusChem*. **2013**, *78*, 808-815.

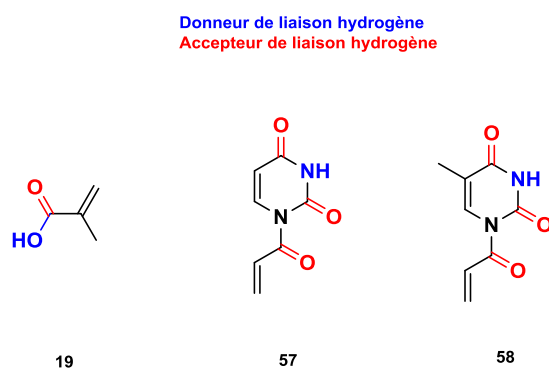
<sup>287</sup> Manuguerra, J. C.; van der Werf, S., Les antiviraux contre la grippe, *Virol*. **1999**, *3*, 439-452.

<sup>288</sup> Jeulin, H.; Kedzierewicz, F.; Grancher, N.; Venard, V.; Quel avenir pour la ribavirine en dehors de l'hépatite C ?, *Virol*. **2009**, *13*, 83-92.



**Figure 57 : Représentation de la ribavirine (6) qui est un mime de la guanosine (8) et de l'adénosine (7)**

Ces remarques structurales sur la ribavirine sont très utiles pour imaginer de nouveaux monomères capables d'interagir fortement avec cette dernière. Ces nouveaux ligands permettraient de créer des MIPs plus spécifiques de la ribavirine que ceux synthétisés avec les monomères commerciaux. Les structures de ces monomères pourraient être guidées par l'arrangement type Watson-Crick des paires de bases au sein de la structure d'un ADN ou d'un ARN. Cet assemblage est naturellement tenu grâce aux liaisons hydrogène données par les différentes fonctions chimiques de ces nucléobases. En considérant que la ribavirine pouvait mimer la structure de l'adénosine, elle pourrait potentiellement s'apparier à ses bases complémentaires que sont la thymine et l'uracile. Nous avons donc choisi de synthétiser deux monomères fonctionnels à partir de la thymine et de l'uracile (Annexe II). Afin de pouvoir polymériser facilement par réaction radicalaire ces dérivés de nucléobases, il a été décidé d'introduire un motif acrylate sur ces molécules. Cette dérivation a lieu sur la position N<sup>1</sup> du cycle aromatique de l'uracile et de la thymine. Cette fonction acrylate va apporter à ces monomères une réactivité élevée en polymérisation radicalaire et une cinétique de polymérisation proche de celle du réticulant, l'EGDMA (20), qui appartient de même à la famille des acrylates (Figure 58).

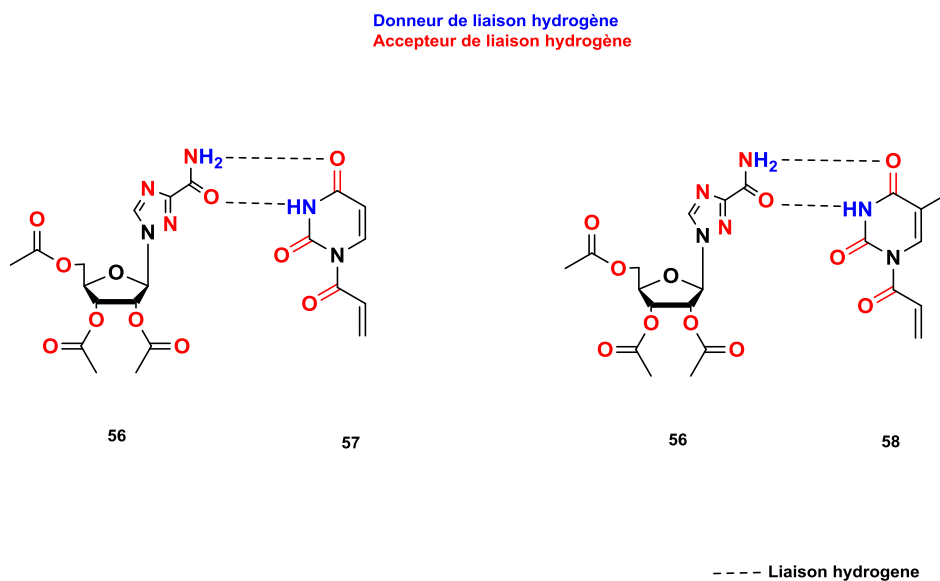


**Figure 58 : Monomères fonctionnels utilisés pour la synthèse de polymères imprimés : l'acide méthacrylique (19), le N-acryloyluracile (57) et le N-acryloylthymine (58).**

Ces monomères seront nommés *N*-acryloyluracile (57) et *N*-acryloylthymine (58). L'assemblage du complexe de pré-polymérisation entre la 2',3',5'-tri-*O*-acétylribavirine et chaque monomère fonctionnel synthétisé au laboratoire devrait donc s'effectuer selon les schémas montrés à la Figure 59. Cet assemblage est naturellement stœchiométrique et donnera un complexe de type



T:MF 1:1. Ce ratio ainsi que la force de liaison ont été mis en évidence par une titration  $^1\text{H}$ -RMN et par modélisation moléculaire.



**Figure 59 : Représentation graphique de la complémentarité entre la base de la ribavirine triacétylée (56) et chacun des monomères fonctionnels (57 et 58) en utilisant la complexation 1:1 (T:MF).**

Parallèlement à ces deux nouveaux monomères fonctionnels, un troisième monomère, accessible commercialement et de la famille des acrylates, sera aussi testé : l'acide méthacrylique (**19**). Ce monomère est l'entité chimique la plus utilisée dans la synthèse des MIPs. Mais, dans notre cas, cette molécule est très intéressante car elle montre une affinité particulière avec les bases puriques telles que l'adénine et la guanine,<sup>140</sup> structures mimées par la ribavirine. L'existence de cette liaison favorisée entre la structure purinique et le MAA a été montrée par l'équipe de Vasapollo dans l'étude de l'extraction urinaire de la 1-méthyladénosine par MISPE,<sup>239</sup> mais aussi par Lakka *et al.* qui ont utilisé le MAA pour créer un MIP sélectif à l'adénine afin de mimer les cavités actives des ATP kinases.<sup>286</sup> Un autre point important qui vient appuyer le choix du MAA, est du fait que ce monomère est intensément utilisé dans le domaine biomédical. En effet, les polymères et copolymères à base de MAA forment des systèmes de libération biocompatibles.<sup>104</sup> Pour le MAA, spécifiquement, le ratio template : monomère sera choisi égal à 1 : 4. Ce ratio reste, à ce jour, le plus utilisé dans la littérature dans le cas de l'approche non covalente, et conduit majoritairement à une sélectivité maximale des MIPs synthétisés.<sup>182</sup> Car, son véritable atout réside dans la fonction acide carboxylique qui agit à la fois en tant qu'accepteur et donneur de liaison hydrogène.

L'utilisation de ces différents monomères fonctionnels va nous permettre de mettre en place différentes formulations de MIPs pour la libération contrôlée de la ribavirine. L'étude va se baser sur la comparaison de leur capacité d'adsorption, leur sélectivité et sur leurs profils de libération par rapport à leur référence non imprimée.

## II. Résultats et discussions

### II.1. Test de solubilité

La ribavirine est un nucléoside très polaire ( $\log P = -2,7$ ), insoluble dans des solvants organiques de faible polarité et aprotique d'où la nécessité d'utiliser l'approche de « *dummy-template* ». L'acétylation de la partie ribose permet de diminuer la polarité de la ribavirine ( $\log P = -1,08$ ). Ceci rend possible l'utilisation d'un solvant aprotique permettant d'améliorer la complexation entre le template et le monomère fonctionnel laquelle se base sur des interactions non covalentes. Dans le cas du MAA (**19**), l'acétonitrile est choisi comme porogène, car c'est un solvant qui permet d'apporter au polymère une grande surface spécifique<sup>289</sup> et du fait qu'il soit polaire et aprotique, va solubiliser facilement le monomère et le dummy-template tout en ne gênant pas les interactions mises en jeu lors de la complexation de ces deux molécules.

Afin de confirmer le bon choix du solvant porogène, nous avons procédé à un test de solubilité selon le même protocole que celui décrit dans le chapitre précédent. La quantité de chaque solvant a été augmentée par ajouts successifs dans un tube où se trouvait 1 mg de notre « *dummy-template* » ou un des monomères fonctionnels jusqu'à la dissolution totale du composé. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 15 :

**Tableau 15 : Solubilité du dummy-template (56) et des trois monomères choisis : (19), (57) et (58) dans les deux solvants aprotiques choisis**

Solvant	Température (°C)	$\delta_p$	$\delta_h$	$\epsilon$	Solubilité monomère	Solubilité (56)
MeCN	25	18	6,1	37,5	2 mg.mL <sup>-1</sup> ( <b>19</b> )	2 mg.mL <sup>-1</sup>
					1,3 mg.mL <sup>-1</sup> ( <b>57</b> )	
					0,4 mg.mL <sup>-1</sup> ( <b>58</b> )	
DMSO	25	16,4	10,2	46,68	2 mg.mL <sup>-1</sup> ( <b>19</b> )	2 mg.mL <sup>-1</sup>
					2,2 mg.mL <sup>-1</sup> ( <b>57</b> )	
					2 mg.mL <sup>-1</sup> ( <b>58</b> )	

Selon les résultats obtenus, la triacétylation de la ribavirine a permis de diminuer sa polarité et ainsi rendre ce dérivé plus soluble dans l'acétonitrile que cette dernière. Cependant, les monomères **57** et **58** possèdent une faible solubilité dans l'acétonitrile d'où la substitution de ce dernier avec le DMSO qui possède un caractère protique légèrement plus élevé ( $\delta_h = 10,2$ ) mais qui reste assez proche de celui de l'acétonitrile.

**En conclusion, le MIP contenant le monomère 19 sera synthétisé dans l'acétonitrile. Alors que, étant donnée la faible solubilité des deux monomères 57 et 58 dans l'acétonitrile, les MIPs contenant les deux monomères dérivés de la thymine et de l'uracile seront synthétisés dans le DMSO.**

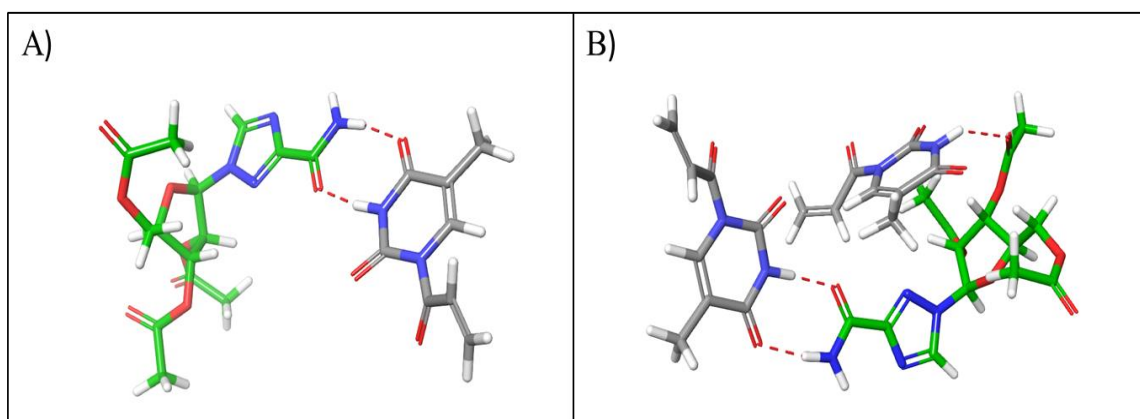
<sup>289</sup> Rahman, S. K. A.; Yusof, N. A.; Abdullah, A. H.; Mohammad, F.; Idris, A.; Al-Iohedan, H. A., Evaluation of porogen factors for the preparation of ion imprinted polymer monoliths used in mercury removal, *PLoS ONE*. **2018**, *13*, e019554.

## II.2. Etude des interactions template-monomères fonctionnels

### a) Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire permet de prédire la stabilité du complexe de pré-polymérisation dans différents solvants par le calcul de la constante de complexation et donc l'énergie libre de la réaction de complexation. De plus, elle nous permet de déterminer la structure de moindre énergie du complexe formé par assemblage du template et des monomères fonctionnels. Cela va permettre de constater si l'assemblage entre la ribavirine triacétylée et chacun des monomères fonctionnels **57** et **58** se fait préférentiellement par appariement des bases nucléiques.

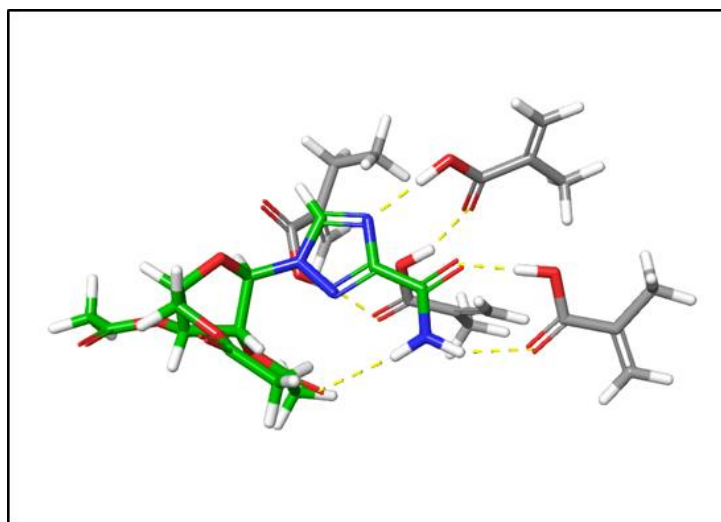
Pour cela nous avons étudié la complexation de notre dummy-template respectivement en présence de chacun des monomères **57** et **58**.



**Figure 60 : Résultats obtenus par modélisation moléculaire montrant la complexation du dummy-template 56 avec A) 1 éq, B) 2 éq, du monomère fonctionnel (58).**

Les figures obtenues montrent que le monomère **58** se complexe préférentiellement avec la base du dummy-template **56** (A). Lorsqu'on ajoute un deuxième monomère, ce dernier vient créer une liaison hydrogène avec un des carbonyles des fonctions esters éthyliques du ribose dérivé (B). Ces résultats mettent en évidence la complexation stœchiométrique de type 1 : 1 basée sur deux liaisons hydrogène existant entre la base pyrimidique du monomère et la fonction amide liée en position 3 du cycle triazole de la ribavirine triacétylée. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le monomère **57** (clichés en annexe I-b et I-c).

La modélisation du complexe de pré-polymérisation entre le dummy-template **56** et le monomère **19** avec un ratio de 1:4 (T:MF) a montré que les monomères viennent interagir préférentiellement avec la partie hétérocycle azoté de la ribavirine triacétylée. Ce qui nous a confirmé que le MAA est bien un monomère qui présente une forte affinité avec les analogues de base purique comme il avait été mentionné dans la littérature.



**Figure 61 : Structure du complexe de pré-polymérisation entre le template 56 et le monomère 19 pour un ratio 1:4 (T:MF) dessinée par modélisation moléculaire**

Le tableau suivant nous donne les valeurs de  $\Delta G$  obtenues par DFT pour chacun des complexes. Les résultats montrent des valeurs de  $\Delta G$  négatives indiquant que la formation des complexes dans ces deux solvants est un processus spontané. Ce processus de complexation est entraîné par les interactions de type hydrogène et van der Waals.<sup>136</sup>

**Tableau 16 : les valeurs de  $\Delta G$  obtenues pour les différents complexes de pré-polymérisation dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et dans l'acétonitrile (MeCN)**

Complexe	Ratio	Solvant	$\Delta G$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )
56:19	1:4	DMSO	-26,27
		MeCN	-33,19
56:57	1:1	DMSO	-34,33
		MeCN	-44,31
56:58	1:1	DMSO	-36,06
		MeCN	-44,03

Les différentes valeurs de  $\Delta G$  montrent que les complexes sont plus stables dans l'acétonitrile que dans le DMSO, car plus élevées en valeur absolue. Cela peut être expliqué par le caractère aprotique plus faible de l'acétonitrile, favorisant les interactions de type liaisons hydrogène. Cependant, étant donné la faible solubilité des monomères **57** et **58** dans le MeCN nous avons préféré garder le DMSO comme solvant de polymérisation. En revanche, pour le monomère **19**, étant donné qu'il est parfaitement soluble dans le MeCN, nous avons décidé de garder ce dernier pour la synthèse du MIP correspondant.

### b) Titration <sup>1</sup>H-RMN

Afin d'évaluer l'affinité existante entre le dummy-template **56** et chacun des trois monomères **19**, **57** et **58**, nous avons procédé à une titration <sup>1</sup>H-RMN. L'interaction a été confirmée en suivant la variation du déplacement chimique  $\Delta\delta$  de l'hydrogène en N<sup>3</sup> de la base nucléique des monomères **57** et **58**, avec l'ajout de la ribavirine triacétylée, ou le  $\Delta\delta$  des hydrogènes de la fonction

amide du dummy-template **56** avec l'ajout du monomère **19**. Comme il a été expliqué dans le chapitre 1, la titration a été conduite avec une concentration constante du *Host*, ou [H], en augmentant progressivement la concentration du *Guest*, ou [G]. Puis, la variation du déplacement chimique a été tracée en fonction de la concentration finale en [G] après chaque ajout. Cette étude a été menée dans l'acétonitrile deutéré, d'abord pour que le solvant de titration soit identique au porogène utilisé avec le monomère **19**, et aussi pour obtenir une meilleure définition du signal d'un proton labile qu'avec le DMSO-d<sub>6</sub>, dans le cas des monomères **57** et **58**. Ces dernières titrations ont été possibles dans l'acétonitrile-d<sub>3</sub> car les concentrations choisies en monomères étaient très faibles, ce qui a permis de solubiliser les monomères fonctionnels **57** et **58**, utilisés comme *Host*. L'équation correspondant à une association de type 1:1 a été appliquée. Après utilisation de la régression non linéaire, la constante d'association théorique  $K_a$  pour chaque complexe a été calculée. Les résultats sont exprimés dans le Tableau 17.

**Tableau 17 : Résultats de la titration <sup>1</sup>H-RMN en utilisant le modèle de régression non linéaire de type 1:1**

Complexe	$K_a$ [M <sup>-1</sup> ]	$\Delta_{HG}$ (ppm)
<b>56:19</b>	653	0,02
<b>56:57</b>	122	0,59
<b>56:58</b>	260	0,44

La valeur de  $K_a$  est assez élevée pour le complexe **56:19** et correspond aux valeurs trouvées dans la littérature lorsque le MAA est utilisé dans la synthèse de MIPs sélectifs des bases puriques.<sup>140</sup> Nous savons aussi, que spontanément, le premier équivalent de monomères MAA introduit dans la formulation interagira fortement avec la fonction amide de la ribavirine. Cela confirme l'importance de cette fonction chimique dans le processus de reconnaissance du MIP synthétisé avec le MAA. En comparant les constantes d'association des monomères **57** et **58**, on voit bien que la valeur du  $K_a$  pour le complexe **56:58** est plus élevée que celui du complexe **56:57**. Cela peut s'expliquer par la stabilité de chacun des monomères dans le solvant choisi et aussi de leurs différences de polarité. **Ces résultats confirment ceux obtenus avec la modélisation moléculaire indiquant que la stabilité du complexe 56:58 et la spontanéité de sa formation restent légèrement plus élevées que le complexe 56:57.**

Afin d'évaluer la stœchiométrie dummy-template:MF des deux complexes **56:57** et **56:58**, les tracés de Job (ou job-plot) ont été effectués (**chapitre 1**). Les résultats montrent que le sommet de la courbe correspond à la fraction molaire 0,5 pour les deux monomères **57** et **58**. **Cela confirme que le complexe formé est bien de type 1:1 pour chacun des monomères** (Figure 62).

**Finalement, cette étude prédictive nous confirme le bon choix du ratio 1:1 (T:MF) pour chacun des monomères fonctionnels utilisés (57 et 58) et, aussi, nous a permis de mettre en évidence la force de liaison pour chaque complexe dans l'acétonitrile deutéré.**

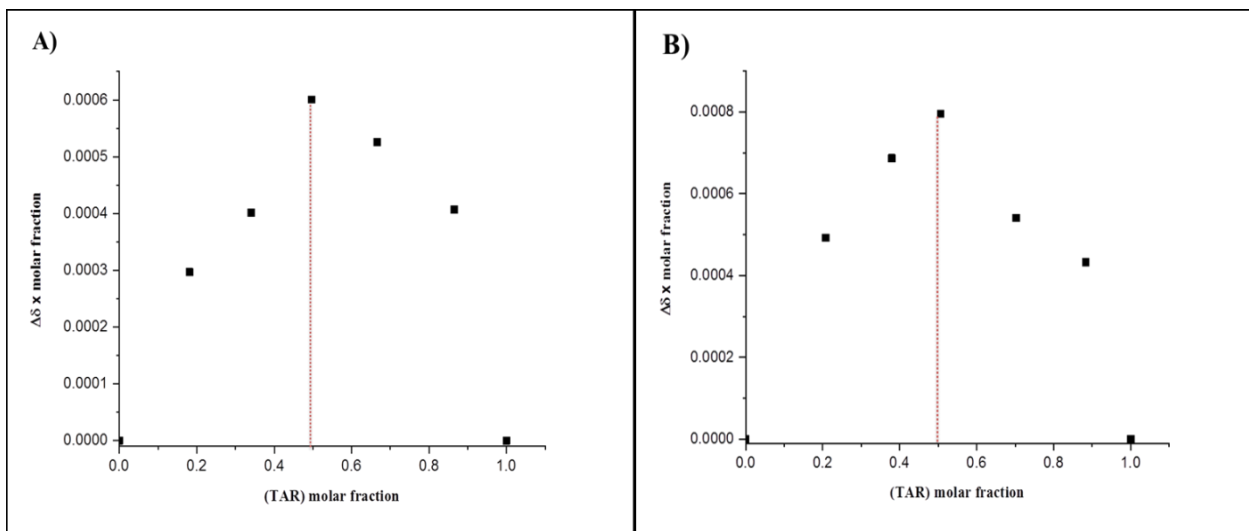


Figure 62 : Job-plot pour l'association du template 56 (triacetylated ribavirin ou TAR) avec le monomère 57 (A), et le monomère 58 (B)

### II.3. Synthèse des polymères imprimés

A partir des résultats obtenus dans les études prédictives et dans la littérature, nous avons choisi de tester en premier lieu le monomère **19**. Pour la synthèse de ce MIP, nous avons choisi le ratio 1:4:20 (template, monomère et réticulant) le plus cité dans la littérature sur la synthèse des polymères imprimés. Cette synthèse a été effectuée dans le porogène acétonitrile. Cependant, étant donnée leur faible solubilité dans le MeCN, la synthèse des MIPs utilisant les monomères **57** et **58** a été effectuée dans le DMSO. Le ratio choisi est le 1:1:20 conformément aux résultats obtenus par la titration  $^1\text{H-RMN}$ .

Pour la synthèse de ces différents MIPs, nous avons utilisé l'EGDMA comme agent réticulant afin de minimiser les interactions hydrophiles avec le dummy-template. Pour chaque formulation, le polymère non imprimé a été obtenu dans les mêmes conditions omni l'ajout du dummy-template **40**. Ces formulations sont détaillées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Formulations utilisées dans la synthèse des MIP-09 (monomère 19), MIP-10 (monomère 57) et MIP-11 (monomère 58)

Polymère	Template (g)	Monomère (g)	EGDMA (mL)	AIBN (g)	Solvant (mL)	Ratio (T:MF:R)
MIP-09	(56) 0,37	(19) 0,344	3,7	0.035	MeCN (6)	1:4:20
MIP-10	(56) 0,37	(57) 0,166	3,7	0,035	DMSO (4,1)	1:1:20
MIP-11	(56) 0,37	(58) 0,180	3,7	0,035	DMSO (4,1)	1:1:20

### II.4. Caractérisation du MIP par FT-IR

Avant de procéder à la caractérisation des polymères obtenus par analyse frontale, l'étude de la fonctionnalité chimique a été faite par spectroscopie FT-IR en mode ATR. Le but de cette caractérisation est, principalement, d'étudier la polymérisation de chacun des monomères **57** et **58**.

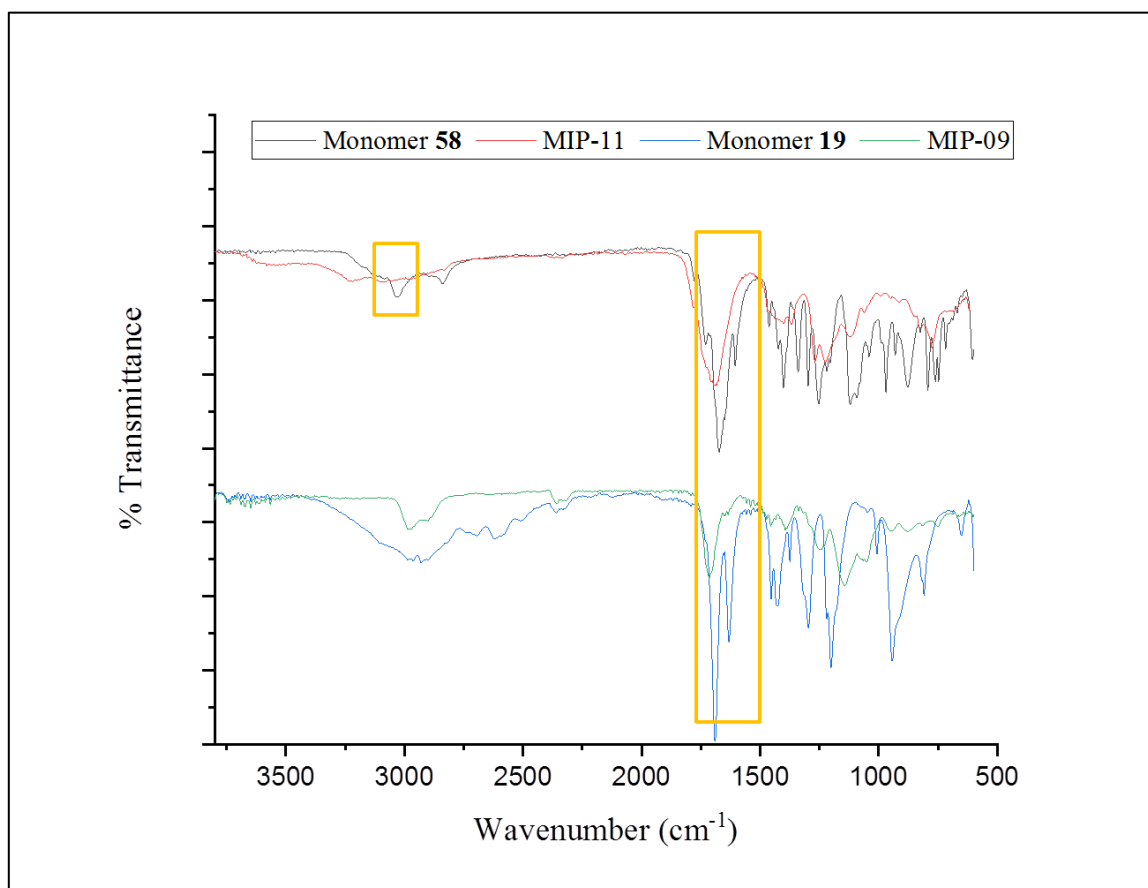


Figure 63 : Spectre FT-IR des monomères 19 et 58 et leur polymère imprimé respectif : MIP-09 et MIP-11

Les spectres FT-IR obtenus (Figure 63) montrent la disparition de la bande à  $3060\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique de la vibration d'élongation  $\nu_{\text{C-H}}$  de la fonction  $-\text{C}=\text{C-H}$  du groupement vinylique présent sur les monomères 57 et 58. Cela montre que le fait de greffer un groupement acrylique sur la thymine et l'uracile a permis de créer des monomères qui s'incluent dans le polymère avec la même cinétique de polymérisation que l'agent réticulant. On peut comparer ces résultats avec ceux obtenus pour le monomère 19, qui montre la disparition de la bande caractéristique due à la vibration d'élongation  $\nu_{\text{C=C}}$  du vinyle à  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Cette caractérisation a permis de valider la formation de notre polymère.

## II.5. Etude et caractérisation de l'adsorption

Les caractérisations de l'affinité et de la capacité des polymères obtenus avec la molécule dummy-template 56 ont été menées par analyse frontale. A partir de chaque palier de concentration, la quantité  $Q$  du template adsorbée a été calculée et tracée en fonction de la concentration correspondante  $C_f$  dans la phase mobile (Figure 64). Ces études ont été effectuées à un débit et une température constants.

Afin de déterminer la capacité d'adsorption ( $N$ ) et les constantes d'association de chacun des polymères imprimés/non imprimés, nous avons appliqué les équations mathématiques de quatre modèles d'isothermes d'adsorption,<sup>197</sup> à savoir Langmuir (L), Bi-Langmuir (Bi-L), Freundlich (F) et Freundlich-Langmuir (F-L).

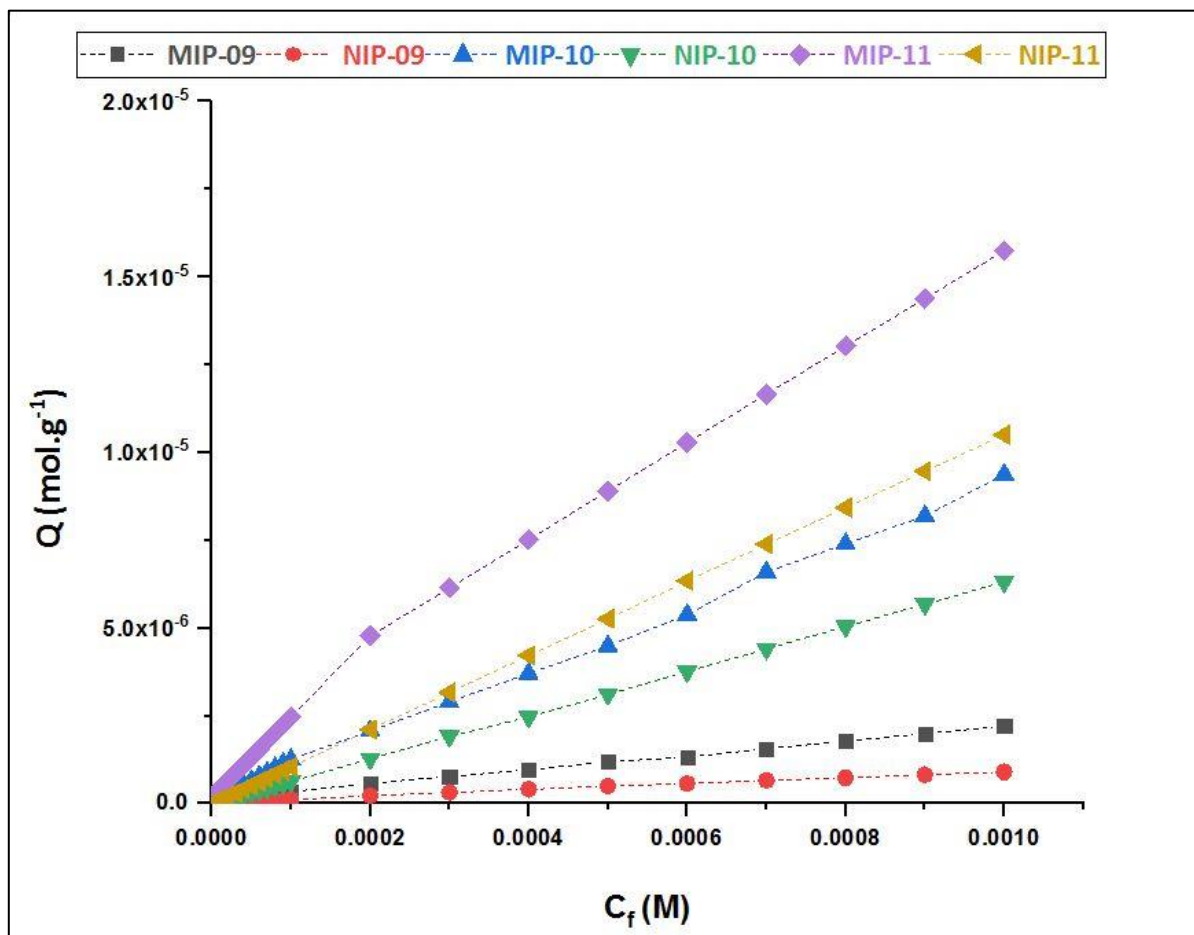


Figure 64 : Données expérimentales obtenues par une analyse frontale pour chacun des polymères imprimés/non-imprimés en utilisant le dummy-template 56 (MIP-09 : carré noir, NIP-09 : rond rouge, MIP-10 : triangle bleu, NIP-10 : triangle vert, MIP-11 : losange violet, NIP-11 : triangle jaune).

Les isothermes obtenues ont toutes une allure hyperbolique, ce qui nous permet d'affirmer que les matériaux n'ont pas atteint leur capacité de saturation. Cela est peut-être dû aux erreurs possibles engendrées par le système chromatographique.<sup>290</sup> La Figure 64 montre que le **MIP-11** possède une capacité plus élevée que les autres MIPs et NIPs. Il possède aussi un grand nombre de sites de reconnaissances comparé au **MIP-09** et **MIP-10**, car c'est lui qui montre la plus grande différence de capacité avec son polymère référence **NIP-11**. Pour chacune des formulations obtenues, on voit une différence entre les polymères imprimés et non-imprimés. Cette différence est variable, et se traduit par la présence d'empreintes de la molécule dummy-template. Cette variation dépend de l'affinité du polymère avec la molécule dummy-template et la distribution des sites de reconnaissance au sein du polymère. Des modèles d'isotherme d'adsorption de Langmuir, Bi-Langmuir, Freundlich et Freundlich-Langmuir sont extraits les constantes d'affinités  $K_a$  et le nombre de sites actifs  $N$ , pour chaque MIP et NIP, par régression non-linéaire.

<sup>290</sup> Samuelsson, J.; Sajonz, P.; Fornstedt, T., Impact of an error in the column hold-up time for correct adsorption isotherm determination in chromatography: I. Even a small error can lead to a misunderstanding of the retention mechanism, *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1189*, 19-31.



**Tableau 19** : les constantes d'affinités ( $K_a$ ,  $L \cdot mol^{-1}$ ) et le nombre de sites actifs ( $N$ ,  $mol \cdot g^{-1}$ ) obtenues par applications des modèles de régression non linéaire (Langmuir, Bi-Langmuir, Freundlich et Freundlich-Langmuir) en utilisant les données obtenues par analyse frontale des **MIP/NIP (09, 10 et 11)**.

NIP-09						NIP-10					NIP-11				
Modèle	N	$K_a$	m	$R^2$	$F_{value}$	N	$K_a$	m	$R^2$	$F_{value}$	N	$K_a$	m	$R^2$	$F_{value}$
Langmuir	$4,09 \cdot 10^{-06}$	$0,27 \cdot 10^{+03}$	-	0,999	$65,2 \cdot 10^{+03}$	$4,72 \cdot 10^{-05}$	$0,15 \cdot 10^{+03}$	-	0,996	$6,2 \cdot 10^{+03}$	N/D				
Bi-Langmuir	N/D					N/D					N/D				
Freundlich	$2,01 \cdot 10^{-06}$	$10,8 \cdot 10^{+03}$	0,88	0,999	$84,5 \cdot 10^{+03}$	$8,75 \cdot 10^{-07}$	$9,7 \cdot 10^{+03}$	0,87	0,998	$15,7 \cdot 10^{+3}$	$1,1 \cdot 10^{-06}$	$8,4 \cdot 10^{+03}$	0,92	0,999	$24,4 \cdot 10^{+03}$
Freundlich-Langmuir	$0,1 \cdot 10^{-03}$	$0,3 \cdot 10^{-06}$	0,88	0,999	$54,6 \cdot 10^{+03}$	N/D					N/D				
MIP-09						MIP-10					MIP-11				
Modèle	N	$K_a$	m	$R^2$	$F_{value}$	N	$K_a$	m	$R^2$	$F_{value}$	N	$K_a$	m	$R^2$	$F_{value}$
Langmuir	$8,93 \cdot 10^{-6}$	$0,31 \cdot 10^{+03}$	-	0,996	$6,1 \cdot 10^{+03}$	$3,23 \cdot 10^{-05}$	$0,32 \cdot 10^{+03}$	-	0,997	$7,2 \cdot 10^{+03}$	$4,1 \cdot 10^{-05}$	$0,54 \cdot 10^{+03}$	-	0,997	$7,8 \cdot 10^{+03}$
Bi-Langmuir	N/D					N/D					N/D				
Freundlich	$6,16 \cdot 10^{-06}$	$12,2 \cdot 10^{+03}$	0,83	0,998	$12,4 \cdot 10^{+03}$	$1,32 \cdot 10^{-06}$	$8,95 \cdot 10^{+03}$	0,84	0,999	$25,4 \cdot 10^{+03}$	$7,55 \cdot 10^{-06}$	$15,8 \cdot 10^{+03}$	0,71	0,999	$37,3 \cdot 10^{+03}$
Freundlich-Langmuir	N/D					N/D					N/D				

N/D : non déterminé

Les valeurs extraites sont présentées dans le tableau 19. Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) est l'un des paramètres les plus utilisés pour s'assurer du bon ajustement du modèle théorique avec les données expérimentales (plus la valeur de  $R^2$  se rapproche de 1, plus le modèle est bien ajusté). Or,  $R^2$  apparaît être peu approprié lorsqu'il est utilisé pour démontrer la performance ou la validité de certains modèles non linéaires, surtout les modèles sigmoïdaux.<sup>291</sup> Idéalement, il devrait être complété par d'autres valeurs telles que celle du test de Fisher ( $F_{\text{value}}$ ).<sup>267,292</sup> Comme les tracés développés sont de type asymptotique, nous avons décidé de garder le coefficient  $R^2$  dans nos valeurs d'ajustement, mais nous avons aussi adjoint la valeur de F pour l'aide à la décision du bon modèle au vu des valeurs de  $R^2$  et  $F_{\text{value}}$  données dans le Tableau 19.

Le modèle de Freundlich semble correspondre le mieux aux résultats expérimentaux observés pour chacune des formulations avec l'analyse frontale. Cela paraît logique, car une faible énergie d'association dans le complexe de pré-polymérisation donne naturellement une distribution continue en énergie des sites d'adsorption. Ce modèle décrit aussi l'hétérogénéité de surface qui est donnée par le paramètre  $m$  ; plus sa valeur se rapproche de 0 plus la distribution des sites actifs est hétérogène, et plus il est proche de 1, plus la distribution des sites est homogène en énergie. Ce modèle s'applique principalement pour les polymères imprimés utilisant une approche non covalente, ce qui est le cas ici. Selon les travaux de Shimizu *et al.*<sup>293,204</sup> and Guiochon *et al.*,<sup>198</sup> le modèle de Freundlich est le plus utilisé pour décrire une distribution continue des sites actifs en tenant compte de l'hétérogénéité des MIPs obtenus par approche non covalente. Ce modèle peut exprimer l'affinité et la sélectivité des régions de sous-saturation (cf. Figure 35).

Dans notre cas, pour les **MIP 09 à 11**, les valeurs de  $m$  sont inférieures à 1. Ceci montre une certaine hétérogénéité dans la distribution en énergie des sites d'adsorption. Cette hétérogénéité peut être engendrée par la grande quantité du réticulant utilisée comparativement à la quantité des monomères fonctionnels, dans la formulation de ces 3 MIPs.<sup>206</sup> Les quantités de dummy-template adsorbées par les MIPs restent expérimentalement et théoriquement plus élevées que les NIPs correspondants. Le constat est le même avec les constantes d'association, qui sont au moins deux fois plus élevées que celles des polymères non imprimés. Par exemple, avec le **MIP-11**, les paramètres extraits du modèle de Freundlich donnent **un nombre de sites N de 7,5  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  (1,1  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  pour le NIP-11) et une constante d'association moyenne  $K_a$  de 15,8.10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> (8,4.10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> pour le NIP-11)**. A partir de la Figure 64 (insert), en ce qui concerne le domaine des faibles concentrations, il existe une différence plus significative encore entre le **MIP-10** et le **NIP-10**. Cela prouve la présence des sites d'adsorption à forte énergie avec des  $K_a > 10^6$  M<sup>-1</sup>. Cette différence est plus visible pour le **MIP-10** que pour les **MIP-09** et **MIP-11**.

**On peut ainsi déduire de cette étude que les MIPs obtenus possèdent des constantes d'association et des capacités différentes dont certaines sont plus élevées que d'autres. Mais, tous les MIPs présentant une différence d'adsorption positive par rapport à leur NIP, la présence de cavités**

<sup>291</sup> Spiess, A. N.; Neumeyer, N., An evaluation of  $R^2$  as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach, *BMC. Pharmacology*. **2010**, *10*, 6.

<sup>292</sup> Chen, Y.; Kele, M.; Quiñones, I.; Sellergren, B.; Guiochon, G., Influence of the pH on the behavior of an imprinted polymeric stationary phase-supporting evidence for a binding site model, *J. Chromatogr. A*. **2001**, *927*, 1-17.

<sup>293</sup> Umpleby II, R. J.; Baxter, S. C.; Bode, M.; Berch Jr, J. K.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D., Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta*. **2001**, *435*, 35-42.

définies capables d'interagir fortement avec le dummy-template est confirmée. Ces différences en énergie d'interaction et en capacité vont jouer sûrement un rôle important sur la libération de la molécule adsorbée, la ribavirine.

## II.6. Etude cinétique du relargage de la ribavirine

Afin de mettre en place l'étude cinétique de relargage de la ribavirine à partir de ces différents systèmes de libération, il faut d'abord charger ces matériaux. Pour cela, 50 mg de chacun des polymères imprimés/ non-imprimés ont été mis en contact avec une solution de ribavirine à 10 mM dans un mélange MeCN/Eau (87/13, v/v). Comme il a été décrit dans le chapitre précédent, ce mélange permet de solubiliser la ribavirine tout en diminuant la compétition entre le solvant protique et l'antiviral au sein de la cavité. Ce mélange permet ainsi d'augmenter l'adsorption de la ribavirine sur le polymère.

Etant donné que nos MIPs/NIPs sont des polymères rigides (avec un taux de réticulation > 75 %) synthétisés sans aucun monomère thermosensible, nous avons décidé de procéder directement à l'étude du relargage de l'antiviral dans un tampon aqueux PBS (Phosphate Buffer Saline, avec tampon phosphate à 10 mM, chlorure de potassium à 2,7 mM et chlorure de sodium à 137 mM) qui mime les fluides biologiques, de pH 7,4, à une température de 38 °C. Le relargage a été étudié sur 24 h. En premier lieu, nous avons comparé les résultats obtenus pour le couple **MIP/NIP-09**. Les résultats expérimentaux ont été présentés sur la Figure 65, où il a été tracé le rapport masse de la ribavirine relarguée à un instant  $t$  ( $M_t$ ) par la masse initiale chargée ( $M_0$ ) en fonction du temps.

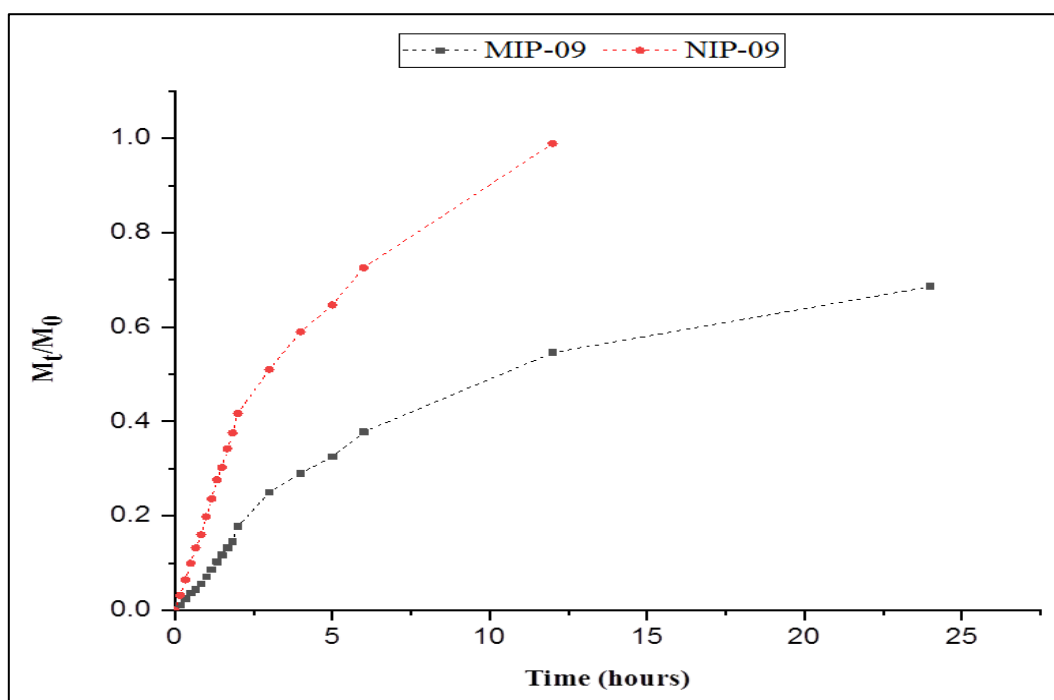


Figure 65 : Relargage de la ribavirine ( $M_t/M_0$ ) en fonction du temps pour le MIP-09 et le NIP-09, sur 24h dans un tampon phosphate (pH : 7,4 ; 0,01M) à 38°C

Les courbes obtenues montrent clairement un relargage plus rapide pour le **NIP-09** que pour le **MIP-09**. Il est possible de voir que la masse contenue dans le **NIP-09** a été totalement libérée au bout de 12h. Cependant, pour le **MIP-09**, au bout de 24 h, il n'y a que 68 % de la masse de ribavirine initialement présente au sein du polymère qui a été libérée dans le milieu. Ces résultats montrent

que le système polymérique imprimé possède dans sa matrice des sites avec lesquels la ribavirine est en interaction forte, ou cavités de reconnaissance, qui retiennent plus longtemps cet antiviral. Ce modèle montre que les énergies d'association spécifiques pour le **MIP-09** sont plus fortes que celles créées par le **NIP-09** qui sont des interactions non spécifiques avec une énergie d'association plus faible. Ce phénomène de retard dans la libération d'un principe actif avec des formulations contenant le MAA (monomère **19**) a déjà été montré dans la littérature. Par exemple, dans les travaux de Puoci *et al.*,<sup>89</sup> la libération d'un anticancéreux, le 5-FU, a été étudiée à partir d'un MIP de type poly (MAA-co-EGDMA) imprimé dans un milieu mimant les fluides gastriques et un autre mimant le plasma. Les résultats obtenus ont montré un relargage prolongé sur le temps pour le polymère imprimé comparé au non-imprimé.

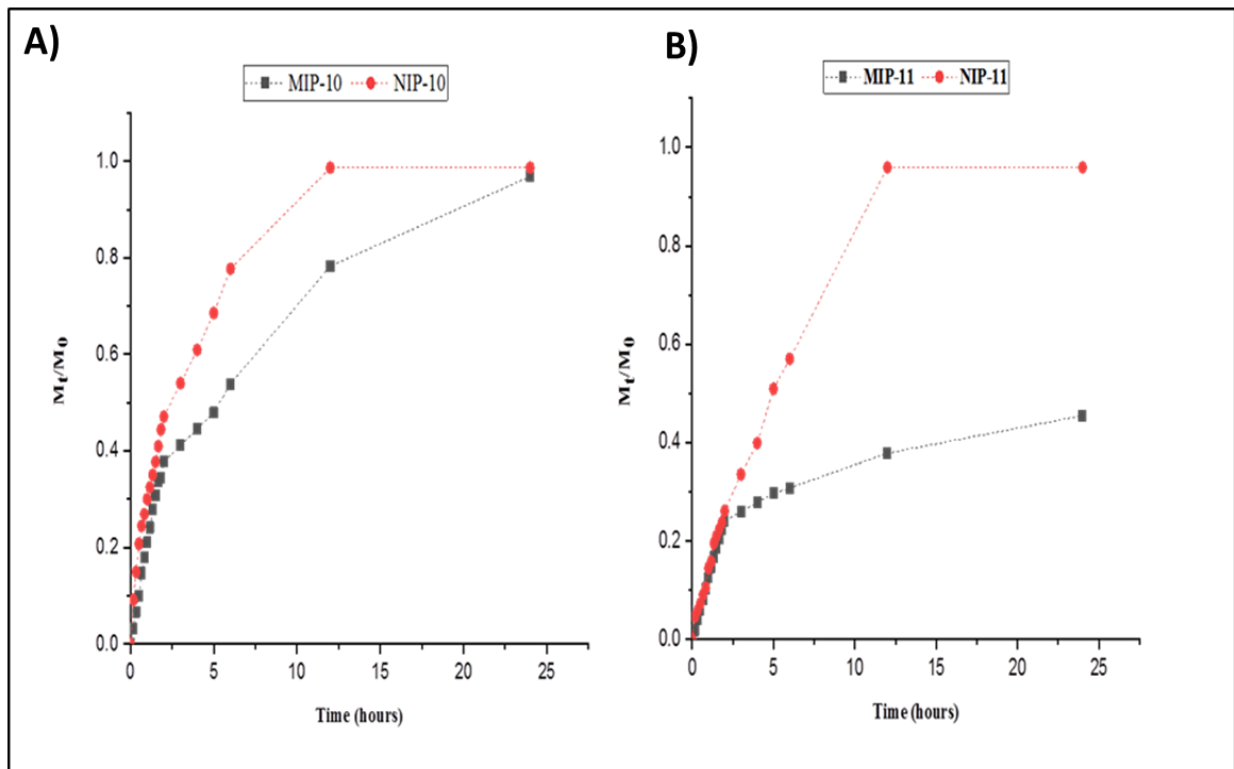
Pour mieux connaître le phénomène qui régit la libération de la ribavirine à partir du couple MIP/NIP-09, nous avons eu recours aux modèles mathématiques. Dans notre cas, étant donné que notre polymère est rigide et le phénomène de gonflement est négligeable, nous avons décidé d'appliquer les modèles de Higuchi et de Korsmeyer-Peppas. Les paramètres calculés sont présentés dans le Tableau 20. L'évaluation du coefficient de régression  $R^2$  et le paramètre du test de Fisher  $F_{value}$  permettent de déterminer le bon modèle.

**Tableau 20 : Paramètres obtenus après régression non linéaire avec les modèles de Higuchi et de Korsmeyer-Peppas pour le MIP-09 et le NIP-09.** La régression non linéaire est appliquée sur les premiers 60% de matière libérée pour le modèle de Korsmeyer-Peppas.

Modèle	MIP-09				NIP-09			
	n	k	$R^2$	$F_{value}$	n	k	$R^2$	$F_{value}$
Higuchi	-	0,135	0,9282	483	-	0,273	0,9432	828
Korsmeyer-Peppas	0,73	0,094	0,9746	678	0,78	0,213	0,9748	884

Les paramètres de régression non linéaire nous ont permis de conclure que la cinétique de relargage s'ajuste le mieux avec le modèle de Korsmeyer-Peppas. A partir de la valeur de l'exposant  $n$ , nous pouvons déterminer le phénomène qui gouverne la libération. Etant donné que la valeur de  $n$  obtenue est comprise entre 0,5 et 1, cette cinétique suit un modèle non-fickien ou anormale. Ce phénomène est géré par la diffusion et le gonflement. La diffusion de l'eau dans la matrice polymérique permet le réarrangement lent, la dissolution de la ribavirine et sa libération.<sup>277</sup> On peut aussi voir que la constante cinétique de libération  $k$  est beaucoup plus lente pour le **MIP-09** que celle du **NIP-09**. Cela peut démontrer l'effet de l'encagement de la ribavirine au sein de sa cavité sur la rétention du principe actif et donc sur sa cinétique de libération dans le cas du **MIP-09**.<sup>89</sup> Le solvant, ici le tampon aqueux PBS, a du mal à s'immiscer au sein des cavités pour venir casser les interactions existantes entre la ribavirine et le polymère pour l'extraire et la dissoudre. Mais, une fois dissoute, la ribavirine par diffusion au sein des pores de la matrice polymérique, va atteindre les bords de la particule et diffuser au sein du milieu tamponné, comme le fait la ribavirine adsorbée dans les pores du NIP.

Les profils de libération des deux autres couples **MIP/NIP-10** et **MIP/NIP-11** sont aussi tracés. Les données expérimentales nous ont permis de constater que le **MIP-10** possède un relargage plus retardé que le **NIP-10**. Cependant, ces deux polymères libèrent la totalité de la ribavirine adsorbée dans les 24 heures de mesure. Le **MIP-10** relargue toute sa ribavirine adsorbée en 24 h et le **NIP-10** le fait en 12 h. Alors que le **MIP-11** relargue seulement 45 % de son principe actif en 24 h. Le **NIP-11** suit le même profil que le NIP-10, il a libéré toute la ribavirine adsorbée en 12h. Ce phénomène est en partie dû aux constantes d'association  $K_a$  qui sont plus élevées pour le **MIP-11** que pour le **NIP-11**. La ribavirine est beaucoup plus retenue par le MIP en raison de la présence des cavités spécifiques où se lie la ribavirine avec une énergie d'interaction plus élevée.



**Figure 66 : Profil de relargage de la ribavirine ( $M_t/M_0$ ) en fonction du temps.** Libération effectuée sur 24h dans un tampon phosphate (pH : 7,4 ; 0,01M) à 38°C pour chacun le couple **MIP/NIP-10** (A) et le couple **MIP/NIP-11** (B)

Afin d'essayer de comprendre les cinétiques de relargage, nous avons utilisé les deux modèles de Higuchi et de Korsmeyer-Pappas. Les données calculées, présentées dans le tableau 16, ont été comparées en se basant sur le  $R^2$  et le  $F_{value}$ .

**Tableau 21 : Paramètres obtenus suite à la régression non linéaire appliquée aux modèles de Higuchi et de Korsmeyer-Peppas pour le MIP/NIP (10-11).** La régression non linéaire est effectuée sur les premiers 60% de la libération pour le modèle de Korsmeyer-Peppas.

	MIP-10				NIP-10			
Modèle	n	K	$R^2$	$F_{value}$	n	K	$R^2$	$F_{value}$
Higuchi	-	0,215	0,967	1577	-	0,303	0,989	6275
Korsmeyer-Peppas	0,53	0,219	0,9463	531	0,5	0,302	0,99	3455

Modèle	MIP-11				NIP-11			
	n	K	R <sup>2</sup>	F <sub>value</sub>	n	K	R <sup>2</sup>	F <sub>value</sub>
Higuchi	-	0,11	0,854	406	-	0,208	0,932	718
Korsmeyer-Peppas	0,38	0,146	0,92	357	0,69	0,166	0,99	2527

D'après ces paramètres, on voit que le modèle de Higuchi s'ajuste le mieux sur nos données expérimentales. Cela nous a permis de déterminer que **la cinétique de relargage est gouvernée par la diffusion et le transport du solvant à l'intérieur de la matrice**. Et non plus par une question rhéologique du matériau ; ici, au vu de la rigidité des différents matériaux, un quelconque gonflement de la matrice expliquant la libération est à proscrire. La diffusion du solvant au sein de la matrice polymérique, permettant ainsi la dissolution de la ribavirine, et la diffusion de la ribavirine dans le solvant contenu dans les pores gèrent sa libération au cours du temps.

**En conclusion, le MIP-09 et le MIP-11 ont montré une libération prolongée sur le temps, qui peut être intéressante pour l'utilisation de ces derniers comme systèmes de libération. Pour le MIP-10, malgré la quantité intéressante qui peut y être adsorbée (annexe VII) qui est supérieure au NIP-10, il présente un profil de libération trop proche de sa référence pour être retenu pour la suite des investigations.**

## II.7. Etude Biologique des matériaux pour la libération la ribavirine dans les poumons

### a) Etude de la cytotoxicité et d'immunogénicité des matériaux

L'étude de cytotoxicité et d'immunogénicité (effectués en collaboration avec l'équipe du DR.Si-Tahar) ont été conduites en suivant les mêmes protocoles que ceux décrits dans le chapitre précédent. Ces études ont été menées sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (Beas-2B) avec différentes concentrations de matériaux (0,25 et 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>). Pour les polymères imprimés à base de MAA, une simple vérification de la biocompatibilité avec ce type de cellules est recommandée. Etant donnée la large utilisation de ce monomère dans le domaine de l'encapsulation, Erreur ! Signet non défini. ces études viendront juste appuyer son utilisation. En revanche, l'utilisation des nouveaux monomères **57** (NAU) et **58** (NAT) dans la synthèse des **MIP-10** et **MIP-11**, respectivement, demandent obligatoirement la vérification de la cytotoxicité de ces polymères afin de pouvoir les utiliser comme cargos polymériques.

Pour cela, deux solutions de concentrations différentes (0,05 mg/mL et 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>) en microparticules ont été mises en contact avec les cellules Beas-2B. Cette étude a été menée en présence ou non d'un sérum de vœu fœtal (SVF) afin de suivre le comportement des particules en présence de protéines globulaires. En effet, au contact de ce type de protéines, les polymères peuvent les adsorber en grand nombre et ainsi modifier leur furtivité pour le système immunitaire ou changer leur comportement au sein de la culture cellulaire, et faire évoluer dans le cas des particules chargées en principe actif leur profil de relargage. D'un autre côté, nous avons vérifié le comportement du système immunitaire face à nos matériaux. Pour cela, la concentration

l'interleukine-6 (IL-6) a été quantifiée. Le pourcentage de cellules viables ainsi que la concentration de l'IL-6 sont obtenus après 24h d'exposition des cellules Beas-2B aux microparticules polymériques.

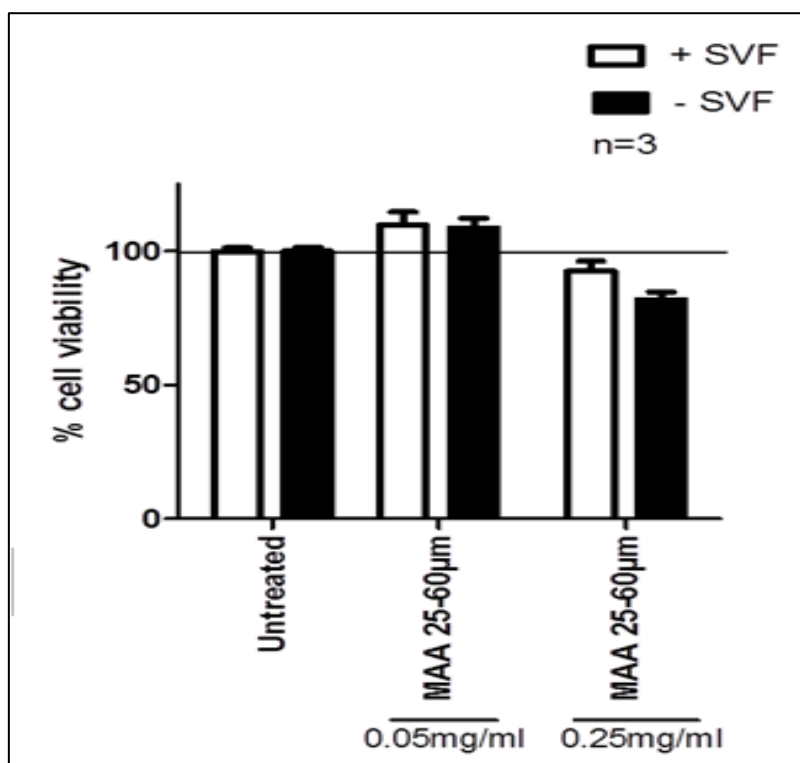


Figure 67 : Pourcentage de viabilité cellulaire pour le NIP 9 ou poly(MAA-co-EGDMA) à deux concentrations différentes de matériaux : 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> et 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>, en présence (+SVF) ou non (-SVF) de sérum de veau foetal. Les résultats sont obtenus après 24h d'incubation.

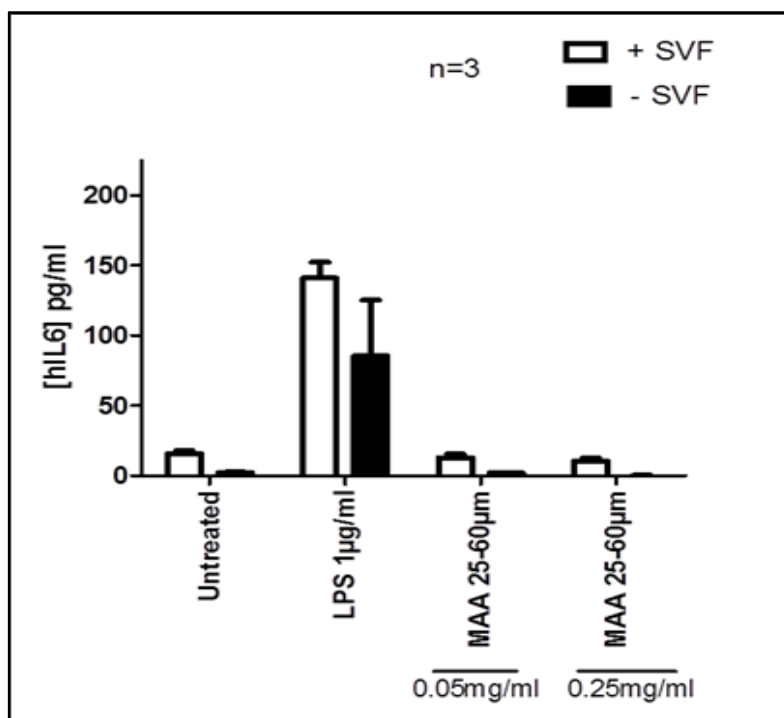
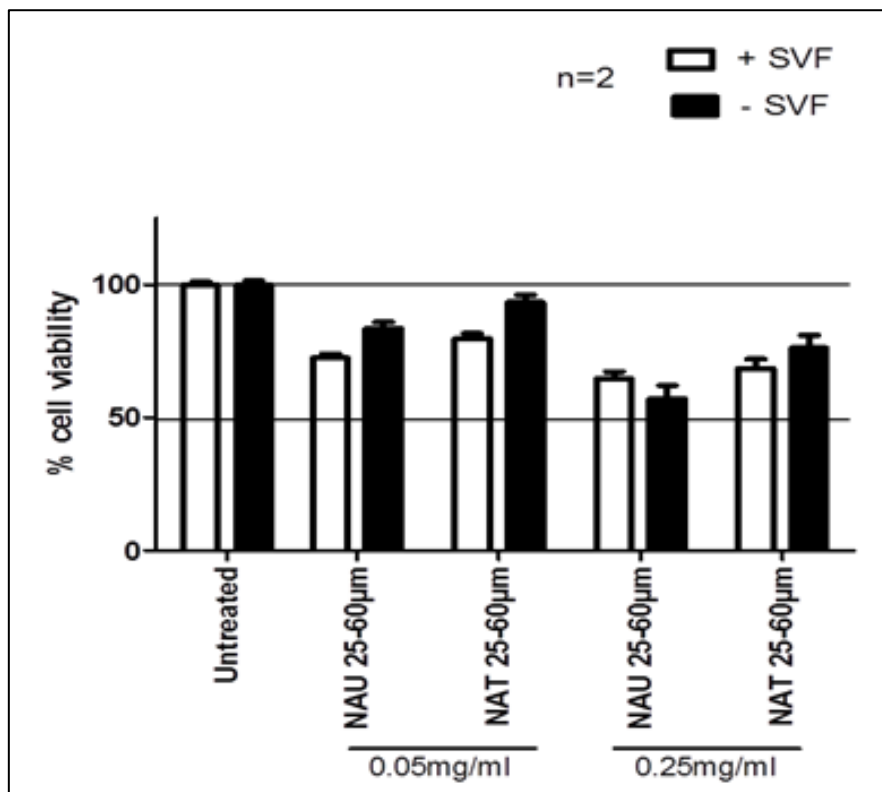


Figure 68 : Concentration de l'interleukine-6 en pg.mL<sup>-1</sup> pour le NIP-9 ou poly(MAA-co-EGDMA) à deux concentrations différentes de matériaux : 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> et 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>, en présence (+SVF) ou non (-SVF) de sérum de veau foetal. Le LPS (1 µg.mL<sup>-1</sup>) représente des cellules incubées en présence de lipopolysaccharide (témoin positif). Les résultats sont obtenus après 24h d'incubation.

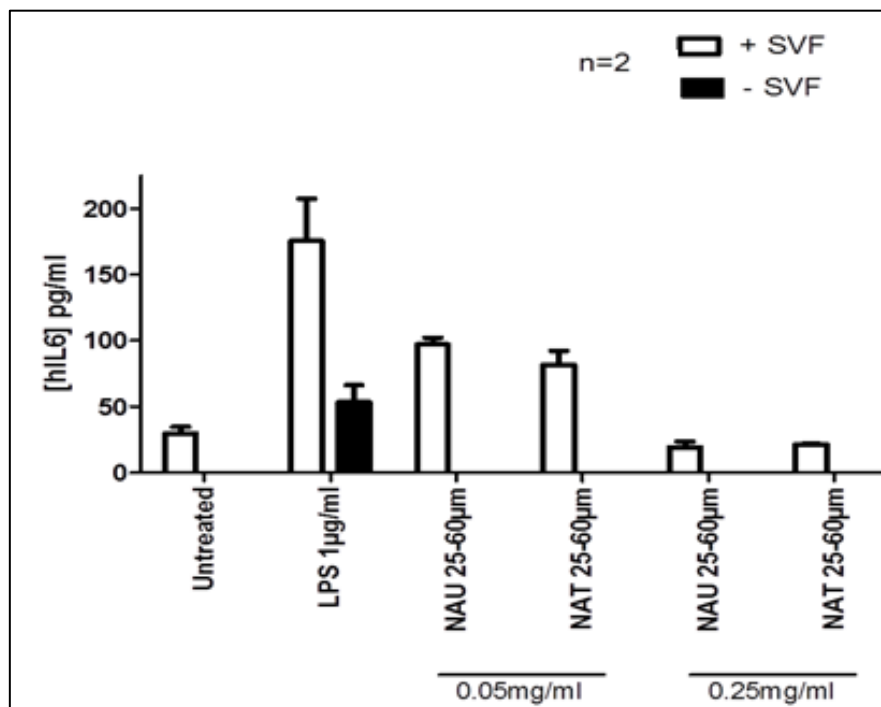
Les données montrées sur les Figure 67 et Figure 68 pour les matériaux à base de **MAA**, montrent une très bonne viabilité cellulaire en présence et en absence du SVF, à deux concentrations différentes de polymère. La faible concentration de l'IL-6 en présence des différentes concentrations de ces matériaux montre que le système immunitaire n'induit aucune réponse immunogène en présence de ces matériaux et ne les considère pas comme une potentielle menace. Ces résultats sont concordants avec les données de la littérature qui indique que le **MAA** est un monomère biocompatible. Erreur ! Signet non défini.

Concernant les matériaux à base de NAU et NAT, les résultats montrent une diminution du % de viabilité cellulaire pour les deux concentrations de matériaux. Les données montrent qu'on a une viabilité cellulaire de 80% (0,05 mg.mL<sup>-1</sup> ; +SVF) pour le NIP basé sur la **NAT**, qui est plus élevée que celle observée pour le NIP basé sur la **NAU** où il est trouvé 72% (0,05 mg.mL<sup>-1</sup> ; +SVF). Ce pourcentage décroît légèrement en augmentant la quantité de matériau mise en contact (0,25 mg.mL<sup>-1</sup>) comme le montre la Figure 69.



**Figure 69 : Pourcentage de viabilité cellulaire pour chacun des matériaux : NIP-10 ou poly(NAU-co-EGDMA) (NAU) et le NIP-11 ou poly(NAT-co-EGDMA) (NAT), à deux concentrations de matériaux : 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> et 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>, en présence (+SVF) ou non (-SVF) de sérum de veau fœtal. Les résultats sont obtenus après 24h d'incubation.**





**Figure 70** : Concentration de l'interleukine-6 en  $\text{pg.mL}^{-1}$  pour chacun des matériaux : NIP-10 ou poly(NAU-co-EGDMA) (NAU) et NIP-11 ou poly(NAT-co-EGDMA) (NAT), à deux concentrations de matériaux :  $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$  et  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ , en présence (+SVF) ou non (-SVF) de sérum de veau fœtal. Le LPS ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) représente le témoin positif. Les résultats sont obtenus après 24h d'incubation

Concernant l'étude d'immunogénicité (Figure 70), les deux NIPs montrent une légère augmentation de la concentration de l'IL-6 comparativement à des cellules seules. Malgré cela, cette augmentation reste beaucoup plus faible que le témoin en présence de LPS ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Cette concentration d'IL-6 reste toujours plus faible pour le **NAT** par rapport au **NAU**.

En conclusion, malgré la légère toxicité prouvée pour les matériaux à base de **NAT** et **NAU** comparativement au **MAA** (monomère biocompatible), leur utilisation en tant que cargos polymères reste possible. Cette hypothèse est basée sur le fait que la potentielle utilisation de ces cargos chez le patient va être temporaire, car la maladie visée demande des prises sur quelques jours seulement et non sur le long terme. En effet, si c'était pour une maladie chronique, ou la prise de principes actifs serait à vie, il serait plus judicieux d'utiliser des matériaux uniquement à base de **MAA**, par exemple.

## b) Etude virologique

Afin de déterminer l'efficacité de ces nouveaux systèmes de libération, nous avons effectué des études virologiques sur des cellules infectées par le Virus Influenza A<sup>278</sup> comme décrites dans le chapitre précédent.

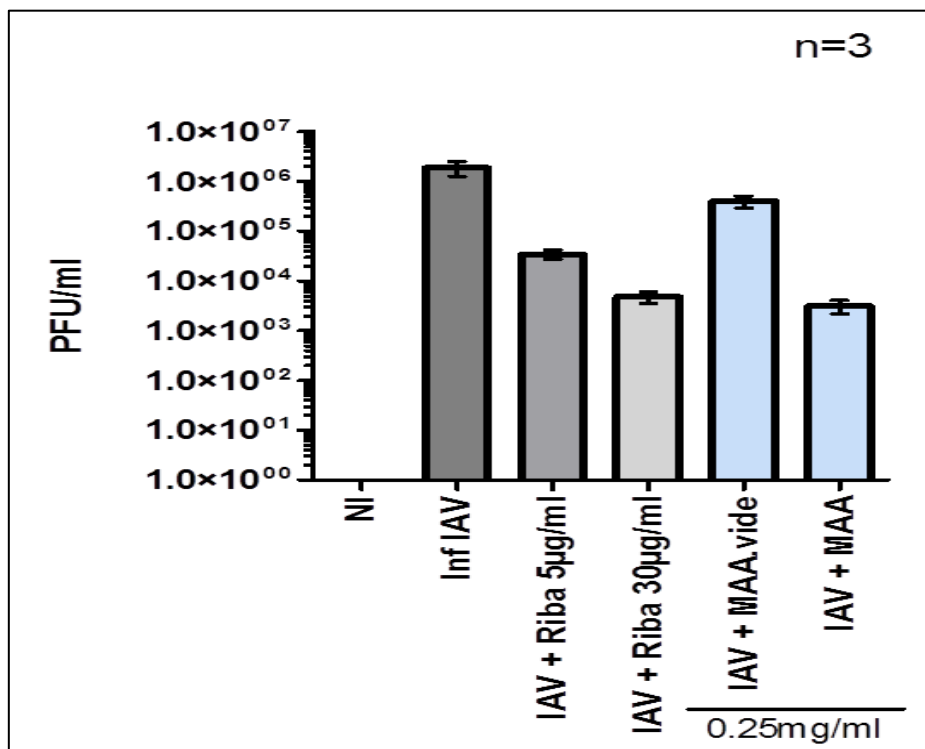


Figure 71 : Résultats de la quantification virale obtenus en unité formant des plaques (PFU/mL) pour la formulation à base de MAA ou MIP-09 non chargé (IAV + MAA.vide) et chargé (IAV + MAA), en comparaison avec des cellules non infectées (NI), des cellules infectées avec le virus Influenza A (inf IAV), des cellules infectées incubées avec une concentration de ribavirine à 5 µg.mL<sup>-1</sup> (IAV + Riba 5µg/mL) et à 30 µg.mL<sup>-1</sup> (IAV + Riba 30 µg.mL<sup>-1</sup>).

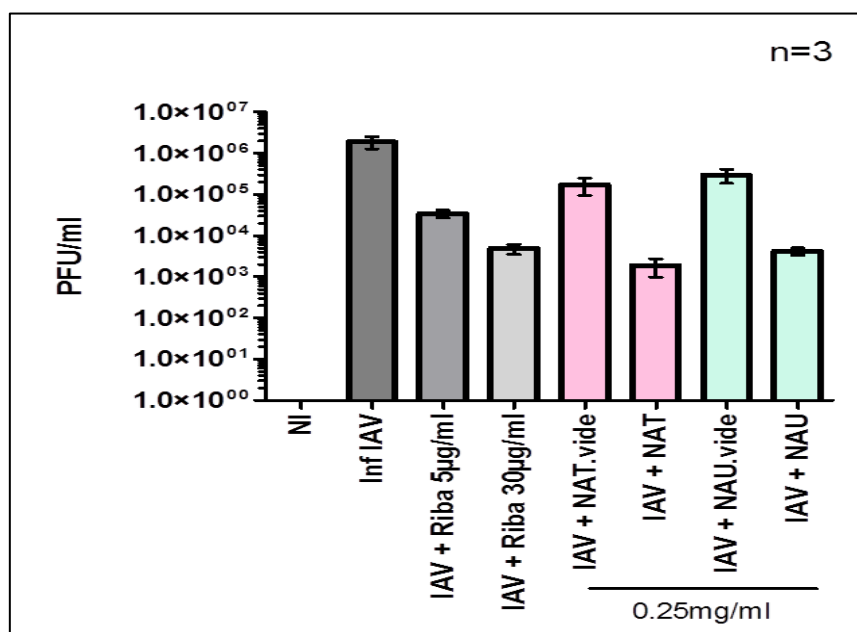


Figure 72 : Résultats pour la quantification virale obtenus en unité formant des plaques (PFU/mL) pour chacun des matériaux chargés : MIP-10 vide (IAV + NAU.vide) et chargé (IAV + NAU), MIP-11 vide (IAV + NAT.vide) et chargé (IAV + NAT) en comparaison avec des cellules non infectées (NI), des cellules infectées avec le virus Influenza A (inf IAV), des cellules infectées incubées avec une concentration de ribavirine dans le milieu à 5 µg.mL<sup>-1</sup> (IAV + Riba 5µg.mL<sup>-1</sup>) et à 30 µg.mL<sup>-1</sup> (IAV + Riba 30 µg.mL<sup>-1</sup>).

Selon les résultats obtenus dans l'étude cinétique de la libération de la ribavirine, malgré la faible quantité relarguée dans le milieu étudié, cela a montré une efficacité virologique assez intéressante. Cet effet est comparable à une dose de ribavirine de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Ces résultats amènent à conclure que la libération lente du principe actif permet de maintenir une concentration constante dans le temps. Aussi on peut s'avancer à conclure qu'une faible concentration du principe actif relâchée dans le milieu permet de faciliter la pénétration de ce dernier et améliorer sa biodisponibilité.

### III. Conclusion

Cette étude décrit la synthèse et l'évaluation d'un polymère à empreintes moléculaires utilisant la technique de "Dummy-template" en utilisant la 2',3',5'-tri-O-acétyl-ribavirine pour la reconnaissance de la ribavirine en utilisant différents monomères acryliques. Plusieurs conclusions ont été déduites à partir des résultats obtenus :

- L'utilisation du dummy-template **56** a permis d'améliorer la solubilité de la molécule template dans un solvant organique. Cela a permis d'utiliser des solvants polaires aprotiques permettant d'améliorer les interactions non covalentes.
- L'étude des interactions monomère-template a permis de démontrer qu'une forte affinité existe entre chacun des monomères **19**, **57** et **58** et la molécule dummy-template existe. Aussi cette étude a permis de mettre en évidence le ratio 1:1 entre le dummy-template **40** et chacun des monomères **57** et **58**.
- Les résultats de l'analyse frontale ont permis de déterminer que l'adsorption suit le modèle de Freundlich. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité de distribution en énergie des sites d'adsorption. Les constantes d'association **K<sub>a</sub>** pour le **MIP-09** ( $12,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) et le **MIP-11** ( $15,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) ont été plus élevées que celles obtenues pour chacun des **NIPs**. Le **MIP-11** a montré aussi une plus grande capacité que son **NIP**.
- Le relargage de la ribavirine est bien retardé pour les polymères imprimés contrairement aux polymères non imprimés, pour les **MIP-09** et **MIP-11**. Cet effet est obtenu grâce aux cavités ayant plus d'affinité avec la ribavirine. Cependant, malgré la légère différence entre leur mode de libération, les profils de libération du **MIP-10** et du **NIP-10** sont trop similaires.
- L'application des modèles de cinétique a permis, grâce au modèle d'Higuchi, de voir que le relargage est gouverné par la diffusion du solvant et le transport de la ribavirine.
- Les études biologiques ont prouvé que les polymères à base d'acide méthacrylique (**19**) sont des polymères biocompatibles. Cependant, l'utilisation des monomères **57** et **58** dans la synthèse de leur MIPs respectifs (**MIP-10** et **MIP-11**) ont montré une légère cytotoxicité. Mais, l'utilisation de ces matériaux reste envisageable pour des cargos polymériques utilisés pour des maladies non chroniques (des prises à courte durée).

## IV. Partie experimentale

### IV.1. Apparatus and reagents

Ribavirin was purchased from Carbosynth, Berkshire, UK. Methacrylic acid (99%, MAA), Uracil ( $\geq 99.0\%$  purity), Thymine ( $\geq 99.0\%$  purity), Acryloyl chloride (97% purity contains  $< 210$  ppm as stabilizer), Hexamethyldisilazane (99.9% purity), Ethylene glycol dimethacrylate (98% purity, EGDMA), 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (98% purity, AIBN), phosphate buffered saline tablet (0.01M, pH 7.4) were purchased from Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France. Ultra-High Quality water (18 M $\Omega$ .cm) was produced from an Elga apparatus, Villeurbanne, France. Acetic acid Glacial (AcOH), Dimethylsulfoxide (analytical grade, DMSO), Acetonitrile (analytical grade, MeCN), was purchased from FisherScientific, Illkirch, France.

Fourier Transform Infrared Spectrometer, scan range: MIR 4,000–450 cm<sup>-1</sup>, resolution 1.0 cm<sup>-1</sup>, and 64 as number of scans. The Shimadzu - MIRacle 10 (IRaffinity 1), is equipped with Ge Cristal and is driven by IRsolution 1.50 software.

HPLC analyses were performed using an Agilent 1260 Infinity HPLC chromatograph (Agilent Technologies, Les Ulis, France). The chromatograph was equipped with a 1260 binary pump (G1311B), a 1260 standard autosampler (G1329B), a 1260 thermostated column compartment (G1316A) and a 1260 diode array detector (G4212B) with a Max-Light cartridge cell (1  $\mu$ L volume, 10 mm cell path length). Porous graphitic carbon (PGC, Hypercarb™) HPLC column (particle seize : 5 $\mu$ m ; pore seize : 250 Å) was used (mobile phase : water/MeCN ; 85/15 : v/v).

The <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded on Bruker Avance DPX 250 (Freq : 250,135 MHz). Chemical shifts are reported in ppm on the  $\delta$  scale relative to TMS as internal standard or to the solvent signal used.

### IV.2. Synthesis of template and monomers

The synthesis of the acylated template **56**, each monomer **57** and **58** was done by a PhD student V. Hervin (Institute of Organic and Analytical Chemistry - ICOA UMR 7311, France). The synthesis procedure of the template and monomers is described in short in Annexe II.

### IV.3. <sup>1</sup>H-NMR Titration

The titration studies were performed in deuterated chloroform (CHCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>) following the Complexation Induced Shift (CIS) as described in chapter 2. Thus, different volumes of the 0.01 M stock solutions of [G] added stepwise to the 0.6 mL of 0.001 M solution of the [H]. The <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz) spectra were obtained at 20°C making 128 scans for each analysis. The study was performed in one tube adding different volume amounts of monomer which corresponded to different concentration equivalents of the template. The dilution of the concentration was avoided by preparing the monomer stock solution using the template solution. The shift ( $\Delta\delta$ ) of the protons in the template/monomer amido functionalities were followed. The  $\Delta\delta$  was plotted against the concentration of free guest and the curve produced is fitted to a non-linear 1:1 binding isotherm which is described by Eq. 1 in Chapter 2, using OriginPro 2017.

#### **IV.4. Polymer synthesis**

Following the formulations in Table 18 (chapter 2), 1 mmol of template (56) was first dissolved in MeCN (or DMSO), and different equivalents of each functional monomer (19, 57 or 58) was added and the solution was sonicated for 1h in ultrasonic bath until all the components were solubilized. Then 20 mmol (3.7 mL) of EGDMA and the initiator AIBN (35mg) was introduced to a borosilicate polymerization tube and degassed for 5 min with nitrogen in order to remove dissolved oxygen. After the tube was then sealed and the polymerization takes place under UV overnight. After the tubes were removed, broken with a hammer and the monolithic polymers recovered. The resulting monoliths were lightly crushed to give smaller particle and sieved to 25-60  $\mu\text{m}$ . Non-imprinted polymer (NIP) was prepared in the same manner, but with the omission of a template species.

#### **IV.5. Extraction and quantification of ribavirin**

Extraction of the template (56) was obtained with consecutive ultrasound washings for 6h, using a mixture of MeOH and acetic acid (8/2, v/v) for 1h at 50 °C. The washing solution is replaced every hour by a fresh one. The recovered Ribavirin was quantified with an HPLC system in order to verify the extraction and to know how much template (56) remained trapped in the polymer.

#### **IV.6. Frontal chromatography experiment**

Polymer particles (25–60  $\mu\text{m}$ , 60-100 mg dry weight) were slurry packed into stainless steel HPLC columns (50 mm x 4.6 mm i.d.), using a MeCN. The column was then connected to the HPLC and equilibrated with MeCN until a stable baseline was observed.

Staircase frontal chromatography was performed on each imprinted and non-imprinted polymer with the corresponding “dummy” template (56). Again, MeCN was used as mobile phase at 25 °C and at a flow rate of 0.5 mL.min<sup>-1</sup>. A step-wise gradient was applied, mixing 10% increments of prepared template solutions in the mobile phase and pure mobile phase. Finally, a chromatogram with a total of 30 steps in the concentration range of 10<sup>-6</sup> to 10<sup>-3</sup> M was obtained. Therefore, the analysis was performed using three separate solutions of the corresponding template in order to cover each one domain of three decades of concentration, 10<sup>-6</sup>-10<sup>-5</sup>, 10<sup>-5</sup>-10<sup>-4</sup> and 10<sup>-4</sup>-10<sup>-3</sup> M, at the wavelength 206 nm or 254 nm depending on the saturation of the detector. The breakthrough volume for a non-retained analyte was measured by eluting the columns with MeCN containing 1% acetone (v/v, %) as void marker. The obtained adsorption isotherms were fitted to the different models, using the Origin Pro 2017 software.



# **Chapitre 5 : Synthèse des SMIP sphériques de la ribavirine par polymérisation par précipitation**





## I. Introduction

Dans l'optique d'obtenir des polymères imprimés sphériques, nous nous sommes intéressés aux techniques de polymérisation permettant leur obtention. Étant donné que le système de libération contrôlée va être conçu pour cibler les poumons, les billes polymériques synthétisées doivent avoir un diamètre moyen compris entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ .<sup>294</sup>

Dans la littérature, plusieurs techniques de polymérisation sont référencées pour obtenir des particules sphériques avec une géométrie et une taille bien déterminées. Parmi ces techniques, on peut citer les polymérisations en émulsion, en dispersion, en suspension et par précipitation. Le tableau ci-dessous présente les diamètres moyens des particules sphériques en fonction du mode de polymérisation.

**Tableau 22** : Taille moyenne des particules sphériques en fonction de la technique de polymérisation.<sup>155</sup>

Technique	Emulsion	Dispersion	Suspension	Précipitation
Diamètre ( $\mu\text{m}$ )	< 1	1-10	5-50	0,3-10

Les particules polymériques de petite taille possèdent plusieurs avantages dans le domaine de l'impression moléculaire. Plus le diamètre des billes est petit plus la surface spécifique est importante : il y a donc plus de cavités accessibles. Par exemple, dans le cas de la synthèse de MIPs spécifiques de l'éthyluracile, pour des billes de diamètre de 0,1 et 1  $\mu\text{m}$ , la capacité d'adsorption est respectivement de 480  $\mu\text{mol/g}$  ou 180  $\mu\text{mol/g}$ .<sup>295</sup> Cela met en évidence l'impact de la taille des billes sur la surface spécifique et par conséquent sur l'adsorption de la molécule d'intérêt. Un autre avantage apporté par la technique d'impression moléculaire sphérique est que les étapes de broyage et de tamisage ne seront plus nécessaires. Ce qui permet d'éviter de briser un grand nombre de cavités spécifiques. Cependant la synthèse des particules sphériques passe par une étape de stabilisation dans le milieu de synthèse dans la majorité des techniques utilisées. Par exemple, en polymérisation par émulsion, suspension ou dispersion, des agents externes (stabilisants, tensioactifs...) neutres ou ioniques sont nécessaires pour stabiliser les réactifs dans le milieu pour permettre l'obtention des particules sphériques. Mais, le but étant de synthétiser des systèmes de libération sphériques, les stabilisants, qui peuvent polluer la surface polymérique et ainsi augmenter la toxicité de ces particules, sont à bannir. L'option la plus intéressante, dans notre cas, est d'utiliser la polymérisation par précipitation.<sup>158</sup>

La polymérisation par précipitation est une technique simple à mettre en œuvre et est proche techniquement de la polymérisation en bulk. Elle consiste à polymériser directement, et sans ajout d'additifs, les monomères fonctionnels, le réticulant et la molécule template dans un solvant porogène. La seule différence avec la synthèse en bulk réside dans le volume de solvant considéré. Dans la synthèse par précipitation, le volume de solvant est plus important que le volume total des réactifs. Les oligomères formés ont le temps de croître, s'agglutiner et précipiter, formant ainsi des

<sup>294</sup>Suedee, R., Novel Strategic Innovations for Designing Drug Delivery System Using Molecularly Imprinted Micro/Nanobeads, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2013**, *20*, 235-268.

<sup>295</sup>Zhao, L.; Jianfu, D.; Michael, D.; Ye, T., Molecularly Imprinted Polymeric Nanospheres by Diblock Copolymer Self-Assembly, *Macromolecules.* **2006**, *39*, 2629-2636.

billes sphériques. En contrôlant plusieurs paramètres tels que le volume de solvant, le temps de polymérisation et la quantité des réactifs, il est possible d'obtenir des billes de même diamètre dites monodisperses. Si ces paramètres ne sont pas précisément ajustés, les billes formées posséderont des diamètres appartenant à une large fenêtre de mesure ; ces billes sont dites polydisperses. On peut citer l'exemple de l'impression moléculaire de la (S)-nicotine qui a permis grâce à cette technique d'obtenir des billes sphériques monodisperses. Le MIP a été synthétisé à partir de MAA et de divinylbenzène, et les billes obtenues avaient environ 4 micromètres de diamètre. Ces polymères imprimés sphériques ont permis une bonne sélectivité entre la (S)-nicotine et son énantiomère.<sup>160</sup> Contrairement à la polymérisation en bulk, comme le volume de solvant est important, l'effet de dilution oblige, les interactions entre template et monomères fonctionnels sont affaiblies. Ce qui diminue en règle générale les interactions entre le template et les monomères fonctionnels.

**Au final, cette technique reste la plus simple à mettre en œuvre. Cette dernière permet l'obtention des billes polymériques de diamètres entre 0,3 et 10  $\mu\text{m}$  indispensable pour l'administration des principes actifs par voie pulmonaire.**

- **Stratégie de synthèse**

En se basant sur les résultats obtenus dans le chapitre précédent, nous avons choisi de garder l'approche du dummy-template pour l'impression moléculaire de la ribavirine. Pour cela la 2', 3', 5'-tri-*O*-acétylribavirine (**56**) a été choisie comme molécule dummy-template. De plus, comme les formulations à base d'acide méthacrylique (**19**) et de *N*-acryloylthymine (**58**) ont permis d'obtenir des systèmes adsorbant des quantités assez intéressantes de ribavirine et qui montraient des libérations prolongées de ce même antiviral, nous avons choisi de transposer ces dernières à la synthèse par précipitation. Ainsi, nous souhaitons synthétiser des MIPs sphériques en conservant les mêmes ratios T:MF:R égaux à 1:4:20 pour le monomère **19**, et 1:1:20 pour le monomère **58**.

L'acétonitrile (MeCN) est le solvant le plus utilisé dans la polymérisation par précipitation permettant l'obtention de particules sphériques homogènes et le plus souvent monodisperses. L'emploi de ce solvant est aussi intéressant pour l'impression moléculaire par approche non-covalente car c'est un solvant polaire mais aprotique ( $\delta_h = 6,1$ ). D'un autre côté, le template **6** et le monomère fonctionnel **19** sont solubles dans le MeCN, mais le monomère **58** est peu soluble dans ce même solvant. Cependant, étant donné que la polymérisation par précipitation impose un grand volume de solvant, cela permet pour la même quantité de molécule **58**, de descendre en-dessous de sa limite de solubilité et de la solubiliser sans problème (voir Tableau 15, chapitre 4).

En ce qui concerne les paramètres tels que la quantité de réactifs dans le milieu et le temps de polymérisation, nous nous sommes référés aux travaux de Xia *et al.*<sup>296</sup> En effet, ces derniers ont montré qu'il était possible de synthétiser des microbilles imprimées monodisperses pour la reconnaissance du Kaempferol en utilisant la polymérisation par précipitation. Dans cette étude, ils ont modifié les conditions de polymérisation tel que le pourcentage des réactifs par rapport au volume de solvant et le temps de polymérisation. Ils ont finalement démontré que des billes

---

<sup>296</sup> Xia, Q.; Yun, Y.; Qiang, L.; Huang, Z.; Liang, Z., Preparation and characterization of monodisperse molecularly imprinted polymer microspheres by precipitation polymerization for kaempferol. *Des. Monomers. Polym.* **2017**, *20*, 201–209.

polymériques monodisperses pouvaient être obtenues d'une manière répétitive pour une concentration des réactifs ne dépassant pas les 2 % (w/v) et un temps de polymérisation de 24h. Nous avons choisi de suivre les grandes lignes de ce travail en optant pour des concentrations des réactifs dans le solvant porogène à 1 % et 2% (w/v), ainsi que des temps de polymérisation de 6, 16 et 24h.

## II. Résultats et discussions

### II.1. Optimisation de la synthèse des polymères

Pour la synthèse des polymères imprimés avec le template **56**, nous avons choisi le monomère **19** et le monomère **58** pour complexer le template. L'EGDMA (**20**) a été choisi comme agent réticulant car sa longue chaîne permet de créer des cavités assez grandes adaptées à la taille du dummy-template. Il a été reporté dans la littérature que l'utilisation d'une réticulation aussi élevée (20 équivalents) permettait de générer une rigidité de surface suffisante aux particules créées durant la polymérisation rendant ainsi difficile leur agglomération.<sup>297</sup> L'AIBN a été utilisé comme initiateur car il est parfaitement soluble dans l'acétonitrile et que sa température d'activation (50-70°C) est inférieure à la température d'ébullition du solvant (81°C). Le ratio choisi pour chacun des monomères fonctionnels est resté inchangé afin de pouvoir comparer les capacités ainsi que le relargage de chacun des polymères obtenus avec ceux trouvés dans l'étude de leur synthèse en bulk (chapitre précédent). Nous avons augmenté le temps de complexation, c'est-à-dire le temps de mise en contact du dummy-template avec les monomères fonctionnels, afin de favoriser au maximum la formation du complexe de pré-polymérisation. Car, ici, la solution de réactifs est très diluée et il faut donc laisser aux réactifs le temps de se rencontrer et de se complexer. Le tableau suivant montre les différentes conditions de synthèse pour chacun des polymères imprimés. Les polymères non imprimés sont obtenus dans les mêmes conditions sans ajout du dummy-template.

---

<sup>297</sup> (a) Li, K.; Stöver, H. D. H., Synthesis of monodisperse poly(divinylbenzene) microspheres, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1993**, *31*, 3257-3263. (b) Hattori, M.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S., Highly crosslinked polymer particles by dispersion polymerization, *J. Appl. Polym. Sci.* **1993**, *50*, 2027-2034

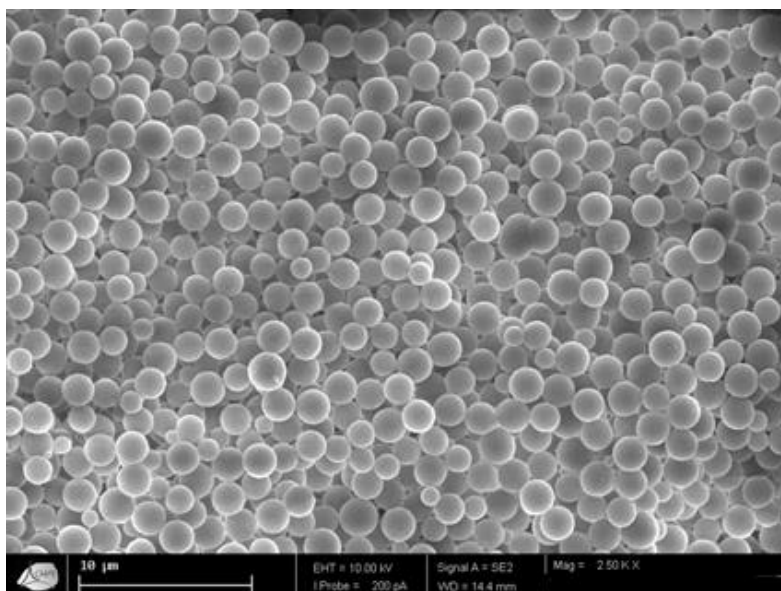
**Tableau 23 : Formulations des polymères imprimés sphériques (SMIP) en employant la ribavirine triacétylée (4) comme dummy-template, le MAA (19) et NAT (58) comme monomères fonctionnels, l'EGDMA (20) comme agent réticulant et l'AIBN comme initiateur**

	Template (g)	Monomère (g)	EGDMA (mL)	AIBN (mg)	MeCN (mL)	Ratio (T:MF:R)	Concentration (w/v)	Temps (h)
SMIP-12		(19) 0,344	3,7	50	585	1:4:20	1%	6
SMIP-13		(19) 0,344	3,7	50	585	1:4:20	1%	16
SMIP-14		(19) 0,344	3,7	50	585	1:4:20	1%	24
SMIP-15		(19) 0,344	3,7	50	579	1:4:20	2%	6
SMIP-16		(19) 0,344	3,7	50	579	1:4:20	2%	16
SMIP-17	(56) 0,37	(19) 0,344	3,7	50	579	1:4:20	2%	24
SMIP-18		(58) 0,18	3,7	50	564	1:1:20	1%	6
SMIP-19		(58) 0,18	3,7	50	564	1:1:20	1%	16
SMIP-20		(58) 0,18	3,7	50	564	1:1:20	1%	24
SMIP-21		(58) 0,18	3,7	50	559	1:1:20	2%	6
SMIP-22		(58) 0,18	3,7	50	559	1:1:20	2%	16
SMIP-23		(58) 0,18	3,7	50	559	1:1:20	2%	24

## II.2. Caractérisations morphologiques des SMIPs

### a) Etude de la taille et de la dispersion des polymères sphériques

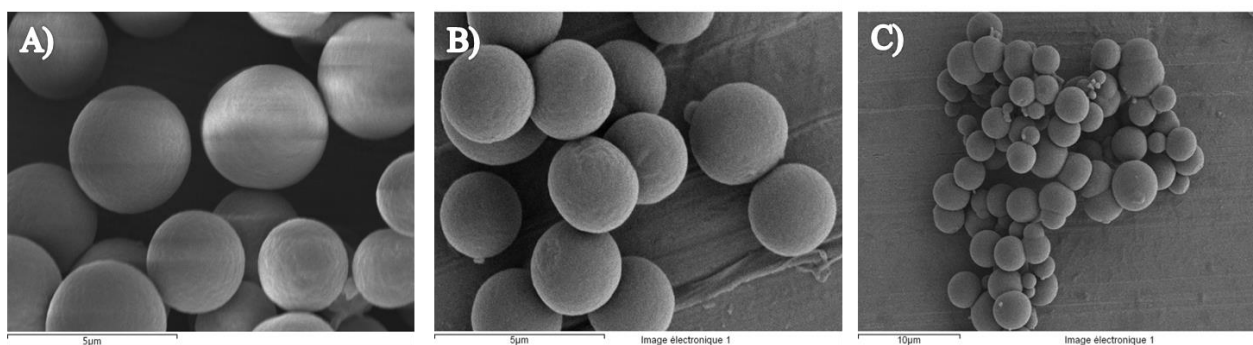
Une étude des particules formées par microscopie électronique (MEB) a été réalisée afin de mettre en évidence la formation de billes polymériques. Les premiers clichés obtenus montrent l'obtention de billes sphériques et régulières (Figure 73).



**Figure 73 : Cliché obtenu par microscopie électronique à balayage montrant des particules sphériques (MIP) après polymérisation par précipitation en utilisant le MAA (19) comme monomère fonctionnel, l'EGDMA (20) comme agent réticulant dans l'acétonitrile, pour une concentration de 1 % (w/v) en réactifs et un temps de polymérisation de 16 h.**

- **Influence du temps de polymérisation**

Le temps de polymérisation joue un rôle important sur la morphologie des polymères sphériques. Selon les résultats obtenus, on remarque une agglomération importante au bout de 24 h de polymérisation avec une légère augmentation du diamètre des billes. L'explication tient du fait qu'au début de la polymérisation les particules sphériques ont suffisamment d'espace dans le milieu dilué pour assurer leur développement. Avec l'augmentation du diamètre des particules dans le temps, l'espace inter-particules devient moins important d'où l'augmentation de la probabilité de se rencontrer et générer des phénomènes d'agglomération. Malgré l'obtention de microsphères monodisperses au bout de 6h ce temps ne sera pas suffisant. Il est rapporté dans la littérature qu'un faible temps de polymérisation pour les polymères imprimés peut jouer sur la recapture de la molécule cible. Cela peut être dû au fait que les microsphères ne sont pas suffisamment stables pour pouvoir maintenir la stabilité des cavités de reconnaissance de la molécule empreinte.<sup>296</sup> Pour cela nous avons choisi un temps de polymérisation de 16 h.



**Figure 74 : Clichés obtenus en MEB pour les particules sphériques SMIPs à différents temps de polymérisation pour une concentration des réactifs 1 % (% w/v) : A) 6 h, B) 16 h, C) 24 h pour la formulation utilisant le MAA (19) comme monomère fonctionnel.**

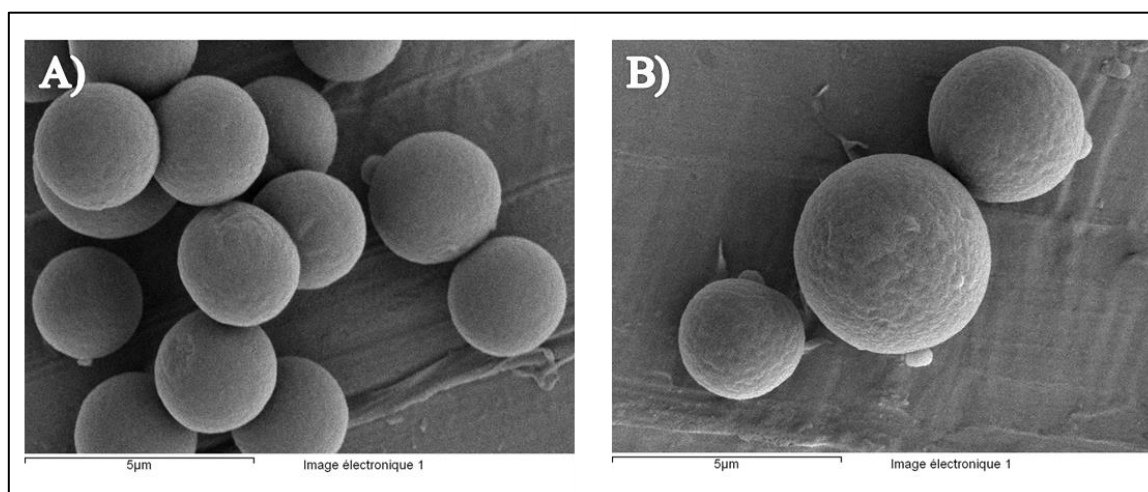
- **Influence de la concentration des réactifs**

La concentration des réactifs dans le milieu réactionnel est très importante pour la formation des SMIP sphériques monodisperses. L'augmentation de la concentration de réactifs dans le milieu réactionnel diminue l'espace nécessaire pour la formation des microsphères et favorise l'agglomération. Les résultats obtenus montrent qu'à 1 % (w/v) de concentration on obtient des microsphères monodisperses et régulières à 16 h de réaction. Cependant pour une concentration de 2 % (w/v), on commence, au bout de 16 h de réaction, à avoir un début d'agglomération. Ceci montre que cette concentration est la limite supérieure pour notre formulation et le temps imparti pour récupérer des microsphères monodisperses et éviter les phénomènes d'agglomération. Le tableau suivant récapitule la structure des particules obtenues :

**Tableau 24 : Caractérisation morphologique des MIPs sphériques (SMIPs)**

	<b>Ratio (T:MF:R)</b>	<b>Concentration (w/v)</b>	<b>Temps (h)</b>	<b>Morphologie des particules</b>	
<b>SMIP-12</b>	1:4:20	1%	6	Microsphères	Monodisperses
<b>SMIP-13</b>	1:4:20	1%	16	Microsphères	Monodisperses
<b>SMIP-14</b>	1:4:20	1%	24	Microsphères	Agglomération
<b>SMIP-15</b>	1:4:20	2%	6	Microsphères	Monodisperses
<b>SMIP-16</b>	1:4:20	2%	16	Microsphères	Début d'agglomération
<b>SMIP-17</b>	1:4:20	2%	24	Microsphères	Agglomération
<b>SMIP-18</b>	1:1:20	1%	6	Microsphères	Monodisperses
<b>SMIP-19</b>	1:1:20	1%	16	Microsphères	Monodisperses
<b>SMIP-20</b>	1:1:20	1%	24	Microsphères	Agglomération
<b>SMIP-21</b>	1:1:20	2%	6	Microsphères	Monodisperses
<b>SMIP-22</b>	1:1:20	2%	16	Microsphères	Monodisperses
<b>SMIP-23</b>	1:1:20	2%	24	Microsphères	Agglomération

En résumé, les conditions optimales pour l'obtention des billes polymériques monodisperses sont un temps de polymérisation de 16 h et une concentration des réactifs de 1 % (w/v) dans le solvant porogène (MeCN). Les billes synthétisées montrent une taille comprise entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ , ce qui remplit la condition imposée par la voie d'administration pulmonaire.



**Figure 75 : Exemples de clichés MEB obtenus pour les SMIP-19 (A) et SNIP-19 (B) dans les conditions optimales : 1 % (w/v) en concentration des réactifs, temps de polymérisation 16h.**

### b) Granulométrie

Des analyses de granulométrie ont été effectuées afin de déterminer la taille moyenne des microsphères polymériques. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 25.

**Tableau 25 : Tailles moyennes ( $\mu\text{m}$ ) des microsphères obtenues en polymérisation par précipitation dans les conditions optimales pour chacun des SMIP et SNIP.**

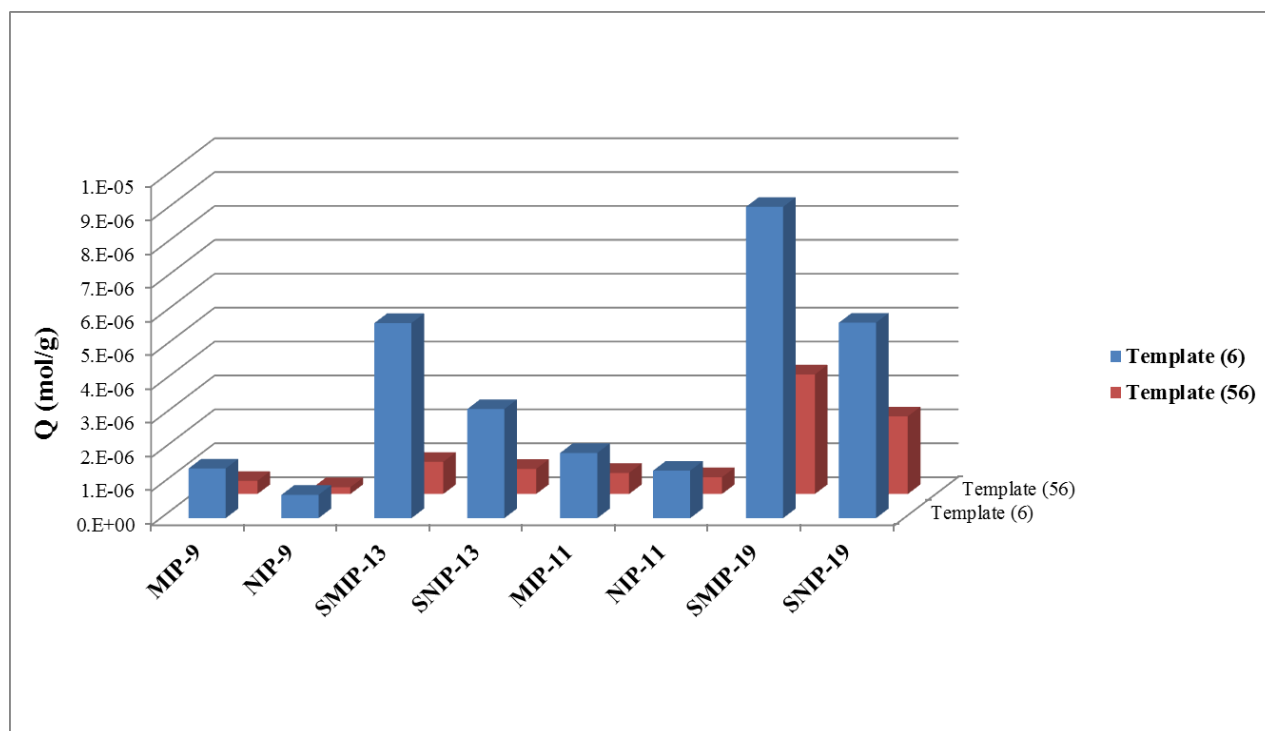
	Ratio (T:MF:R)	Concentration (w/v)	Temps (h)	Tailles moyenne ( $\mu\text{m}$ )
<b>SMIP-13</b>	1:4:20	1%	16	3,68
<b>SNIP-13</b>	1:4:20	1%	16	4,28
<b>SMIP-19</b>	1:1:20	1%	16	2,6
<b>SNIP-19</b>	1:1:20	1%	16	3,05

Les résultats montrent que, dans les conditions optimales, nous avons pu obtenir des microsphères monodisperses avec une taille moyenne comprise entre 3 et 4  $\mu\text{m}$ . Ces billes polymériques permettent de remplir la contrainte imposée par la libération pulmonaire qui est de travailler avec des particules dont la taille appartient à la gamme de taille 1 - 5  $\mu\text{m}$ .

### II.3. Etude comparative des capacités d'adsorption des polymères imprimés.

Nous avons comparé les capacités de chacun des MIP/NIP (9 et 11) créés par synthèse monolithique, et des SMIP/SNIP (13 et 19) créés par polymérisation par précipitation. Nous avons mesuré les capacités pour le dummy-template 56 et pour l'antiviral 6. Les tests d'adsorption ont été effectués dans un mélange MeCN/Eau (87/13, v/v) capable de solubiliser les deux molécules en question mais aussi diminuer les interactions entre le solvant et le polymère gênant la complexation, comme il a déjà été fait dans le chapitre 1. Les résultats sont représentés sur la figure 38.





**Figure 76 : Capacités d'adsorption ( $\text{mol.g}^{-1}$ ) obtenues par batch pour les MIP-9, MIP-11, SMIP-13 et SMIP-19 et de leurs NIPs respectifs en utilisant la ribavirine (6) et la 2', 3', 5'-tri-O-acétylribavirine (56) à une concentration de 1 mM dans 1,5 mL d'un mélange MeCN/Eau (87/13, v/v), la masse du polymère est égale à 20 mg.**

Les résultats montrent une différence marquée entre les polymères imprimés et les non imprimés pour chacune des formulations. Cela montre une bonne reconnaissance de la partie hétérocyclique fonctionnalisée avec un amide primaire de la ribavirine. Cette reconnaissance est principalement effectuée par des interactions non covalentes de type hydrogène sur cette partie-là de la molécule cible comme le montre le Tableau 26 :

**Tableau 26** : comparaison des valeurs du « Binding capacity » obtenues pour chacun des polymères monolithiques **MIP/NIP 09 et 11** et sphériques **SMIP/SNIP 13 et 19** en se basant sur la quantité adsorbée pour chacune des molécules template (6) et (56)

	Template	MIP/NIP-09	SMIP/SNIP-13	MIP/NIP-11	SMIP/SNIP-19
<b>Binding Capacity</b>	<b>6</b>	2,13	1,78	1,37	1,6
	<b>56</b>	1,93	1,27	1,26	1,53

Dans le cas de l'utilisation de l'acide méthacrylique en tant que monomère fonctionnel, on remarque que le Binding capacity est plus faible pour la microbille imprimée que pour la particule irrégulière provenant d'une synthèse en bulk. Cela peut s'expliquer par l'augmentation du volume du solvant réactionnel qui dilue grandement les réactifs et entraîne la formation d'un nombre réduit de complexes recherchés, de type 1:4. Cela peut se corriger potentiellement par l'augmentation du temps de complexation.

La deuxième information qu'on peut extraire de ces résultats est que les capacités d'adsorption pour chacun des MIPs/NIPs sont beaucoup plus élevées quand il s'agit des polymères sphériques. Cette augmentation est obtenue par la conservation des sites de reconnaissance dans

les billes sphériques. En effet, le broyage du monolithe créé en bulk et le tamisage des particules résultantes a pour conséquence la formation de particules inhomogènes et la destruction d'un nombre important des sites de reconnaissance.<sup>298</sup>

La comparaison entre l'adsorption des templates **6** et **56** a été étudiée. Les résultats montrent que pour tous les MIPs et NIPs, la quantité adsorbée du template **6** est plus élevée que le template **56**. Ces résultats s'expliquent par la différence structurale des deux molécules. En effet, la présence des groupements OH sur la partie sucre de la molécule **6** permet de développer plus d'interactions non spécifiques avec la surface du polymère et avec l'EGDMA (**20**) au sein même des cavités. Il a déjà été rapporté que ce type d'interaction se retrouve largement dans les poches hydrophobes de certaines protéines.<sup>299</sup> En plus le template **6** a une taille plus réduite, ce qui facilite sa pénétration dans les cavités principalement conçues pour sa molécule dérivée qui possède un volume moléculaire plus grand.

#### II.4. Etude cinétique de la libération de la ribavirine

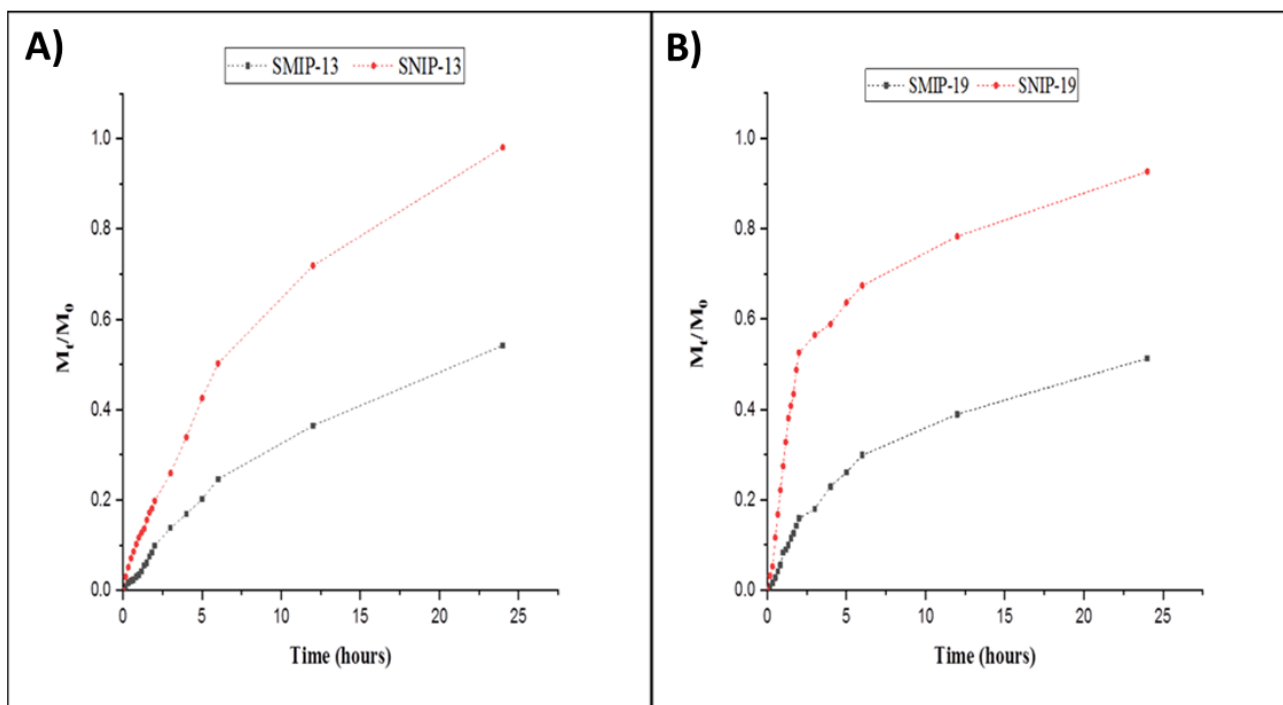
La libération de la ribavirine à partir des polymères imprimés/ non imprimés sphériques a été étudiée suivant le même protocole que celui décrit dans le **chapitre 3**. Les polymères sphériques ont été chargés dans une solution Eau/MeCN (13/87, v/v) à 10 mM de ribavirine. Après 24 heures, Le surnageant a été récupéré afin de déterminer la quantité adsorbée par chacun des SMIP et SNIP. L'étude de relargage a été menée dans un tampon phosphate aqueux (0,01 M) à une température de 38 °C.

Les résultats (Figure 77) sont présentés en traçant le rapport de la masse de ribavirine relarguée à un instant  $t$  ( $M_t$ ) par la masse initiale chargée ( $M_0$ ) en fonction du temps. Les résultats montrent une différence importante du pourcentage de ribavirine libérée entre le **SMIP** et le **SNIP** au bout de 24h. Cette différence met en évidence la présence de cavités spécifiques dans les SMIPs et montre le rôle que jouent ces empreintes sur le profil de libération de la ribavirine. En comparant ces profils avec ceux obtenus dans le chapitre précédent avec les **MIP/NIP 09** et **11**, nous remarquons un léger prolongement du temps de libération dans le cas des microsphères polymériques. Ce prolongement est lié au changement de la morphologie de la matrice devenue sphérique. Les polymères imprimés sphériques ne libèrent que 50 à 60% de leur quantité maximale chargée tandis que les polymères non imprimés libèrent la quasi-totalité de la ribavirine chargée au bout de 24 h.

---

<sup>298</sup> Szabelski, P.; Kaczmarek, K.; Cavazzini, A.; Chen, Y. B.; Sellergren, B.; Guiochon, G., Energetic heterogeneity of the surface of a molecularly imprinted polymer studied by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr. A.* **2002**, *964*, 99-111.

<sup>299</sup> Perlstein, J., The Weak Hydrogen Bond In Structural Chemistry and Biology (International Union of Crystallography, Monographs on Crystallography, 9) By Gautam R. Desiraju (University of Hyderabad) and Thomas Steiner (Freie Universität Berlin), *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 191-192.



**Figure 77 : Profils de libération de la ribavirine ( $M_t/M_0$ ) en fonction du temps pour chacun des SMIP/SNIP 13 (A) et 19 (B) obtenu sur 24h dans un tampon phosphate (pH : 7,4 ; 0,01M) à 38°C**

Pour mieux connaître le phénomène qui gouverne la libération de la ribavirine des polymères sphériques, nous avons eu recours aux modèles mathématiques donnés dans la littérature. Pour cela, nous avons décidé d'appliquer les modèles de Korsmeyer-Peppas et le modèle de Lonsdale-Baker qui est un modèle dérivé de celui de Higuchi mais qui est destiné à l'étude de relargage d'un médicament à partir d'une matrice sphérique.<sup>227</sup> Les paramètres calculés sont présentés dans le tableau 21. L'évaluation du coefficient de régression  $R^2$  et le paramètre du test de Fisher  $F_{\text{value}}$  permettent de déterminer le modèle qui s'ajuste le mieux avec les points expérimentaux.

**Tableau 27 : Paramètres calculés suite à une régression non linéaire appliquée aux modèles de Korsmeyer-Peppas et de Lonsdale-Baker pour les SMIP/SNIP 13 et 19. La régression non linéaire est effectuée sur les premiers 60% de ribavirine libérée pour le modèle de Korsmeyer-Peppas.**

Modèle	SMIP-13				SNIP-13			
	n	K	$R^2$	$F_{\text{value}}$	n	K	$R^2$	$F_{\text{value}}$
Baker-Lonsdale	-	0,0127	0,9664	628	-	0,053	0,972	770
Korsmeyer-Peppas	0,71	0,057	0,9835	886	0,82	0,111	0,997	7223
Modèle	SMIP-19				SNIP-19			
	n	K	$R^2$	$F_{\text{value}}$	n	K	$R^2$	$F_{\text{value}}$
Baker-Lonsdale	-	0,0126	0,9894	2313	-	0,06	0,922	368
Korsmeyer-Peppas	0,55	0,094	0,9663	558	0,64	0,28	0,9175	270

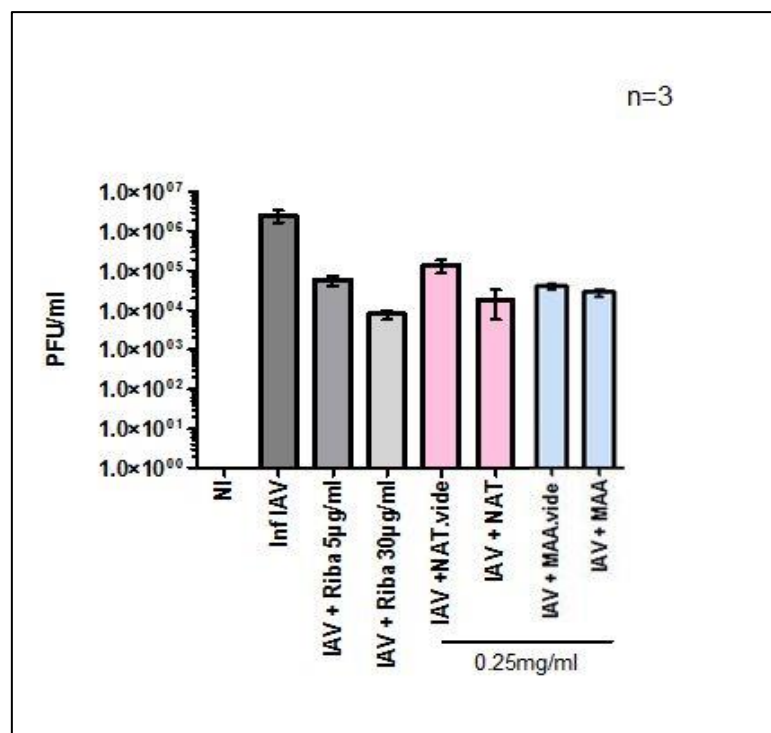
Les résultats obtenus montrent que le modèle de Korsmeyer-Peppas s'applique mieux au profil de relargage des **SMIP/SNIP-13**. Les valeurs du paramètre  $n$  sont comprises entre 0,43 et 0,85. Ce paramètre indique donc un mode de libération non fickien ou anormal pour ces systèmes de libération.<sup>277</sup> Cette anomalie montre que le phénomène de diffusion et de relaxation du polymère sont comparables. En effet, la pénétration du solvant dans les pores entraîne le réarrangement des chaînes polymériques et la diffusion lente du solvant au cœur de la matrice. Ce phénomène prend du

temps car la réticulation reste assez forte, donc la libération est retardée aussi par ce phénomène en plus de l'interaction forte existant entre la ribavirine et ses poches spécifiques qui retarde sa venue dans le milieu tamponné. Ce qui est démontré par les valeurs différentes des  $k$  entre le MIP et son NIP. La constante cinétique  $k$ , calculée égale à 0,057, pour le **SMIP-13** est deux fois plus faible que celle calculée pour le **SNIP-13**,  $k = 0,111$ . Ce résultat montre que la présence des cavités dans le polymère imprimé augmente la rétention d'une partie de l'antiviral diminuant ainsi sa vitesse de libération.

Pour le **SMIP/SNIP-19**, les paramètres de la régression non linéaire indiquent que le modèle de Lonsdale-Baker est le plus adéquat. Etant donné que ce modèle était développé à partir du modèle de Higuchi pour des matrices sphériques, on peut conclure que le mode de libération est gouverné par la diffusion du solvant à travers la matrice poreuse et la dissolution de l'antiviral dans ce solvant. Cette diffusion est beaucoup plus lente avec la diminution de la taille des pores et la variation du diamètre de la sphère.

## II.5. Etude de l'effet antiviral des DDS de type SMIPs sur des cellules infectées avec le IAV

Afin de déterminer l'efficacité de ces nouveaux systèmes de libération sphériques, il a été procédé à des études virologiques sur des cellules (Beas-2B) infectées par le Virus Influenza A<sup>278</sup> comme décrites dans le chapitre 2. Le but de cette étude est de mesurer l'action antivirale de la ribavirine relâchée par les SMIPs chargés in vitro en quantifiant le virus avant ajout et après 24 h d'incubation.



**Figure 78 : Résultats de la quantification virale obtenue en unité formant des plaques (PFU/mL) pour chacun des matériaux chargés : SMIP-13 vide (IAV + MAA.vide) et chargé (IAV + MAA), SMIP-19 vide (IAV + NAT.vide) et chargé (IAV + NAT), en comparaison avec des cellules non infectées (NI), des cellules infectées avec le virus Influenza A (inf IAV), des cellules infectées avec une concentration de ribavirine dans le milieu de 5 µg.mL<sup>-1</sup> (IAV + Riba 5µg.mL<sup>-1</sup>) et de 30 µg.mL<sup>-1</sup> (IAV + Riba 30 µg.mL<sup>-1</sup>).**

Les résultats (Figure 78) observés montrent que les polymères imprimés non chargés induit à la diminution de la charge virale (diminution du nombre des virions). Cette diminution peut être potentiellement induite par le changement de taille et de morphologie des particules. D'autre part, du fait que les billes sphériques pénètrent la cellule, cela peut influencer les profils de relargage de ces matériaux. D'un autre côté, il se peut que nos matériaux soient capables de recapturer des éléments intracellulaires (de type nucléoside) nécessaire à la réplication du virus d'où la diminution de la charge virale.

## II.6. Optimisation de la synthèse des polymères imprimés sphériques

### II.6.1. Synthèse de SMIP fluorescents pour l'étude de la bio-distribution *in vitro*

Le but de cette étude est de vérifier tout d'abord la pénétration ou non des particules sphériques dans la cellule *in vitro*. Pour cela, nous avons modifié les particules sphériques en leurs apportant le caractère fluorescent. Plusieurs études ont montré que l'introduction d'un faible pourcentage d'un monomère fluorescent dans la formulation de base d'un MIP permet de conférer à ce dernier cette propriété.<sup>300</sup> Nous avons opté pour l'utilisation de la fluorescéine-*O*-acrylate, car cette molécule est l'une des plus employées dans le domaine des MIPs fluorescents et surtout elle possède des longueurs d'onde d'adsorption et d'émission très connus et facilement accessibles en microscopie confocale de fluorescence.

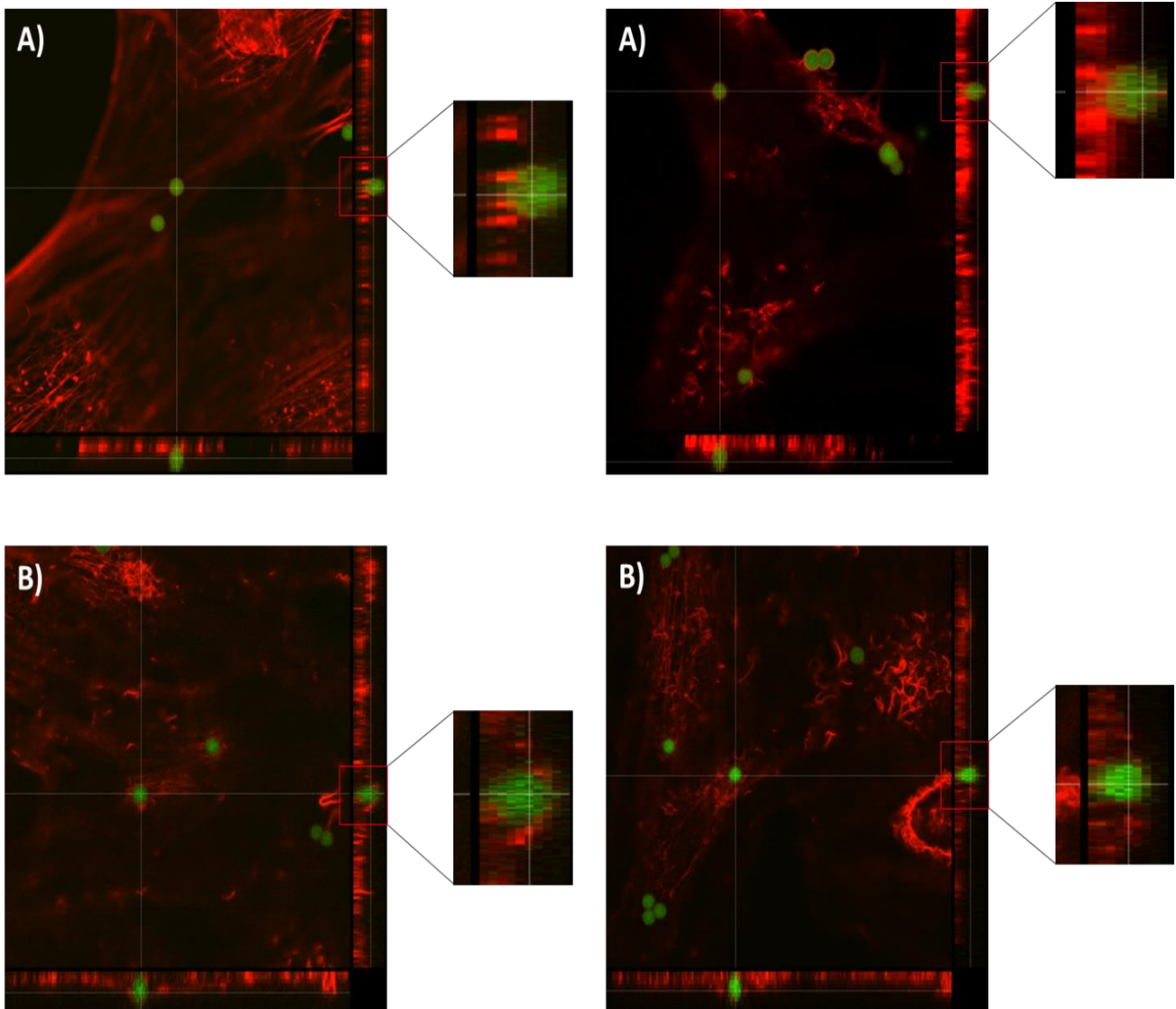
**Tableau 28 : Formulations des polymères imprimés sphériques (SMIP) fluorescents** en employant la ribavirine triacétylée (**4**) comme dummy-template, le MAA (**19**) et le NAT (**58**) comme monomères fonctionnels, l'EGDMA comme agent réticulant, l'AIBN comme initiateur et 1% w/w de fluorescéine-*O*-acrylate comme monomère fluorescent

	Template (g)	Monomère (g)	EGDMA (mL)	AIBN (mg)	MeCN (mL)	Ratio (T:MF:R)	Fluorescéine- <i>O</i> - acrylate (mg)	Temps (h)
SMIP-13	( <b>56</b> ) 0,37	( <b>19</b> ) 0,344	3,7	50	585	1:4:20	15.45 (1% wt)	16
SNIP-13	-	( <b>19</b> ) 0,344	3,7	50	585	0:4:20	15.45 (1% wt)	16
SMIP-19	( <b>56</b> ) 0,37	( <b>58</b> ) 0,18	3,7	50	564	1:1:20	3.86 (1% wt)	16
SNIP-19	-	( <b>58</b> ) 0,18	3,7	50	564	0:1:20	3.86 (1% wt)	16

L'utilisation d'un microscope confocal permet de suivre le mouvement des microparticules sphériques fluorescentes et de visualiser si oui ou non elles pénètrent les cellules bronchiques humaines. Les images obtenues (Figure 79) montrent que les particules sphériques viennent dans un premier temps se déposer sur la surface de la cellule (clichés **A** de la Figure 79). Puis, grâce au

<sup>300</sup> Hernandez-Guerrero, M.; Min, E.; Barner-Kowollik, C.; Müller, A. H. E.; Stenzel, M. H., Grafting thermoresponsive polymers onto honeycomb structured porous films using the RAFT process, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4718-4730.

phénomène d'endocytose, les billes polymériques d'environ 3  $\mu\text{m}$  de diamètre vont s'internaliser par la cellule (clichés **B** de la Figure 79). On peut conclure à ce moment-là que la libération de la ribavirine va se faire d'abord dans le milieu extérieur proche de la cellule. Puis, étant donné que les billes relargue très lentement la ribavirine, une libération du principe actif va avoir lieu dans le milieu intracellulaire suite à la pénétration dans la cellule de ce cargo. Ce phénomène peut potentiellement améliorer la biodisponibilité de la ribavirine et son action virale.



**Figure 79 :** Clichés **A)** extracellulaires et **B)** intracellulaires obtenus par microscope confocal montrant la déposition des billes polymériques sphériques sur la surface extracellulaire (A) puis sa pénétration dans un deuxième temps dans l'espace intracellulaire par endocytose (B)

## II.6.2. Etude de l'effet de l'ajout d'un monomère thermosensible sur la libération de la ribavirine

### a) Synthèse des Microsphères imprimés thermosensibles

Afin d'essayer de prolonger encore plus le profil de libération de la ribavirine par le SMIP-19, nous avons essayé modifier légèrement sa formulation de base. Pour cela, nous avons ajouté au mélange de pré-polymérisation un monomère thermosensible qui est le NIPAm (**11**). Ce monomère

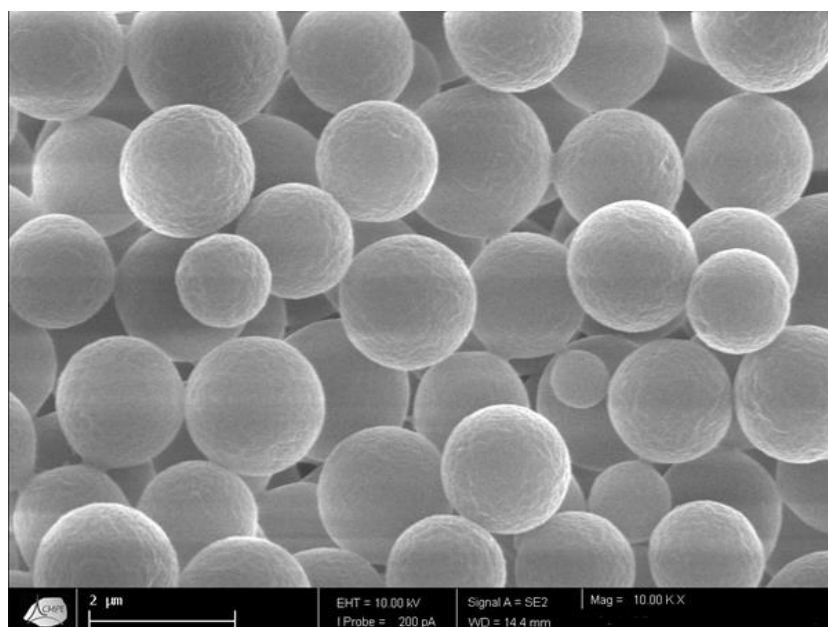
comme décrit dans le chapitre 1, apporte au polymère un caractère thermosensible lui permettant de se rétracter dans un milieu aqueux à une température supérieure à sa LCST (32°C).<sup>241</sup>

Pour cela, nous avons ajouté le monomère **11** à la formulation du MIP-19 afin de garder un ratio 1:4:20 (T:MF:R), avec 4 comme équivalents de monomères fonctionnels, c'est-à-dire 3 équivalents de MAA et 1 équivalent de NIPAm. Ce ratio est à ce jour le plus utilisé dans le cas des interactions non covalentes et a bien souvent conduit à une grande sélectivité.<sup>182</sup> Le tableau 23 montre les détails des formulations des polymères imprimés et de référence. Comme d'habitude le NIP est obtenu de la même façon que le MIP sans ajout de la molécule template.

**Tableau 29 : Synthèse des polymères sphériques SMIP/SNIP-24** en employant la 2', 3', 5'-tri-O-acétylribavirine (**56**) comme template, le NAT (**58**) comme monomère 1, le NIPAm (**24**) comme monomère 2, l'EGDMA comme agent réticulant, l'AIBN comme initiateur. Les billes sont synthétisées par polymérisation par précipitation pendant 16h en utilisant le MeCN comme solvant avec une concentration des réactifs de 1% (w/v).

	Template (g)	Monomère 1 (g)	Monomère 2 (g)	EGDMA (mL)	AIBN (mg)	MeCN (mL)	Ratio (T:MF1:MF2:R)
SMIP-24	( <b>56</b> ) 0,37	( <b>58</b> ) 0,18	( <b>24</b> ) 0,34	3,7	50	584	1:1:3:20
SNIP-24	-	( <b>58</b> ) 0,18	( <b>24</b> ) 0,34	3,7	50	584	0:1:3:20

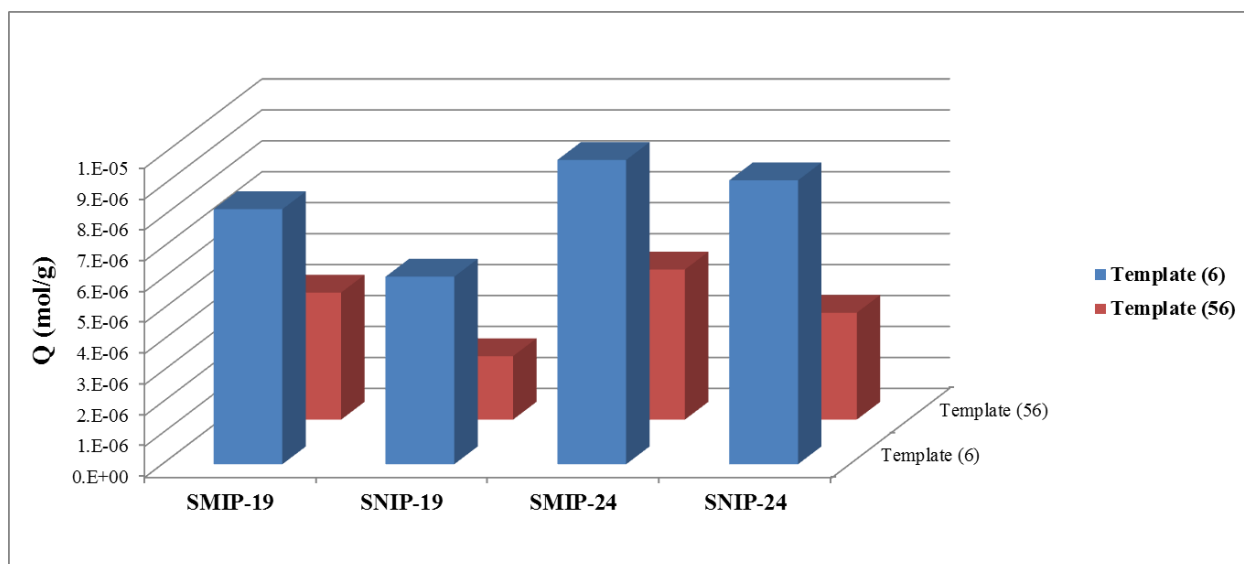
Cette polymérisation a permis d'obtenir dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment des billes micrométriques monodisperses et bien régulières comme le montre la Figure 80.



**Figure 80 : Cliché MEB montrant des particules polymériques sphériques micrométriques (Taille moyenne de 3 μm) pour le SMIP-24.**

## b) Etude comparative de la capacité d'adsorption

Nous avons étudié l'effet de l'ajout d'un Co-monomère hydrophile et thermosensible sur les capacités d'adsorption des templates **6** et **56**. Cette étude a été menée par batch. Pour cela nous avons mis 20 mg de nos matériaux en contact avec une solution de template **6** et séparément de template **56** tous les deux à la même concentration de 1 mM. Après équilibre, nous avons calculé les quantités adsorbées par chacun des SMIP et SNIP.



**Figure 81 : Capacités d'adsorption ( $\text{mol.g}^{-1}$ ) obtenues par Batch pour le SMIP-19, le SMIP-24 et de leur SNIP respectif en utilisant la ribavirine (**6**) et la 2', 3', 5'-tri-O-acétylribavirine (**56**) dans un mélange MeCN /Eau (87/13, v/v) à une concentration de 1 mM.**

Les résultats montrent une légère augmentation de la quantité adsorbée par le **SMIP-24** comparativement au **SMIP-19**. Cependant, on remarque une diminution de la reconnaissance du template par l'augmentation de la quantité adsorbée par la référence **SNIP-24** pour les deux templates. Cette augmentation est due à l'incorporation du monomère **24** qui augmente le nombre de sites d'interaction non spécifique grâce à la présence du groupement amine secondaire sur ce dernier. Cette augmentation de la capacité du MIP comme du NIP ne renforce malheureusement pas le Binding capacity, car celui-ci se voit même légèrement diminuer.

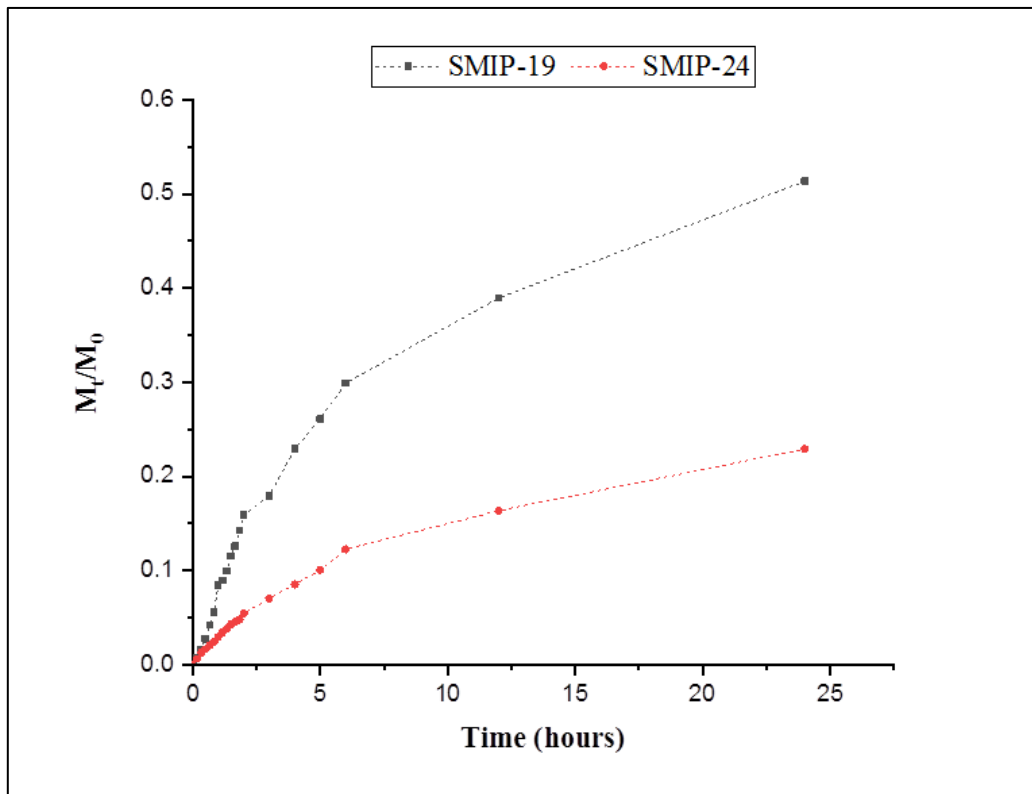
## c) Etude du relargage des Microsphères thermosensibles

Le profil de relargage du polymère **SMIP-24** est effectué et comparé avec celui du **SMIP-19**. Cette étude a été menée en commençant par le chargement du SMIP-24 avec une solution de ribavirine (10 mM) dans un mélange MeCN/Eau (87/13, v/v) pendant 24 heures. Le relargage a été effectué dans un tampon phosphate (0,01 M) à une température de 38 °C. Les résultats obtenus nous permettent de tracer le rapport de la masse de la ribavirine relarguée à un instant  $t$  ( $M_t$ ) par la masse initiale chargée ( $M_0$ ) en fonction du temps (Figure 82).

**Le tracé montre une diminution de la vitesse de relargage de la ribavirine pour le SMIP-24.** En effet, comme il a été décrit dans le deuxième chapitre, le NIPAm est un monomère thermosensible, ce qui fait qu'à une température supérieure à sa LCST, le polymère change de morphologie en passant d'hydrophile à hydrophobe et en se replie sur lui-même. Ce changement de



morphologie et la rétractation du polymère peut induire une diminution de la taille de la particule et de la taille des pores rendant plus difficile la diffusion du solvant au sein de la matrice polymérique. De plus, le polymère devenant plus hydrophobe, il ralentit encore plus sa mouillabilité et freine la pénétration du milieu aqueux dans son réseau poreux, ce qui diminue la libération de la molécule se trouvant à l'intérieur de la matrice. **Par conséquent la cinétique de relargage diminue et la libération de la ribavirine devient plus lente que pour le polymère imprimé ne contenant que des monomères de type MAA.**



**Figure 82** : Profil de libération de la ribavirine ( $M_t/M_0$ ) en fonction du temps pour les **SMIP-19** (tracé noir) et **SMIP-24** (tracé rouge) obtenu sur 24h dans le PBS (0,01 M) à 38 °C.

### III. Conclusion

Cette étude décrit la synthèse et l'évaluation d'un polymère à empreintes moléculaires sphérique utilisant la technique de la polymérisation par précipitation en utilisant le 2',3',5'-tri-O-acétyl-ribavirine comme molécule dummy-template pour la libération retardée de la ribavirine dans un liquide mimant le milieu pulmonaire. Plusieurs conclusions ont été déduites à partir des résultats obtenus :

- La polymérisation par précipitation a permis d'obtenir des microsphères imprimés monodisperses de taille moyenne entre 2 et 4  $\mu\text{m}$  pour les différentes formulations.
- Une étude comparative de l'adsorption du template **6** et **56** a permis de voir une augmentation de la quantité adsorbée par les polymères imprimés / non imprimés sphériques en comparaison avec les polymères obtenus en Bulk.
- L'étude cinétique de la libération de la ribavirine à partir des polymères sphériques a montré une différence de relargage entre les SMIP et les SNIP. Les modèles cinétiques ont montré que la libération de la ribavirine du SMIP-13 suit le modèle de Korsmeyer-Pappas qui indique un mode de libération non fickien. Tandis que le SMIP-19 suit le modèle de Lonsdale-Baker indiquant que la diffusion et le transport du solvant gouverne la libération de la ribavirine.
- L'ajout d'un co-monomère fluorescent (Fluorescéine-O-acrylate) a permis l'obtention d'un polymère imprimé sphérique fluorescent et a permis l'étude de la bio-distribution du SMIP en milieu cellulaire. Cette étude a montré que les particules micrométriques sphériques de la taille de quelques microns ( $\sim 3 \mu\text{m}$ ) pénètrent la cellule bronchique humaine impliquant une libération de l'antiviral dans le milieu intracellulaire.
- L'ajout d'un co-monomère thermosensible (**11**) à la formulation du **SMIP-19** a permis de ralentir la libération de la ribavirine à une température supérieure à sa LCST. Cependant, l'augmentation de la quantité adsorbée des molécules **6** et **56** se fait au détriment de la sélectivité.
- Les études virologiques montrent que les polymères imprimés non chargés induit à la diminution de la charge virale qui puisse être induite par le changement de taille et de morphologie des particules. Aussi, la pénétration cellulaire peut influencer le profil de relargage de ces matériaux et il se peut que nos matériaux sont capable de recapturer des éléments intracellulaires (de type nucléoside) nécessaire à la réplication du virus d'où la diminution de la charge virale.

## IV. Partie experimentale

### IV.1. Apparatus and reagents

Ribavirin was purchased from Carbosynth, Berkshire, UK. Methacrylic acid (99%, MAA), Uracil ( $\geq 99.0\%$  purity), Thymine ( $\geq 99.0\%$  purity), Ethylene glycol dimethacrylate (98% purity, EGDMA), 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (98% purity, AIBN), Fluorescein o-acrylate (95% purity), *N*-isopropylacrylamide ( $>99\%$ , NIPAm), phosphate buffered saline tablet (0.01M, pH 7.4) were purchased from Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France. Ultra-High Quality water (18 M $\Omega$ .cm) was produced from an Elga apparatus, Villeurbanne, France. Acetic acid Glacial (AcOH), Acetonitrile (analytical grade, MeCN), was purchased from FisherScientific, Illkirch, France.

HPLC analyses were performed using an Agilent 1260 Infinity HPLC chromatograph (Agilent Technologies, Les Ulis, France). The chromatograph was equipped with a 1260 binary pump (G1311B), a 1260 standard autosampler (G1329B), a 1260 thermostated column compartment (G1316A) and a 1260 diode array detector (G4212B) with a Max-Light cartridge cell (1  $\mu$ L volume, 10 mm cell path length). Porous graphitic carbon (PGC, Hypercarb™) HPLC column (particle size : 5  $\mu$ m ; pore size : 250 Å) was used (mobile phase : water/MeCN ; 85/15 : v/v).

### IV.2. Polymer synthesis by precipitation

Molecularly imprinted microspheres were synthesized using precipitation polymerization under the conditions described in Table 23 (chapter 4). The template molecule (56) was dissolved in a large volume of MeCN in PVC bottle equipped with a screw cap. The functional monomer (19 or 58) was added and the solution was sonicated for 1h in ultrasonic bath until all the components were solubilized. After, the crosslinker and the initiator were then added. The solution was purged with gentle flow of N<sub>2</sub> for 5min and sealed. Polymerization was carried out by inserting the bottle in oil bath and the polymerization was induced at 70°C with slight continuous agitation (100 rpm).

After polymerization, particles were collected by filtration on 0,2  $\mu$ m PTFE filtration membrane.

### IV.3. Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis.

The morphology of samples was observed using a field emission scanning electron microscopy (FEG, JEOL JSM 7800F Prime), Ultra high resolution (optimal magnification: 1.000.0000, Resolution : 7 Å from 30kV to 1 kV ). Observation conditions: work distance: between 6mm and 10mm, Accelerating voltage: 1 kV to 5 kV, large Depth of Focus (LDF) mode. Polarized support 5kV (super-high resolution Gentle Beam (GBSH)) + scanning CF (Charge Free). Pre-treatment of samples: powders are deposited on self-adhesive carbon pellets then a gold film is deposited with a thickness about 5nm by cathodic sputtering on the whole support before observation. To complete analysis, a second device is used: a LEO Gemini 1530 SEM apparatus (Leo Elektronenmikroskopie, Oberkochen, Germany). Prior to scanning electron microscopy (SEM) analysis the polymer samples were deposited onto SEM supports with a silver-containing solution, dried under reduced pressure and further coated with a thin platinum layer (2 nm) using a sputter coater Cressington 208 HR (Elektronen Optik Service, Dortmund, Germany). SEM analysis was performed using scanning electron microscopy with the help of a LEO Gemini 1530 SEM apparatus (Leo Elektronenmikroskopie, Oberkochen, Germany).

#### **IV.4. Granulometry**

A COULTER LS Series instrument measures the size distributions of particles. An instrument with a fluid module, hazardous fluid module, or micro volume module can measure sample particles suspended in a liquid. The LS230 can measure particles from 0.04  $\mu\text{m}$  to 2000  $\mu\text{m}$ .

#### **IV.5. Extraction and quantification of ribavirin**

Extraction of the template (4) was obtained with consecutive ultrasound washings for 6h, using a mixture of MeOH and acetic acid (8/2, v/v) for 1h at 50 °C. The washing solution is replaced every hour by a fresh one. The recovered Ribavirin was quantified with an HPLC system in order to verify the extraction and to know how much template (4) remained trapped in the polymer.

#### **IV.6. Kinetic study of ribavirin release**

The kinetic study of Ribavirin release from polymers was conducted by placing a single charged polymer beads (50 mg) in dialyze tubes putted in 40 mL of distilled water or PBS which was shaken gently, by a mechanical shaker. In this kinetic study, the release solution is changed for each sample. The study was induced at two different temperatures (25 and 40°C)

#### **IV.7. Immunofluorescence, internalization spherical polymers**

BEAS-2B cells were seeded on glass cover slips at a density of  $1.8 \times 10^3$  cells/mL. After 48h, cells were incubated for 1h at 4°C to stop the membrane exchange. Spherical polymers labeled with fluorescein at 0.01mg/mL were adsorbed for 1 h at 4°C, unbound polymers were washed away. Cells were incubated at 37°C for 2 h (control cells were left at 4°C for 2h). Cells were then fixed with 4% PFA for 20 min at RT, washed with PBS and permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 10 min at RT. Two additional washes with PBS and saturation with PBS/BSA 1% for 10 min at RT were performed. Cells were incubated with Actin Red 555 Ready Probes Reagent (Molecular Probes) for 30 min at RT. Samples were mounted using Fluoromount G (eBioscience). Z-stacks were acquired with a 63X objective on a Leica SP8 confocal microscope and analyzed using ImageJ software.

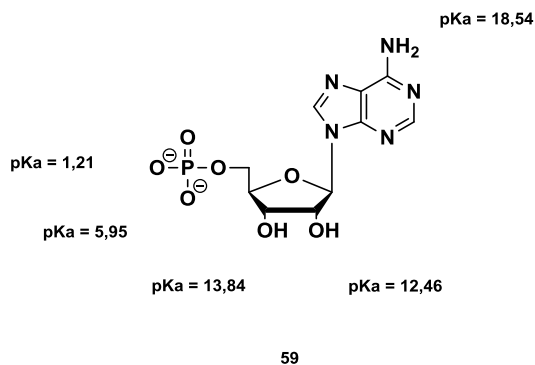


**Chapitre 6 : Synthèse d'un Hydrogel  
imprimé sphérique pour la libération  
contrôlée d'un nucléotide : l'adénosine-  
5'-monophosphate.**



## I. Introduction

L'adénosine 5'-monophosphate (**59**), également appelé acide 5'-adénylique, est un nucléotide qui se trouve dans l'ARN. C'est un ester d'acide phosphorique couplé à l'adénosine. L'AMP comprend un groupement phosphate, un ribose et la nucléobase adénine. L'AMP peut être produite pendant la synthèse de l'ATP par l'enzyme adénylate kinase. Son activité pharmacologique nécessite une conversion intracellulaire en analogue 5'-triphosphate ; une des enzymes qui catalyse cette conversion est la kinase nucléosidique (NK).



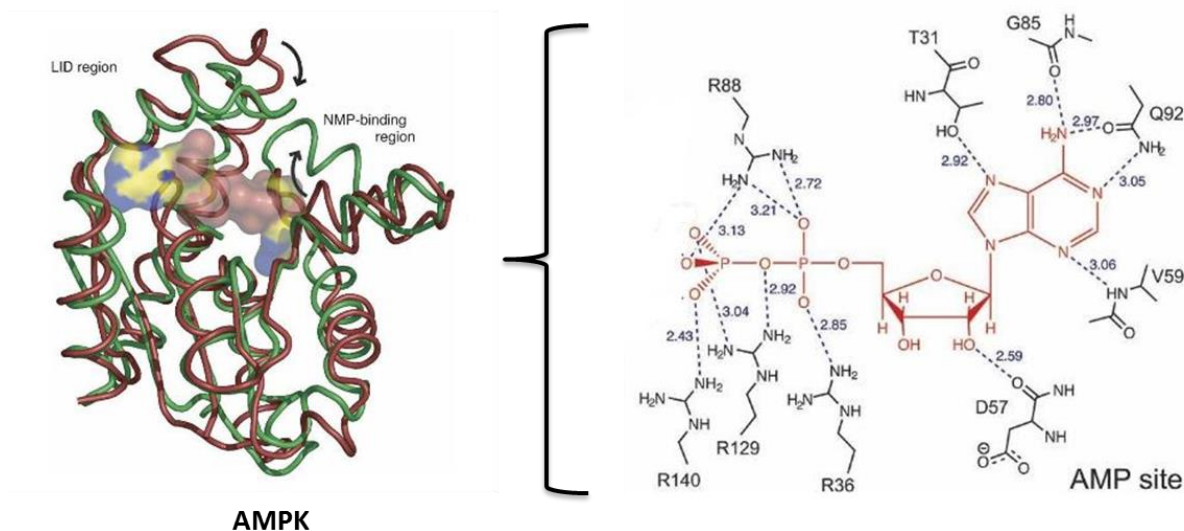
**Figure 83 : Structure de l'adénosine 5'-monophosphate (59), avec les valeurs de pKa calculées *via* le logiciel MarvinSketch.<sup>244</sup>**

Récemment, il a été suggéré que l'adénosine 5'-monophosphate (5'-AMP) accélère le renouvellement épidermique humain freiné par le vieillissement. En effet, le renouvellement épidermique est lié au métabolisme énergétique des cellules basales de l'épiderme et l'adénosine 5'-triphosphate (5'-ATP) est nécessaire à ce renouvellement et à la division cellulaire. La présence de la 5'-AMP dans le milieu intracellulaire augmente la production de la 5'-ATP<sup>301</sup> et donc la lutte contre le vieillissement cutané est directement dépendante de la concentration en 5'-AMP contenue dans les cellules de peau humaine. Le but de cette étude est donc d'apporter la concentration de 5'-AMP nécessaire à la reprise du « turn-over » cellulaire dermique chez les personnes âgées par l'intermédiaire d'un système de délivrance retardée de type hydrogel imprimé. Pour ce faire, un polymère à empreintes moléculaires mimant le site actif de l'adénylate monophosphate kinase (AMPK) sera synthétisé. Le site actif de cette enzyme est pris comme modèle pour créer le complexe de pré-polymérisation indispensable à la synthèse d'un MIP spécifique de la molécule 5'-AMP.<sup>302</sup> Dans ce type d'enzyme, la 5'-AMP est lié au site actif par le biais de liaisons non covalentes, ioniques et liaisons hydrogène, dans lesquelles deux arginines, deux glutamines et une thréonine sont impliquées (Figure 84).

<sup>301</sup> Furukawa, F.; Kanehara, S.; Harano, F.; Shinohara, S.; Kamimura, J.; Kawabata, S.; Igarashi, S.; Kawamura, M.; Yamamoto, Y.; Miyachi, Y. Effects of adenosine 5'-monophosphate on epidermal turnover, *Arch. Dermatol. Res.* **2008**, *300*, 485–493.

<sup>302</sup> Yan, H.; Tsai, M.D., Nucleoside monophosphate kinases: structure, mechanism, and substrate specificity, *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **1999**, *73*, 103-134.





**Figure 84 : Schéma de l'AMP dans le site active de l'enzyme AMPKinase reconstituée après cristallisation.**<sup>303</sup>

Les valeurs de pKa des deux groupes hydroxyle sur le ribose et un groupe amino sur la nucléobase sont très élevées. Cela limite l'effet du pH et les rend donneurs de liaison hydrogène. Le groupement phosphate confère à la molécule un caractère acide et très polaire pouvant interagir avec d'autres molécules par liaison ionique forte (à pH > pKa). De ce fait nous avons choisi de complexer la partie phosphate de la 5'-AMP *via* des interactions ioniques et la base nucléique *via* des interactions non covalentes de type liaison hydrogène.

### I.1. Choix de la technique de polymérisation

La polymérisation par Pickering<sup>304</sup> inverse est un type d'émulsion qui a montré de nombreux avantages en comparaison avec les émulsions classiques due à la non utilisation d'un surfactant. Ainsi, on élimine les problèmes de formation de mousse et on diminue la toxicité et le coût.<sup>305</sup> Cette technique est utilisée principalement pour la synthèse des particules d'hydrogels sphériques. Les nanoparticules de silices modifiées sont utilisées dans ce cas pour remplacer le tensioactif et stabiliser l'émulsion. L'équipe de Finkle *et al.*<sup>306</sup> a démontré que la phase qui doit contenir préférentiellement les particules solides est la phase continue, dans ce cas la phase organique ou huileuse. En se basant sur les travaux de Binks *et al.*, nous avons choisi des particules de silice de taille comprise entre 10 et 30 nm, dérivées par le chlorométhylsilane. Le résultat est une émulsion eau dans l'huile (W/O) stabilisée par les nanoparticules de silice hydrophobes.<sup>307</sup>

<sup>303</sup> Bellinzoni, M.; Haouz, A.; Graña, M.; Munier-Lehmann, H.; Shepard, W.; Alzari, P.M., The crystal structure of Mycobacterium tuberculosis adenylate kinase in complex with two molecules of ADP and Mg<sup>2+</sup> supports an associative mechanism for phosphoryl transfer, *Protein. Sci.* **2006**, *15*, 1489-1493.

<sup>304</sup> Shen, X.; Ye, L., Interfacial Molecular Imprinting in Nanoparticle-Stabilized Emulsions. *Macromolecules.* **2011**, *44*, 5631-5637.

<sup>305</sup> Zhang, K.; Wu, W.; Meng, H.; Guo, K.; Chen, J. F., Pickering emulsion polymerization: Preparation of polystyrene/nano-SiO<sub>2</sub> composite microspheres with core-shell structure, *Powder. Technol.* **2009**, *190*, 393-400.

<sup>306</sup> Finkle, P.; Draper, H. D.; Hildebrand, J. H., The theory of emulsification, *J. Am. Chem. Soc.* **1923**, *45*, 2780-2788.

<sup>307</sup> Binks, B. P.; Lumsdon, S. O., Effects of oil type and aqueous phase composition on oil water mixtures containing particles of intermediate hydrophobicity, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 2959-2967.

Dans la préparation des hydrogels sphériques imprimés et non imprimés, deux différentes phases ont été préparées. La phase aqueuse contenant le template, les monomères fonctionnels, l'agent réticulant et l'initiateur. Et la deuxième phase organique contenant les nanoparticules de silice hydrophobe. Le toluène a été choisi comme phase organique car les solvants aromatiques sont les plus utilisés pour des émulsions de type eau dans l'huile, contrairement aux solvants organiques non-polaire comme les alcanes et les cycloalcanes, qui sont utilisés pour des émulsions types huile dans l'eau.<sup>307</sup> Il faut ajouter à cela que le toluène est connu pour montrer un faible changement dans la taille et la distribution des gouttelettes formées au cours du temps par rapport aux autres solvants aromatiques ainsi que pour diminuer le phénomène de mûrissement d'Ostwald, qui sont préjudiciables pour la stabilité de l'émulsion.<sup>308</sup> Nous avons opté pour la photopolymérisation car la polymérisation par Pickering inverse peut être sujette à une faible stabilité thermique.<sup>309</sup> Aussi la littérature a montré que la polymérisation induite par voie photochimique à basse température permet de réduire l'énergie cinétique du complexe de pré-polymérisation en augmentant sa stabilité et permet d'avoir un bon taux de recapture et une bonne spécificité, comparativement à une polymérisation induite par voie thermique où les températures sont supérieures à 40 °C.<sup>152,310</sup>

Le rapport massique entre la phase continue (toluène) et les nanoparticules de silice hydrophobe est très important. Dans ce cas de figure, la masse de nanoparticules est de 30 mg pour 10 g de toluène. Ce ratio a été adapté à partir d'une étude dans laquelle des microsphères de poly(*N*-isopropylacrylamide) ont été synthétisées en émulsion par Pickering inverse.<sup>311</sup> La concentration des nanoparticules doit être optimale afin de pouvoir sécuriser la gouttelette en couvrant entièrement sa surface, permettant ainsi d'éviter les phénomènes de floculation et de mûrissement d'Ostwald.

Le rapport massique entre la phase dispersée (phase aqueuse) et la phase dispersante (phase organique, toluène) est calculé pour être égale à 0,4 (avec un rapport volumique de 0,32). Pour cela nous avons suivi les résultats des travaux menés par l'équipe de Ye, qui montre que ce rapport est optimal pour la synthèse de microparticules d'hydrogels imprimés sélectifs de protéines par la technique de Pickering inverse.<sup>312</sup>

## I.2. Choix des réactifs de polymérisation

Pour la synthèse d'un MIP hydrogel sphérique en utilisant la technique de polymérisation par Pickering inverse, il est nécessaire d'utiliser des réactifs solubles dans l'eau. La 5'-AMP (**59**), qui est naturellement soluble dans l'eau, a été gardée comme template pour cette étude. Le premier monomère fonctionnel qui est le 2-(diméthylamino) éthyle méthacrylate DMEAM (**60**) a déjà été utilisé comme monomère dans la synthèse d'un MIP spécifique de la 5'-AMP afin de l'extraire de

<sup>308</sup> Kabalnov, A. S.; Pertzov, A. V.; Shchukin, E. D., Ostwald ripening in emulsions: I. Direct observations of Ostwald ripening in emulsions, *J. Colloid. Interface. Sci.* **1987**, *118*, 590-597.

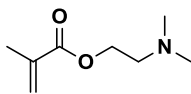
<sup>309</sup> Sharma, T.; Kumar, G. S.; Chon, B. H.; Sangwai, J. S., Thermal stability of oil-in-water Pickering emulsion in the presence of nanoparticle, surfactant, and polymer, *J. Ind. Eng. Chem.* **2015**, *22*, 324-334.

<sup>310</sup> Vasapollo, G.; Del Sole, R.; Mergola, L.; Lazzoi, M. R.; Scardino, A.; Scorrano, S.; Mele, G., Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 5908-5945.

<sup>311</sup> Duan, L.; Chen, M.; Zhou, S.; Wu, L., Synthesis and Characterization of Poly (*N*-isopropylacrylamide)/Silica Composite Microspheres via Inverse Pickering Suspension Polymerization, *Langmuir.* **2009**, *25*, 3467-3472.

<sup>312</sup> Shen, X.; Zhou, T.; Ye, L., Molecular imprinting of protein in Pickering emulsion, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8198-8200.

l'urine sur phase solide (SPE).<sup>313</sup> Ce monomère se distingue principalement par sa capacité de former une interaction ionique avec le groupement phosphate des nucléotides dans l'eau, ou le DMSO, mais aussi pour sa très faible toxicité lorsqu'il est sous forme de polymère.<sup>314</sup>



60

**Figure 85 : Structure du monomère fonctionnel 2-(diméthylamino) éthyle méthacrylate DMEAM (60)**

Cependant, pour la polymérisation par Pickering inverse, les deux solvants doivent être impérativement non miscibles. Or le DMSO, malgré sa polarité et sa capacité à dissoudre tous nos réactifs, est connu pour être miscible avec les différents solvants organiques utilisés pour ce type de polymérisation tel que le toluène, l'hexane, le cyclohexane... C'est pour cette raison, que le DMSO a été remplacé par un solvant non toxique qui est l'eau permettant ainsi l'obtention d'un bon hydrogel.

Afin d'améliorer la reconnaissance de notre template, un deuxième monomère, possédant un groupement amide, a été ajouté à la formulation. Dans différentes études, ce monomère (AAM) a montré une bonne interaction et reconnaissance de la base nucléique de la molécule **59** via des interactions non covalentes dans le DMSO.<sup>313</sup> Cependant, et afin de conférer le caractère thermosensible au polymère, nous avons choisi de remplacer l'AAM (**45**) par le NIPAm (**24**). Ce dernier, nous permet d'obtenir un polymère thermosensible et qui, en milieu aqueux, subit une transition réversible à partir de 32°C. Dans l'eau et en-dessous de cette température critique inférieure de solubilité (LCST, lower critical solution temperature), il est hydrophile et gonflé, au-delà (température proche de celle de la peau humaine) il devient hydrophobe et se replie sur lui-même.<sup>116</sup> Le plus intéressant c'est que ce polymère n'est pas cytotoxique pour les cellules de type fibroblaste, par exemple,<sup>315</sup> et en l'incorporant avec le DMEAM en tant que co-monomère, il permet de réduire la toxicité de ce dernier.<sup>316</sup> L'agent réticulant choisi est le MBA car il présente une grande solubilité dans l'eau (20 g/L à 20 °C) et est très utilisé dans le domaine médical.<sup>220</sup> Nous avons utilisé un initiateur azoïque hydrosoluble, le VA-044, qui a une bonne réactivité photochimique.<sup>317</sup> Le réarrangement théorique du complexe de polymérisation formé par le template **59** d'un côté et chacun des monomères fonctionnels (**60** et **24**) de l'autre côté, est donné par la Figure 86.

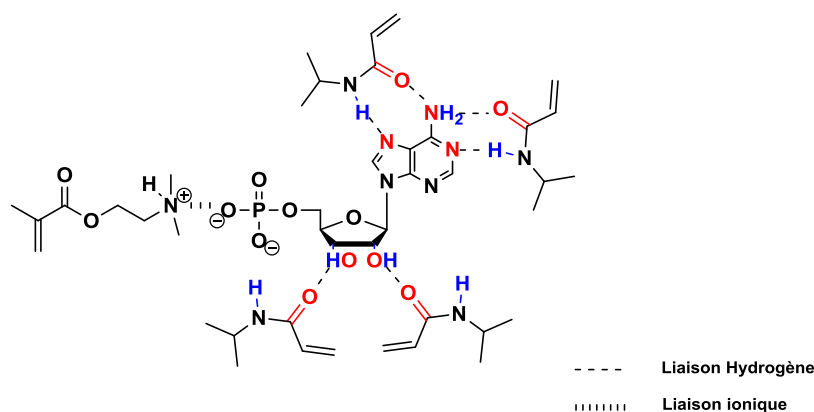
<sup>313</sup> Breton, F.; Delépée, R.; Jegourel, D.; Deville-Bonne, D.; Agrofoglio, L. A., Selective adenosine-5'-monophosphate uptake by water-compatible molecularly imprinted polymer, *Anal. Chim. Acta.* **2008**, *616*, 222-229.

<sup>314</sup> Xu, F. J.; Li, H.; Li, J.; Zhang, Z.; Kang, E. T.; Neoh, K. G., Pentablock copolymers of poly(ethylene glycol), poly((2-dimethyl amino) ethyl methacrylate) and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) from consecutive atom transfer radical polymerizations for non-viral gene delivery, *Biomaterials.* **2008**, *19*, 3023-3033.

<sup>315</sup> Cooperstein, M. A.; Canavan, H. E., Assessment of cytotoxicity of (*N*-isopropylacrylamide) and Poly(*N*-isopropyl acrylamide)-coated surfaces, *Biointerphases.* **2013**, *8*, 19.

<sup>316</sup> Moselhy, J.; Sarkar, S.; Chia, M. C.; Mocanu, J. D.; Taulier, N.; Liu, F. F.; Wu, X. Y., Evaluation of copolymers of *N*-isopropylacrylamide and 2-dimethyl(aminoethyl)methacrylate in nonviral and adenoviral vectors for gene delivery to nasopharyngeal carcinoma, *Int. J. Nanomedicine.* **2007**, *2*, 461-478.

<sup>317</sup> Koyanagi, K.; Takashima, Y.; Nakamura, T.; Yamaguchi, H.; Harada, A., Radical polymerization by a supramolecular catalyst: cyclodextrin with a RAFT reagent, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2495-2502.



**Figure 86 : Hypothèse du complexe de pré-polymérisation formé entre le template (59) et les monomères fonctionnels (60 et 24).**

En se basant sur les études précédentes, et afin de comparer l'affinité et la capacité des MIP-hydrogels obtenus par Pickering inverse, nous avons synthétisé un ensemble MIP/NIP en bulk dans le DMSO en gardant les mêmes ratios entre le template, les monomères fonctionnels et l'agent réticulant que ceux du polymère créé en émulsion de Pickering inverse. Les MIP/NIP bulk sont synthétisés dans le DMSO, car nous ne sommes pas dans l'obligation de générer un milieu biphasique, et en utilisant l'AIBN comme initiateur, car très soluble dans le DMSO, contrairement au Pickering inverse où on a utilisé l'eau comme porogène et le VA-044 comme initiateur.

## II. Résultats et discussions

### II.1. Etude des interactions template-monomère

Etant donné que, dans l'eau et à pH neutre, la partie basique du monomère **60** est sous forme cationique (pKa du groupement amine est 8,42), elle peut former une interaction ionique avec la partie acide du template **59** (pKa de 1,22 et 6,27 pour les groupements hydroxyles de la fonction phosphate). Nous avons choisi un ratio 1 :1 pour le complexe template- monomère fonctionnel **59/60**. A l'aide de la spectrométrie UV, nous avons établi le job plot mettant en évidence les interactions entre le template et le monomère fonctionnel. Cette étude a permis d'optimiser le ratio template/Monomère fonctionnel. Ainsi, le tracé bleu de la Figure 87, montre un optimum à la fraction molaire de 0,5, ce qui démontre que le complexe formé est de la forme 1:1.

De même, afin de déterminer le ratio du monomère **24** choisi, nous avons procédé de la même façon en étudiant cette fois le job-plot du complexe **59/60** avec le monomère **24** dans l'eau. Le résultat nous montre que le meilleur ratio est 1:4 pour le complexe (**59/60**) : **24**. Car, l'optimum de la courbe passe à l'aplomb du point 0,2.

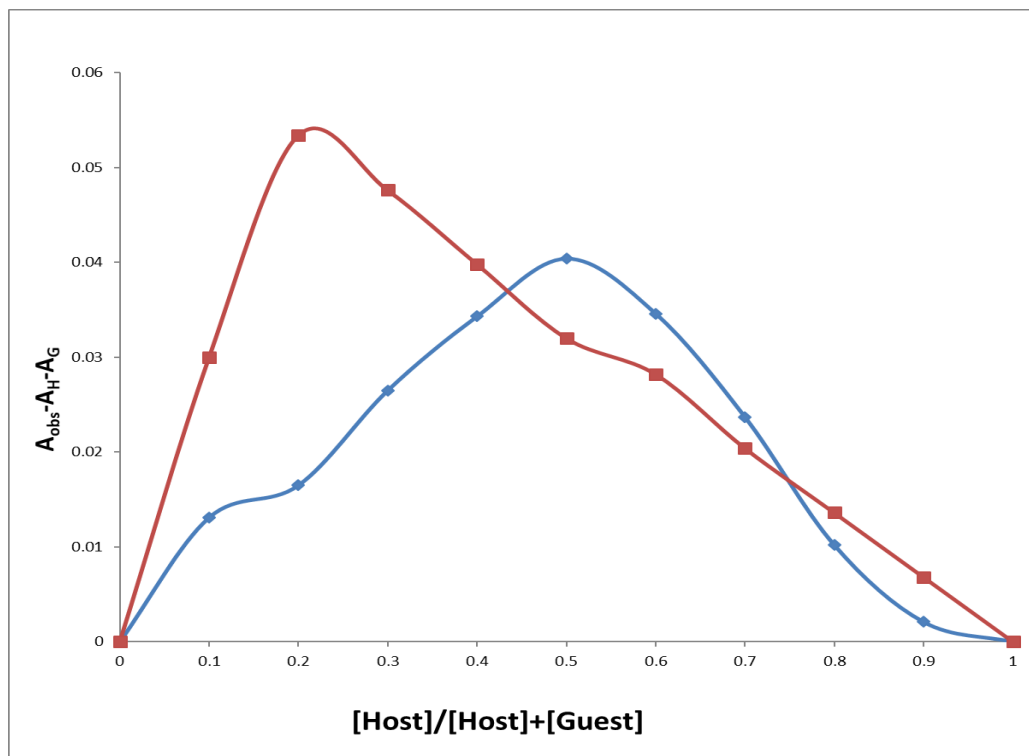
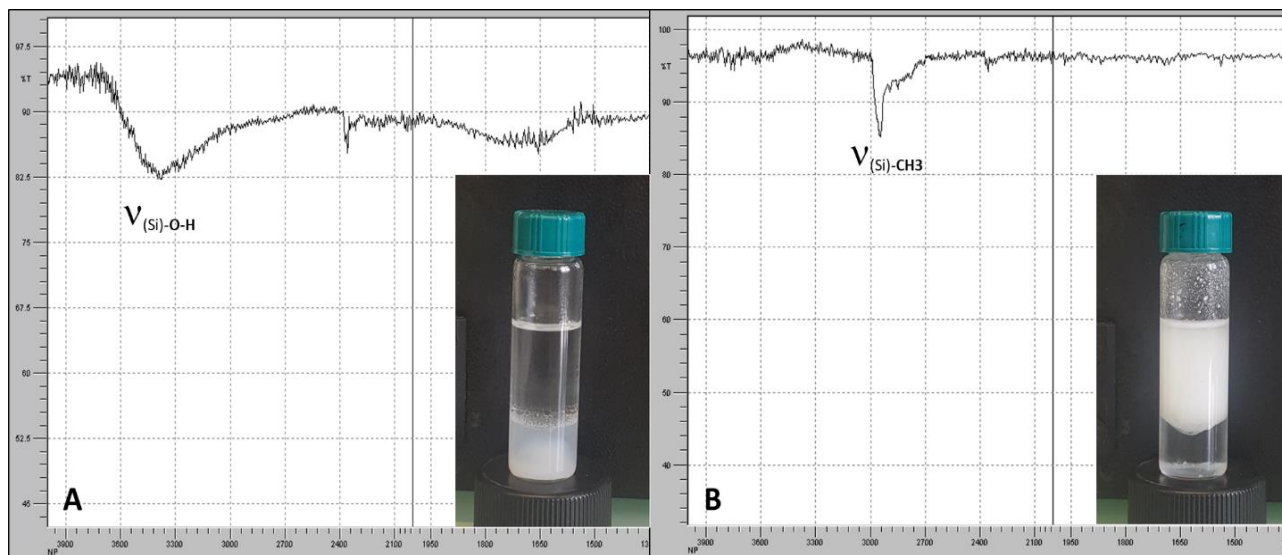


Figure 87 : UV job-plot des complexes [59/60] (en Bleu) et [(59/60)/ 24] (en rouge), dans l'eau.

## II.2. Synthèse et Caractérisation des nanoparticules de silice modifiées

Afin d'utiliser les nanoparticules de silice pour la polymérisation par Pickering inverse, nous avons procédé à la dérivation de ces dernières, en utilisant le chlorure de triméthylsilane (TMSCl) comme agent de dérivation, afin de les rendre hydrophobe et pouvoir les disperser dans la phase continue apolaire. Le rapport massique nanoparticules / agent de dérivation été optimisé (10/1, w/w).<sup>311</sup> La Figure 88 nous montre les spectres ATR-FTIR des nanoparticules de silice avant et après modification par le TMSCl (agent de dérivation).

Contrairement au  $\text{SiO}_2$  non dérivé, les  $\text{SiO}_2$ -TMSCl montrent l'absence de la bande caractéristique du groupement hydroxyle aux alentours de  $3300 \text{ cm}^{-1}$  et une nouvelle bande est apparue aux alentours de  $2970 \text{ cm}^{-1}$ , qui est caractéristique de la vibration d'élongation du  $\text{CH}_3$ . Cela montre que la dérivation des  $\text{SiO}_2$  par le TMSCl a été effective. Les différentes propriétés hydrophile et hydrophobe des nanoparticules de silice respectivement modifiées et non modifiées ont été démontrées en dispersant ces dernières dans un mélange d'eau et de toluène. Les nanoparticules hydrophiles ( $\text{SiO}_2$ ) forme une suspension dans l'eau (photo de gauche) contrairement aux nanoparticules hydrophobes qui sont transférées dans le toluène comme le montre la Figure 88 (photo de droite).



**Figure 88 : Spectre IR des nanoparticules de silice non modifiées (A) et modifiées (B), ainsi que les résultats de la suspension des SiO<sub>2</sub> non modifiés (hydrophile) et modifiés (hydrophobe) dans un mélange eau/Toluène. Les SiO<sub>2</sub> non modifiés sont dispersés dans l'eau (phase du dessous) (A) et SiO<sub>2</sub> modifiés sont dispersés dans le toluène (phase du dessus) (B).**

### II.3. Synthèse des polymères

Les polymères ont été préparés en utilisant le template **59**, les molécules **60** et **24** comme monomères fonctionnels, et le MBA comme agent réticulant, et le DMSO pour les polymères monolithiques et en utilisant l'AIBN comme initiateur (Tableau 30). Pour les polymères préparés par Pickering inverse, les mêmes réactifs ont été utilisés cette fois dans l'eau (phase dispersée) avec le toluène (phase dispersante ou continue). Le rapport massique eau/toluène a été ajusté à 0,4. Les nanoparticules de silices hydrophobes ont été dispersées dans la phase continue. L'initiateur utilisé dans ce cas de figure est le VA-044, qui est un initiateur hydrosoluble (Tableau 31).

Le ratio template : monomère fonctionnel 1:monomère fonctionnel 2:réticulant choisi est 1:1:4:0,5. Les polymères non imprimés sont préparés de la même façon sans ajouter le template.

**Tableau 30 : Formulation des MIP-25 et NIP-25 monolithique dans le DMSO.**

	Template (mg)	MF 1 (mg)	MF 2 (mg)	DMSO (mL)	MBA (mg)	AIBN (mg)
<b>MIP-25</b>	(59) 1736	(60) 786	(24) 2263	12	386	5
<b>NIP-25</b>	-	(60) 786	(24) 2263	12	386	5

**Tableau 31 : Formulation de la phase aqueuse pour le Pickering inverse pour le SMIP-26 et SNIP-26.**

	Template (mg)	MF 1 (mg)	MF 2 (mg)	Eau (g)	MBA (mg)	VA-044 (mg)
<b>SMIP-26</b>	(59) 405	(60) 167	(24) 528	2,8	89	2
<b>SNIP-26</b>	-	(60) 167	(24) 528	2,8	89	2

## II.4. Etude de la taille et de la morphologie des polymères imprimés

Une étude par microscopie électronique à balayage (MEB) a été réalisée afin d'avoir une idée sur la taille et la structure de la surface des polymères. Les clichés montrent que les **SMIP-26** et **SNIP-26** sont de formes sphériques avec une surface rugueuse et un diamètre moyen de 24  $\mu\text{m}$ , et une dispersion entre 10 et 50  $\mu\text{m}$  (Figure 89). Contrairement aux MIP et NIP monolithiques qui donnent des particules irrégulières avec une surface lisse, et une taille moyenne de 50  $\mu\text{m}$  (dispersion entre 35 et 60  $\mu\text{m}$ ).

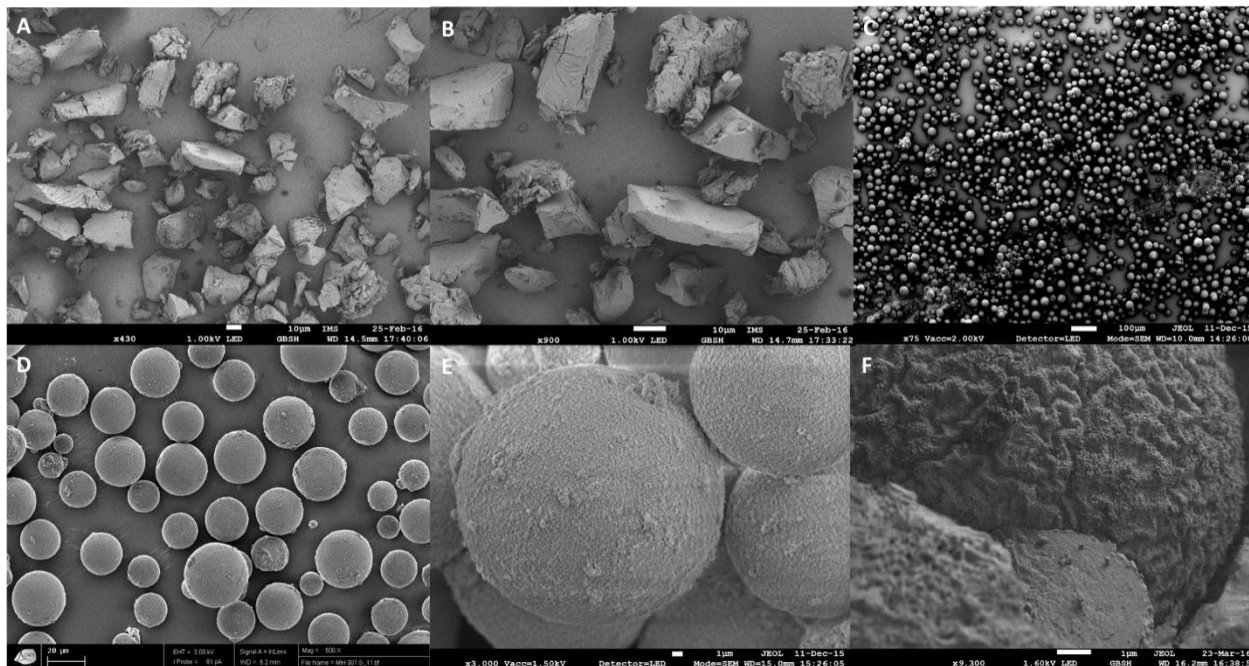


Figure 89 : Clichés MEB du MIP-25 (A), NIP-25 (B) monolithique, SMIP-26 à grand échelle (C), SNIP-26 (D) et SMIP-26 (E) préparé par Pickering inverse et SMIP-26 (F) avant lavage au HF. L'échelle microscopique est de 10  $\mu\text{m}$  pour A et B, 100  $\mu\text{m}$  pour C, 20  $\mu\text{m}$  pour D, et 1  $\mu\text{m}$  pour E et F.

## II.5. Etude caractéristique des hydrogels

La caractérisation de l'affinité et de la capacité des MIP/NIP synthétisés ont été effectuées par différentes analyses : une analyse frontale pour les **MIP/NIP-25** monolithiques et une analyse en batch pour les **SMIP/SNIP-26** synthétisés en Pickering inverse. La taille moyenne peu élevée des billes obtenues par Pickering inverse, nous pousse à opter pour l'analyse en batch plutôt que l'analyse frontale afin d'éviter les problèmes de surpression suite au remplissage des colonnes chromatographiques par ces billes hydrogels. Les isothermes d'adsorption obtenus, en appliquant les modèles de régression non linéaire, vont nous donner une idée sur la constante d'association **K<sub>a</sub>** (affinité avec le polymère) ainsi que le nombre de sites actifs dans les différents matériaux. La Figure 90 montre les isothermes d'adsorption obtenus pour chacun des MIP/NIP-25 et SMIP/SNIP-26 en traçant la quantité du template **59** adsorbée par le polymère (MIP ou NIP) en fonction de la quantité du template **59** libre en solution à 25°C.

Les quatre modèles d'isotherme sont de la forme S ou sigmoïdal dans le domaine de concentrations utilisé. En terme général, le modèle sous forme de sigmoïde est obtenu lorsque l'adsorption à la surface du polymère présente une hétérogénéité en termes d'énergie, mais aussi qu'il y a, en plus du phénomène classique d'interaction adsorbant-adsorbé, un phénomène de

coopérativité entre les molécules adsorbées ou interaction adsorbat-adsorbat. Cependant, chacun de ces phénomènes requiert l'usage d'un modèle d'isotherme différent afin de pouvoir extraire les informations les plus importantes et caractériser nos polymères.

Tout d'abord, le modèle combiné Freundlich-Langmuir (FL) a été utilisé car ce dernier décrit l'adsorption d'une monocouche de la molécule template sur la surface hétérogène qui se peuple le polymère imprimé.<sup>268</sup> Une autre équation décrivant l'adsorption des molécules en se basant sur le phénomène de coopérativité sur une surface homogène est celle du modèle de Hill (H). La seule différence entre ces deux modèles, ayant la même équation mathématique (Eq. 22)<sup>318</sup> réside dans le paramètre  $m$  qui aura une signification différente pour chacun. Dans le modèle de FL,  $m$  est le paramètre d'hétérogénéité dont sa valeur doit être comprise entre 0 et 1. Plus la valeur de  $m$  se rapproche de 1, plus la surface est hétérogène. Par contre, dans le modèle de Hill,  $m$  est le coefficient de Hill et qui donne une idée sur la coopérativité. Lorsque  $m = 1$ , cela indique une non-coopérativité (modèle de Langmuir), lorsque  $m$  est supérieur à 1, cela indique une coopérativité positive (l'adsorption devient plus facile quand la quantité des molécules augmente) et quand  $m$  est inférieur à 1 cela indique une coopérativité négative (l'adsorption devienne plus difficile avec l'augmentation de la quantité des molécules). Le modèle de Hill est aussi utilisé pour la caractérisation des MIPs.<sup>319</sup> L'équation qui sera utilisée dans la suite est la suivante :

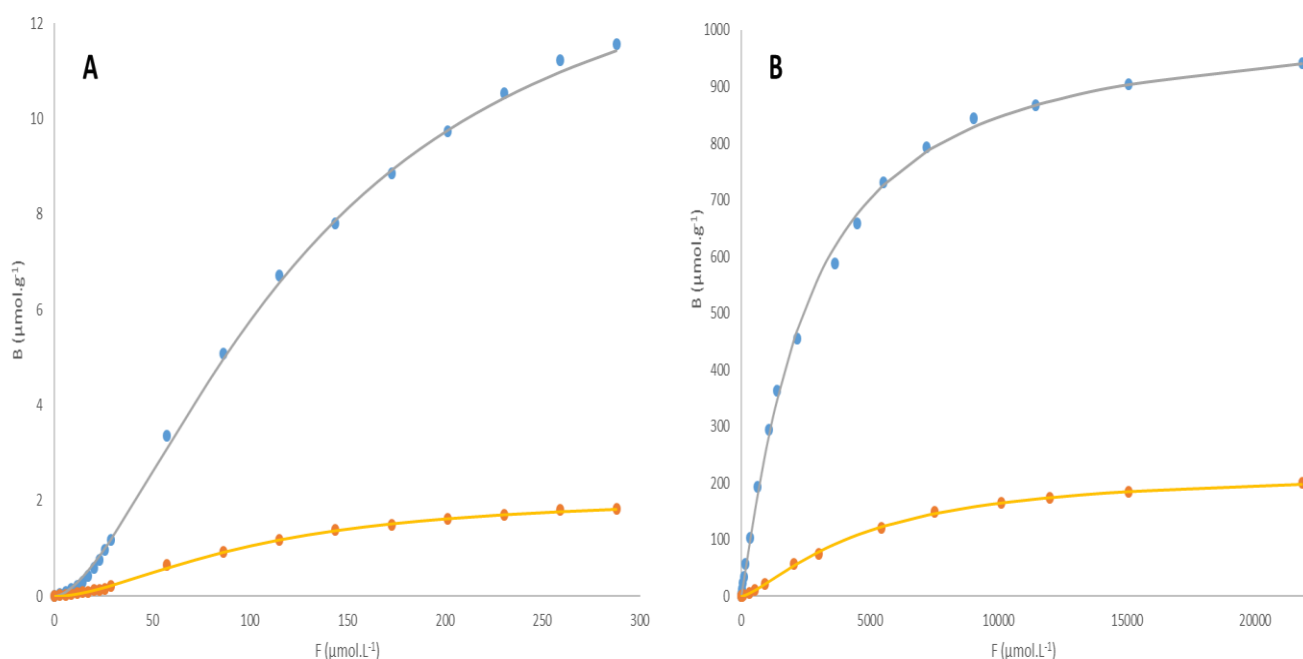
$$B = \frac{B_{max} \times K^m \times F^m}{1 + K^m \times F^m} \quad \text{Eq. 22}$$

$B$  étant la quantité de molécule template adsorbée sur le MIP ou le NIP ( $\text{mol.g}^{-1}$ ),  $B_{max}$  est la quantité maximale adsorbée ( $\text{mol.g}^{-1}$ ),  $m$  est le coefficient de Hill,  $K$  est la constante d'association ( $\text{L.mol}^{-1}$ ) et  $F$  est la concentration du template mise en contact dans la solution ( $\text{mol.L}^{-1}$ ). Les graphes obtenus par frontal ou par batch sont représentés dans la Figure 90 où  $B$  et  $F$  sont exprimés respectivement en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  et  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

<sup>318</sup> Koopal, L. K.; van Riemsdijk, W. H.; de Witt, J. C. M.; Benedetti, M. F., Analytical isotherm equations for multicomponent adsorption to heterogeneous surfaces, *J. Colloid. Interface. Sci.* **1994**, *166*, 51-60.

<sup>319</sup> Lavignac, N.; Brain, K. R.; Allender, C. J., Concentration dependent atrazine–atrazine complex formation promotes selectivity in atrazine imprinted polymers, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 138-144.





**Figure 90 : Comparaison entre le modèle d'adsorption expérimental du template 59 et le meilleur modèle de régression non linéaire obtenu.** Le graphe obtenu par analyse frontal pour le MIP-25 et NIP-25 obtenu par la polymérisation en bulk en utilisant le template 59, pour des concentrations libres entre 2,88 et 288  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (A), le graphe obtenu par batch pour le SMIP-26 et SNIP-26 obtenue par Pickering inverse avec le template 59 pour des concentrations libres entre 11 et 21830  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (B). MIP : cercles bleu, NIP : cercles oranges, modèle de Hill MIP : courbe grise, modèle de Hill NIP : courbe jaune.

Les paramètres des isothermes d'adsorption sont obtenus par régression non linéaire. Afin de déterminer la bonne adéquation entre le modèle théorique et expérimental, plusieurs tests statistiques ont été pris en compte tel que le coefficient de détermination  $R^2$ , le test de  $\chi^2$ , ainsi que le test de Fisher  $F_{\text{value}}$ .<sup>267</sup> Les modèles de Langmuir (L), Bi-Langmuir (Bi-L) et Freundlich (F) ont été utilisés ici vu leurs utilisations répétitives mais aussi en guise de comparaison avec le modèle retenu (Annexe 5). Les résultats obtenus par le modèle de Hill sont données dans le Tableau 32:

**Tableau 32 : Résultats obtenues par analyse frontal pour le MIP/NIP-25 et par batch pour le SMIP/SNIP-26** donnant les valeurs des constantes d'affinités ( $K_a$  ;  $\text{L.mol}^{-1}$ ), le nombre de sites actifs ( $B_{\text{max}}$  ;  $\text{mol.g}^{-1}$ ), le coefficient de détermination ( $R^2$ ), la valeur de Chi carré réduit ( $\chi^2$ ) et la valeur du test statistique de Fisher ( $F_{\text{value}}$ ).

Modèle	Paramètres	MIP-25	NIP-25	SMIP-26	SNIP-26
Hill	$B_{\text{max}}$ ( $\text{mol.g}^{-1}$ )	$(14,67 \pm 0,42) \times 10^{-6}$	$(2,13 \pm 0,05) \times 10^{-6}$	$(10,61 \pm 1,58) \times 10^{-4}$	$(2,25 \pm 0,37) \times 10^{-4}$
	$K$ ( $\text{L.mol}^{-1}$ )	267,0 $\pm$ 11.8	224,0 $\pm$ 8,1	275,4 $\pm$ 12,5	53,2 $\pm$ 4,2
	$m$	1,599 $\pm$ 0.049	1,700 $\pm$ 0.054	1,052 $\pm$ 0.027	1,342 $\pm$ 0.036
	$r^2$	0,99915	0,99895	0,99929	0,99951
	$\chi^2$	$1,68 \times 10^{-14}$	$5,49 \times 10^{-16}$	$9,27 \times 10^{-11}$	$2,99 \times 10^{-12}$
	F-test	13675	11561	20080	19678

La première information obtenue, c'est que les valeurs de  $m$  sont supérieures à 1, cela montre la présence de phénomène de coopérativité positive au niveau de l'adsorption des molécules. Pour le **SMIP-26** synthétisé par Pickering inverse, la valeur de  $m$  est très proche de 1 ( $1,052 \pm 0,027$ ). Cela peut révéler que l'adsorption sur la surface du polymère suit la théorie de Langmuir, et qui montre qu'il y a une adsorption spécifique homogène sur le polymère imprimé avec une molécule **59** occupant un site actif.<sup>197</sup> Les autres polymères obtenus ont une valeur de  $m$  supérieur à 1, cela veut dire qu'une ou plusieurs molécules **10** logent dans les cavités spécifiques. Probablement une molécule se lie par des interactions électrostatiques dans les cavités (ou non spécifique sur la surface) suivie par une deuxième qui vient s'adsorber sur la première par des interactions de type  $\pi$ -stacking avec la base nucléotidique de cette dernière. Ce phénomène peut être accentué par le gonflement du polymère dans le milieu aqueux. Donc le paramètre de Hill pourrait être présenté comme le nombre de molécules présentes dans un site actif.<sup>319,270</sup>

Cependant, et indépendamment des équations mathématiques, quand le modèle de Hill sera appliqué au modèle expérimental, le paramètre de coopérativité sera affecté par l'hétérogénéité des sites car les polymères imprimés sont généralement connus pour générer des sites de reconnaissances avec une distribution hétérogène. Donc, il est difficile de séparer l'hétérogénéité et la coopérativité donné par le même paramètre (valeur  $m$ ). Pour cela que la recapture du template **59** pour ces quatre formulations a été déterminée par le même modèle, afin de pouvoir bien comparer les paramètres  $B_{max}$  et  $K_a$  et pouvoir tirer les avantages et les inconvénients de ces deux techniques de polymérisation.

En termes de capacité, donné par le  $B_{max}$ , qui est l'équivalent de la quantité du template **59** adsorbée par masse du polymère, les MIPs montrent une plus grande adsorption en termes de quantité que les NIPs. Cependant, et afin d'évaluer les performances de l'adsorption sélective du MIP, nous avons comparé les quantités adsorbées par ce dernier à ceux du NIP qui génère des adsorptions non sélectives.

Les résultats obtenus montrent, qu'à une concentration libre de  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$  du template **59**, la *Binding capacity* (BC) pour le MIP/NIP-25 et le SMIP/SNIP-26 est égale respectivement à 6,5 et 48,2. Cela prouve que l'impression du template **59** a bien été établie pour les deux polymérisations. Cependant, cette différence est beaucoup plus importante pour le polymère obtenu par Pickering inverse que pour le polymère monolithique. Ces résultats sont également en accord avec des études antérieures qui comparaient les MIP monolithiques avec ceux obtenus par précipitation.<sup>320</sup> **Cela permet de conclure sur le fait que la synthèse des billes polymériques imprimées par Pickering inverse est plus avantageuse que la synthèse en masse.**

Aussi le BC est relié à la porosité du matériau et aussi à sa surface spécifique. Dans le cas des hydrogels, il est difficile de bien déterminer ces paramètres et cela est dû à leurs propriétés de gonflement dans un milieu aqueux. Donc le taux de gonflement vient dans ce cas nous donner une idée sur ces paramètres. Pour ça, Nous avons mesuré le taux de gonflement, qui est de 21 et 18 pour le **MIP-25** et **NIP-25** respectivement, et de 13,3 et 15,9 pour le **SMIP-26** et **SNIP-26** respectivement.

---

<sup>320</sup> Mohajeri, S. A.; Karimi, G.; Aghamohammadian, J.; Khansari, M. R. Clozapine Recognition *via* Molecularly Imprinted Polymers; Bulk Polymerization Versus Precipitation Method, *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *121*, 3590-3595.

Et ces résultats corrèlent bien avec les études faites dans la littérature pour les poly(NIPAm) de type hydrogel.<sup>321</sup> Bien que le taux de gonflement soit assez important dans un milieu aqueux pour les quatre polymères, cela n'explique pas le BC pour chaque MIP/NIP car les taux de gonflement sont à peu près similaires pour le MIP et le NIP de chaque couple avec une légère différence qui peut être induite par l'erreur expérimentale. Néanmoins les capacités assez élevées sur le **SMIP-26** sphériques obtenu par Pickering inverse est très intéressante surtout pour l'administration des principes actifs. Outre, la molécule template utilisée dans ce cas de figure doit se dissocier dans les conditions physiologiques désirées et l'équilibre avec le polymère doit être réversible pour une bonne libération.

Ensuite, il est important de comparer les constantes d'association (Tableau 32) qui exprime la force de liaison entre le template et la cavité spécifique à cette dernière. La  $K_a$  obtenue pour le SMIP-26 est la plus élevée. Cette valeur obtenue, si on prenait en compte le fait que le polymère présentait une hétérogénéité de surface et aussi une coopérativité positive, était la moyenne de toutes les constantes d'association développés par le template **59** sur les différents sites de reconnaissance hétérogène du polymère. Donc, pour le **SMIP-26** et **SNIP-26**, la valeur de  $K_a$  est moyenné sur un large domaine qui s'étend de  $K_{min}$  jusqu'à  $K_{max}$  donné respectivement par  $1/F_{max}$  et  $1/F_{min}$ ,<sup>268</sup> avec un F (concentration libre du template **10** dans la solution) qui varie entre 11 et 21830  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Alors que le  $K_a$  pour le **MIP-25** et **NIP-25** a été moyenné sur un plus petit domaine et qui varie entre 2,88 et 288  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Malgré ça, le **SMIP-26** possède le  $K_a$  le plus élevé. **Cette valeur est très intéressante au niveau de la libération de la 5'-AMP car plus elle est élevée, plus la molécule bioactive est retenue dans le site actif diminuant ainsi le relargage instantané en contact avec le milieu physiologique.**

## II.6. Etude cinétique de la libération de la 5'-AMP

La forme sphérique du **SMIP-26** offre un avantage considérable et qui consiste à éliminer le gonflement anisotropique associé aux autres formes géométriques et améliorer ainsi le contrôle du relargage du bioactif.<sup>322</sup> Ainsi la cinétique du relargage a été étudiée sur les particules sphériques. Pour cela, avant d'étudier le relargage de la 5'-AMP au cours du temps, nous avons commencé par charger 50 mg de chacun des polymères synthétisés (**SMIP/SNIP-26**) dans une solution aqueuse concentrée en 5'-AMP (30mM) pendant 24h. Les quantités de la 5'-AMP chargées sur les polymères ont été quantifiées et les résultats sont de 316,05  $\text{mg.g}^{-1}$  ( $9.1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.g}^{-1}$ ) pour le **SMIP-26** et de 66,03  $\text{mg.g}^{-1}$  ( $1.9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.g}^{-1}$ ) pour le **SNIP-26**. Ces quantités de la 5'-AMP chargées ont été très proche des quantités de  $B_{max}$  donnés par l'isotherme d'adsorption et qui sont de  $10.61 \cdot 10^{-4} \text{ mol.g}^{-1}$  pour le **SMIP-26** et  $2.25 \cdot 10^{-4} \text{ mol.g}^{-1}$  pour le **SNIP-26**.

L'étude de relargage a été induite dans un milieu similaire à celui de la peau. En effet selon une étude préliminaire, la peau a un pH acide moyen de 5 et une température de 35 °C. Afin de pouvoir travailler dans ces mêmes conditions, nous avons opté pour une solution aqueuse d'acide

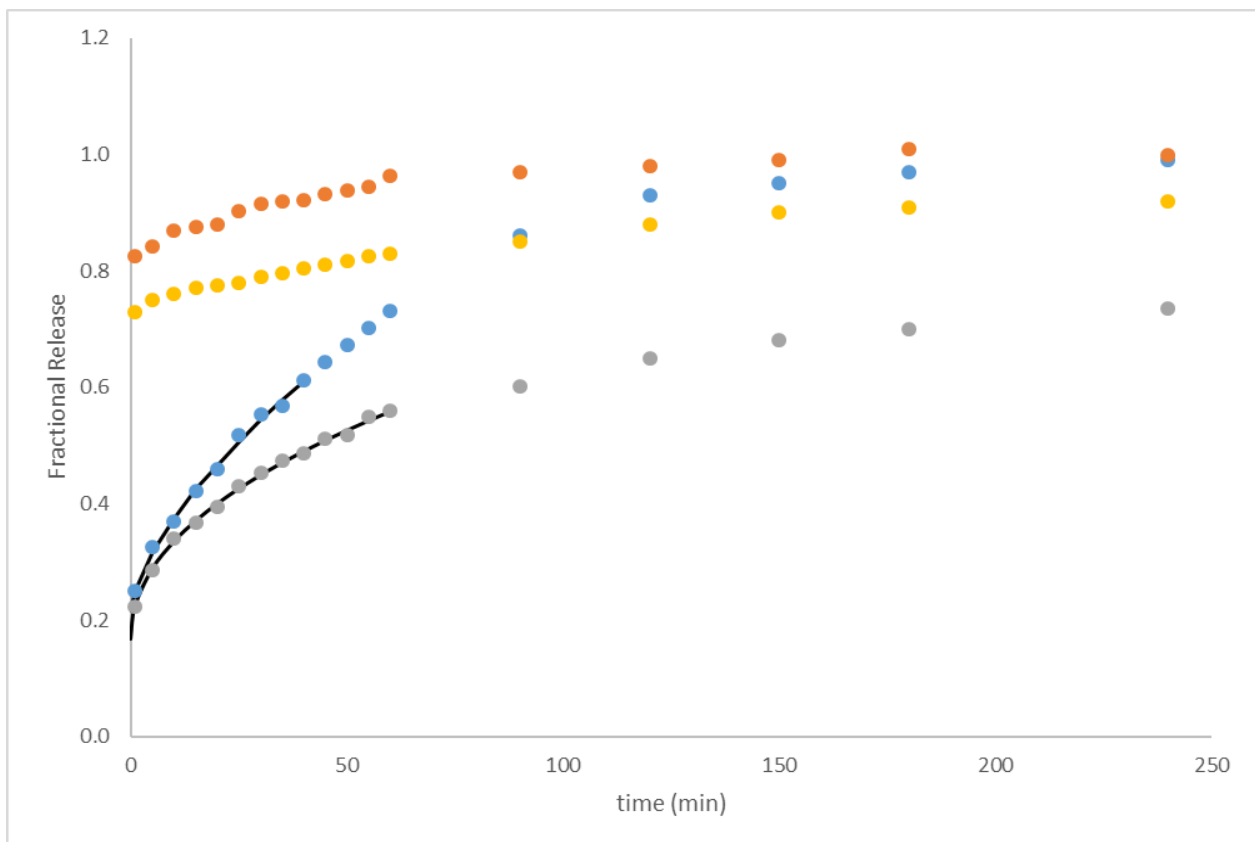
<sup>321</sup> Adrus, N.; Ulbricht, M., Rheological studies on PNIPAAm hydrogel synthesis *via* in situ polymerization and on resulting viscoelastic properties, *React. Funct. Polym.* **2013**, *73*, 141–148.

<sup>322</sup> Salian, V. D.; Byrne, M. E., Controlled Drug Release from Weakly Crosslinked Molecularly Imprinted Networks: The Benefit of Living Radical Polymerization, *Macromol. Chem. Phys.* **2013**, *214*, 2355–2366.

lactique à 5 mM, pH 5 et dans deux températures différentes : 25 et 35 °C.<sup>323</sup> Différents modèles cinétiques de relargage ont été appliqués sur les résultats obtenus afin de pouvoir mieux comprendre les mécanismes de libération et le rôle jouait par la température. Ces modèles ont été choisis car ils sont les plus utilisés dans les études de libération, comme le modèle de Baker et Lonsdale qui a été développé en 1974 à partir du modèle décrit par Higuchi, pour les matrices sphériques<sup>227</sup> ou le modèle de Korsmeyer et Peppas décrit simplement la libération du principe actif où la valeur de la variable  $n$  caractérisait le mécanisme de libération (

Tableau 5).<sup>276</sup>

La Figure 91 montre le rapport de la quantité du 5'-AMP libérée sur la quantité de la 5'-AMP initialement absorbée par la matrice polymérique ( $M_t/M_\infty$ ) obtenu en fonction du temps, et qui montre trois domaines intéressants. Le premier domaine est de courte durée (inférieure à une minute) et qui montre un relargage instantané appelé *burst* et qui est non négligeable. Ce phénomène est présenté dans les différents modèles par le terme  $b$  et qui représente le *burst* (relargage instantané) dans le milieu. Ce phénomène a été prouvé par Huang and Brazel,<sup>324</sup> lorsqu'ils ajoutent au modèle de Korsmeyer et Peppas une constante pour pouvoir s'adapter au saut de concentration à  $t = 0$ . Le terme  $b$  est déterminé par extrapolation des données au début du relargage.



<sup>323</sup> Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk, H.; Finkel, P., Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora, *Int. J. Cosmet. Sci.* **2006**, *28*, 359-370.

<sup>324</sup> Huang, X.; Brazel, C. S., On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *J. Control. Release.* **2001**, *73*, 121-136.

**Figure 91 : Ajustement du modèle théorique selon les résultats de relargage obtenu: SMIP-26 à 35°C (cercle gris), SNIP-26 à 35°C (cercle jaune), SMIP-26 à 25°C (cercle bleu) et SNIP-26 à 25°C (cercle orange); dans un tampon lactate (5mM, pH 5); courbes (ligne noire): obtenue à partir du modèle fractionné  $n \leq 0,6$ , symboles: résultats expérimentaux.**

Le choix du meilleur modèle est basé, comme pour les isothermes d'adsorption, sur le coefficient de détermination  $R^2$ , ainsi que le test de Fisher  $F_{value}$ , obtenus en traçant les résultats suivant l'équation de chaque modèle. Plus la valeur de  $R^2$  est proche de 1, et plus la  $F_{value}$  est petite, plus le modèle est ajustable et proche du modèle expérimental. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 33.

**Tableau 33 : Les paramètres obtenus suite à la régression non linéaire selon les modèles de Korsmeyer-Peppas et Baker-Lonsdale.** Les paramètres sont extraits de la régression non linéaire effectuée sur 60% de la libération. Les cases grises ont montré le meilleur modèle.

Modèle	SMIP-26 (25°C)					SMIP-26 (35°C)				
	n	K	b	$R^2$	$F_{value}$	n	K	b	$R^2$	$F_{value}$
Baker-Lonsdale	-	0,0091	0,0578	0,9909	1327	-	0,0051	0,0634	0,99034	2242
Korsmeyer-Peppas	0,6524	0,03568	0,2152	0,992	25737	0,473	0,05652	0,167	0,99762	33457

Le meilleur modèle obtenu, qui est donné par les meilleures paramètres statistiques, est celui de "Korsmeyer-Peppas", qui exprime un relargage fractionné de la 5'-AMP défini par la quantité de la 5'-AMP libérée à un temps "t" (Mt) divisé par la quantité du 5'-AMP chargée dans le SMIP-26 ( $M_\infty$ ), en fonction du temps. La constante  $k$  est liée à la vitesse de la réaction, la valeur  $n$  représente l'exposant de diffusion et qui dépend de la nature du mécanisme de libération, et enfin  $b$  qui le paramètre exprimant le *burst* ou le relargage initial instantané.

Dans notre cas, pour un polymère sphérique, si la valeur de  $n$  (exposant de diffusion) est comprise entre  $0,43 < n < 0,85$ , cela peut indiquer une diffusion irrégulière, c'est-à-dire une diffusion non fickienne. Dans ce cas de figure, le relargage du bioactif est contrôlé par la diffusion et relaxation du polymère, comme par exemple le gonflement. Les microsphères imprimées de type hydrogel synthétisé par Pickering inverse (**SMIP-26**) montre un profil de relargage différent de celui du SNIP-26. Premièrement, la quantité du 5'-AMP relargué au début d'une manière quasi-instantanée est beaucoup plus élevée pour le NIP que pour le MIP, à n'importe quelle température, en contact avec la solution aqueuse. Pratiquement, 80% de la quantité de la 5'-AMP chargée a été relargué par le **SNIP-26** lors de ce *burst* contrairement au **SMIP-26** auquel ce *burst* est beaucoup moins important, proche de 20% de la quantité du 5'-AMP chargé sur ce dernier. Par contre en traduisant ce pourcentage du 5'-AMP relargué par le **SMIP-26** et le **SNIP-26**, on remarque que les quantités sont assez proches. Cela montre que le phénomène du *burst* exprime le relargage de la 5'-AMP adsorbé sur la surface des polymères par le biais des interactions non spécifiques. Ça montre que la 5'-AMP se libère plus facilement de la matrice NIP.

Vu que le MIP possèdent des sites d'interactions spécifiques à la 5'-AMP qui sont distribués dans toute la surface de la bille (à l'intérieur et l'extérieur), ça montre que le 5'-AMP se libère suivant

des phénomènes de diffusion dû à l'augmentation du gradient de concentration, mais aussi au phénomène de gonflement du polymère. Cependant, la valeur  $n$  de diffusion est de 0,65 et 0,47 pour le **SMIP-26** à 25 et 35 °C respectivement. Ces valeurs sont supérieures à 0,43 qui est la valeur limite séparant la diffusion fickienne du non fickienne. A 25 °C, le gonflement du polymère ainsi que la diffusion peuvent expliquer le profil de relargage obtenu, avec potentiellement un autre phénomène qui peut être de la relaxation du polymère car la valeur de  $n$  est proche de 0,43. Mais à 35°C, il semble que les deux processus de diffusion et de relaxation avaient un taux comparable. Dans ce cas, la relaxation est devenue plus importante en raison de l'incorporation du monomère fonctionnel **11** en quantité importante en monomère fonctionnel. Ce monomère étant thermosensible, cela engendre un changement de conformation du polymère, étant donné qu'on est à une température supérieure à sa LCST (qui est de 32°C). Dans ce cas de figure et à 35°C, le **SMIP-26** a changé de polarité, d'hydrophile à hydrophobe, engendrant ainsi une rétractation du polymère et son repliement sur lui-même dans la solution aqueuse. De ce fait, la 5'-AMP se retrouve emprisonnée à l'intérieur du polymère et sa libération se retrouve ralenti et prolongé sur le temps. Ceci a démontré que la température joue un rôle important sur la libération de le 5'-AMP à partir des polymères imprimés sphériques.

**Au final, selon les résultats obtenus, le polymère imprimé synthétisé par Pickering inverse, formant des microbilles de type hydrogel, présente une libération prolongée réelle par rapport au polymère non-imprimée, quelle que soit la température.**

### III. Conclusion

Cette étude décrit la conception d'un polymère à empreintes moléculaires sphérique de type hydrogel sélectif pour l'adénosine mono-phosphate en utilisant la technologie de polymérisation par Pickering inverse. Selon les résultats obtenus, plusieurs conclusions ont été déduites :

- L'utilisation de différents monomères fonctionnels a permis de bien stabiliser le complexe de pré-polymérisation en développant différents types d'interactions : des interactions électrostatiques et des interactions non covalentes.
- L'isotherme d'adsorption a été obtenue en appliquant les modèles de régression non linéaire. Ces derniers ont permis de choisir le modèle de Hill. Ce modèle a mis en évidence le phénomène de coopérativité positive (plus qu'une molécule de la 5'-AMP peut se loger dans un site de reconnaissance) et aussi une hétérogénéité au niveau énergétique.
- Les SMIP/SNIP-26 préparés par Pickering inverse ont montré une capacité de charge et un facteur d'impression plus élevés que les MIP/NIP-25 monolithiques
- La libération du nucléotide bioactif en question chargé sur les MIP sphériques semble suivre trois mécanismes de relargage comme le montre le modèle modifié de Korsmeyer-Peppas.
- Le relargage instantané ou *burst* joue un rôle immédiat sur la désorption de la molécule située sur la surface et qui sont retenues par des interactions non spécifiques. C'est pour cela que cet effet du *burst* est plus prononcé au niveau du NIP. Le gonflement du polymère qui engendre une perturbation au niveau des sites spécifiques et engendre la dissociation de cette molécule. Enfin le phénomène de diffusion lent du 5'-AMP dans le milieu aqueux.
- Le polymère a montré une réponse thermosensible en diminuant le taux de libération de la 5'-AMP et qui est dû à l'incorporation d'un monomère thermosensible modifiant ainsi la conformation du polymère avec l'augmentation de la température et diminue ainsi le coefficient de diffusion.
- Enfin le **SMIP-26** a montré une libération durable sur le temps, qui est de 3h contrairement au **SNIP-26** (1 h) ce qui est prometteur dans le domaine de la cosmétique.

Les résultats obtenus sont prometteurs. Ils peuvent être améliorés en essayant de diminuer la polydispersité des billes (taille) afin de mieux contrôler les capacités de charge.

## IV. Partie experimentale

### IV.1. Apparatus and reagents

Adenosine-5'-monophosphoric acid (99%, 5'-AMP) was purchased from Thermo Fisher, Karlsruhe, Deutschland. Dimethylsulfoxide (analytical grade, DMSO) was purchased from FisherScientific, Illkirch, France. *N*-isopropylacrylamide (>98.0%, NIPAm) was purchased from TCI Europe NV, Zwijndrecht, Belgium. Hydroxylamine solution (50 wt.% in H<sub>2</sub>O, 99.999%), *N,N'*-Methylenebis(acrylamide) (99%, MBAm), 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate (98%, DMAEM), silica nanopowder (spec. surface area 175-225 m<sup>2</sup>/g, 99.8%, 12 nm diameter), trimethylsilyl chloride ( $\geq$  99%, TMSCl), toluene (HPLC grade  $\geq$  99.9%) and hydrofluoric acid 48 wt. % in H<sub>2</sub>O ( $\geq$ 99.99%, HF) were purchased from Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France. 1,2-Bis(2-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)propan-2-yl)diazene dihydrochloride (95%, VA-044) was purchased from Fluorochem, Hadfield, United-Kingdom. Ultra-High Quality water (18 M $\Omega$ .cm) was produced from an Elga apparatus, Villeurbanne, France.

### IV.2. Silica nanoparticles derivatization

In order to use the polymerization by inverse Pickering emulsion, the dried silica nanoparticles are derivatized in order to make them hydrophobic. The weight ratio nanoparticles / derivatization agent is found to be optimized to 10/1.<sup>311</sup> For this, in a 100 mL flask, 3 g of silica nanoparticles are added to 30 mL of toluene, with stirring to obtain homogeny suspension. Then 0.300 mg of TMSCl are added slowly to suspension. It is left stirring for 15 min at room temperature. After, the solvent is allowed to evaporate overnight to obtain dry nanoparticles. Silica nanoparticles are stored under an argon atmosphere in a dry environment.

### IV.3. Polymers synthesis

#### a) Synthesis of molecularly imprinted polymers in bulk polymerisation

The details of formulation was presented in table 24. The procedure is to dissolve 1 mmol of template **59** in DMSO in borosilicate polymerization tube, and 1 mmol of the functional monomer **60** was added. The solution was mixed using ultrasounds until all the components were solubilized. After this, the second functional monomer **24** is added and mixed. Then MBA was introduced and mixture was degassed for 10 min with nitrogen in order to remove dissolved oxygen. After the initiator was added the tube was then sealed and the polymerization was initiated by placing the tubes in an UV oven. Polymerization was allowed to continue overnight, after which the tubes were removed, broken with a hammer and the monolithic polymers recovered. The resulting monoliths were lightly crushed to give smaller particles, which were extracted several times with the same volumes of a MeOH/NH<sub>3</sub>(aq) pH 10 (50/50, v/v) solution, under sonication during 30 min. The pH is adjusted to 10 units because it allowed to deprotonate the amine function of DMAEM (pKa = 8.42) and thus cleave the electrostatic bond between the MIP and the template. The extraction of the template is finished when the absorbance measured at the maximum wavelength of the 5'-AMP in the washing solution (262 nm) is practically equal to zero. The polymers were then crushed and sieved to 25-60  $\mu$ m. These particles were subjected to sedimentation in acetone (3 times) to remove



fine particles prior to further use. Non-imprinted polymer (NIP) was prepared in the same manner without adding the template.

#### **b) Synthesis of molecularly imprinted polymers by inverse pickering polymerisation**

The formulations for the preparation of microspheres are summarized in Table 25, in the Supporting Information. 30 mg of derivatized silica nanoparticles and 10 g of toluene was mixed in a 20 mL clear vial and sonicated for 5 min to form a homogeneous suspension. Subsequently, the aqueous solution containing the template **59** (405mg), the first functional monomer **60** (167mg), the first functional monomer **24** (528mg), MBA (89mg), 2.8g of water and water-soluble initiator VA-044 (2 mg), was added in the oil phase, sonicated for 2 min and the mixture was emulsified with a vortex mixer at 3000 rpm for 3 min to obtain a stable inverse suspension. This aqueous solution was deoxygenated by bubbling N<sub>2</sub> at room temperature for 10 min before mixing. The emulsion is polymerized in UV oven overnight to obtain hydrogel microspheres. The beads after filtration is washed with methanol three times and were dried at 50°C under vacuum for 12 h to remove water and toluene. In order to remove hydrophobic silica nanoparticles on the surface of SMIP or SNIP, the hydrogel is placed in 15 mL polyethylene centrifuge tubes containing 24% HF aqueous solution and were placed in a ThermoMixer C (Eppendorf, Dutscher, Brumath, France), vibrated for 48h at ambient temperature. Later on, SMIP microspheres are washed to remove template following the same procedure that used with irregular particles obtained after bulk polymerization. Following, the polymeric particles are washed with methanol and placed in a vacuum heated desiccator. Correspondingly, non-imprinted polymers (SNIP) are prepared with the same steps without adding the template.

#### **IV.4. Swelling measurement**

In order to better elucidate the difference between the dry and swollen state of the polymers, swelling tests are performed in water. Swelling measurements are made by gravimetric measure. The known weight of dry hydrogel sample (around 10 mg) is measured in eppendorf tube and suspended in 1 mL pure water at 25°C. After 24 h, the hydrogel sample is removed, quickly blotted free of surface water using filter paper and weighed on an analytical balance (reproducibility 0.03 mg). The swelling ratio is calculated from the equation: Swelling ratio = Swollen weight of the sample / Dry weight of the sample.

#### **IV.5. Quantification of 5'-AMP in solution**

The adsorption isotherms, for the hydrogels from bulk materials, were determined using a multistep staircase frontal analysis. The staircase frontal chromatograph with a series of programmed concentration steps is performed on packed columns containing polymer particles. The concentration of template in mobile phase, constituted of aqueous hydroxylammonium acetate 1mM pH 7, is gradually increasing over time with each step change. Each step lasts until the subsequent equilibration on the column is not achieved. When the equilibrium is obtained and all the binding sites are saturated at the given concentration, a breakthrough curve is recorded as a step of a signal. Therefore, the adsorption isotherms are drawn using the calculated amount of analyte bound on the column in each step with **Eq. 3**, by integrating the surface of each step and approximating to the concentration bound.

Where  $V_{R,n+1} - V_0$  is the volume at the time of the  $(n+1)^{\text{th}}$  step,  $C_{n+1}$  and  $C_n$  the corresponding concentrations of each step,  $F$  the phase ratio and  $V_0$  the void volume of the column corrected for the hold-up and extra-column volumes.  $q^*_{n+1}$  and  $q^*_n$  are the corresponding quantities bound on stationary phase at each step.

For spherical material, the adsorption isotherms are determined using batch method. So, 20 mg of each MIP and NIP polymer particles were placed in 1.5 mL eppendorf tubes, and 1 mL of aqueous hydroxylammonium acetate 1mM, pH 7, solution with different concentration of 5'-AMP is added. Each suspension was gently shaken for 16 h at 25°C in ThermoMixer C, and the supernatants are separated by centrifugation. The concentration of 5'-AMP in the supernatant solutions is measured by HPLC.

All aqueous solutions of 5'-AMP are analyzed in an Agilent 1260 Infinity HPLC chromatograph (Agilent Technologies, Les Ulis, France). The chromatograph was equipped with a 1260 binary pump (G1311B), a 1260 standard autosampler (G1329B), a 1260 thermostated column compartment (G1316A) and a 1260 diode array detector (G4212B) with a Max-Light cartridge cell (1  $\mu$ L volume, 10 mm cell path length). A silica grafted C18 HPLC column (Prevail® C18, 150 mm  $\times$  3 mm i.d., 5  $\mu$ m particle size) (Grace, Epernon, France) was used. The volume of sample analyzed was 5  $\mu$ L. The temperature of the oven was set at 30 °C. The separation of analytes was performed using isocratic elution with ammonium acetate 25mM pH 7 aqueous solution: acetonitrile (95:5, v/v) with a flow rate of 0.4 mL/min. 5'-AMP is evaluated at 260 nm.

#### **IV.6. Kinetic study of 5'-AMP release**

Beads hydrogels from inverse inverse Pickering emulsion (50 mg) was soaked in 1.5 mL of 5'-AMP aqueous hydroxylammonium acetate solution (1 mM) pH 7, at 28.8 mM. After 24 h, the suspension is centrifuged at 5000 rpm for 5 min and the microparticles were recovered and dried at 40°C overnight in a vacuum heated desiccator. 5'-AMP concentration in the supernatant was quantified using the HPLC method and the mass of 5'-AMP loaded in the polymer particles was determined. The same procedure was performed using for the NIP hydrogel. The kinetic study of 5'-AMP release from MIP and NIP hydrogel microbeads is conducted by placing 50 mg of each loaded material in a 50 mL flask containing 40 mL of aqueous lactic acid solution, 5 mM, pH 5.5, to mimic the skin pH. The suspension is gently stirred with a magnetic bar. In this kinetic study, the 5'-AMP concentration was measured by taking 200  $\mu$ L of solution each time, filtrating the volume and injecting directly on HPLC.



## Conclusion Générale

Ce travail de thèse est une étude exploratoire destinée à développer différents systèmes polymériques imprimés moléculairement pour la libération d'un nucléoside (la ribavirine) et nucléotide (5'-AMP). Différentes formulations ont été mises en place pour que la molécule d'intérêt puisse se complexer au sein du polymère poreux grâce à des interactions non covalentes. Ces différents systèmes de libération se sont distingués par leurs profils de relargage et cinétique de libérations distinctes dans un tampon aqueux mimant le milieu physiologique pulmonaire.

Une étude bibliographique a permis d'appréhender l'impact des maladies respiratoires dans le monde, principalement la grippe (Influenza A) qui touche l'épithélium respiratoire cilié au sein des poumons. Le choix a été porté sur ces derniers comme voie d'administration, car elle est non invasive et ciblée. La ribavirine reste un modèle intéressant pour la lutte contre les virus respiratoires à ARN. Cette molécule a été prise comme modèle pour le développement de nos cargos polymériques dans le traitement de la grippe. Les systèmes polymériques de libération prolongée ont été synthétisés pour être biocompatibles en utilisant des monomères développant des interactions spécifiques avec la ribavirine. La technologie des empreintes moléculaires associée à ces systèmes s'est montrée prometteuse. Car, cette technologie a permis de créer des particules de polymère de type cargo conduisant à des libérations prolongées du principe actif gouvernées par la température, la relaxation et la force d'interaction avec la ribavirine du système polymérique.

Nous avons développé différentes formulations de MIPs en bulk afin de synthétiser facilement des systèmes de libération de type hydrogel. Ainsi, deux types d'hydrogels imprimés ont été formulés dans l'eau avec la ribavirine (**6**) comme molécule template. Le choix des monomères fonctionnels s'est porté sur l'acrylamide (**45**) et le *N*-isopropylacrylamide (**24**) qui est un monomère thermosensible. Les études prédictives ainsi que les études expérimentales de ratio template : monomère fonctionnel ont permis de conclure que pour ces deux monomères le meilleur ratio 1 : 6 pour avoir un MIP sélectif de la ribavirine dans l'eau. L'extraction de la ribavirine des polymères en bulk a été optimisée ; il y a besoin de 6 lavages consécutifs de 1h chacun en utilisant les ultrasons pour libérer les cavités du polymère de la quasi-totalité de la ribavirine. Les résultats d'adsorption montrent que le **MIP-03** (à base d'acrylamide) suit le modèle de Bi-Langmuir où la première population de sites d'adsorption est de l'ordre de  $3,25 \cdot 10^{-5}$  mol/g avec une faible affinité ( $K_a : 0,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) et où la deuxième population de cavités est de  $1,4 \cdot 10^{-5}$  mol/g mais avec une forte affinité ( $K_a : 173 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ). Par contre, le **MIP-07** (à base de NIPAm), possède une distribution beaucoup plus hétérogène des sites d'adsorption. Le modèle de Hill permet de prendre en compte un phénomène de coopérativité positive présent sur ce MIP. Ce modèle permet de déterminer une capacité de  $5,98 \cdot 10^{-6}$  mol/g et une constante d'affinité moyenne de  $694 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Ensuite, l'utilisation du mélange MeCN/Eau (87/13, v/v) comme solvant de charge (25 °C, 16 h) a permis d'obtenir un taux de recapture maximal de la ribavirine dans les deux matériaux. Enfin, les profils de libération de la ribavirine pour les polymères imprimés sont retardés comparativement aux polymères non imprimés. Ce retard est obtenu grâce aux empreintes moléculaires créées sur la surface des deux polymères imprimés qui montrent plus d'affinité pour la ribavirine que les interactions non spécifiques identifiées grâce aux polymères non imprimés. La libération de la ribavirine est gouvernée par un mécanisme classé comme non-Fickien. Ce dernier indique que des phénomènes de

relaxation du polymère ainsi que la diffusion régissent le relargage de la ribavirine. Des études de cytotoxicité, d'immuno-stimulation et virologiques ont montré que ces deux cargos polymériques de type polyacrylamide sont biocompatibles et permettent d'obtenir une libération plus faible de la ribavirine dans le milieu cellulaire. Cet effet retard permet aux matériaux chargés d'avoir le même effet sur des cellules épithéliales bronchiques humaines infectées qu'une solution de ribavirine seule à 30 µg/mL. Cela montre que les hydrogels développés remplissent leur fonction dans des études in vitro, et montrent l'importance d'une libération prolongée d'un principe actif par rapport à une solution de concentration initiale fixe et élevée.

Une nouvelle approche de synthèse de MIPs sélectif à la ribavirine en se basant sur l'approche de dummy-template. Pour cela, la 2',3',5'-tri-O-acétyl-ribavirine (**56**) a été synthétisée afin d'améliorer la solubilité de la molécule antivirale dans un solvant organique aprotique. L'utilisation de solvants polaires aprotiques permettent ainsi de renforcer les interactions non covalentes présentes au sein du complexe de pré-polymérisation. Les monomères fonctionnels sont le MAA (**19**), commercialement disponible, et deux autres, le N-acryloyluracile (**57**) et le N-acryloylthymine (**58**), synthétisés au laboratoire. Le premier a été choisi pour sa forte affinité connue envers les bases puriques, et les autres pour développer une stratégie de reconnaissance se basant sur les complexations de type complémentarité de bases nucléiques type Watson-Crick. L'étude des interactions monomère - dummy-template a permis de démontrer qu'une forte affinité existe entre chacun des monomères **19**, **57** et **58** et la partie triazole substitué amide de la ribavirine triacétylée. Aussi, cette étude a permis de mettre en évidence le ratio 1:1 entre le dummy-template **56** et chacun des monomères **57** et **58**. Les résultats des analyses frontales ont permis de déterminer que l'adsorption suit le modèle de Freundlich. Ce modèle confirme une hétérogénéité de distribution en énergie des sites d'adsorption sur chacun des matériaux. Les constantes d'association  $K_a$  pour le **MIP-09** ( $12,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) et le **MIP-11** ( $15,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) sont plus élevées que celles obtenues pour chacun des **NIPs**. Le **MIP-11** a montré aussi une plus grande capacité que son **NIP**. Enfin, l'application des modèles de cinétique a permis, grâce au modèle d'Higuchi, de constater que le relargage était gouverné par la diffusion du solvant à travers les pores de la particule et le transport de la ribavirine vers la surface du matériau. Enfin, les études biologiques ont prouvé que les polymères à base d'acide méthacrylique (**19**) sont des polymères biocompatibles. Les **MIP-10** et **MIP-11** contenant les monomères **57** et **58**, respectivement, ont montré cependant une légère cytotoxicité. Mais, l'utilisation de ces matériaux reste envisageable pour des cargos polymériques utilisés pour des maladies non chroniques, telle que la grippe.

Dans une deuxième partie, nous avons transférer les formulations pour la synthèse en bulk développées précédemment vers la synthèse de microparticules sphériques. Le but étant de réussir à synthétiser des polymères à empreintes moléculaires sphériques en utilisant la technique de la polymérisation par précipitation. Le dummy-template est le même que celui utilisé en bulk, la 2',3',5'-tri-O-acétyl-ribavirine (**56**), les monomères sont le MAA (**19**) et le NAT (**58**), l'agent réticulant est l'EGDMA, et le solvant porogène est l'acétonitrile. En utilisant la technique de polymérisation par précipitation, nous avons pu obtenir des microsphères imprimées monodisperses de taille moyenne comprise entre 2 et 4 µm pour les différentes formulations. Une étude comparative de l'adsorption de la ribavirine (**6**) et de son dummy-template (**56**) a permis d'observer une augmentation de la quantité adsorbée par les polymères imprimés et non imprimés sphériques comparativement avec

les polymères obtenus en Bulk. L'étude cinétique de la libération de la ribavirine à partir de ces polymères sphériques a montré des profils de libération différents entre les SMIPs et les SNIPs. Les modèles cinétiques ont montré que la libération de la ribavirine du **SMIP-13** (avec le MAA) suit le modèle de Korsmeyer-Peppas qui indique que le profil de relargage est gouverné par un mode de libération non fickien. Tandis que le **SMIP-19** (avec le NAT) suit le modèle de Lonsdale-Baker indiquant que la diffusion et le transport du solvant gouverne la libération de la ribavirine. Afin d'améliorer les performances ou de suivre la dispersion dans une culture cellulaire des microbilles polymériques imprimées, nous avons procédé à l'ajout de différents co-monomères à la formulation. Le premier co-monomère ajouté est un co-monomère fluorescent, la fluorescéine-*O*-acrylate, qui a permis l'obtention d'un polymère imprimé sphérique fluorescent. Ainsi, nous avons pu suivre la bio-distribution du SMIP en milieu cellulaire *in vitro*. Cette étude a démontré que les particules micrométriques sphériques d'une taille de quelques microns pénétraient la cellule épithéliale bronchique humaine. Cette observation permet de penser qu'une partie de l'antiviral doit être libérée dans le milieu intracellulaire. En deuxième lieu, l'ajout d'un co-monomère thermosensible (**24**) à la formulation du **SMIP-19** a permis d'augmenter sa capacité par rapport au MIP avec du MAA seulement. Mais, cette augmentation de la quantité adsorbée des molécules **6** et **56** se fait au détriment de la sélectivité. Le NIP correspondant voit aussi sa capacité augmentée. Par contre, ce SMIP thermosensible voit sa vitesse de libération de la ribavirine ralentir à une température de 38 °C comparativement au **SMIP-19**.

Le dernier chapitre présente la conception et la synthèse d'un hydrogel à empreinte moléculaire sélectif du nucléotide 5'-AMP en utilisant la technologie d'émulsion de Pickering inverse. Les monomères utilisés dans la formulation du MIP ont permis de stabiliser le complexe de pré-polymérisation en développant une interaction électrostatique, une liaison hydrogène et une interaction apolaire avec la 5'-AMP. L'isotherme d'adsorption peut être tracé en utilisant le modèle de Hill, montrant un phénomène de coopérativité positive. Les résultats ont montré que les particules imprimées préparées par une approche conventionnelle, telles que la polymérisation en masse, possède une capacité de charge inférieure et un facteur d'impression plus faible que les microsphères d'hydrogel imprimées obtenues par Pickering inverse. La libération du bioactif adsorbé dans la matrice polymérique imprimée semble suivre trois mécanismes, comme le démontre le modèle de Korsmeyer-Peppas modifié. Dans un premier temps, le burst joue un rôle immédiat en relarguant les molécules situées à la surface du polymère et retenues uniquement par des interactions non spécifiques. C'est pourquoi l'effet du burst était plus prononcé avec le NIP. Dans un second temps, le polymère présentait une réponse thermosensible, grâce à l'utilisation du NIPAM comme un des monomères fonctionnels. La température a diminué le taux de libération du 5'-AMP comparativement au MIP formé en bulk, car la conformation du polymère a changé et le coefficient de diffusion a diminué. Cela a été démontré *via* l'exposante diffusionnelle **n** calculé dans le modèle cinétique choisi. Le troisième mécanisme est lié au transport de la 5'-AMP au sein du réseau poreux de la matrice. Le **SMIP-26** a montré une libération de la 5'-AMP en 3 heures, contre 1 heure pour le **SNIP-26**, dans un milieu aqueux tamponné simulant le pH moyen d'une peau humaine, démontrant ainsi la potentielle applicabilité des MIP à la cosmétologie.

En perspective de ce travail, plusieurs pistes de travail peuvent être identifiées. L'architecture des SMIP sphériques peut être optimisée en utilisant la technique de greffage des chaînes de

polyéthylène glycol sur leur surface externe afin de diminuer leur toxicité et les rendre furtifs. L'intérêt de cette technique est de permettre de protéger les particules sphériques des macrophages pulmonaires. Dans un autre contexte, les formulations d'hydrogels imprimés peuvent être transposées à la synthèse de MIPs sphériques en utilisant soit la technique Pickering inverse ou l'émulsion. Afin d'améliorer les paramètres et obtenir les tailles de billes escompté, l'utilisation des plans d'expérience pourra être recommandée.

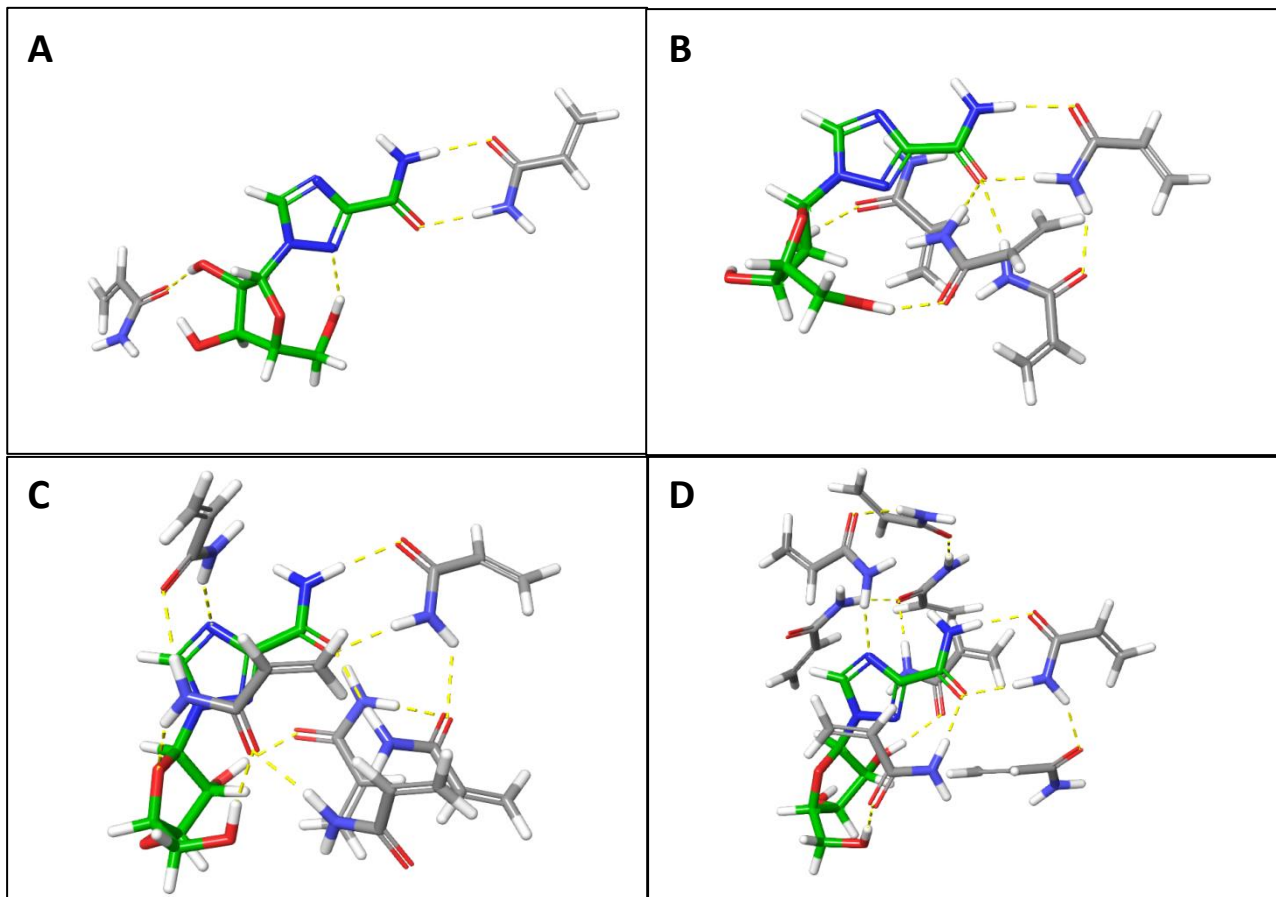
# **ANNEXES**



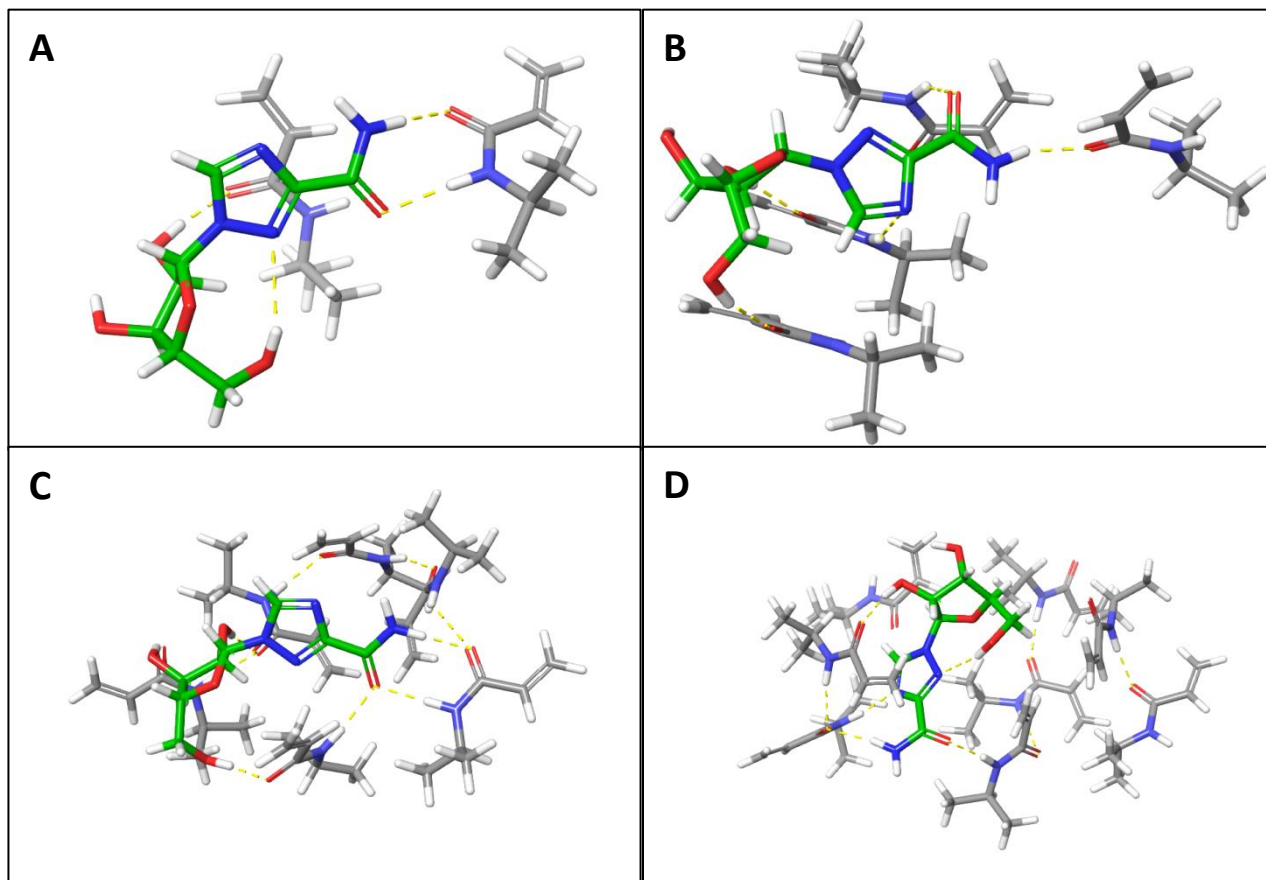


## Annexe I : Modelisation moléculaire

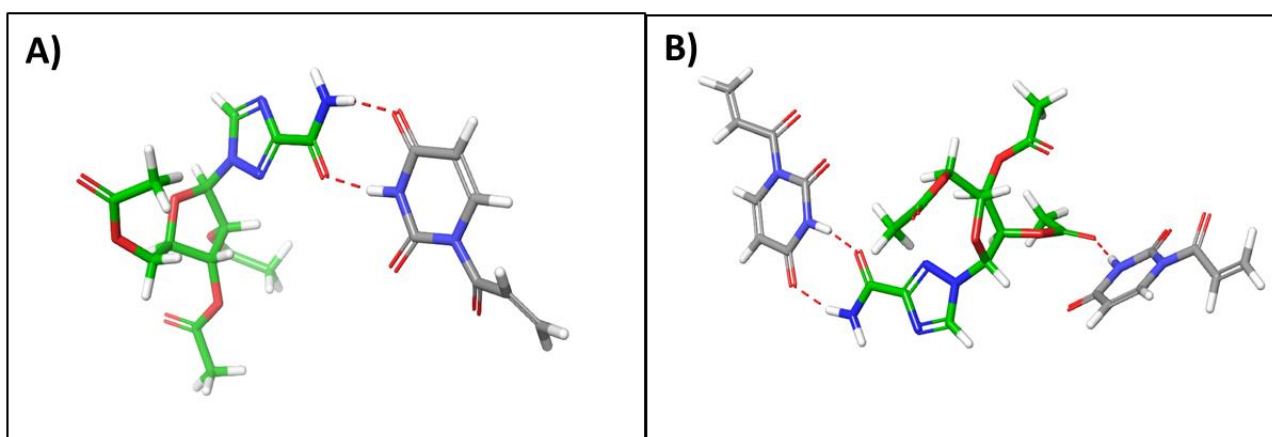
- a) schéma montrant le complexe formé entre la molécule de ribavirine (squelette carboné en vert) et les molécules d'acrylamide (squelette carboné en gris) pour les ratio (T/MF) : A) 1/2, B) 1/4, C) 1/6 et D) 1/8.



- b) Schéma montrant le complexe formé entre la molécule de ribavirine (squelette carboné en vert) et les molécules du *N*-isopropylacrylamide (squelette carboné en gris) pour les ratio (T/MF) : A) 1/2, B) 1/4, C) 1/6 et D) 1/8.

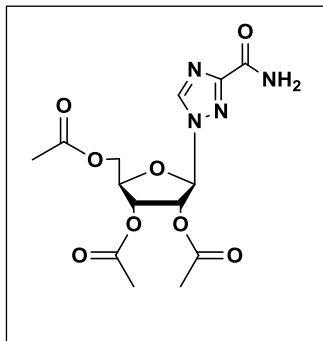


- c) Schéma montrant le complexe formé entre la molécule de ribavirine acétylée (squelette carboné en vert) et le N-acryloyluracile (squelette carboné en gris) pour les ratio (T/MF) : A) 1/1, B) 1/2



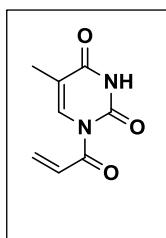
## Annexe II : Synthèses du dummy tempate et des monomères

### a) Synthèse de la 2', 3', 5'-tri-O-acetyribavirine



According to the slightly modified procedure,<sup>325</sup> to a suspension of ribavirin (11.16g, 0.046 mol, 1 eq.) in dry acetic anhydride (78 mL, 0.826 mol, 18 eq.) under argon atmosphere, pyridine (19 mL, 0.228 mol, 5 eq.) was added at room temperature and stirred during 24 hours. Then, the clearly colorless solution was concentrated to dryness and the residue was co-evaporated twice with toluene and twice with cyclohexane in *vacuo* to give a white solid. The desired product was purified by flash chromatography with DCM/MeOH (95/5) to give a white powder (15.8g, 93%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-d4) : 8.68 (1H, s); 6.25 (1H, m); 5.80 (1H, m); 5.67 (1H, t, <sup>3</sup>J = 5.62 Hz); 4.41-4.49 (2H, m); 4.24 (1H, dd, J= 4.41Hz, 11.98Hz); 2.12 (3H, s); 2.11 (3H, s); 2.04 (3H, s). <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD-d4) : 172.3; 171.4; 171.1; 163.0; 158.9; 147.1; 91.0; 82.0; 75.5; 72.1; 63.9; 20.6; 20.4; 20.3. HRMS calculated for [C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>]<sup>+</sup> m/z 371.1197 and found m/z 371.1205.

### b) Synthèse du N-acryloylthymine



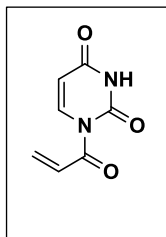
According to the procedure,<sup>326</sup> to a solution of the commercially bis-O,O'-silylated-thymine (1.39 g, 5.14 mmol, 1 eq.) in dry acetonitrile (50 mL) under argon atmosphere, acryloyl chloride (0.84 mL, 10.3 mmol, 2 eq.) was added to the solution and stirred at reflux temperature for 3 hours. The colorless solution switched to the yellow pale color, then the reaction mixture was stopped and was concentrated in *vacuo* to give a white powder. The crude powder was solubilized in acetonitrile with warmed filtration to remove the residual thymine. The filtrate was cooled in ice bath and the recrystallized powder was filtrated and was washed twice with very cold acetonitrile to give a white powder (0.51 g, 57 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) : 11.63 (1H, s, NH); 7.95 (1H, m); 7.14 (1H, m); 6.38 (1H, m); 5.97 (1H, m); 1.85 (3H, m). <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d6) : 165.5;

<sup>325</sup> Patent WO2009105258.

<sup>326</sup> Akashil, M.; Tanaka, Y.; Iwasaki, H.; Miyauchi, N., Synthesis and polymerization of new vinyl derivatives of thymine, *Die Angew. Makromol. Chem.* **1987**, *147*, 207-213.

163.6; 149.5; 133.6; 131.0; 130.9; 112.3; 12.0. HRMS calculated for  $[C_8H_9N_2O_3]^+$  m/z 181.0607 and found m/z 181.0609.

### c) Synthèse du *N*-acryloyluracile



According to the slightly modified procedure,<sup>326</sup> to a suspension of the commercially uracil (2.0 g, 17.8 mmol, 1 eq.) in dry acetonitrile (40 mL), anhydrous HMDS (9.3 mL, 44.6 mmol, 2.5 eq.) and a drop of TMS-Cl were added under argon atmosphere. Then, the solution was stirred at reflux for 18 hours. The resulting clearly solution was cooled to the room temperature and concentrated to dryness to give a colorless oil. The resulting bis-O,O-silylated-uracil was dissolved in dry acetonitrile (40 mL) and cooled to -40°C under argon atmosphere. Then acryloyl chloride (2.9 mL, 35.7 mmol, 2.0 eq.) was added and the colorless solution switched to the yellow color. After 4 hours at -40°C the reaction mixture was quenched with MeOH (3.6 mL, 89.2 mmol, 5.0 eq.) and was concentrated in *vacuo* to give a white powder. This crude powder was solubilized in acetonitrile, filtrated under warm condition, to remove the residual uracil. The filtrate was cooled in ice bath and the recrystallized powder was filtrated and was washed twice with very cold acetonitrile to give a white powder (1.18 g, 40 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 11.62 (1H, s, NH); 8.04 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8.25 Hz); 7.13 (1H, m); 6.40 (1H, m); 5.99 (1H, m); 5.83 (1H, m). <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 166.0; 163.4; 150.0; 139.0; 131.8; 131.2; 105.0. HRMS calculated for  $[C_7H_7N_2O_3]^+$  m/z 167.0451 and found m/z 167.0453.

**Annexe III : les pourcentages et les quantités de ribavirine libérés au bout de 24h pour le NIP-03 et le NIP-07**

	NIP -03				NIP-07			
	25°C		40°C		25°C		40°C	
	% libéré	M (µg)	% libéré	M (µg)	% libéré	M (µg)	% libéré	M (µg)
<b>Eau</b>	90	498	75	413	71	195	58	156
<b>PBS</b>	72	399	67	373	93	253	46	125

**Annexe IV : les pourcentages de ribavirine libérés au bout de 24h et les quantités relarguées par rapport à les quantités initiales chargées pour chacun des MIP-09, MIP-10, MIP-11 monolithique et SMIP-13, SMIP-19 et SMPI-24 sphériques.**

	MIP-09		MIP-10		MIP-11	
	38°C		38°C		38°C	
	% libéré	µmol	% libéré	µmol	% libéré	µmol
<b>Eau</b>	68	0,74	96	1,29	45	1,02

	SMIP-13		SMIP-19		SMIP-24	
	38°C		38°C		38°C	
	% libéré	µmol	% libéré	µmol	% libéré	µmol
<b>Eau</b>	54	1,07	51	1,41	23	0,63

**Annexe V : Les résultats de l'analyse frontale pour le MIP-25 et ceux du batch pour le SMIP-26 et leurs NIP correspondant et donnant les valeurs des constante d'affinité ( $K_a$  ; L.mol<sup>-1</sup>), le nombre de site actif ( $B_{max}$  ; mol.g<sup>-1</sup>), le coefficient de détermination ( $R^2$ ), la valeur de Chi carré réduit ( $\chi^2$ ) et la valeur du test statistique de Fisher (Fvalue)**

Model	Paramètres	MIP-25	NIP-25	SMIP-26	SNIP-26
Langmuir	$B_{max}$ (mol.g <sup>-1</sup> )	$(4,71 \pm 1.39) \times 10^{-5}$	$(0,94 \pm 7,16) \times 10^{-4}$	$(109 \pm 0,98) \times 10^{-5}$	$(27,65 \pm 0,10) \times 10^{-5}$
	$K_a$ (L.mol <sup>-1</sup> )	1232,7±460,3	82,0±633,4	346,8±9,8	135,2±12,1
	$r^2$	0,98656	0,95003	0,99919	0,99575
	$\chi^2$	$2,65 \times 10^{-13}$	$2,60 \times 10^{-14}$	$1,06 \times 10^{-10}$	$2,58 \times 10^{-11}$
	F <sub>value</sub>	1295	357	26236	3423
Freundlich	$B_{max}$ (mol.g <sup>-1</sup> )	$(3,22 \pm 0,66) \times 10^{-6}$	$(7,36 \pm 0,68) \times 10^{-7}$	$(8,78 \pm 0,92) \times 10^{-4}$	$(15,58 \pm 4,16) \times 10^{-5}$
	$K_a$ (L.mol <sup>-1</sup> )	41514,7±5442,3	35442,5±6028,1	2915,6±336,2	1789,9±4,9
	$r^2$	0,97822	0,9666	0,95454	0,96502
	$\chi^2$	$4,33 \times 10^{-13}$	$1,75 \times 10^{-14}$	$5,98 \times 10^{-9}$	$2,15 \times 10^{-10}$
	F <sub>value</sub>	836	568	479	434
Bi-Langmuir	$B_{max1}$ (mol.g <sup>-1</sup> )				
	$K_{a1}$ (L.mol <sup>-1</sup> )				
	$B_{max2}$ (mol.g <sup>-1</sup> )				
	$K_{a2}$ (L.mol <sup>-1</sup> )			N/D	
	$r^2$				
	$\chi^2$				
	F <sub>value</sub>				

N/D: non déterminé

## Annexe VI : Modèles mathématiques caractérisant la cinétique du relargage à partir d'une matrice polymérique en prenant en compte le phénomène du burst

Modèle	Equation	Mécanisme de relargage
Baker and Lonsdale <sup>56</sup> +  <i>burst</i>	$\frac{3}{2}[1-(1-Mt/M_\infty)^{2/3}] Mt/M_\infty = k t + b$	Diffusion à partir d'une capsule ou microsphère non gonflé
Korsmeyer et Peppas <sup>57</sup> + <i>burst</i>  (Huang & Brazel) <sup>58</sup>	$Mt/M_\infty = k t^n + b$	n = 0.85, transport ; n = 0.43, diffusion Fickienne ; 0.43 < n < 85, diffusion non-Fickienne

Mt: la quantité du bioactif relargué dans le temps t; M $\infty$ : la quantité maximale du bioactif relargué ; k : constante spécifique au modèle; n est l'exposant de diffusion caractérisant le relargage du bioactif.



## Références

1. Lagathu, G.; Colimon, R., Grippe : vaccination, prophylaxie et traitement par les antiviraux. *Médecine thérapeutique* 2010, 16, 357-373.
2. Escuret, V.; Frobert, E.; Lina, B., Grippe et antiviraux, *Réanimation*. 2011, 20, 169-177.
3. Jordan, P. C.; Stevens, S. K. ; Deval, J., Nucleosides for the treatment of respiratory RNA virus infections, *Antivir. Chem. Chemother.* 2018, 26, 1-19.
4. Adams, R. P.; Knowler, J. ; Leader, D., The structure of the nucleic acids. In *The Biochemistry of the Nucleic Acids* ; Ed Springer: Netherlands, 1992, 5-39.
5. Diab, R.; Degobert, G.; Hamoudeh, M.; Dumontet, C.; Fessi, H., Nucleoside analogue delivery systems in cancer therapy, *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2007, 4, 513-531.
6. Fedan, J. S., Nucleotides and nucleosides in pulmonary function. In *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics*. K. A. Jacobson and M. F. Jarvis, editors. Wiley-Liss, Inc., 1997, New York.
7. Fedan, J. S., Nucleosides and Nucleotides in the Lung: Role in Asthma, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1999, 21, 7-9.
8. Sidwell, R. W.; Huffman, J. H.; Khare, G. P.; Allen, L. B.; Witkowski, J. T.; Robins, R. K., Broad-spectrum antiviral activity of Virazole : 1-beta-D-ribofuranosyl- 1,2,4-triazole-3-carboxamide, *Science*. 1972, 177, 705-706.
9. (a) Sidwell, R. W.; Allen, L. B.; Khare, G. P.; Huffman, J. H.; Witkowski, J. T.; Simon, L. N.; Robins, R. K., Effect of 1-beta-D-ribofuranosyl- 1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on herpes and vaccinia keratitis and encephalitis in laboratory animals, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1973, 3, 242-246. (b) Huffman, J. H.; Sidwell, R. W.; Khare, G. P.; Witkowski, J. T.; Allen, L. B.; Robins, R. K., In vitro effect of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1973, 3, 235-241.
10. (a) Borden, K. L.; Culjkovic-Kraljacic, B., Ribavirin as an anti-cancer therapy: acute myeloid leukemia and beyond ?, *Leuk. Lymphoma*. 2010, 51, 1805-1815. (b) Kokeny, S.; Papp, J.; Weber, G.; Vaszko, T.; Carmona-Saez, P.; Olah, E., Ribavirin acts via multiple pathways in inhibition of leukemic cell proliferation, *Anticancer. Res.* 2009, 29, 1971-1980.
11. Schleuning, M.; Buxbaum-Conradi, H.; Jager, G.; Kolb, H. J., Intravenous ribavirin for eradication of respiratory syncytial virus (RSV) and adenovirus isolates from the respiratory and/or gastrointestinal tract in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants, *Hematol. J.* 2004, 5, 135-144.
12. Haas, W. H.; Breuer, T.; Pfaff, G.; Schmitz, H.; Köhler, P.; Asper, M.; Emmerich, P.; Drosten, C.; Gölnitz, U.; Fleischer, K.; Günther, S., Imported Lassa fever in Germany : surveillance and management of contact persons, *Clin. Infect. Dis.* 2003, 36, 1254-1258.
13. (a) Vo, N. V.; Young, K. C.; Lai, M. M., Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase, *Biochemistry*. 2003, 42, 10462-10471. (b) Bougie, I.; Bisailon, M., Initial binding of the broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin to the hepatitis C virus RNA polymerase, *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 52471-52478.
14. (a) Lowe, J. K.; Brox, I.; Henderson, J. F., Consequences of inhibition of guanine nucleotide synthesis by mycophenolic acid and virazole, *Cancer. Res.* 1977, 37, 736-743. (b) Muller, W.

- E.; Maidhof, A.; Taschner, H.; Zahn, R. K., Virazole (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; a cytostatic agent, *Biochem. Pharmacol.* 1977, 26, 1071-1075.
15. (a) Crotty, S.; Cameron, C. E.; Andino, R., RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98, 6895-6900. (b) Vignuzzi, M.; Stone, J. K.; Andino, R., Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications, *Virus. Res.* 2005, 107, 173-181.
  16. Goswami, B. B.; Borek, E.; Sharma, O. K.; Fujitaki, J.; Smith, R. A., The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits capping of mRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979, 89, 830-836.
  17. Tam, R. C.; Pai, B. P.; Bard, J.; Lim, C.; Averett, D. R.; Phan, U. T.; Milovanovic, T., Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J. Hepatol.* 1999, 30, 376-382.
  18. Allen, T. M.; Cullis, P. R. ; *Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream*, Science. 2004, 19, 1818-1822.
  19. Park, K., Controlled drug delivery systems: Past forward and future back, *J. Control. Release.* 2014, 190, 3-8.
  20. Schultz, P.; Kleinebudde, P., A new multiparticulate delayed release system. Part I: Dissolution properties and release mechanism, *J. Control. Release.* 1996, 47, 181-189.
  21. Courier, H. M.; Butz, N.; Vandamme, T. F., Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* 2002, 19, 425-98.
  22. Nokhodchi, A.; Martin, P. G., *Pulmonary drug delivery : advances and challenges*. Wiley Book series, 2015.
  23. Byron, P. R.; Patton, J. S., Drug delivery via the respiratory tract. *J. Aerosol. Med.* 1994, 7, 49-75.
  24. Zhoua, Q.; Tang, P.; Leung, S. S. Y.; Chan, J. G. Y.; Chan, H., Emerging inhalation aerosol devices and strategies: Where are we headed ?, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014, 75, 3-17.
  25. Nicol, M. Q.; Dutia, B. M., The role of macrophages in influenza A virus infection Future, *Virology* 2014, 9, 847-886.
  26. Patton, J. S.; Byron, P. R., Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007, 6, 67-74.
  27. Byron, P. R.; Hindle, M.; Lange, C. F.; Longest, P. W.; McRobbie, D.; Oldham, M. J.; Olsson, B.; Thiel, C. G.; Wachtel, H.; Finlay, W. H., In vivo-in vitro correlations: predicting pulmonary drug deposition from pharmaceutical aerosols, *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug. Deliv.* 2010, 23, 59-69.
  28. Dolovich, M.; MacIntyre, N. R.; Anderson, P. J.; Camargo, C. A.; Chew, N.; Cole, C. H.; Dhand, R.; Fink, J. B.; Gross, N. J.; Hess, D. R.; Hickey, A. J.; Kim, C. S.; Martonen, T. B.; Pierson, D. J.; Rubin, B. K.; Smaldone, G. C., Consensus statement: Aerosols and delivery devices, *Respir. Care.* 2000, 45, 589-596.
  29. Heyder, J.; Svartengren, M. U., Basic principles of particle behavior in the human respiratory tract. In: *Drug Delivery to the Lung*. Bisgaard, H.; O'Callaghan, C.; Smaldone, G. C., Eds., Marcel Dekker, NY, USA. 2002, 21-45.
  30. Beletsi, A.; Leontiadis, L.; Klepetsanis, P.; Ithakissios, D. S.; Avgoustakis, K., Effect of preparative variables on the properties of poly(DL-lactide-co-glycolide)-

methoxypoly(ethyleneglycol) copolymers related to their application in controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.* 1999, 182, 187-197.

31. Pacheco, P.; White, D.; Sulchek, T., Effects of Microparticle Size and Fc Density on Macrophage Phagocytosis, *PLoS. ONE.* 2013, 8, e60989.
32. Crotts, G.; Park, T. G., Preparation of porous and nonporous biodegradable polymeric hollow microspheres, *J. Control. Release.* 1995, 35, 91-105.
33. Sanchez, L.; Yi, Y.; Yu, Y., Effect of partial PEGylation on particle uptake by macrophages, *Nanoscale.* 2017, 9, 288-297.
34. Yang, W.; Peters J. I.; Williams III, R. O., Inhaled Nanoparticles-A Current Review, *Int. J. Pharm.* 2008, 356, 239- 247.
35. Newman, S. P., Aerosol deposition considerations in inhalation therapy, *Chest.* 1985, 88, 152S-160S.
36. Todoroff, J.; Vanbever, R., Fate of nanomedicines in the lungs, *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.* 2011, 16, 246-254.
37. Benattia, A.; Cavaillon, P.; Gachelin, E.; Devillier, P.; Vecellio, L.; Williams, G.; Dubus, J. C., Traitements inhalés : critères de choix des dispositifs, absorption systémique des médicaments par voie inhalée et récepteurs pulmonaires à l'amertume, *Rev. Mal. Respir.* 2015, 32, 791-799.
38. (a) Baginski, L.; Tachon, G.; Falson, F.; Patton, J. S.; Bakowsky, U.; Ehrhardt, C., Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of proteolytic enzymes in cultures of human respiratory epithelial cells, *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug. Deliv.* 2011, 24, 89-101. (b) Yamahara, H.; Morimoto, K.; Lee, V. H.; Kim, K. J., Effects of protease inhibitors on vasopressin transport across rat alveolar epithelial cell monolayers, *Pharm. Res.* 1994, 11, 1617-1622.
39. Boudendouna, A. H., Méthodologie de la formulation d'une forme orale solide à libération prolongée. 2010. Thèse doctorale en Science Génie Matériaux, Toulouse : Institut National Polytechnique, 246.
40. Loira-Pastoriza, C.; Todoroff, J.; Vanbever, R., Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2014, 75, 81-91.
41. Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 1965, 13, 238-252.
42. Wang, A. Z.; Langer, R.; Farokhzad, O. C., Nanoparticle delivery of cancer drugs, *Annu. Rev. Med.* 2012, 63, 185-198.
43. Willis, L.; Hayes Jr., D.; Mansour, H. M., Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery, *Lung.* 2012, 190, 251-262.
44. (a) Finlay, W.H.; Wong, J. P., Regional lung deposition of nebulized liposome-encapsulated ciprofloxacin. *Int. J. Pharm.* 1998, 167, 121-127. (b) Chimote, G.; Banerjee, R., In vitro evaluation of inhalable isoniazid-loaded surfactant liposomes as an adjunct therapy in pulmonary tuberculosis, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2010, 94, 1-10.
45. (a)Huang, W. H.; Yang, Z. J.; Wu, H.; Wong, Y. F.; Zhao, Z. Z.; Liu, L., Development of liposomal salbutamol sulfate dry powder inhaler formulation, *Biol. Pharm. Bull.* 2010, 33, 512-517. (b) Chen, X.; Huang, W.; Kwan Wong, B. C.; Yin, L.; Wong, Y. F.; Xu, M.; Yang, Z., Liposomes

- prolong the therapeutic effect of anti-asthmatic medication via pulmonary delivery, *Int. J. Nanomedicine*. 2012, 7, 1139-1148.
46. (a) Waldrep, J. C.; Arppe, J.; Jansa, K. A.; Vidgren, M., Experimental pulmonary delivery of cyclosporin A by liposome aerosol. *Int. J. Pharm.* 1998, 160, 239-249. (b) Chougule, M.; Padhi, B.; Misra, A., Nano-liposomal dry powder inhaler of tacrolimus : preparation, characterization, and pulmonary pharmacokinetics. *Int. J. Nanomedicine*. 2007, 2, 675-688.
  47. Hitzman, C. J.; Elmquist, W. F.; Wattenberg, L. W.; Wiedmann, T. S., Development of a respirable, sustained release microcarrier for 5-fluorouracil I: in vitro assessment of liposomes, microspheres, and lipid coated nanoparticles, *J. Pharm. Sci.* 2006, 95, 1114-1126.
  48. (a) Murata, M.; Nakano, K.; Tahara, K.; Tozuka, Y.; Takeuchi, H., Pulmonary delivery of elcatonin using surface-modified liposomes to improve systemic absorption: polyvinyl alcohol with a hydrophobic anchor and chitosan oligosaccharide as effective surface modifiers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012, 80, 340-346. (b) Shahiwala, A.; Misra, A., Pulmonary absorption of liposomal levonorgestrel, *AAPS. PharmSciTech*. 2004, 5, E13.
  49. Hajos, F.; Stark, B.; Hensler, S.; Prassl, R.; Mosgoeller, W., Inhalable liposomal formulation for vasoactive intestinal peptide, *Int. J. Pharm.* 2008, 357, 286-294.
  50. Liu, F.Y.; Shao, Z.; Kildsig, D. O.; Mitra, A. K., Pulmonary delivery of free and liposomal insulin. *Pharm. Res.* 1993, 10, 228-232.
  51. Garbuzenko, O. B.; Saad, M.; Betigeri, S.; Zhang, M.; Vetcher, A. A.; Soldatenkov, V. A.; Reimer, D. C.; Pozharov, V. P.; Minko, T., Intratracheal versus intravenous liposomal delivery of siRNA, antisense oligonucleotides and anticancer drug, *Pharm. Res.* 2009, 26, 382-394.
  52. (a) Gaspar, M. M.; Bakowsky, U.; Ehrhardt, C., Inhaled liposomes - Current strategies and future challenges. *J. Biomed. Nanotechnol*, 2008, 4, 245-257. (b) Gibbons, A.; McElvaney, N. G.; Cryan, S. A., A dry powder formulation of liposome-encapsulated recombinant secretory leukocyte protease inhibitor (rSLPI) for inhalation: preparation and characterisation, *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* 2010, 11, 1411-1421.
  53. Sharma, A.; Sharma, U. S., Liposomes in drug delivery: progress and limitations, *Int. J. Pharm.* 1997, 154, 123-140.
  54. (a) Bonacucina, G.; Cespi, M.; Misici-Falzi, M.; Palmieri, G. F., Colloidal soft matter as drug delivery system, *J. Pharm. Sci.* 2009, 98, 1-42. (b) Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Hirasaki, G. J.; Mikos, A. G., Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency, *Gene Ther.* 1999, 6, 1380-1388. (c) Radler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R., Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes, *Science*. 1997, 275, 810-814.
  55. (a) Inapagolla, R.; Guru, B. R.; Kurtoglu, Y. E.; Gao, X.; Lieh-Lai, M.; Bassett, D. J. P.; Kannan, R. M., In vivo efficacy of dendrimer-methylprednisolone conjugate formulation for the treatment of lung inflammation, *Int. J. Pharm.* 2010, 399, 140-147. (b) Ryan, G. M.; Kaminskas, L. M.; Kelly, B. D.; Owen, D. J.; McIntosh, M. P.; Porter, C. J. H., Pulmonary administration of PEGylated polylysine dendrimers: absorption from the lung versus retention within the lung is highly size-dependent, *Mol. Pharm.* 2013, 10, 2986-2995. (c) Kaminskas, L.M.; McLeod, V. M.; Ryan, G. M.; Kelly, B. D.; Haynes, J. M.; Williamson, M.; Thienthong, N.; Owen, D. J.; Porter, C. J., Pulmonary administration of a

- doxorubicinconjugated dendrimer enhances drug exposure to lung metastases and improves cancer therapy, *J. Control. Release.* 2014, 183, 18-26.
56. Morris, C. J.; Aljayyousi, G.; Mansour, O.; Griffiths, P.; Gumbleton, M., Endocytic Uptake, Transport and Macromolecular Interactions of Anionic PAMAM Dendrimers within Lung Tissue, *Pharm. Res.* 2017, 34, 2517-2531.
  57. Palmerston Mendes, L.; Pan, J.; Torchilin, V. P., Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy, *Molecules.* 2017, 22, 1401-1421.
  58. Bilensoy, E.; Sarisozen, C.; Esendağlı, G.; Doğan, A. L.; Aktaş, Y.; Sen, M., Mungan NA. Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors, *Int. J. Pharm.* 2009, 371, 170-176.
  59. Bai, J.; Li, Y.; Du, J.; Wang, S.; Zheng, J.; Yang, Q.; Chen, X., One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite, *Mat. Chem. Phys.* 2007, 106, 412-415.
  60. Zhang, Z. Y.; Smith, B. D., High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model, *Bioconjug. Chem.* 2000, 11, 805-814.
  61. Martínez, A.; Iglesias, I.; Lozano, R.; Teijón, J. M.; Blanco, M. D., Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. Evaluation as drug delivery systems, *Carbo. Poly.* 2011, 83, 1311-1321.
  62. Saraogi, G. K.; Gupta, P.; Gupta, U. D.; Jain, N. K.; Agrawal, G. P., Gelatin nanocarriers as potential vectors for effective management of tuberculosis, *Int. J. Pharm.* 2010, 385, 143-149.
  63. Thambi, T.; You, D. G.; Han, H. S.; Deepagan, V. G.; Jeon, S. M.; Suh, Y. D.; Choi, K. Y.; Kim, K.; Kwon, I. C.; Yi, G.; Lee, J. Y.; Lee, D. S.; Park, J. H., Bioreducible Carboxymethyl Dextran Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery, *Adv. Healthc. Mater.* 2014, 3, 1829-1838.
  64. (a) Brannon-Peppas, L., Recent Advances on the Use of Biodegradable Microparticles and Nanoparticles in Controlled Drug Delivery, *Int. J. Pharm.* 1995, 116, 1-9. (b) Ravi Kumar, M. N., Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2000, 3, 234-258.
  65. (a) El-Sherbiny, I. M.; Abdel-Bary, E. M.; Harding, D. R. K., Swelling characteristics and in vitro drug release study with pH- and thermally sensitive hydrogels based on modified chitosan, *J. Appl. Polym. Sci.* 2006, 102, 977-985. (b) El-sherbiny, I. M.; McGill, S.; Smyth, H. D. C., Swellable microparticles as carriers for sustained pulmonary drug delivery, *J. Pharm. Sci.* 2010, 99, 2343-2356. (c) El-Sherbiny, I. M.; Smyth, H. D. C., Biodegradable nano-micro carrier systems for sustained pulmonary drug delivery: (I) self-assembled nanoparticles encapsulated in respirable/swellable semi-IPN microspheres, *Int. J. Pharm.* 2010, 395, 132-141. (d) El-Sherbiny, I. M.; Smyth, H. D. C., Novel cryomilled physically crosslinked biodegradable hydrogel microparticles as carriers for inhalation therapy, *J. Microencapsul.* 2010, 27, 657-668. (e) El-Sherbiny, I. M.; Smyth, H. D. C., Controlled release pulmonary administration of curcumin using swellable biocompatible microparticles, *Mol. Pharm.* 2012, 9, 269-280.
  66. Wulff, G.; Sarhan, A., Über die Anwendung von enzymalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1972, 84, 364.
  67. Arshady, R.; Mosbach, K., Synthesis of substrate - selective polymers by host - guest polymerization, *Die Makromolekulare Chemie* 1981, 182, 687-692.
  68. Haupt, K.; Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical. Reviews.* 2000, 100, 2495-2504.

69. Alexander, C.; Andersson, H. S.; Andersson, L. I.; Ansell, R. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M. J., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *J. Mol. Recognit.* 2006, 19, 106-180.
70. Svenson, J.; Nicholls, I. A., On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta.* 2001, 435, 19-24.
71. Brüggemann, O.; Haupt, K.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Mosbach, K., New configurations and applications of molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. A.* 2000, 889, 15-24.
72. Tarannum, N.; Singh, M., Selective recognition and detection of l-aspartic acid by molecularly imprinted polymer in aqueous solution, *Am. J. Analyt. Chem.* 2011, 2, 909-918.
73. Çakir, P.; Cutivet, A.; Resmini, M.; Bui, B. T. S.; Haupt, K., Protein-Size Molecularly Imprinted Polymer Nanogels as Synthetic Antibodies, by Localized Polymerization with Multi-initiators, *Adv. Mater.* 2013, 25, 1048-1051.
74. Nomura, Y.; Muguruma, H.; Yano, K.; Kugimiya, A.; McNiven, S.; Ikebukuro, K.; Karube, I., Selective recognition of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid using a molecularly imprinted polymer, *Anal. Lett.* 1998, 31, 973-980.
75. Janotta, M.; Weiss, R.; Mizaikoff, B.; Brüggemann, O.; Ye, L.; Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers for nitrophenols-an advanced separation material for environmental analysis, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2001, 80, 75-86.
76. Guo, T.; Xia, Y.; Hao, G.; Song, M.; Zhang, B., Adsorptive separation of hemoglobin by molecularly imprinted chitosan beads, *Biomaterials.* 2004, 25, 5905-5912.
77. Zeng, Z.; Hoshino, Y.; Rodriguez, A.; Yoo, H.; Shea, K. J., Synthetic polymer nanoparticles with antibody-like affinity for a hydrophilic peptide, *ACS. nano.* 2009, 4, 199-204.
78. Brahmbhatt, H.; Poma, A.; Pendergraft, H.M.; Watts, J. K.; Turner, N. W., Improvement of DNA recognition through molecular imprinting: hybrid oligomer imprinted polymeric nanoparticles (oligoMIP NPs), *Biomater. Sci.* 2016, 4, 281-287.
79. Jenik, M.; Schirhagl, R.; Schirck, C.; Hayden, O.; Lieberzeit, P.; Blaas, D.; Paul, G.; Dickert, F. L., Sensing picornaviruses using molecular imprinting techniques on a quartz crystal microbalance, *Anal. Chem.* 2009, 81, 5320-5326.
80. Pan, J.; Chen, W.; Ma, Y.; Pan, G., Molecularly imprinted polymers as receptor mimics for selective cell recognition, *Chem. Soc. Rev.* 2018, 47, 5574-5587.
81. He, C.; Long, Y.; Pan, J.; Li, K.; Liu, F., Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2007, 70, 133-150.
82. Wistuba, D.; Schurig, V., Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A.* 2000, 875, 255-276.
83. Hillberg, A. L.; Brain, K. R.; Allender, C. J., Molecular imprinted polymer sensors: Implications for therapeutics, *Adv. Drug. Delivery. Rev.* 2005, 57, 1875-1889.
84. Alexander, C.; Davidson, L.; Hayes, W., Imprinted polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis, *Tetrahedron.* 2003, 59, 2025-2057.
85. Rathbone, D. L., Molecularly imprinted polymers in the drug discovery process, *Adv. Drug Delivery. Rev.* 2005, 57, 1854-1874.

86. Li, B.; Xu, J.; Hall, A. J.; Haupt, K.; Tse Sum Bui, B., Water-compatible silica sol–gel molecularly imprinted polymer as a potential delivery system for the controlled release of salicylic acid, *J. Mol. Recognit.* 2014, 27, 559-565.
87. Puoci, F.; Iemma, F.; Cirillo, G.; Picci, N.; Matricardi, P.; Alhaique, F., Molecularly imprinted polymers for 5-fluorouracil release in biological fluids, *Molecules.* 2007, 12, 805-814.
88. Puoci, F.; Iemma, F.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Parisi, O. I.; Spizzirri, U. G.; Picci, N., New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media, *Eur. Polym. J.* 2009, 45, 1634-1640.
89. Ali, M.; Horikawa, S.; Venkatesh, S.; Saha, J.; Hong, J. W.; Byrne, M. E., Zero-order therapeutic release from imprinted hydrogel contact lenses within in vitro physiological ocular tear flow, *J. Control. Release.* 2007, 124, 154-162.
90. Piletska, E. V.; Turner, N. W.; Turner, A. P.; Piletsky, S. A., Controlled release of the herbicide simazine from computationally designed molecularly imprinted polymers, *J. Control. Release.* 2005, 108, 132-139.
91. Suedee, R.; Jantararat, C.; Lindner, W.; Viernstein, H.; Songkro, S.; Srichana, T., Development of a pH responsive drug delivery system for enantioselective-controlled delivery of racemic drugs, *J. Control. Release.* 2010, 142, 122-131.
92. Peppas, N. A., Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2013, 65, 1, 5-9.
93. Luliński, P., Molecularly imprinted polymers based drug delivery devices: a way to application in modern pharmacotherapy. A review, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2017, 76, 1344-1353.
94. Aydin, O.; Attila, G.; Dogan, A.; Aydin, M.V.; Canacankatan, N.; Kanik, A., The Effects of Methyl Methacrylate on Nasal Cavity, Lung, and Antioxidant System (An Experimental Inhalation Study), *Toxicol. Pathol.* 2002, 30, 350-356.
95. Pearson, R. M.; Juettner, V. V.; Hong, S., Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery, *Front. Chem.* 2014, 2, 108.
96. Konduru, N. V.; Molina, R. M.; Swami, A.; Damiani, F.; Pyrgiotakis, G.; Lin, P.; Andreatti, P.; Donaghey, T. C.; Demokritou, P.; Krol, S.; Kreyling, W.; Brain, J. D., Protein corona: implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells, *Part. Fibre. Toxicol.* 2017, 14, 42.
97. Ribeiro, A.; Veiga, F.; Santos, D.; Torres-Labandeira, J. J.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C., Bioinspired imprinted PHEMA-hydrogels for ocular delivery of carbonic anhydrase inhibitor drugs, *Biomacromolecules.* 2011, 12, 701-709.
98. Zhang, L.; Qi, Z.; Huang, Q.; Zeng, K.; Sun, X.; Li, J.; Liu, Y.-N., Imprinted-like biopolymeric micelles as efficient nanovehicles for curcumin delivery, *Colloids. Surf. B: Biointerfaces.* 2014, 123, 15-22.
99. Castro, L. E. V.; Martinez, C. J. P.; Castro, T. C.; Ortega, M. M. C.; Encinas, J. C., Chemical polymerization of pyrrole in the presence of L-serine or L-glutamic acid: electrically controlled amoxicillin release from composite hydrogel, *J. Appl. Polym. Sci.* 2015, 132, 41804.
100. Wang, P.; Zhang, A.; Jin, Y.; Zhang, Q.; Zhang, L.; Peng, Y.; Du, S., Molecularly imprinted layer-coated hollow polysaccharide microcapsules towards gate-controlled release of water-soluble drugs, *RSC. Adv.* 2014, 4, 26063-26073.

101. Asadi, E.; Abdouss, M.; Leblanc, R. M.; Ezzati, N.; Wilson, J. N.; Azodi-Deilami, S., In vitro/in vivo study of novel anti-cancer biodegradable cross linked tannic acid for fabrication of 5-fluorouracil-targeting drug delivery nano-device based on molecular imprinted polymer, *RSC Adv.* 2016, 6, 37308-37318.
102. Luliński, P., Molecularly imprinted polymers as the future drug delivery devices, *Acta. Pol. Pharm.* 2013, 70, 601-609.
103. Zaidi, S. A., Molecularly imprinted polymers as drug delivery vehicles, *Drug. Deliv.* 2014, 23, 2262-2271.
104. (a) Hiratani, H.; Alvarez-Lorenzo, C., Timolol uptake and release by imprinted soft contact lenses made of N,N-diethylacrylamide and methacrylic acid, *J. Control. Release.* 2002, 83, 223-230. (b) Hiratani, H.; Fujiwara, A.; Tamiya, Y.; Mizutani, Y.; Alvarez-Lorenzo, C., Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses, *Biomaterials.* 2005, 26, 1293-1298.
105. Cunliffe, D.; Kirby, A.; Alexander, C., Molecularly imprinted drug delivery systems, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2005, 57, 1836-1853.
106. Alvarez-Lorenzo, C.; Hiratani, H.; Gomez-Amoza, J. L.; Martinez-Pacheco, R.; Souto, C.; Concheiro, A., Soft contact lenses capable of sustained delivery of timolol, *J. Pharm. Sci.* 2002, 91, 2182-2192.
107. Norell, M. C.; Andersson, H. S.; Nicholls, I. A., Theophylline molecularly imprinted polymer dissociation kinetics: a novel sustained release drug dosage mechanism, *J. Mol. Recognit.* 1998, 11, 98-102.
108. Allender, C.; Richardson, C.; Woodhouse, B.; Heard, C.; Brain, K., Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers, *Int. J. Pharm.* 2000, 195, 39-43.
109. (a) Suedee, R.; Srichana, T.; Martin, G. P., Evaluation of matrices containing molecularly imprinted polymers in the enantioselective-controlled delivery of  $\beta$ -blockers, *J. Control. Release.* 2000, 66, 135-147. (b) Suedee, R.; Srichana, T.; Chotivatesin, R.; Martin, G., Stereoselective release behaviors of imprinted bead matrices, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 2002, 28, 545-554. (c) Suedee, R.; Srichana, T.; Rattananont, T., Enantioselective release of controlled delivery granules based on molecularly imprinted polymers, *Drug. Deliv.* 2002, 9, 19-30.
110. Gong, C.; Wong, K. L.; Lam, M. H., Photoresponsive molecularly imprinted hydrogels for the photoregulated release and uptake of pharmaceuticals in the aqueous media, *Chem. Mater.* 2008, 20, 1353-1358.
111. Wang, C.; Javadi, A.; Ghaffari, M.; Gong, S.; A pH-sensitive molecularly imprinted nanospheres/hydrogel composite as a coating for implantable biosensors, *Biomaterials.* 2010, 31, 4944-4951.
112. Li, N.; Qi, L.; Shen, Y.; Qiao, J.; Chen, Y., Novel Oligo (ethylene glycol)-Based Molecularly Imprinted Magnetic Nanoparticles for Thermally Modulated Capture and Release of Lysozyme, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2014, 6, 17289-17295.
113. De las Heras Alarcon, C.; Pennadam, S.; Alexander, C., Stimuli-responsive polymers for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* 2005, 34, 276-285.
114. Heskins, M.; Guillet, J. E., Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide), *J. Macromol. Sci. Part. A. Pure. Appl. Chem.* 1968, 2, 1441-1455.



115. Pan, G.; Zhang, Y.; Guo, X.; Li, C.; Zhang, H., An efficient approach to obtaining water-compatible and stimuli-responsive molecularly imprinted polymers by the facile surface-grafting of functional polymer brushes via RAFT polymerization, *Biosens. Bioelectron.* 2010, 26, 976-982.
116. Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A., Reversible adsorption by a pH-and temperature-sensitive acrylic hydrogel, *J. Control. Release.* 2002, 80, 247-257.
117. Santora, B. P.; Gagné, M. R.; Moloy, K. G.; Radu, N. S., Porogen and Cross-Linking Effects on the Surface Area, Pore Volume Distribution, and Morphology of Macroporous Polymers Obtained by Bulk Polymerization, *Macromolecules.* 2001, 34, 658-661.
118. Piletsky, S. A.; Piletska, E. V.; Karim, K.; Freebairn, K. W.; Legge, C. H.; Turner, A. P. F., Polymer Cookery : Influence of Polymerization Conditions on the Performance of Molecularly Imprinted Polymers, *Macromolecules.* 2002, 35, 7499-7504.
119. Hwang, C. C.; Lee, W. C., Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods, *J. Chromatogr. A.* 2002, 962, 69-78.
120. Karim, K.; Breton, F.; Rouillon, R.; Piletska, E. V.; Guerreiro, A.; Chianella, I.; Piletsky, S. A., How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers?, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2005, 57, 1795-1808.
121. Sellergren, B. ; Lepistoe, M. ; Mosbach, K., Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition, *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 5853-5860.
122. Wulff, G.; Schauhoff, S., Enzyme-analog-built polymers. 27. Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting. Selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus spatial requirements, *J. Org. Chem.* 1991, 56, 395-400.
123. Jégourel, D.; Delépée, R.; Breton, F.; Rolland, A.; Vidal, R.; Agrofoglio, L. A., Molecularly imprinted polymer of 5-methyluridine for solid-phase extraction of pyrimidine nucleoside cancer markers in urine, *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 8932-8939.
124. Wulff, G.; Best, W.; Akelah, A., Enzyme-analogue built polymers, 17 Investigations on the racemic resolution of amino acids, *React. Polym.* 1984, 2, 167-174.
125. Wulff, G.; Heide, B.; Helfmeier, G., Enzyme-analog built polymers. 20. Molecular recognition through the exact placement of functional groups on rigid matrixes via a template approach, *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 1089-109.
126. Shea, K. J.; Sasaki, D. Y., On the control of microenvironment shape of functionalized network polymers prepared by template polymerization, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 3442-3444.
127. Shea, K. J.; Sasaki, D. Y., An analysis of small-molecule binding to functionalized synthetic polymers by <sup>13</sup>C CP/MAS NMR and FT-IR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4109-4120.
128. Alexander, C.; Smith, C. R.; Whitcombe, M. J.; Vulfson, E. N., Imprinted Polymers as Protecting Groups for Regioselective Modification of Polyfunctional Substrates, *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 6640- 6651.

129. Sellergren, B.; Andersson, L., Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analog imprinting strategy, *J. Org. Chem.* 1990, 55, 3381-3383.
130. Matsui, J.; Fujiwara, K.; Takeuchi, T., Atrazine-selective polymers prepared by molecular imprinting of trialkylmelamines as dummy template species of atrazine, *Anal. Chem.* 2000, 72, 1810-1813.
131. Lanza, F.; Sellergren, B., The application of molecular imprinting technology to solid phase extraction. *Chromatographia.* 2001, 53, 599-611.
132. Ellwanger, A.; Berggren, C.; Bayoudh, S.; Crecenzi, C.; Karlsson, L.; Owens, P. K.; Ensing, K.; Cormack, P.; Sherrington, D.; Sellergren, B., Evaluation of methods aimed at complete removal of template from molecularly imprinted polymers, *Analyst.* 2001, 126, 784-792.
133. (a) Andersson, L. I.; Paprica, A.; Arvidsson, T., A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting, *Chromatographia.* 1997, 46, 57-62. (b) Manesiotis, P.; Hall, A. J.; Sellergren, B., Improved imide receptors by imprinting using pyrimidine-based fluorescent reporter monomers, *J. Org. Chem.* 2005, 70, 2729-2738.
134. Krstulja, A.; Lettieri, S.; Hall, A. J.; Roy, V.; Favetta, P.; Agrofoglio, L. A., Tailor-made molecularly imprinted polymer for selective recognition of the urinary tumor marker pseudouridine, *Macromol. Biosci.* 2017, 17, 1700250.
135. Krstulja, A.; Schutter, C. D.; Favetta, P.; Manesiotis, P.; Agrofoglio, L. A., Artificial receptors for the extraction of nucleoside metabolite 7-methylguanosine from aqueous media made by molecular imprinting, *J. Chromatogr. A.* 2014, 1365, 12-18.
136. Bhagrath, M.; Sidwell, R.; Czako, K.; Seyda, K.; Anderson, W.; Bodor, N.; Brewster, M. E., Improved Delivery through Biological Membranes. Synthesis, Characterization and Antiviral Activity of a Series of Ribavirin Chemical Delivery Systems: 5 and Carboxamide Derivatives, *Antivir. Chem. Chemother.* 1991, 2, 265-286.
137. Dong, H.; Tong, A. J.; Li, L. D., Syntheses of steroid-based molecularly imprinted polymers and their molecular recognition study with spectrometric detection, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2003, 59, 279-284.
138. Spivak, D. A.; Shea, K. J., Binding of nucleotide bases by imprinted polymers, *Macromolecules.* 1998, 31, 2160-2165.
139. Kempe, M., Oxytocin receptor mimetics prepared by molecular imprinting, *Lett. Pept. Sci.* 2000, 7, 27-33.
140. Sellergren, B.; Ekberg, B.; Mosbach, K., Molecular imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers: Demonstration of substrate- and enantio-selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino acid derivatives. *J. Chromatogr. A.* 1985, 347, 1-10.
141. Bunte, G.; Hürttlen, J.; Pontius, H.; Hartlieb, K.; Krause, H., Gas phase detection of explosives such as 2, 4,6-trinitrotoluene by molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta.* 2007, 591, 49-56.
142. Yu, C.; Mosbach, K., Molecular Imprinting Utilizing an Amide Functional Group for Hydrogen Bonding Leading to Highly Efficient Polymers, *J. Org. Chem.* 1997, 62, 4057-4064.
143. Zhu, X.; Cao, Q.; Hou, N.; Wang, G.; Ding, Z., The preparation and the recognition property of molecularly imprinted polymer of podophyllotoxin, *Anal. Chim. Acta.* 2006, 561, 171-177.

144. Wulff, G.; Kemmerer, R.; Vietmeier, J.; Poll, H. G., Chirality of vinyl polymers - the preparation of chiral cavities in synthetic-polymers, *New. J. Chem.* 1982, 6, 681-687.
145. Suedee, R.; Seechamnaturakit, V.; Canyuk, B.; Ovatlarnporn, C.; Martin, G. P., Temperature sensitive dopamine-imprinted (N,N-methylene-bis-acrylamide cross-linked) polymer and its potential application to the selective extraction of adrenergic drugs from urine, *J. Chromatogr. A.* 2006, 1114, 239-249.
146. Shea, K. J.; Stoddard, G. J.; Shavelle, D. M.; Wakui, F.; Choate, R. M., Synthesis and characterization of highly crosslinked poly(acrylamides) and poly(methacrylamides). A new class of macroporous polyamides, *Macromolecules.* 1990, 23, 4497-4507.
147. Mane, S.; Ponrathnam, S.; Chavan, N., Effect of Chemical Cross-linking on Properties of Polymer Microbeads: A Review, *Can. J. Chem.* 2015, 3, 473-485.
148. Sellergren, B.; Shea, K. J., Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers, *J. Chromatogr. A.* 1993, 635, 31-49.
149. Luliński, P.; Maciejewska, D., Impact of functional monomers, cross-linkers and porogens on morphology and recognition properties of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylamine imprinted polymers. *Mater. Sci. Eng. C.* 2011, 31, 281-289.
150. Spivak, D.; Gilmore, M. A.; Shea, K. J., Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers, *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 4388-4393.
151. Renkecz, T.; László, K.; Horváth, V.; Molecularly imprinted microspheres prepared by precipitation polymerization at high monomer concentrations, *Mol. Impr.* 2014, 2, 1-17.
152. Rosset, R.; Caude, M.; Jardy, A., *Chromatographie en phase liquide et supercritique*, Elsevier / Masson : 1991.
153. Pérez-Moral, N.; Mayes, A. G., Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods, *Anal. Chim. Acta.* 2004, 504, 15-21.
154. Jegourel, D. Etude exploratoire de l'impression moléculaire polymère de l'uridine sous format monolithique et submicronique. Thèse de doctorat de l'Université d'Orléans, Orléans, 2008.
155. Mayes, A. G., Chapter 12 Polymerisation techniques for the formation of imprinted beads. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Sellergren, B., Ed. Elsevier: 2000, 23, 305-324.
156. Kempe, H.; Kempe, M., Novel Method for the Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Bead Libraries, *Macromol. Rapid. Commun.* 2004, 25, 315-320.
157. Ye, L.; Cormack, P. A. G.; Mosbach, K., Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay, *Anal. Comm.* 1999, 36, 35-38.
158. Sambe, H.; Hoshina, K.; Moaddel, R.; Wainer, I. W.; Haginaka, J., Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization, *J. Chromatogr. A.* 2006, 1134, 88-94.
159. Kumbar, S.; Laurencin, C.; Deng, M., *Natural and Synthetic Biomedical Polymers.* 2014: Elsevier Science.
160. Asua, J. M., Miniemulsion polymerization, *Prog. Polym. Sci.* 2002, 27, 1283-1346.
161. Capek, I.; Chern, C. S., *Radical polymerization in direct mini-emulsion systems*, *New Polymerization Techniques and Synthetic Methodologies*, Springer. 2001, 101-165.

162. Candau, F., Polymerization in microemulsions. *Polymerization in organized media*, 1992, 215-282.
163. Capek, I., Radical polymerization of polar unsaturated monomers in direct microemulsion systems, *Adv. Colloid. Interface. Sci.* 1999, 80, 85-149.
164. Pérez, N.; Whitcombe, M. J.; Vulfson, E. N., Molecularly imprinted nanoparticles prepared by core-shell emulsion polymerization, *J. Appl. Polym. Sci.* 2000, 77, 1851-1859.
165. Mayes, A. G.; Mosbach, K., Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase, *Anal. Chem.* 1996, 68, 3769-3774.
166. J. Ansell, R.; Mosbach, K., Magnetic molecularly imprinted polymer beads for drug radioligand binding assay, *Analyst.* 1998, 123, 1611-1616.
167. Lu, S.; Cheng, G.; Pang, X., Preparation of molecularly imprinted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/P(St-DVB) composite beads with magnetic susceptibility and their characteristics of molecular recognition for amino acid, *J. Appl. Polym. Sci.* 2003, 89, 3790-3796.
168. Ansell, R. J.; Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers by suspension polymerization in perfluorocarbon liquids with emphasis on the influence of porogenic solvent, *J. Chromatogr. A.* 1997, 787, 55-66.
169. Langer, R.; Peppas, N. A., *Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology*, *AIChE. J.* 2003, 49, 2990-3006.
170. Byrne, M. E.; Salián, V., Molecular imprinting within hydrogels II: Progress and analysis of the field, *Int. J. Pharm.* 2008, 364, 188-212.
171. Yu, C.; Mosbach, K., Insights into the origins of binding and the recognition properties of molecularly imprinted polymers prepared using an amide as the hydrogen-bonding functional group, *J. Mol. Recogn.* 1998, 11, 69-74.
172. Asanuma, H.; Akiyama, T.; Kajiya, K.; Hishiya, T.; Komiyama, M., Molecular imprinting of cyclodextrin in water for the recognition of nanometer-scaled guests, *Anal. Chim. Acta.* 2001, 435, 25-33.
173. *Acta Biomaterialia* Volume 28, December 2015, Pages 121-127.
174. Hoshino, Y.; Ohashi, R. C.; Miura, Y., Rational design of synthetic nanoparticles with a large reversible shift of acid dissociation constants: Proton imprinting in stimuli responsive nanogel particles, *Adv. Mater.* 2014, 26, 3718-3723.
175. Pampí, P.; Kofinas, P., Biomimetic glucose recognition using molecularly imprinted polymer hydrogels, *Biomaterials.* 2004, 25, 1969-1973.
176. Byrne, M. E.; Park, K.; Peppas, N. A., Molecular imprinting within hydrogels, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2002, 54, 149-161.
177. Xia, Y. Q.; Guo, T. Y.; Song, M.D.; Zhang, B. H.; Zhang, B. I., Hemoglobin Recognition by Imprinting in Semi-Interpenetrating Polymer Network Hydrogel Based on Polyacrylamide and Chitosan, *Biomacromolecules.* 2005, 6, 2601-2606.
178. Espinosa-García, B. M.; Argüelles-Monal, W. M.; Hernández, J.; Félix-Valenzuela, L.; Acosta, N.; Goycoolea, F. M., Molecularly Imprinted Chitosan-Genipin Hydrogels with Recognition Capacity toward O-Xylene, *Biomacromolecules* 2007, 8, 3355-3364.

179. Wang, B.; Liu, M. Z.; Liang, R.; Ding, S. L.; Chen, Z. B.; Chen, S. L.; Jin, S. P., MMTCA Recognition by Molecular Imprinting in Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Based on Poly(acrylic acid) and Poly(vinyl alcohol), *Macromol. Biosci.* 2008, 8, 417-425.
180. Andersson, H. S.; Karlsson, J. G.; Piletsky, S. A.; Koch-Schmidt, A. C.; Mosbach, K.; Nicholls, I., Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers, II : Influence of monomer–template ratio and sample load on retention and selectivity, *J. Chromatogr. A.* 1999, 848, 39-49.
181. Rampey, A. M.; Umpleby II, R. J.; Rushton, G. T.; Iseman, J. C.; Shah R. N.; Shimizu, K. D., Characterization of the Imprint Effect and the Influence of Imprinting Conditions on Affinity, Capacity, and Heterogeneity in Molecularly Imprinted Polymers Using the Freundlich Isotherm-Affinity Distribution, *Analysis. Anal. Chem.* 2004, 76, 1123-1133.
182. Batra, D.; Shea, K. J., Combinatorial methods in molecular imprinting, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003, 7, 434-442.
183. Dong, W. G.; Yan, M.; Zhang, M. L.; Liu, Z.; Li, Y. M., A computational and experimental investigation of the interaction between the template molecule and the functional monomer used in the molecularly imprinted polymer, *Anal. Chim. Acta.* 2005, 542, 186-192.
184. Pavel, D.; Lagowski, J., Computationally designed monomers and polymers for molecular imprinting of theophylline and its derivatives, Part. I. *Polymer.* 2005, 46, 7528-7542.
185. Yanez, F.; Chianella, I.; Piletsky, S. A.; Concheiro, A.; Alvarez-Lorenzo, C., Computational modeling and molecular imprinting for the development of acrylic polymers with high affinity for bile salts, *Anal. Chim. Acta.* 2010, 659, 178-185.
186. (a) Molinelli, A.; O'Mahony, J.; Nolan, K.; Smyth, M. R.; Jakusch, M.; Mizaikoff, B., Analyzing the Mechanisms of Selectivity in Biomimetic Self-Assemblies via IR and NMR Spectroscopy of Prepolymerization Solutions and Molecular Dynamics Simulations, *Anal. Chem.* 2005, 77, 5196-5204. (b) McStay, D.; Al-Obaidi, A. H.; Hoskins, R.; Quinn, P. J., Raman spectroscopy of molecular imprinted polymers, *J. Opt. A. Pure. Appl. Opt.* 2005, 7, S340-S345. (c) Fish, W. P.; Ferreira, J.; Sheardy, R. D.; Snow N. H.; O'Brien, T. P., Rational Design of an Imprinted Polymer: Maximizing Selectivity by Optimizing the Monomer-Template Ratio for a Cinchonidine MIP, Prior to Polymerization, Using Microcalorimetry, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2005, 28, 1-15. (d) O'Mahony, J.; Molinelli, A.; Nolan, K.; Smyth, M. R.; Mizaikoff, B., Towards the rational development of molecularly imprinted polymers: <sup>1</sup>H NMR studies on hydrophobicity and ion-pair interactions as driving forces for selectivity, *Biosens. Bioelectron.* 2005, 20, 1884-1893. (e) Alvarez-Lorenzo, C.; Yanez, F.; Barreiro-Iglesias, R.; Concheiro, A., Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery systems, *J. Control. Release.* 2006, 113, 236-244.
187. Umpleby II, R. J.; Baxter, S. C.; Rampey, A. M.; Rushton, G. T.; Chen, Y.; Shimizu, K. D., Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. B.* 2004, 804, 141-149.
188. Lv, Y. ; Lin, Z. ; Tan, T. ; Feng, W. ; Qin, P. ; Li, C., Application of molecular dynamics modeling for the prediction of selective adsorption properties of dimethoate imprinting polymer. *Sens. Actuator B-Chem.* 2008, 133, 15-23.
189. Kazemi, S. ; Daryani, A. S. ; Abdouss, M. ; Shariatinia, Z., DFT computations on the hydrogen bonding interactions between methacrylic acid-trimethylolpropane trimethacrylate

- copolymers and letrozole as drug delivery systems. *J. Theor. Comput. Chem.* 2016, 15, 02, 1650015.
190. Cleland, D. ; Olsson, G. D. ; Karlsson, B. C. G. ; Nicholls, I. A. ; McCluskey, A., Molecular dynamics approaches to the design and synthesis of PCB targeting molecularly imprinted polymers: interference to monomer-template interactions in imprinting of 1,2,3-trichlorobenzene. *Org. Biomol. Chem.* 2014, 12, 844-853.
191. Thordarson, P., Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 1305-1323.
192. Connors, K. A., Binding constants: The measurement of molecular complex stability. John Wiley & Sons: New York, 1987.
193. Hirose, K., Determination of binding constants, *Analytical methods in supramolecular chemistry*, Christoph Schalley, 2012 Wiley-VCH edition.
194. Job, P., Formation and stability of inorganic complexes in solution, *Annali. Di. Chimica.* 1928, 9, 113-203.
195. García-Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E., Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers, *Sens. Actuator. B-Chem.* 2007, 123, 1180-1194.
196. Guiochon, G.; Shirazi, S. G.; Katti, A. M., *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press: 1994.
197. Marchetti, N.; Cavazzini, A.; Pasti, L.; Dondi, F., Determination of adsorption isotherms by means of HPLC: adsorption mechanism elucidation and separation optimization, *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 727-741.
198. Sajonz, P.; Kele, M.; Zhong, G.; Sellergren, B.; Guiochon, G., Study of the thermodynamics and mass transfer kinetics of two enantiomers on a polymeric imprinted stationary phase, *J. Chromatogr. A.* 1998, 810, 1-17.
199. Manesiotis, P.; Kashani, S.; McLoughlin, P., Molecularly imprinted polymers for the extraction of imiquimod from biological samples using a template analogue strategy, *Anal. Methods.* 2013, 5, 3122-3128.
200. Graham, D., The Characterisation of Physical Adsorption Systems. I. The Equilibrium Function and Standard Free Energy of Adsorption, *J. Phys. Chem. A.* 1953, 57, 665-669.
201. Umpleby li, R. J.; Baxter, S. C.; Bode, M.; Berch Jr, J. K.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D., Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterisation of molecularly imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta.* 2001, 435, 35-42.
202. Rushton, G. T.; Karns, C. L.; Shimizu, K. D., A critical examination of the use of the Freundlich isotherm in characterizing molecularly imprinted polymers (MIPs), *Anal. Chim. Acta.* 2005, 528, 107-113.
203. Umpleby, R. J.; Baxter, S. C.; Chen, Y.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D., Characterisation of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir–Freundlich Isotherm, *Anal. Chem.* 2001, 73, 4584-4591.
204. Umpleby li, R. J.; Bode, M.; Shimizu, K. D., Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers, *Analyst.* 2000, 125, 1261-1265.
205. Shaikh, H. K.; Kshirsagar, R. V.; Patil, S. G., Mathematical models for drug release characterization : a review, *W. J. P. R.* 2015, 4, 324-338.

206. (a) Colombo, P., Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 1993, 11, 37-57. (b) Narasimhan, B. Accurate models in drug delivery systems. In: *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology 2000*, 155-181.
207. Kanjickal, D. G.; Lopina, S. T., Modeling of drug release from polymeric delivery systems-A review, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* 2004, 21, 345-386.
208. (a) Singhavi, G., Review : In vitro drug release characterization models, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2011, 2, 77-84. (b) Costa, P., Modeling and comparison of dissolution profile, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, 13, 123-133
209. Ramteke, K. H., Mathematical models of drug dissolution: a review, *sch. Acad. J. Pharm.* 2014, 3, 388-396.
210. Lokhandwala, H., Kinetic modeling and dissolution profiles comparison: An overview, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2013, 4, 728-737.
211. Dash, S., Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery system, *Acta. Pol. Pharm.* 2010, 67, 217-223.
212. Langer, R. S.; Peppas, N. A., Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: A review, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.* 1983, C23, 61-126.
213. Agnes, E. J.; Ortega, G. G., Mathematical models and physicochemical of diffusion, *Pharmacy. Book.* 2003, 19, 9-19.
214. Narsimhan, B.; Mallapragada S. K.; Peppas, N. A., Release Kinetics, Data Interpretation, *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, E. Mathiowitz (ed.), John Wiley & Sons, 1999, 921-935.
215. Higuchi, T., Rate of release of medicaments from ointments bases containing drugs in suspension, *J. Pharm. Sci.* 1961, 50, 874-875.
216. Higuchi, W. I., Analysis of data on the medicament release from ointments, *J. Pharm. Sci.* 1962, 51, 802-804.
217. Higuchi, T., Mechanism of sustained-action medication, *J. Pharm. Sci.* 1963, 52, 1145-1149.
218. Omidian, H.; Park, K., Introduction to hydrogels. In R. M. Ottenbrite, K. Park, & T. Okano (Eds.), *Biomedical applications of hydrogels handbook*, 2010, 1-16.
219. Siepmann, J.; Peppas, N. A., Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2012, 64, 163-174.
220. Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E. M.; Buri, P.; Peppas, N. A., Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* 1983, 15, 25-35.
221. Kim, H.; Fassihi, R., Application of binary polymer in drug release rate modulation. 2. Influence of formulation variables and hydrodynamic conditions on release kinetics, *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 323-328.
222. Peppas, N. A.; Narasimhan, B., Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems, *J. Control. Release.* 2014, 190, 75-81.
223. Peppas, N. A., Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers, *Pharm. Acta. Helv.* 1985, 60, 110-111.
224. Kosmidis, K.; Argyrakis, P.; Macheras, p., Fractal kinetics in drug release from finite fractal matrices, *J. Chem. Phys.* 2003, 119, 6373-6377.

225. Baker, R. W.; Lonsdale, H. S., Controlled release: mechanisms and rates. In A. C. Taquary, & R. E. Lacey (1st Eds.), *Controlled release of biologically active agents*, 1974, (pp. 15–71). New York: Plenum.
226. Hixson, A. W.; Crowell, J. H., Dependence of reaction velocity upon surface and agitation: I-Theoretical consideration, *Ind. Eng. Chem.* 1931, 23, 923-931.
227. Weibull, W., A statistical distribution function of wide applicability, *J. Appl. Mech.* 1951, 18, 293-297.
228. Katzhendler, I.; Hofman, A.; Goldberger, A.; Friedman, M., Modeling of drug release from erodible tablets, *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 110-115.
229. Peppas, N. A.; Sahlin, J. J., A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation, *Int. J. Pharm.* 1989, 57, 169-172.
230. Kidane, A.; Bhatt, P. P., Recent advances in small molecule drug delivery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005, 9, 347-351.
231. Yoshida, R.; Sakai, K.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Pulsatile drug delivery systems using hydrogels, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 1993, 11, 85-108.
232. Bates, J.; Magda, J., pH-Responsive Hydrogels and their Applications in Chemomechanical Sensors, *ScienceJet.* 2014, 4, 128.
233. Mishra, B.; Upadhyay, M.; Reddy Adena, S. K.; Vasant, B. G.; Muthu, M. S., Hydrogels : An Introduction to a Controlled Drug Delivery Device, *Synthesis and Application in Drug Delivery and Tissue Engineering*, Austin. *J. Biomed. Eng.* 2017, 4, 1037.
234. Hiratani, H.; Lorenzo, C. A., The nature of backbone monomers determines the performance of imprinted soft contact lenses as timolol drug delivery systems, *Biomaterials.* 2004, 25, 1105-1113
235. Bates, J. S.; Whitson, L. R.; Albertson, K. M.; Hickerson, N. S.; Nichols, P. E.; Larson, B. E.; Sparks, T. D., Molecular Imprinted Hydrogels in Drug Delivery Applications, *MRS. Proceedings.* 2015, 1797, mrss15–2132190.
236. Xu, L.; Xu, Z., Molecularly imprinted polymer based on multiwalled carbon nanotubes for ribavirin recognition, *J. Polym. Res.* 2012, 19, 9942.
237. Scorrano, S.; Longo, L.; Vasapollo, G., Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of 1-methyladenosine from human urine, *Anal. Chim. Acta.* 2010, 659, 167-171.
238. Erion, M. D.; Stoeckler, J. D.; Guida, W. C.; Walter, R. L.; Ealick, S. E., Purine Nucleoside Phosphorylase. 2. Catalytic mechanism. *Biochemistry.* 1997, 36, 11735-11748.
239. Bawa. P.; Pillay. V.; Choonara. Y. E.; du toit. L. C, Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery, *Biomed. Mater.* 2009, 4, 022001.
240. Okuyama, Y.; Yoshida, R.; Sakai, K.; Okano, T.; Sakurai, Y, Stimuli-responsive polymers and their applications in drug, *J. Biomater. Sci. Polym.* 1993, 4, 545–556.
241. Matsunaga, T.; Hishiya, T.; Takeuchi, T., Optimization of Functional Monomer Content in Protein-Imprinted Polymers, *Anal. Lett.* 2007, 40, 2633-2640.
242. Logiciel MarvinSketch 6.3.0 ChemAxon
243. [http://www.inrs.fr/publications/bdd/doc/solvant.html?refINRS=SOLVANT\\_67-68-5](http://www.inrs.fr/publications/bdd/doc/solvant.html?refINRS=SOLVANT_67-68-5).
244. (a) Karlsson, B. C. G.; O'Mahony, J.; Karlsson, J. G.; Bengtsson, H.; Eriksson, L. A.; Nicholls, I. A. Structure and dynamics of monomer-template complexation: an explanation for molecularly imprinted polymer recognition site heterogeneity, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131,



- 13297-13304. (b) Nicholls, I. A.; Andersson, H. S.; Charlton, C.; Henschel, H.; Karlsson, B. C. G.; Karlsson, J. G.; O'Mahony, J.; Rosengren, A. M.; Rosengren, K. J.; Wikman, S., Theoretical and computational strategies for rational molecularly imprinted polymer design, *Biosens. Bioelectron.* 2009, 25, 543-552. (c) O'Mahony, J.; Karlsson, B. C. G.; Mizaikoff, B.; Nicholls, I. A., Correlated theoretical, spectroscopic and X-ray crystallographic studies of a non-covalent molecularly imprinted polymerisation system, *Analyst.* 2007, 132, 1161-1168.
245. Svensson, J.; Andersson, H. S.; Piletsky, S. A.; Nicholls, I. A., Spectroscopic studies of the molecular imprinting self-assembly process, *J. Mol. Recognit.* 1998, 11, 83-886.
246. Osmani, Q.; Hughes, H.; Flavin, K.; Hedin-Dahlström, J.; Allender, C. J.; Frisby, J.; McLoughlin, P., The use of FTIR and NMR spectroscopies to study prepolymerisation interactions in nitrogen heterocycles, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 1229-1236.
247. (a) Lübke, C.; Lübke, M.; Whitcombe, M. J.; Vulfson, E. N., Imprinted polymers prepared with stoichiometric template-monomer complexes: efficient binding of ampicillin from aqueous solutions, *Macromolecules.* 2000, 33, 5098-5105. (b) Hall, A. J.; Manesiotis, P.; Emgenbroich, M.; Quaglia, M.; De Lorenzi, E.; Sellergren, B., Urea host monomers for stoichiometric molecular imprinting of oxyanions, *J. Org. Chem.* 2005, 70, 1732-1736. (c) Wei, S.; Jakusch, M.; Mizaikoff, B., Investigating the mechanisms of 17 $\beta$ -estradiol imprinting by computational prediction and spectroscopic analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389, 423-431 (d) Ansell, R. J.; Wang, D.; Kuah, J. K. L., Imprinted polymers for chiral resolution of ( $\pm$ )-ephedrine. Part 2: probing pre-polymerisation equilibria in different solvents by NMR, *Analyst.* 2008, 133, 1673-1683. (e) Ansell, R. J.; Wang, D., Imprinted polymers for chiral resolution of ( $\pm$ )-ephedrine. Part 3: NMR predictions and HPLC results with alternative functional monomers, *Analyst* 2009, 134, 564-576.
248. Pauli, G. F.; Gödecke, T.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C., Quantitative  $^1\text{H}$  NMR: Development and Potential of an Analytical Method – an Update, *J. Nat. Prod.* 2012, 75, 834-851.
249. Tom, L. A.; Schneck, N. A.; Walter, C., Improving the imprinting effect by optimizing template:monomer:cross-linker ratios in a molecularly imprinted polymer for sulfadimethoxine, *J. Chromatogr. B.* 2012, 909, 61-64
250. Lv, Y.; Lin, Z.; Tan, T.; Feng, W.; Qin, P.; Li, C., Applications of molecular dynamics modeling for the prediction of selective adsorption properties of dimethoate imprinting polymer, *Sens. Actuators. B: Chemical.* 2008, 133, 15-23
251. Levi, R.; McNiven, S.; Piletsky, S. A.; Cheong, S. H.; Yano, K.; Karube, I., Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers, *Anal. Chem.* 1997, 69, 2017-2021.
252. Baggiani, C.; Trotta, F.; Giraudi, G.; Giovannoli, C.; Vanni, A., A molecularly imprinted polymer for the pesticide bentazone, *Anal. Commun.* 1999, 36, 263-266.
253. Tarbin, J. A.; Sharman, M., Synthesis and preliminary evaluation of a molecularly imprinted polymer selective for artificial phenolic estrogenic compounds, *Anal. Commun.* 1999, 36, 105-107.
254. Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A.; Piletska, E. V.; Chen, B.; Karim, K.; Turner, A. P. F., "Bite-and-Switch" approach using computationally designed molecularly imprinted polymers for sensing of creatinine, *Biosens. Bioelectron.* 2001, 16, 631-637.

255. Tóth, B.; Pap, T.; Horvath, V.; Horvai, G., Nonlinear adsorption isotherm as a tool for understanding and characterizing molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. A.* 2006, 1119, 29-33.
256. (a) Zhu, Q. Z.; Haupt, K.; Knopp, D.; Niessner, R., Molecularly imprinted polymer for metsulfuron-methyl and its binding characteristics for sulfonylurea herbicides, *Anal. Chim. Acta.* 2002, 468, 217-227. (b) Moein, M. M.; Javanbakht, M.; Akbari-adergani, B., Molecularly imprinted polymer cartridges coupled on-line with high performance liquid chromatography for simple and rapid analysis of dextromethorphan in human plasma samples, *J. Chromatogr. B.* 2011, 879, 777-782.
257. (a) Muldoon, M.T.; Stanker, L.H., Molecularly imprinted solid phase extraction of atrazine from beef liver extracts, *Anal. Chem.* 1997, 69, 803-808. (b) Sharma, A. C.; Borovik, A. S., Design, Synthesis, and Characterization of Templated Metal Sites in Porous Organic Hosts: Application to Reversible Dioxygen Binding, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 8946-8955.
258. Nomachi, M.; Kubo, T.; Hosoya, K.; Kaya, K., Solvent effects in the preparation of molecularly imprinted polymers for melatonin using N-propionyl-5-methoxytryptamine as the pseudo template, *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 384, 1291-1296.
259. Abraham, A. A.; Sen, A. K., Thermal and swelling studies of hydrophobically modified polyacrylamide hydrogels, *J. Appl. Polym. Sci.* 2010, 117, 2795-2802
260. Seddiki, N.; Aliouche, D., Synthesis, rheological behavior and swelling properties of copolymer hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide) with hydrophilic monomers, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 2013, 27, 447-457.
261. Shekhar, S.; Mukherjee, M.; Sen, K., Studies on thermal and swelling properties of Poly (NIPAM-co-2-HEA) based hydrogels, *Adv. Mater. Res.* 2012, 1, 269-284.
262. Luliński, P.; Maciejewska, D., Impact of functional monomers, cross-linkers and porogens on morphology and recognition properties of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethylamine imprinted polymers, *Mater. Sci. Eng. C.* 2011, 31, 281-289.
263. Castell, O. K.; Barrow, D. A.; Kamarudin, A. R.; Allender, C. J., Current practices for describing the performance of molecularly imprinted polymers can be misleading and may be hampering the development of the field, *J. Mol. Recognit.* 2011, 24, 1115-1122.
264. Limousin, G.; Gaudet, J. P.; Charlet, L.; Szenknect, S.; Barthès, V.; Krimissa, M., Sorption isotherms : A review on physical bases, modeling and measurement, *Appl. Geochem.* 2007, 22, 249-275.
265. Ncibi, M. C., Applicability of some statistical tools to predict optimum adsorption isotherm after linear and non-linear regression analysis, *J. Hazard. Mater.* 2008, 153, 207-212.
266. Umpleby, R. J.; Baxter, S. C.; Chen, Y.; Shah R. N.; Shimizu, K. D., Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm, *Anal. Chem.* 2001, 73, 4584-4591.
267. Lavignac, N.; Brain, K. R.; Allender, C. J., concentration dependent atrazine-atrazine complex formation promotes selectivity in atrazine imprinted polymers, *Biosens. Bioelectron.* 2006, 22, 138-144.
268. Kadhivel, P.; Azenha, M.; Shinde, S.; Schillinger, E.; Gomes, P.; Sellergren, B.; Silva, A. F., Imidazolium-based functional monomers for the imprinting of the anti-inflammatory drug

- naproxen: Comparison of acrylic and sol-gel approaches, *J. Chromatogr. A.* 2013, 1314, 115-123.
269. Batycky, R. P.; Hanes, J.; Langer, R.; Edwards, D. A., A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres, *J. Pharm. Sci.* 1997, 86, 1464-1477.
270. Sabbagh, F.; Muhamad, I. I., Acrylamide-based Hydrogel Drug Delivery Systems: Release of Acyclovir from MgO nanocomposite hydrogel, *J. Taiwan. Inst. Chem. Eng.* 2017, 72, 182-193.
271. Sivanantham, M.; Tata, B. V. R., Swelling/deswelling of polyacrylamide gels in aqueous NaCl solution: Light scattering and macroscopic swelling study, *Pramana - Journal of Physics.* 2012, 79, 457-469.
272. Zhang, J. T.; Huang, S. W.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X., Preparation and properties of Poly (N-isopropylacrylamide)/Poly (N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymer networks for drug delivery, *J. Poly. Sci. Part. A. Poly. Chem.* 2004, 42, 1249-1256.
273. Lokhandwala, H.; Deshpande, A.; Deshpande, S., Kinetic modeling and dissolution profiles comparison : an overview, *Int. J. Pharm Bio Sci.* 2013, 4, 728-737.
274. Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A., Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* 1983, 15, 25-35.
275. Bruschi, M. L., Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, chapitre 5, 2015, 74-76.
276. Guillot, L.; Le Goffic, R.; Bloch, S.; Escriou, N.; Akira, S.; Chignard, M ; Si-Tahar, M., Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus, *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 5571-5580.
277. Matrosovich, M.; Matrosovich, T.; Garten, W.; Klenk, H., New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays, *Virology.* 2006, 3, 63.
278. J. Frank, Introduction to Computational Chemistry, second ed., John Wiley & Sons Inc., Chichester, England, 2007.
279. Jaguar, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.
280. Bochevarov, A. D.; Harder, E.; Hughes, T. F.; Greenwood, J. R.; Braden, D. A.; Philipp, D. M.; Rinaldo, D.; Halls, M. D.; Zhang, J.; Friesner, R. A., Jaguar: A high-performance quantum chemistry software program with strengths in life and materials sciences, *Int. J. Quantum. Chem.* 2013, 113, 2110-2142.
281. Wu, L.; Zhu, K.; Zhao, M.; Li, Y., Theoretical and experimental study of nicotinamide molecularly imprinted polymers with different porogens, *Anal. Chim. Acta.* 2005, 549, 39-44.
282. Widstrand, C.; Yilmaz, E.; Boyd, B.; Billing, J.; Rees, A., Molecularly imprinted polymers: A new generation of affinity matrices, *Am. Lab.* 2006, 38, 12-14.
283. Shea, J. K.; Spivak, D. A.; Sellergren, B., Polymer complements to nucleotide bases. Selective binding of adenine derivatives to imprinted polymers, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 3368-3369.
284. Lakka, A.; Tsakalof, A., Molecular Imprinting of Tri-O-Acetyladenosine for the Synthetic Imitation of an ATP-Binding Cleft in Protein Kinases, *ChemPlusChem.* 2013, 78, 808-815.
285. Manuguerra, J. C.; van der Werf, S., Les antiviraux contre la grippe, *Virology.* 1999, 3, 439-452.
286. Jeulin, H.; Kedzierewicz, F.; Grancher, N.; Venard, V.; Quel avenir pour la ribavirine en dehors de l'hépatite C ?, *Virology.* 2009, 13, 83-92.

287. Rahman, S. K. A.; Yusof, N. A.; Abdullah, A. H.; Mohammad, F.; Idris, A.; Al-lohedan, H. A., Evaluation of porogen factors for the preparation of ion imprinted polymer monoliths used in mercury removal, *PLoS ONE*. 2018, 13, e019554.
288. Samuelsson, J.; Sajonz, P.; Fornstedt, T., Impact of an error in the column hold-up time for correct adsorption isotherm determination in chromatography: I. Even a small error can lead to a misunderstanding of the retention mechanism, *J. Chromatogr. A*. 2008, 1189, 19-31.
289. Spiess, A. N.; Neumeyer, N., An evaluation of R<sup>2</sup> as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach, *BMC. Pharmacology*. 2010, 10, 6.
290. Chen, Y.; Kele, M.; Quiñones, I.; Sellergren, B.; Guiochon, G., Influence of the pH on the behavior of an imprinted polymeric stationary phase-supporting evidence for a binding site model, *J. Chromatogr. A*. 2001, 927, 1-17.
291. Umpleby II, R. J.; Baxter, S. C.; Bode, M.; Berch Jr, J. K.; Shah, R. N.; Shimizu, K. D., Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta*. 2001, 435, 35-42.
292. Suedee, R., Novel Strategic Innovations for Designing Drug Delivery System Using Molecularly Imprinted Micro/Nanobeads, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. 2013, 20, 235-268.
293. Zhao, L.; Jianfu, D.; Michael, D.; Ye, T., Molecularly Imprinted Polymeric Nanospheres by Diblock Copolymer Self-Assembly, *Macromolecules*. 2006, 39, 2629-2636.
294. Xia., Q.; Yun, Y.; Qiang, L.; Huang, Z.; Liang, Z., Preparation and characterization of monodisperse molecularly imprinted polymer microspheres by precipitation polymerization for kaempferol. *Des. Monomers. Polym.* 2017, 20, 201–209.
295. (a) Li, K.; Stöver, H. D. H., Synthesis of monodisperse poly(divinylbenzene) microspheres, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 1993, 31, 3257-3263. (b) Hattori, M.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S., Highly crosslinked polymer particles by dispersion polymerization, *J. Appl. Polym. Sci.* 1993, 50, 2027-2034
296. Szabelski, P.; Kaczmarski, K.; Cavazzini, A.; Chen, Y. B.; Sellergren, B.; Guiochon, G., Energetic heterogeneity of the surface of a molecularly imprinted polymer studied by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr. A*. 2002, 964, 99-111.
297. Perlstein, J., *The Weak Hydrogen Bond In Structural Chemistry and Biology* (International Union of Crystallography, Monographs on Crystallography, 9) By Gautam R. Desiraju (University of Hyderabad) and Thomas Steiner (Freie Universität Berlin), *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 191-192.
298. Hernandez-Guerrero, M.; Min, E.; Barner-Kowollik, C.; Müller, A. H. E.; Stenzel, M. H., Grafting thermoresponsive polymers onto honeycomb structured porous films using the RAFT process, *J. Mater. Chem.* 2008, 18, 4718-4730.
299. Furukawa, F.; Kanehara, S.; Harano, F.; Shinohara, S.; Kamimura, J.; Kawabata, S.; Igarashi, S.; Kawamura, M.; Yamamoto, Y.; Miyachi, Y. Effects of adenosine 5'-monophosphate on epidermal turnover, *Arch. Dermatol. Res.* 2008, 300, 485–493.
300. Yan, H.; Tsai, M.D., Nucleoside monophosphate kinases: structure, mechanism, and substrate specificity, *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 1999, 73, 103-134.
301. Bellinzoni, M.; Haouz, A.; Graña, M.; Munier-Lehmann, H.; Shepard, W.; Alzari, P.M., The crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* adenylate kinase in complex with two

- molecules of ADP and Mg<sup>2+</sup> supports an associative mechanism for phosphoryl transfer, *Protein. Sci.* 2006, 15, 1489-1493.
302. Shen, X. ; Ye, L., Interfacial Molecular Imprinting in Nanoparticle-Stabilized Emulsions. *Macromolecules.* 2011, 44, 5631-5637.
303. Zhang, K.; Wu, W.; Meng, H.; Guo, K.; Chen, J. F., Pickering emulsion polymerization: Preparation of polystyrene/nano-SiO<sub>2</sub> composite microspheres with core-shell structure, *Powder. Technol.* 2009, 190, 393-400.
304. Finkle, P.; Draper, H. D.; Hildebrand, J. H., The theory of emulsification, *J. Am. Chem. Soc.* 1923, 45, 2780-2788.
305. Binks, B. P.; Lumsdon, S. O., Effects of oil type and aqueous phase composition on oil water mixtures containing particles of intermediate hydrophobicity, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2000, 2, 2959-2967.
306. Kabalnov, A. S.; Pertzov, A. V.; Shchukin, E. D., Ostwald ripening in emulsions: I. Direct observations of Ostwald ripening in emulsions, *J. Colloid. Interface. Sci.* 1987, 118, 590-597.
307. Sharma, T.; Kumar, G. S.; Chon, B. H.; Sangwai, J. S., Thermal stability of oil-in-water Pickering emulsion in the presence of nanoparticle, surfactant, and polymer, *J. Ind. Eng. Chem.* 2015, 22, 324-334.
308. Vasapollo, G.; Del Sole, R.; Mergola, L.; Lazzoi, M. R.; Scardino, A.; Scorrano, S.; Mele, G., Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 5908-5945.
309. Duan, L.; Chen, M.; Zhou, S.; Wu, L., Synthesis and Characterization of Poly (N-isopropylacrylamide)/Silica Composite Microspheres via Inverse Pickering Suspension Polymerization, *Langmuir.* 2009, 25, 3467-3472.
310. Shen, X.; Zhou, T.; Ye, L., Molecular imprinting of protein in Pickering emulsion, *Chem. Commun.* 2012, 48, 8198-8200.
311. Breton, F.; Delépée, R.; Jegourel, D.; Deville-Bonne, D.; Agrofoglio, L. A., Selective adenosine-5'-monophosphate uptake by water-compatible molecularly imprinted polymer, *Anal. Chim. Acta.* 2008, 616, 222-229.
312. Xu, F. J.; Li, H.; Li, J.; Zhang, Z.; Kang, E. T.; Neoh, K. G., Pentablock copolymers of poly(ethylene glycol), poly((2-dimethyl amino) ethyl methacrylate) and poly (2-hydroxyethyl methacrylate) from consecutive atom transfer radical polymerizations for non-viral gene delivery, *Biomaterials.* 2008, 19, 3023-3033.
313. Cooperstein, M. A.; Canavan, H. E., Assessment of cytotoxicity of (N-isopropylacrylamide) and Poly(N-isopropyl acrylamide)-coated surfaces, *Biointerphases.* 2013, 8, 19.
314. Moselhy, J.; Sarkar, S. ; Chia, M. C.; Mocanu, J. D.; Taulier, N.; Liu, F. F.; Wu, X. Y., Evaluation of copolymers of N-isopropylacrylamide and 2-dimethyl(aminoethyl)methacrylate in nonviral and adenoviral vectors for gene delivery to nasopharyngeal carcinoma, *Int. J. Nanomedicine.* 2007, 2, 461-478.
315. Koyanagi, K.; Takashima, Y.; Nakamura, T.; Yamaguchi, H.; Harada, A., Radical polymerization by a supramolecular catalyst: cyclodextrin with a RAFT reagent, *Beilstein J. Org. Chem.* 2016, 12, 2495-2502.

316. Koopal, L. K.; van Riemsdijk, W. H.; de Witt, J. C. M.; Benedetti, M. F., Analytical isotherm equations for multicomponent adsorption to heterogeneous surfaces, *J. Colloid. Interface. Sci.* 1994, 166, 51-60.
317. Lavignac, N.; Brain, K. R.; Allender, C. J., Concentration dependent atrazine–atrazine complex formation promotes selectivity in atrazine imprinted polymers, *Biosens. Bioelectron.* 2006, 22, 138-144.
318. Mohajeri, S. A.; Karimi, G.; Aghamohammadian, J.; Khansari, M. R. Clozapine Recognition via Molecularly Imprinted Polymers; Bulk Polymerization Versus Precipitation Method, *J. Appl. Polym. Sci.* 2011, 121, 3590-3595.
319. Adrus, N.; Ulbricht, M., Rheological studies on PNIPAAm hydrogel synthesis via in situ polymerization and on resulting viscoelastic properties, *React. Funct. Polym.* 2013, 73, 141–148.
320. Salian, V. D.; Byrne, M. E., Controlled Drug Release from Weakly Crosslinked Molecularly Imprinted Networks: The Benefit of Living Radical Polymerization, *Macromol. Chem. Phys.* 2013, 214, 2355–2366.
321. Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk, H.; Finkel, P., Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora, *Int. J. Cosmet. Sci.* 2006, 28, 359-370.
322. Huang, X.; Brazel, C. S., On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *J. Control. Release.* 2001, 73, 121-136.
323. Patent WO2009105258.
324. Akashil, M.; Tanaka, Y.; Iwasaki, H.; Miyauchi, N., Synthesis and polymerization of new vinyl derivatives of thymine, *Die Angew. Makromol. Chem.* 1987, 147, 207-213

## Liste des publications et des communications

### Publication:

1. **MG Ayari**, P Favetta, LA Agrofoglio \* “ Molecularly imprinted polymers based separation and sensing of nucleobases, nucleosides, nucleotides and oligonucleotides” Chap. 3, pp 65-123 in *Molecularly Imprinted Polymers for Analytical Chemistry Applications* Ed. PS Sharma & W Kutner, RSC **2018** (ISBN:978-1-78262-647-3)
2. **MG Ayari**, P Favetta, P Kadhivel, B Plano, C Dejous, B Carbonnier, LA Agrofoglio, Synthesis of imprinted hydrogel microbeads by inverse Pickering emulsion to controlled release of adenosine 5'-monophosphate. *Materials Science & Engineering C* (**2018**, submitted)
2. **MG Ayari**, P Favetta, V Vasseur, M Si-Tahar, B Carbonnier, LA Agrofoglio, Molecularly imprinted Hydrogel based on Ribavirin as drug delivery system for lung. *Journal of controlled release* (**2018**, submitted)

### Posters :

- « Real-time study of adenosine-5' monophosphate adsorption with a Love wave sensor based on molecularly imprinted polymer » by N. Lebal, H. Hallil, V. Raimbault, **M.G. Ayari**, J.L. Lachaud, A. Krstulja, R. Delépeé, L. Agrofoglio, C. Dejous, D. Rebière  
The 9th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2016), **Jun 2016**, Lund (SUEDE)
- « Screening of 5'-AMP analogs by MIP technology – thermodynamic aspects » by **M.G. Ayari**, P. Kadhivel, P. Favetta, L.A. Agrofoglio"  
The 9th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2016), **Jun 2016**, Lund (Suede)
- « Development of MIPs for the recognition of two urinary nucleoside cancer biomarkers » by A. Krstulja, **M.G. Ayari**, S. Lettieri, P. Favetta, A.J. Hall, L.A. Agrofoglio  
The 9th International Conference on Molecular Imprinting (MIP2016), **Jun 2016**, Lund (SUEDE)
- « Monitoring of colorectal cancer by Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of urinary nucleoside biomarkers » by **M.G. Ayari**, A. Krstulja, S. Lettieri, P. Favetta, A.J. Hall, L.A. Agrofoglio  
12th Biotechnocentre Congress, **Oct 2016**, Domaine SEILLAC, Centre val de loire (FRANCE)
- « Molecularly imprinted solid-phase for the extraction of urinary nucleoside biomarkers » by Krstulja, **M.G. Ayari**, S. Lettieri, P. Favetta, A.J. Hall, L.A. Agrofoglio  
12ème congrès francophone sur les sciences séparatives et les couplages de l'AFSEP, **Mar 2017**, Paris (FRANCE)
- « Molecular imprinting material as a new controlled release system » by **M.G. Ayari**, P. Favetta, V. Roy, L.A. Agrofoglio  
30th international conference on antiviral research (ICAR), **May 2017**, Atlanta (USA)
- « Ribavirin-Imprinted Polymers for Drug Sustained Release in Aqueous Media » **M.G. Ayari**, P. Favetta, V. Roy and L.A. Agrofoglio  
AFFINITY, **Jun 2017**, Paris (France)

« A new release control system by molecularly imprinted polymer » by **M.G. Ayari**, P. Favetta, V. Roy, L.A. Agrofoglio  
Journées d'animation scientifique de la fédération de recherche en infectiologie FERI, **Jul 2017**, Tours (FRANCE)

« Développement d'un Polymère à Empreinte Moléculaire pour la Libération Contrôlée de la Ribavirine » **M.G. Ayari**, P. Favetta, V. Hervin, V. Roy, M. Si-Tahar, L.A. Agrofoglio  
13th Biotechnocentre Congress, **Oct 2017**, Domaine SEILLAC, Centre Val de Loire (FRANCE)

### **Communications orales :**

« Synthèse de cargos polymériques pour la libération contrôlée de la Ribavirine » by **M.G. Ayari**, P. Favetta, V. Roy, L.A. Agrofoglio  
Journées d'animation scientifique de la fédération de recherche en infectiologie, **Jul 2018**, Tours (France)







Mohamed Ghazi AYARI



## Développement de Polymères à Empreintes Moléculaires pour la Libération Contrôlée de la Ribavirine et de l'Adénosine-5'-monophosphate

Ce rapport de thèse présente la synthèse de nouveaux cargos polymères associés à la technologie des empreintes moléculaires pour la libération contrôlée des analogues de nucléosides : la ribavirine pour le traitement du virus Influenza A par voie pulmonaire et l'adénosine-5'-monophosphate.

Nous nous sommes concentrés dans un premier lieu au développement de différentes formulations de MIPs en bulk sous forme hydrogels afin de mettre en place des systèmes de libération contrôlée de la ribavirine sous différents stimuli. Ensuite, nous nous sommes basés sur l'approche de « Dummy-template » en utilisant la 2',3',5'-tri-O-acétyl-ribavirine afin de diminuer la polarité de la ribavirine et ainsi accéder à différents solvants aprotique pour mieux stabiliser le complexe de pré-polymérisation. Cette étude a été faite en utilisant de nouveaux monomères synthétisés au sein du laboratoire et en les comparant avec un monomère commercial tel que l'acide méthacrylique. Ces différents MIPs ont montré des différences d'adsorption vis à vis de la ribavirine mais aussi des profils et des cinétiques de relargage différents et dépendant du milieu de libération ou de la température.

Dans un deuxième temps, nous avons transposé certaines formulations utilisant la 2',3',5'-tri-O-acétyl-ribavirine comme molécule template vers la synthèse de billes imprimées. Les MIPs sphériques obtenus ont permis d'avoir la géométrie et le diamètre recherchés pour être administrés par voie pulmonaire. L'incorporation de différents co-monomères ont permis de modifier l'architecture de ces billes en les rendant thermosensibles ou fluorescentes.

Finalement, nous avons, cette fois, synthétisé des polymères imprimés pour la libération contrôlée de l'adénosine-5'-monophosphate. Dans cette étude, nous avons étudié la libération à partir de la forme sphérique obtenue par polymérisation en émulsion de pickering inverse.

Mots clés : Ribavirine, MIP, Influenza A, libération contrôlée, voie pulmonaire, adénosine-5'-monophosphate.

## Development of Molecularly Imprinted Polymers for the Controlled Release of Ribavirin and Adenosine-5'-Monophosphate

This thesis report presents the synthesis of new polymeric cargos associated with molecular imprinting technology for the controlled release of nucleoside analogs: ribavirin for the treatment of pulmonary influenza A and adenosine 5'-monophosphate.

At first, we focused on the development of different formulations of bulk MIPs in hydrogel form with the aim of setting up controlled release systems for ribavirin under different stimuli. Then, we carried out a "Dummy-template" approach using 2', 3', 5'-tri-O-acetyl-ribavirin in order to reduce the polarity of ribavirin so that we could explore different aprotic solvents to better stabilize the pre-polymerization complex. This study was accomplished by the use of new monomers synthesized within the laboratory and by comparing them with a commercial monomer such as methacrylic acid. These different MIPs showed differences in adsorption with respect to ribavirin but also different release profiles and kinetics depending on the release medium or the temperature.

Secondly, we transposed the best formulations using 2', 3', 5'-tri-O-acetyl-ribavirin as template molecule towards the synthesis of imprinted beads. The spherical MIPs obtained showed desired geometry and diameter to be administered by the pulmonary route. The incorporation of various co-monomers allowed to modify the architecture of these beads by making them thermosensitive or fluorescent.

Lastly, this time, we have synthesized imprinted polymers for the controlled release of adenosine-5'-monophosphate. In this part, we studied the release from the spherical shape obtained by inverse Pickering emulsion polymerization.

Keywords : Ribavirin, MIP, Influenza A, Controlled Release, Pulmonary route, adenosine-5'-monophosphate.



ICOA  
Université d'Orléans  
BP 6759  
Rue de chartres  
45067 Orléans, Cedex 2

