



HAL
open science

Hydrogels adaptatifs stimuli-sensibles (temperature et lumière) à base d'acide hyaluronique (HA)

Mathieu Madau

► **To cite this version:**

Mathieu Madau. Hydrogels adaptatifs stimuli-sensibles (temperature et lumière) à base d'acide hyaluronique (HA). Chimie organique. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR066 . tel-03516216

HAL Id: tel-03516216

<https://theses.hal.science/tel-03516216v1>

Submitted on 7 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Hydrogels adaptatifs stimuli-sensibles (température et lumière) à base d'acide hyaluronique (HA)

**Présentée et soutenue par
MATHIEU MADAU**

**Thèse soutenue le 15/12/2021
devant le jury composé de**

MME CATHERINE AMIEL	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE PARIS-EST CRETEIL	Rapporteur du jury
M. JEAN-LUC SIX	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE DE LORRAINE	Rapporteur du jury
M. PATRICE WOISEL	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE DE LILLE	Membre du jury
M. LUC PICTON	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
MME VIRGINIE DULONG	INGENIEUR DE RECHERCHE RF, Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par LUC PICTON et VIRGINIE DULONG, Polymères, biopolymères, surfaces

Liste des abréviations et symboles

A : Absorbance

Azo : Azobenzène

C* : Concentration critique de recouvrement

C** : Concentration critique d'enchevêtrement

CD : Cyclodextrine

CDCl₃ : Chloroforme deutéré

δ : Déplacement chimique

Đ : Dispersité des masses molaires

D₂O : Eau deutérée

DDL : Diffusion dynamique de la lumière

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DMF : *N,N*-Diméthylformamide

DOSY : '*Diffusion Ordered Spectroscopy*'

DP_{POX} : Degré de polymérisation du greffon de polyoxazoline

DP_n : degré de polymérisation

DS : Degré de substitution

EDC : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

HA : Acide hyaluronique

Hydrogel φ : Hydrogel physique

Hydrogel χ : Hydrogel chimique

K_a : Constante d'affinité

LiNO₃ : nitrate de lithium

M_n : Masse molaire moyenne en nombre

M_w : Masse molaire moyenne en masse

NaOD : Deutéroxyde de sodium

NaH₂PO₄ : phosphate de sodium monobasique

Na₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de sodium

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

PBS : Tampon phosphate salin

PiPrOx-co-PnBuOx : Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-co-Poly(2-*n*-butyl-2-oxazoline)

PMeOx : Poly(2-méthyl-2-oxazoline)

PnPrOx : Poly(2-*n*-propyl-2-oxazoline)

POx : Polyoxazoline

R_g : rayon de giration

R_h : rayon hydrodynamique

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SEC/MALLS/UV/DRI/VD : Chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur à diffusion statique multi-angle de la lumière, un détecteur ultraviolet, un détecteur réfractométrique et un détecteur viscosimétrique

T3P® : Anhydride propylphosphonique

TBAOH : hydroxyde de tétrabutylammonium

T_{cp} : Température de point trouble

TEA : triéthylamine

T_{trans} : température de croisement G'/G''

UV-visible : Spectroscopie ultraviolet-visible

[η] : viscosité intrinsèque

[η]_w : Viscosité intrinsèque moyenne en masse

Sommaire général

Introduction générale	1
Chapitre A : Etude bibliographique	9
1 Les hydrogels	13
1.1 Historique	13
1.2 Propriétés physico-chimiques des hydrogels	17
1.2.1 Degré de gonflement	17
1.2.2 Densité de réticulation	19
1.2.3 Longueur de corrélation ξ	20
1.2.4 Propriétés rhéologiques des hydrogels	20
1.3 Hydrogels chimiques et hydrogels physiques	24
1.3.1 Hydrogels chimiques χ	24
1.3.1.1 Synthèse	24
1.3.1.2 Propriétés mécaniques	27
1.3.2 Hydrogels physiques ϕ	29
1.3.2.1 Synthèse	29
1.3.2.2 Propriétés réversibles	32
1.3.3 Hydrogels basés sur des liaisons covalentes dynamiques	34
1.4 Autres classifications des hydrogels	35
1.5 Domaines d'application des hydrogels	36
2 Les polysaccharides	42
2.1 Historique	42
2.2 Structure chimique et propriétés	45
2.3 L'acide hyaluronique (HA)	49
2.3.1 Structure et propriétés	49
2.3.2 Modification chimique	52
2.3.3 Application des HA modifiés	55
3 Les polymères thermosensibles	57
3.1 Principe et propriétés	57
3.2 Les poly(2-oxazoline)s	62
4 Les fonctionnalités photosensibles	67
4.1 Deux catégories principales	67

4.2	Applications des molécules photochromiques	69
4.3	Les azobenzènes.....	70
5	Conclusion	72
6	Bibliographie.....	73
Chapitre B : Matériels et Méthodes.....		97
1	Liste des produits chimiques employés	101
2	Méthodes de caractérisation chimique	102
2.1	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	102
2.2	Spectroscopies d'absorption de la lumière.....	108
2.2.1	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	109
2.2.2	Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-vis)	112
2.2.2.1	Principe.....	112
2.2.2.2	Mesure de points troubles	114
2.2.2.3	Cinétique de l'absorbance d'un dérivé d'azobenzène soluble en milieu acide	114
3	Méthodes de caractérisation physico-chimique.....	115
3.1	Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée MALLS	115
3.2	Viscosimétrie à faible cisaillement.....	121
3.3	Rhéologie.....	122
3.4	Diffusion dynamique de la lumière (DDL)	124
4	Caractérisation des composés employés	127
4.1	L'acide hyaluronique	127
4.1.1	Propriétés physico-chimiques	127
4.1.2	Conversion en sel de tétrabutylammonium.....	130
4.1.2.1	Contexte	130
4.1.2.2	Réaction.....	130
4.2	La Jeffamine® M2005	133
4.3	Les polyoxazolines.....	136
4.4	Les azobenzènes.....	146
4.4.1	Modification chimique	146
4.4.2	Caractérisation	150
5	Références.....	156

Chapitre C : Elaboration d'hydrogels thermosensibles à base de HA-g-M2005	161
1 Introduction.....	165
2 Article.....	166
3 Causes de la dégradation du HA_{1200k} en milieu aqueux.....	187
4 Conclusion	188
5 Références.....	189
Chapitre D : Elaboration d'hydrogels thermosensibles à base de HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx)	191
1 Introduction.....	195
2 Synthèse du HA-g-PMeOx	195
2.1 Sélection de la stratégie de synthèse.....	195
2.2 Synthèse du PMeOx par voie thermique	198
2.3 Greffage du PMeOx sur le HA	201
2.3.1 Protocole de la réaction	201
2.3.2 Caractérisation moléculaire	203
2.3.3 Optimisation de la purification	205
2.3.4 Efficacité du greffage et analyse des propriétés des échantillons.....	210
3 Synthèse du HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx)	215
3.1 Protocole de la réaction	215
3.2 Caractérisation moléculaire	217
3.3 Caractérisation physico-chimique.....	222
3.3.1 Grandeurs physico-chimiques obtenues par SEC/MALLS/VD/DRI.....	222
3.3.2 Analyse de la T_{cp} par spectroscopie UV-vis.	225
3.4 Caractérisation rhéologique de la formation des hydrogels par élévation de la température.....	229
3.4.1 Mesure de la transition hydrogel par rampe thermique	229
3.4.1.1 Influence du ratio $iPrOx/nBuOx$ sur T_{trans}	234
3.4.1.2 Influence du DS sur T_{trans}	238
3.4.1.3 Influence du DP_{POx}	238
3.4.1.4 Influence de la masse molaire du HA sur T_{trans}	240
3.4.2 Impact du protocole de synthèse sur les propriétés des échantillons obtenus	241
3.4.3 Etude de la relaxation des gels	242
3.4.4 Etude de l'injectabilité du gel.....	244

4	Conclusion	246
5	Références	248
	Chapitre E : Fonctionnalisation du HA avec des composés photosensibles.....	253
1	Introduction.....	257
2	Fonctionnalisation du HA avec un dérivé azobenzène.....	258
3	Propriétés physico-chimiques des HA-<i>g</i>-azo.	267
3.1	Analyses SEC/MALLS/UV/VD/DRI.....	267
3.2	Etude de la transition <i>trans</i> → <i>cis</i>	268
4	Formation de complexes d'inclusion avec des cyclodextrines	273
4.1	Complexes avec des cyclodextrines libres	273
4.2	Fonctionnalisation du HA avec l'α-cyclodextrine.....	278
5	Conclusion	287
6	Références	288
	Conclusion générale et perspectives.....	291
	Annexe 1 : Calcul du DS des HA-<i>g</i>-PMeOx.....	301
	Annexe 2 : RMN 2D du HA-<i>g</i>-PMeOx	303
	Annexe 3 : Balayage en fréquence du HA_{990k}-<i>g</i>-(<i>PiPrOx-co-PnBuOx</i>)-0,15 à 10 g.L⁻¹ dans le PBS	306
	Annexe 4 : Détail du calcul de la concentration en azobenzène d'une solution de HA-<i>g</i>-azo	307
	Annexe 5 : Communications et articles	308

INTRODUCTION GENERALE

Les hydrogels sont des matériaux mous constitués d'un réseau tridimensionnel de polymères hydrophiles réticulés physiquement ou chimiquement et capables de retenir un volume important d'eau. On les retrouve couramment dans de nombreuses applications tels les absorbants à base d'acide polyacrylique présents dans les produits hygiéniques à destination des nourrissons, les lentilles de contact à base de polyméthacrylate d'hydroxyéthyle réticulé, les pansements à base d'alginate de calcium, les agents gélifiants pour l'industrie agroalimentaire comme la gélatine, les carraghénanes ou l'agar-agar. Malgré les nombreuses utilisations précitées qui pourraient laisser présager que le sujet a été largement traité, les hydrogels présentent toujours un intérêt certain pour la recherche : ils sont utilisés dans de nombreux projets portant sur le développement de systèmes de rétention pour la libération localisée et contrôlée de principes actifs dans l'organisme ou d'hydrogels injectables pour l'ingénierie tissulaire, par exemple. A titre d'illustration, l'agence nationale de la recherche a financé 84 projets concernant le développement d'hydrogels depuis sa création et 26 projets entre janvier 2018 et décembre 2021.

Les hydrogels sont communément classés en deux catégories selon le type de réticulation dont ils sont constitués, ces dernières ayant un impact conséquent sur leurs propriétés (Figure 1). On parle ainsi d'hydrogels chimiques (χ) lorsque les réticulations interchaînes sont de nature covalente. Elles permettent l'obtention d'une structure stable, mais irréversible, l'énergie nécessaire à rompre les réticulations étant alors du même ordre de grandeur que celles du squelette et des fonctionnalités du polymère servant de base à la structure. Ils sont appliqués par exemple pour produire des lentilles de contact souples. La seconde catégorie est celle des hydrogels physiques (ϕ), dont les réticulations sont à l'inverse plutôt basées sur des liaisons de type ionique ou ionotropique (alginate de calcium), Van der Waals, ou encore liaisons Hydrogène (exemple : complexe de Polyéthylène glycol et d'acide polyméthacrylique), entre autres. Etant donné qu'elles sont de plus faible énergie que les liaisons covalentes, elles sont plus faciles à rompre et à se reformer conduisant à des structures dynamiques dont les temps de relaxation peuvent être très variables en fonction des systèmes envisagés. Ainsi les réticulations physiques présentent l'avantage d'être réversibles. Leur propriété d'association/dissociation dépendra en grande partie de leur environnement physico-chimique, à savoir la force ionique, le pH, la température ou encore la polarité du milieu. Les hydrogels physiques permettent donc de constituer des systèmes auto-réparant (qui pourront se réassocier après rupture). Pour certains systèmes, il est possible de contrôler les conditions

de formation des associations sous l'effet de paramètres extrinsèques variés. On parle alors d'hydrogels stimuli-sensibles, dont il est possible d'adapter les propriétés physicochimiques. En particulier, il est possible de concevoir des transitions sol/gel réversibles obtenues par le biais de stimuli adaptables pour convenir à l'application ciblée. Ces derniers constituent l'objet de cette étude qui a pour but de développer des systèmes thermosensibles et photosensibles.

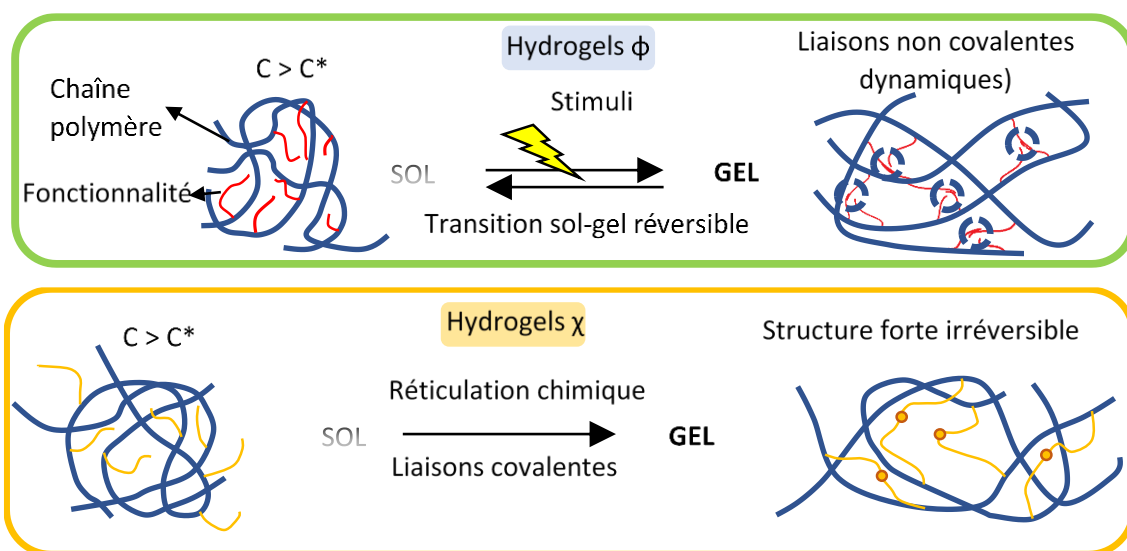


Figure 1 Représentation des hydrogels physiques (haut) et des hydrogels chimiques (bas).

Les hydrogels peuvent être composés de polymères naturels (ex : alginate de calcium) ou de polymères synthétiques (ex : acide polyacrylique). Si des applications dans le domaine biomédical ou en cosmétique sont visées, il y a un intérêt évident à les baser sur des matériaux biocompatibles d'origine naturelle, issus de ressources renouvelables comparées aux dérivés synthétiques qui sont la plupart du temps pétrosourcés. Les polysaccharides, tels l'alginate ou les carraghénanes, sont particulièrement utilisés dans ce domaine. Cependant, les propriétés des polymères d'origine naturelle sont limitées à leurs structures intrinsèques et n'offrent pas les possibilités de contrôle et d'optimisation que l'on va retrouver chez les polymères synthétiques. L'idée première de ce projet de thèse est donc de partir d'un polysaccharide, l'acide hyaluronique, produit dans l'organisme humain et déjà très utilisé dans le domaine biomédical et de le fonctionnaliser avec des composés synthétiques pour lui conférer des propriétés adaptatives stimuli-sensibles dont il ne dispose pas nativement, qui lui permettront de présenter des transitions sol/gel physiques par le biais d'un stimulus (température ou lumière). Ce polysaccharide présente en outre l'avantage d'avoir une structure bien définie présentant une alternance d'unités acides glucuroniques (GlcA) avec des unités *N*-

acétylglucosamines (GlcNAc) par des liaisons β 1 \rightarrow 3 (GlcA \rightarrow GlcNAc) et β 1 \rightarrow 4 (GlcNAc \rightarrow GlcA) (Figure 2). Il peut présenter des masses molaires très élevées, de l'ordre du million de daltons. L'acide hyaluronique présente des fonctionnalités de type alcool, acide carboxylique, acétal et amide qui peuvent être utilisées pour sa modification chimique. Parmi ces dernières, l'acide carboxylique présente l'avantage de n'être présent qu'en un seul exemplaire sur l'unité disaccharide (ce qui permet une fonctionnalisation localisée) et de pouvoir être converti en divers groupes fonctionnels (esters, amides) en conditions relativement douces. Les polysaccharides sont en effet généralement fragiles, ce qui empêche l'utilisation de conditions trop rudes lorsqu'ils sont employés dans une réaction de synthèse et l'acide hyaluronique ne constitue pas une exception à cette tendance.

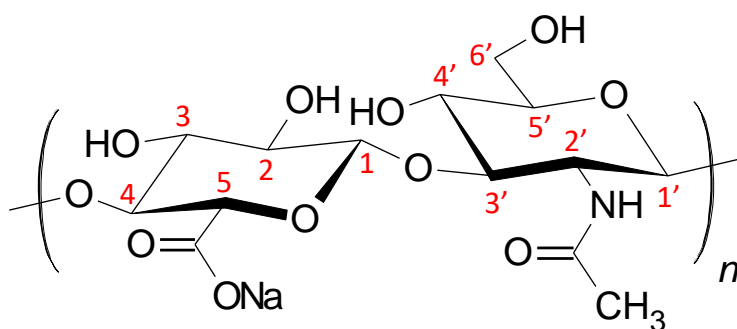


Figure 2 Structure de l'acide hyaluronique.

L'essentiel de ce manuscrit sera consacré à la fonctionnalisation d'acide hyaluronique de masses molaires variables avec des polymères thermosensibles présentant des propriétés de type LCST (*'lower critical solution temperature'*). La LCST est une température au-delà de laquelle la chaîne macromoléculaire passe d'un état soluble à insoluble dans un solvant donné, l'eau dans notre cas. Dans un premier temps, un polyétheramine commercial, la Jeffamine[®] M2005, sera greffé sur l'acide hyaluronique par le biais d'une méthode développée au préalable au sein du laboratoire. Cette dernière est basée sur l'utilisation d'un agent de couplage pour activer la fonctionnalité acide carboxylique du polysaccharide en vue de former une liaison amide par réaction avec l'amine terminale de la Jeffamine[®] M2005. Dans une seconde approche, le greffage d'une autre famille de polymères, les poly(2-alkyl-2-oxazoline), à propriétés LCST modulables, sur l'acide hyaluronique sera abordé en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'impact de la composition monomérique de copolymères de poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-*co*-poly(2-*n*-butyl-2-oxazoline) sur leurs propriétés thermosensibles sera étudié. Puis, la fonctionnalisation originale en une étape de l'acide hyaluronique avec cette famille de polymères sera proposée

dans un premier temps avec le poly(2-méthyl-2-oxazoline), non thermosensible, qui présente la structure la plus simple et dont le monomère est disponible à un prix relativement peu élevé. Cette réaction sera ensuite étendue aux poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-co-poly(2-*n*-butyl-2-oxazoline). Les transitions sol/gel des dérivés élaborés à base d'acide hyaluronique fonctionnalisés seront ensuite évalués notamment par mesures rhéologiques.

Dans la dernière partie de cette étude, plus prospective, nous nous sommes intéressés au contrôle des propriétés physicochimiques de dérivés à base d'acide hyaluronique sous l'influence d'une photostimulation. Dans cette approche, l'acide hyaluronique sera fonctionnalisé avec un groupe chromophore, l'azobenzène, qui peut passer d'une conformation *trans* à une conformation *cis* selon la longueur d'onde à laquelle il est irradié, ce qui entraîne un changement de polarité de la molécule. Un dérivé azobenzène sera tout d'abord modifié de façon à présenter une fonction amine permettant de le greffer sur l'acide hyaluronique. L'évolution des propriétés de l'acide hyaluronique ainsi modifié sera évaluée par spectrophotométrie UV/visible, par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion statique de la lumière multi-angle (SEC/MALLS) ainsi que par rhéologie. Enfin, dans le cadre d'études préliminaires et pour améliorer l'amplitude des transitions envisagées, l' α -cyclodextrine (CD) a été utilisée pour former des complexes d'inclusion sélectifs avec l'azobenzène selon l'état conformationnel de ces derniers (possible en *trans* mais pas en *cis*).

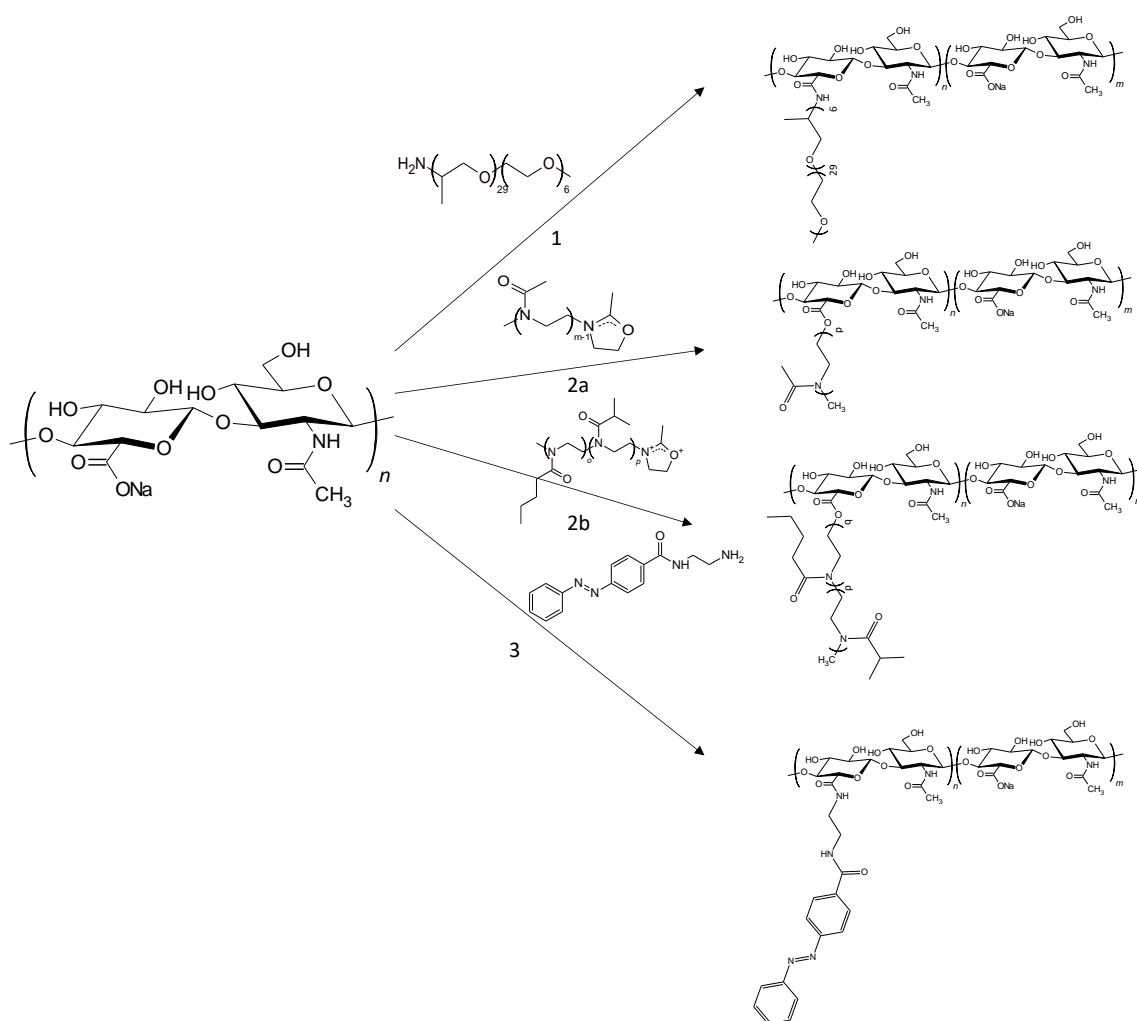


Figure 3 Représentation des différentes fonctionnalisations de l'acide hyaluronique qui seront entreprises au cours de cette thèse.

Chapitre A : Etude bibliographique

Sommaire

1	Les hydrogels	13
1.1	Historique	13
1.2	Propriétés physico-chimiques des hydrogels	17
1.2.1	Degré de gonflement.....	17
1.2.2	Densité de réticulation	19
1.2.3	Longueur de corrélation ξ	20
1.2.4	Propriétés rhéologiques des hydrogels	20
1.3	Hydrogels chimiques et hydrogels physiques.....	24
1.3.1	Hydrogels chimiques χ	24
1.3.1.1	Synthèse	24
1.3.1.2	Propriétés mécaniques.....	27
1.3.2	Hydrogels physiques ϕ	29
1.3.2.1	Synthèse	29
1.3.2.2	Propriétés réversibles	32
1.3.3	Hydrogels basés sur des liaisons covalentes dynamiques	34
1.4	Autres classifications des hydrogels.....	35
1.5	Domaines d'application des hydrogels	36
2	Les polysaccharides	42
2.1	Historique	42
2.2	Structure chimique et propriétés.....	45
2.3	L'acide hyaluronique (HA)	49
2.3.1	Structure et propriétés	49
2.3.2	Modification chimique.....	52
2.3.3	Application des HA modifiés	55
3	Les polymères thermosensibles	57
3.1	Principe et propriétés	57
3.2	Les poly(2-oxazoline)s.....	62
4	Les fonctionnalités photosensibles	67
4.1	Deux catégories principales.....	67

4.2	Applications des molécules photochromiques.....	69
4.3	Les azobenzènes.....	70
5	Conclusion	72
6	Bibliographie.....	73

1 Les hydrogels

1.1 Historique

Les hydrogels sont des matériaux mous constitués d'un réseau de polymères hydrophiles réticulés capables de retenir un volume important d'eau sans être dissouts¹⁻⁴. Ils rencontrent des applications dans de multiples domaines tels le biomédical, les produits hygiéniques, l'industrie agroalimentaire et l'agriculture⁵. Ils constituent une classe particulière de gels, une catégorie de matériaux colloïdaux définis pour la première fois par Thomas Graham en 1861, à une époque où la notion de macromolécule, introduite par Hermann Staudinger en 1920, n'existait pas encore^{6,7}. Ils sont notamment étudiés en vue d'être utilisés dans des applications au contact de tissus vivants, que ce soit comme revêtement dans les cathéters ou comme remplacement de l'humeur vitrée, car ils permettent de surmonter certains inconvénients des polymères rigides du point de vue de la biocompatibilité, à savoir une tension superficielle non usuelle pour les tissus biologiques, une imperméabilité aux métabolites et une tendance à provoquer une irritation mécanique^{3,8}. Wichterle et Lim ont ainsi défini les propriétés que doivent posséder les matériaux polymères destinés à être en contact avec les tissus biologiques, à savoir une structure pouvant contenir de l'eau (et donc la présence de domaines hydrophiles), ne pas être affecté par les procédés biologiques usuels (encore que cela puisse être tourné en avantage dans le cas de système à libération contrôlée⁹) et une perméabilité aux métabolites, tous ces critères étant potentiellement remplis par les hydrogels. Ils ont conclu que les méthacrylates de glycol étaient particulièrement attractifs du fait de leur hydrophilie et pouvaient être utilisés dans des applications telles que les lentilles de contact, un système à base de méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA) copolymérisé avec du diméthacrylate d'éthylène (afin de former les réticulations) se révélant suffisamment prometteur pour permettre une production industrielle de ces matériaux offrant une alternative souple aux lentilles dures à base de polyméthacrylate de méthyle connues depuis les années 30 ou en verre^{8,10-12}. Elles sont en effet plus facile à poser et mieux tolérées mais sont plus fragiles, se déforment plus facilement provoquant alors une modification de la correction visuelle et sont moins perméables à l'oxygène que les lentilles dures (ce qui peut poser problème pour la cornée)³. Ces défauts ont entraîné de nombreuses études ultérieures visant à améliorer leurs propriétés mécaniques^{11,13}.

De nombreuses études pionnières dans le domaine des hydrogels se sont focalisées sur des systèmes synthétiques, même si les matériaux d'origine naturelle étaient également étudiés.

En 1975, les familles principales d'hydrogels ont ainsi été définies comme suit : les polyméthacrylates d'hydroxyalkyle; les polyacrylamides, les polyméthacrylamides et dérivés; les Poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone); les hydrogels cationiques et anioniques; les complexes à base de polyélectrolytes et les alcools polyvinyliques³.

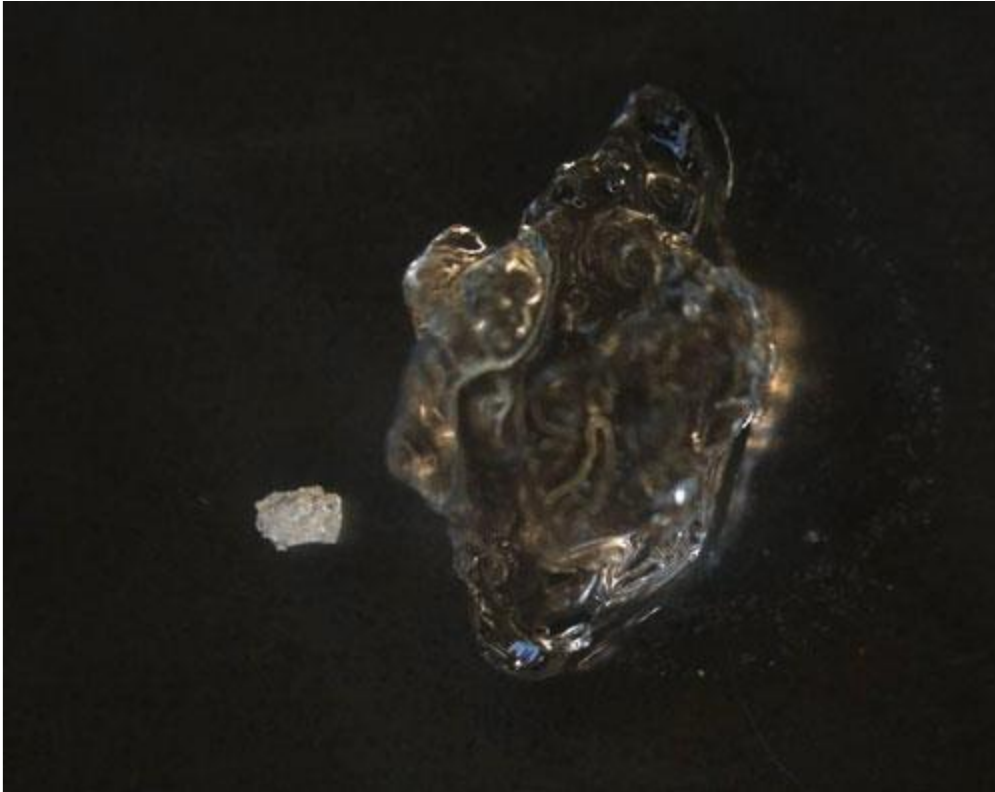


Figure A-1 Polymères super-absorbant à l'état sec (gauche) et à l'état humide (droite)¹⁴

Parmi les applications les plus connues des hydrogels synthétiques, on peut notamment citer les polymères super-absorbants à base d'acide polyacrylique (PAA) réticulé, découverts par Kuhn *et coll.* à la fin des années 40, mais surtout développés pour une exploitation industrielle au cours des années 80. Ils sont capables de retenir un volume très important d'eau (près de 1000 grammes par gramme de polymère, voir Figure A-1) du fait de la présence de charges issues du PAA, ce qui entraîne une forte hydrophilie de la structure^{14,15}. Les hydrogels de PAA sont ainsi utilisés dans des produits d'hygiène individuelle courants comme les couches culottes et les serviettes périodiques même si les quantités de liquides physiologiques absorbées sont un peu plus faibles que l'eau pure en raison de leur force ionique et du caractère polyélectrolyte des hydrogels¹⁵. Ils sont industrialisés entre autres par la société BASF.

La plupart des premiers hydrogels à base de polymères synthétiques étaient basés sur des réticulations covalentes, obtenues notamment par l'incorporation de monomères contenant plusieurs double-liaisons (des agents de réticulation)³. Une exception notable provenait des complexes à base de polyélectrolytes, qui sont issus de l'association de polycations et de polyanions. L'un des premiers exemples, le Ioplex® 101, est composé de poly(vinyl benzyltriméthylammonium chloride) (polycation) associé à du poly(styrène sulfonate) de sodium (polyanion). Il semblait prometteur pour des applications biomédicales en tant que revêtement destiné à limiter le risque de thrombose dans les vaisseaux sanguins en limitant l'adhésion et la déformation de plaquettes sanguines sur le matériau^{3,16,17} et par la suite, d'autres complexes de polyélectrolytes ont été développés¹⁸.

Plus récemment, l'émergence de systèmes polymères thermosensibles comme le poly(*N*-isopropylacrylamide) PNIPAM ou les polyéthers de glycol, qui deviennent insolubles dans l'eau au-delà d'une certaine température, a permis le développement d'hydrogels thermosensibles. Hoffman *et coll.* ont par exemple étudié en 1986 l'évolution des propriétés d'hydrogels formés à partir de PNIPAM réticulé, qui passaient d'un état gel translucide à un état insoluble et opaque du fait que les chaînes polymères se recroquevillaient par augmentation de la température¹⁹.

Il convient cependant de noter que la biocompatibilité des polymères synthétiques sera souvent plus limitée que celle de matériaux naturels³. Bruck avait proposé en 1973 une liste de critères à satisfaire pour qu'un implant médical puisse être qualifié de biocompatible : il faut que le matériau ne soit pas altéré de façon délétère au sein de l'organisme, qu'il n'endommage pas les tissus vivants, qu'il ne soit pas toxique ni ne provoque de développement de cancer ou de réaction allergique, qu'il ne détruise ni n'altère les protéines et enzymes du plasma ou les éléments présents dans le sang en cas de circulation dans ce dernier, qu'il n'amenuise pas la présence d'électrolytes au sein des tissus et qu'il ne se dégrade pas au cours de sa stérilisation⁴. Il y a donc un fort intérêt à substituer les polymères synthétiques par des polymères naturels, comme les protéines ou les polysaccharides, qui sont plus proches de la composition de la matrice extracellulaire²⁰. Ces derniers sont d'ailleurs les premières macromolécules que l'homme ait exploitées de façon industrielle avec notamment la cellulose et ses dérivés semi-synthétiques²¹. Cependant, le fait que leur structure soit plus complexe et moins évidente à modifier que les dérivés synthétiques explique sans doute qu'ils aient initialement connu moins d'entrain que leurs homologues synthétiques (on constatera par exemple que la structure d'un

polysaccharide comme l'alginate n'était pas encore pleinement élucidée au cours des années 1940^{22,23}). Pour autant, certains hydrogels naturels sont connus depuis longtemps : on citera notamment l'agar-agar, un polysaccharide qui après avoir été dissout dans l'eau à une température supérieure à 95 °C forme un gel physique très fort dans l'eau au cours du refroidissement de la solution. Les chaînes d'agar-agar passent, en refroidissant, d'une conformation pelote à une conformation hélice, puis s'agrègent, ce qui aboutit à la formation d'une structure tridimensionnelle²⁴. Si le mécanisme de sa gélification fait encore l'objet d'études récentes, l'utilisation de ses propriétés gélifiantes remonte au 17^{ème} siècle au Japon où il a permis le développement de certaines pâtisseries comme le 'yōkan' encore consommées de nos jours et a été employé en science au 19^{ème} siècle pour la conception de milieux de culture en microbiologie et est, là-aussi, toujours utilisé dans ce domaine²⁵. On peut mentionner de même la gélatine, une protéine issue de la dénaturation du collagène qui gélifie également en solution aqueuse par refroidissement d'une solution préalablement chauffée. Le gel se forme quand la température baisse en-dessous de 30 °C par un mécanisme de changement de conformation similaire à l'agar-agar²⁶. Les hydrogels à base d'alginate, un polysaccharide issu des algues brunes sont également connus depuis longtemps. Le mécanisme de gélification est ici différent, il ne passe pas par un changement de conformation induit par la température, mais résulte d'une réticulation physique provoquée par l'action d'ions multivalents comme le calcium ou l'aluminium^{23,27}. Ces gels sont réversibles et peuvent perdre leur structure 3D par l'action d'une solution contenant du chlorure de sodium²⁸. Il est utilisé comme pansement (ex : pansements NU-GELTM)²⁹ ou comme additif alimentaire³⁰. On peut aussi mentionner comme autres exemples historiques d'hydrogels obtenus à partir de dérivés naturels, les dextrans réticulés chimiquement^{3,31}, les κ et les ι-carraghénanes, les pectines, la gomme gellane ainsi que certains dérivés semi-synthétiques de la cellulose thermo-gélifiants, à savoir la méthylcellulose et l'hydroxypropylmethylcellulose³⁰. Ces derniers, étant composé de polymères biologiques et synthétiques, constituent donc des hydrogels hybrides¹⁰.

Les structures de certains polymères présentés sont résumées Figure A-2.

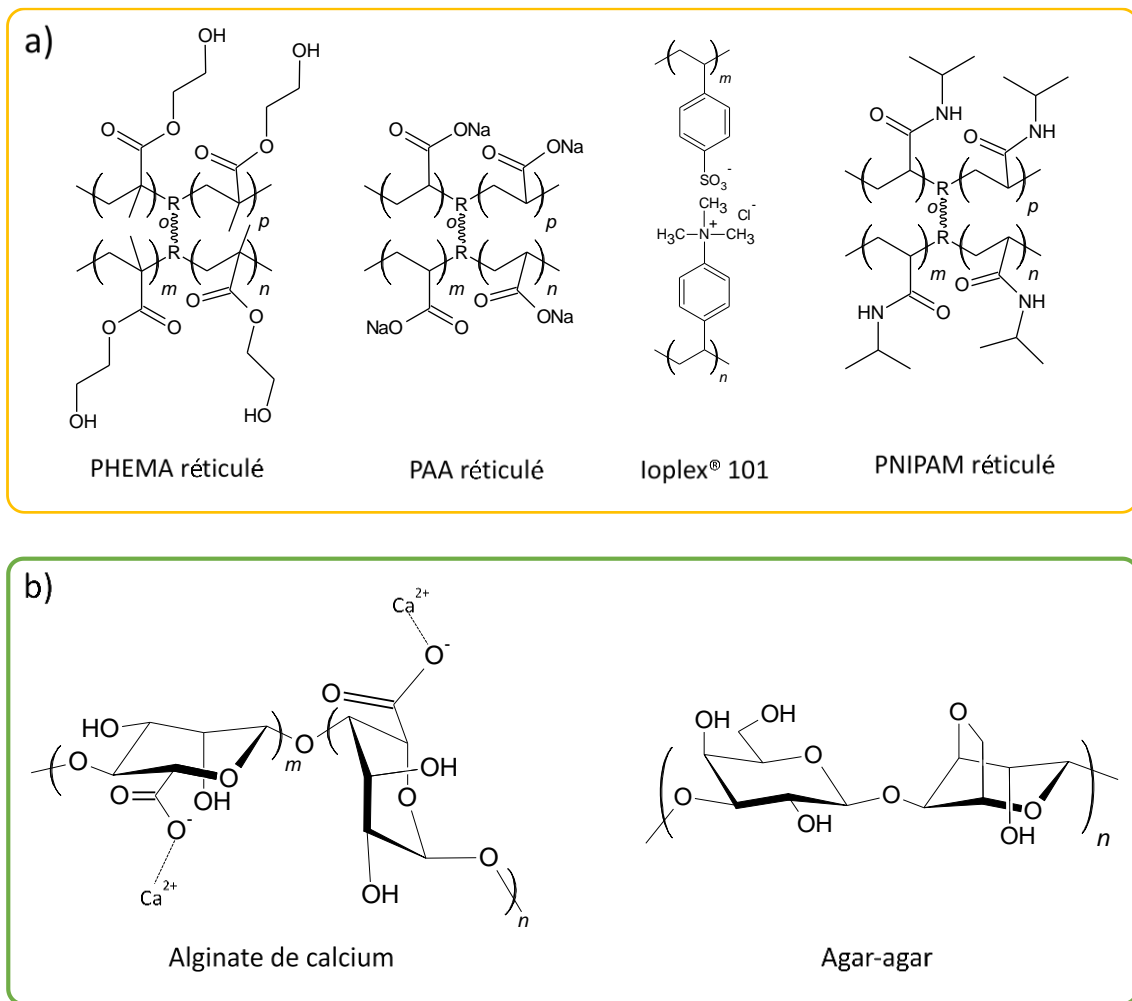


Figure A-2 a) Hydrogels synthétiques. b) Polysaccharides naturels gélifiants.

1.2 Propriétés physico-chimiques des hydrogels

1.2.1 Degré de gonflement

Du fait de son affinité avec l'eau et de sa structure tridimensionnelle, un hydrogel est capable de retenir un certain volume d'eau, ce qui va entraîner un gonflement de sa structure. Ce gonflement peut être modélisé par les théories de Frenkel, Flory et Rehner, bien que ce modèle soit discuté^{6,32,33}. Le gonflement d'un hydrogel est issu d'un équilibre entre deux phénomènes opposés, à savoir la solvatation du polymère hydrophile qui va tendre à se répandre en solution aqueuse avec laquelle il a une forte affinité (mélange) et l'élasticité du réseau macromoléculaire réticulé qui va à l'inverse entraîner la rétraction des chaînes afin de ne pas rompre les nœuds de réticulation^{6,33}. Cet équilibre peut se traduire par une équation faisant intervenir l'expression de l'enthalpie libre :

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{élastique} + \Delta G_{mélange} \quad (A-1)$$

$\Delta G_{élastique}$ correspond à la contribution de l'élasticité de l'hydrogel à l'enthalpie libre et $\Delta G_{mélange}$ à celle du mélange^{32,33}, ΔG_{total} devenant nul à l'équilibre³⁴. $\Delta G_{mélange}$ peut s'exprimer selon la théorie de Flory-Huggins qui modélise le comportement de chaînes polymères en solution^{32,34,35} :

$$\Delta G_{mélange} = RT[N_1 \ln(\varphi_1) + N_2 \ln(\varphi_2) + \chi_{12} N_1 \varphi_2] \quad (A-2)$$

N_1 et N_2 correspondent respectivement aux nombres de molécules du solvant et du polymère, ϕ_1 et ϕ_2 sont respectivement les fractions volumiques du solvant et du polymère, R la constante des gaz parfaits, T la température en Kelvin et χ_{12} le paramètre d'interaction solvant-polymère de Flory-Huggins^{34,35}. McKenna *et coll.* ont montré que contrairement à ce qui était admis, χ_{12} dépend de la densité de réticulation du polymère³². En étudiant des hydrogels de PVA, ils ont notamment observé que ce paramètre était plus élevé pour le gel que pour le polymère équivalent non réticulé en solution aqueuse et qu'il pouvait être exprimé en fonction de la concentration en polymère pour seule variable³². χ_{12} peut être déterminé en mesurant la pression osmotique de l'hydrogel et son module élastique issu de la loi de Hooke³². $\Delta G_{élastique}$ peut être déterminé en utilisant la théorie de l'élasticité des élastomères³³. Cependant, dans le cas où l'hydrogel contiendrait des fonctionnalités ioniques, l'expression de ΔG_{total} se complique du fait des répulsions électrostatiques présentes au sein de la structure, ce qui se traduit par l'apparition d'un nouveau terme $\Delta G_{ionique}$. L'expression de ce paramètre fait intervenir la contribution de Donnan sur la pression osmotique issue de la solvataion des ions par le solvant. Elle dépendra notamment de la force ionique et de la nature des ions présents dans le milieu^{6,33,36}.

Dans la pratique, beaucoup de groupes mesurent principalement le degré de gonflement de leur hydrogel, noté Q , cette mesure étant facile à mettre en application. A ce sujet, il n'y a pas de définition universelle et il est important de se référer à celle donnée par la publication étudiée. Certains utilisent l'équation suivante :

$$Q = \frac{m_{gel\ gonflé}}{m_{gel\ sec}} \quad (A-3a)$$

$m_{gel\ gonflé}$ représente la masse de l'hydrogel, et $m_{gel\ sec}$ celle mesurée quand il est sec^{1,37}. D'autres préfèrent utiliser une formule similaire en remplaçant la masse par le volume correspondant^{6,38}. Dans cette approche, la mesure peut se faire par sédimentation d'un gel à l'équilibre dans des

cellules d'ultracentrifugation et la valeur obtenue peut permettre par la suite d'estimer la masse molaire moyenne du polymère entre deux nœuds de réticulation M_c ³⁸. Dans les deux cas, la valeur de Q en solution aqueuse est nécessairement supérieure ou égale à l'unité. C'est la raison pour laquelle certains préfèrent utiliser la formule suivante qui donnera une valeur minimale théorique nulle³⁹⁻⁴¹ :

$$Q = \frac{m_{gel\ gonflé} - m_{gel\ sec}}{m_{gel\ sec}} \quad (A-3b)$$

Il convient de noter que le gonflement des hydrogels physiques est plus complexe que pour les hydrogels chimiques du fait de la nature dynamique de leurs réticulations qui peuvent s'associer et se dissocier en permanence. Les jonctions peuvent en effet se rompre sous l'impact de la pression osmotique entraînant à terme la dispersion des chaînes polymères sous forme d'agrégats ou en solution⁶.

D'une manière générale, le gonflement sera inversement proportionnel à la densité de réticulation.

1.2.2 Densité de réticulation

La densité de réticulation, qui peut être définie comme la concentration en nœuds de réticulation par unité de volume ou de masse, a une importance déterminante sur les propriétés mécaniques de l'hydrogel formé ainsi que sur le degré de gonflement dans l'eau. Plus le nombre de jonctions est élevé, plus la structure sera contractée et forte mais aussi plus cassante ce qui peut être indésirable^{33,42}. A l'inverse, moins il est élevé, plus la structure sera expansée¹³ mais avec des propriétés mécaniques amoindries. La densité de réticulation peut être évaluée par la masse molaire moyenne du polymère entre chaque liaison inter-chaîne M_c ou par le degré de polymérisation moyen équivalent P_c qui peut aussi être déterminé par la théorie de Flory et Rehner selon l'équation suivante^{33,38} :

$$P_c = \frac{\frac{2\phi_2}{f} - \sqrt[3]{\phi_2}}{\phi_2 + \ln(1 - \phi_2) + \chi_{12}\phi_2^2} \quad (A-4)$$

ϕ_2 est la fraction volumique du polymère, χ_{12} le paramètre d'interaction solvant-polymère de Flory-Huggins et f la fonctionnalité des sites de réticulation³⁸.

1.2.3 Longueur de corrélation ξ

Le maillage du gel correspond à la distance entre deux réticulations et sert à évaluer la porosité de l'hydrogel, qui peut être macro-poreux, micro-poreux, voire nano-poreux³³. La taille des pores est souvent estimée par l'utilisation de la longueur de corrélation ξ , qui a d'abord été introduite comme étant la distance entre deux points de contact au sein d'une chaîne macromoléculaire en régime semi-dilué⁴³ avant d'être étendue aux hydrogels, où ce paramètre représente alors la distance entre deux nœuds de réticulation⁴⁴. Des études ont montré que ξ était inversement proportionnel à la fraction volumique du polymère dans le solvant ϕ_2 selon une loi de puissance également appelée loi d'échelle, qui ne s'exprimera pas de la même façon selon la concentration du gel ou si le polymère en solution est à l'état semi-dilué ou gel⁴⁴.

1.2.4 Propriétés rhéologiques des hydrogels

La rhéologie est le domaine relatif à l'étude des propriétés d'écoulement et de déformation des fluides. Elle est notamment appliquée aux polymères qu'ils soient à l'état fondu ou en solution. Le chimiste étatsunien Eugene Cook Bingham en est le pionnier avec ses études sur les fluides présentant un seuil d'écoulement, ne pouvant se déformer qu'après avoir vaincu sa cohésion interne et par la création en 1929 de la '*Society of Rheology*' où le terme de rhéologie est adopté^{45,46}. La rhéologie a longtemps été appliquée à l'étude de la viscosité dite cinématique d'un fluide ν (exprimant la viscosité dynamique ramenée à la masse volumique du fluide, en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), souvent obtenue en mesurant sa vitesse d'écoulement dans un capillaire. Ce dispositif présente l'inconvénient de dépendre de la gravité, qui constituera la force permettant la mise en mouvement du fluide et ne permet pas d'appréhender les propriétés de déformation élastique des fluides, ce qui nécessite l'application de faibles contraintes n'entraînant pas de déformation permanente du réseau de chaînes polymères. D'autres viscosimètres sont basés sur une autre méthodologie, qui repose sur l'application d'une contrainte laminaire de cisaillement horizontale précise sur le fluide à étudier, ce qui permet de s'affranchir de l'impact de la gravité (Figure A-3). Les premiers exemples sont les modèles de Margules, qui a introduit l'utilisation de cylindres concentriques en 1881 et de Couette, qui a développé un viscosimètre rotationnel basé sur les cylindres concentriques doté d'un moteur électrique permettant de contrôler la vitesse du cylindre externe. Il a notamment pu mesurer la viscosité de l'eau avec une erreur de seulement 10 %⁴⁶. L'essor de l'informatique dans les années 80 a permis de perfectionner les systèmes basés sur les contraintes de cisaillement en permettant un contrôle très précis sur les contraintes appliquées.

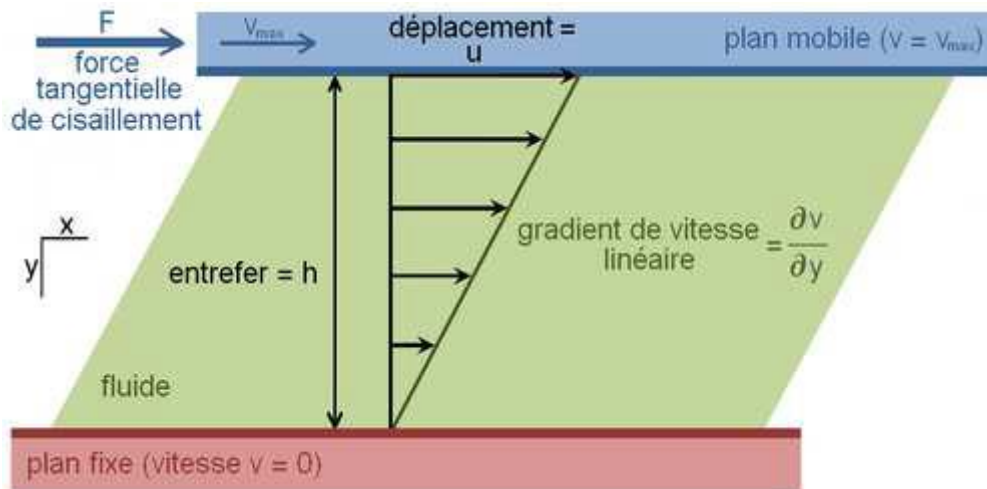


Figure A-3 Représentation d'une contrainte laminaire de cisaillement⁴⁵.

On distingue deux types de mesure, en écoulement ou en oscillation. Le premier implique l'application d'une contrainte de cisaillement exercée dans un mouvement de rotation, ce qui entraîne une déformation permanente du fluide. Il est ainsi adapté à la mesure de sa viscosité dite dynamique η (en Pa.s), qui est liée à la viscosité cinématique ν par la formule suivante :

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (\text{A-5})$$

Où ρ est la masse volumique du liquide en g.mol^{-1} .

Le second type de mesure consiste en l'application d'une contrainte sinusoïdale (mode dynamique). Il est adapté à l'étude des propriétés viscoélastiques du fluide, à savoir la capacité de ce dernier à restituer (contribution élastique) ou non (contribution visqueuse) l'énergie de la déformation pour une contrainte non destructurante. Ce mode de mesure permet de mesurer le module de cisaillement G du fluide selon la loi de Hooke :

$$G = \frac{\tau}{\gamma} \quad (\text{A-6})$$

Où G est le module de cisaillement en Pa, τ est la contrainte en Pa et γ la déformation en pourcentage. Du fait de la nature oscillatoire de la contrainte, la déformation résultante s'effectue également de façon sinusoïdale avec un déphasage δ par rapport à la contrainte (Figure A-4). En cas de déphasage nul, le fluide a des propriétés exclusivement élastiques, tandis qu'il est exclusivement visqueux pour un déphasage de 90° . Les tests en oscillation permettent ainsi de remonter aux contributions élastiques et visqueuses de l'échantillon, les fonctions

sinusoïdales pouvant s'exprimer avec des fonctions complexes. On définit ainsi le module complexe G^* de la façon suivante :

$$G^* = \frac{\tau^*}{\gamma^*} \quad (\text{A-7})$$

Où τ^* est la contrainte complexe :

$$\tau^* = \tau_0[\cos(\omega t) + i\sin(\omega t)] \quad (\text{A-8a}) \quad \text{ou} \quad \tau^* = \tau_0 e^{i\omega t} \quad (\text{A-8b})$$

Où τ_0 est l'amplitude de la contrainte en Pa et ω la vitesse angulaire en rad.s^{-1} .

Et γ^* est la déformation complexe :

$$\gamma^* = \gamma_0[\cos(\omega t - \delta) + i\sin(\omega t - \delta)] \quad (\text{A-9a}) \quad \text{ou} \quad \gamma^* = \gamma_0 e^{i(\omega t - \delta)} \quad (\text{A-9b})$$

Où γ_0 est l'amplitude de la déformation.

G^* est un nombre complexe pouvant ainsi s'écrire sous la forme suivante :

$$G^* = G' + iG'' \quad (\text{A-10})$$

$$\text{Avec } G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta) \quad (\text{A-11a}) \quad \text{et} \quad G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin(\delta) \quad (\text{A-11b})$$

Où G' est le module de conservation (ou module élastique) en Pa et G'' le module de perte (ou module visqueux) en Pa. G' correspond à la contribution élastique du module complexe tandis que G'' correspond à la contribution visqueuse^{45,47}.

On obtient ainsi :

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (\text{A-12})$$

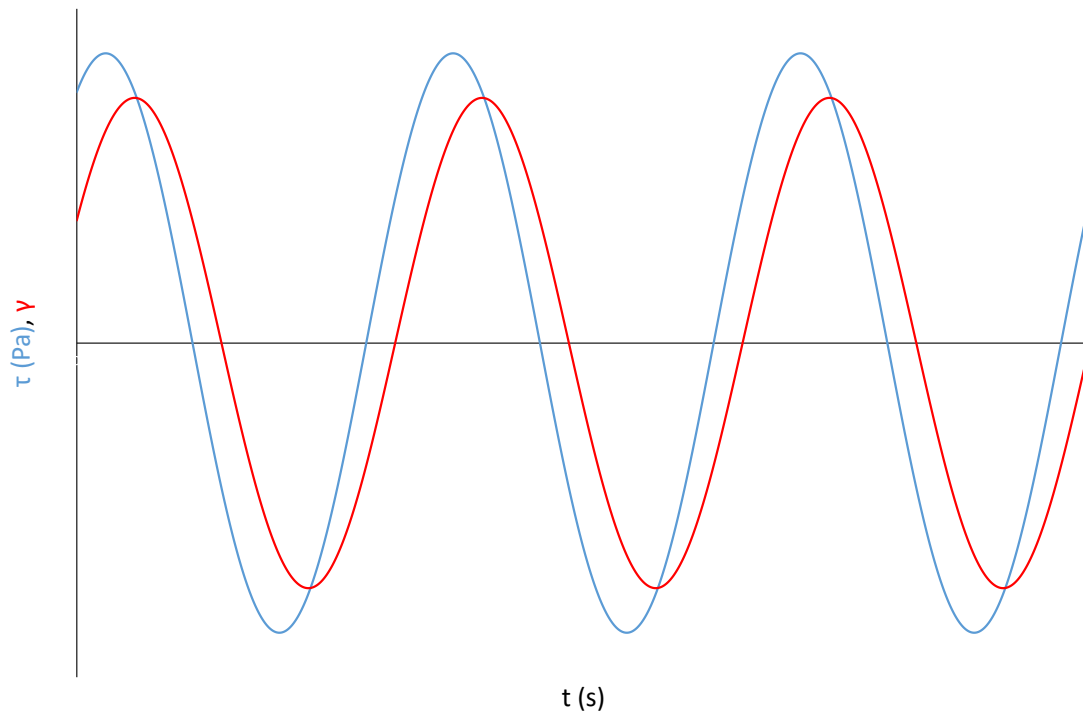


Figure A-4 Représentation du déphasage entre l'application de la contrainte et la déformation de l'échantillon.

Les tests rhéologiques en oscillation sont ainsi particulièrement appropriés à l'étude des hydrogels. En effet, ces derniers ont une certaine capacité à conserver leur structure sous contrainte faible du fait de la présence de réticulations^{6,33} comme déjà évoqué dans la partie 1.2.1. Ils présentent donc des propriétés élastiques qui prédominent sur les propriétés visqueuses, ce qui se traduira expérimentalement par une valeur de G' mesurée supérieure à celle de G'' ¹. On peut ainsi définir un point de gel qui marque la transition d'un liquide visqueux vers un solide élastique⁴⁸. Ce point n'est pas nécessairement obtenu à $G' = G''$ comme souvent indiqué dans la littérature. Les travaux de Winter *et coll.* ont montré en effet qu'au point de gel, les modules G' et G'' ne varient pas l'un par rapport à l'autre quelle que soit la fréquence de la contrainte oscillante, ce qui revient à ce que le paramètre $\tan(\delta)$ (Eq. A-12) soit indépendant de la fréquence^{49,50}. Cette méthode est particulièrement utilisée pour la détermination du point gel lors de cinétique de réticulations chimiques, ce qui permet d'évaluer l'évolution de $\tan(\delta)$ dans la durée au cours de mesures oscillatoires en mode multifréquences (Figure A-5)¹.

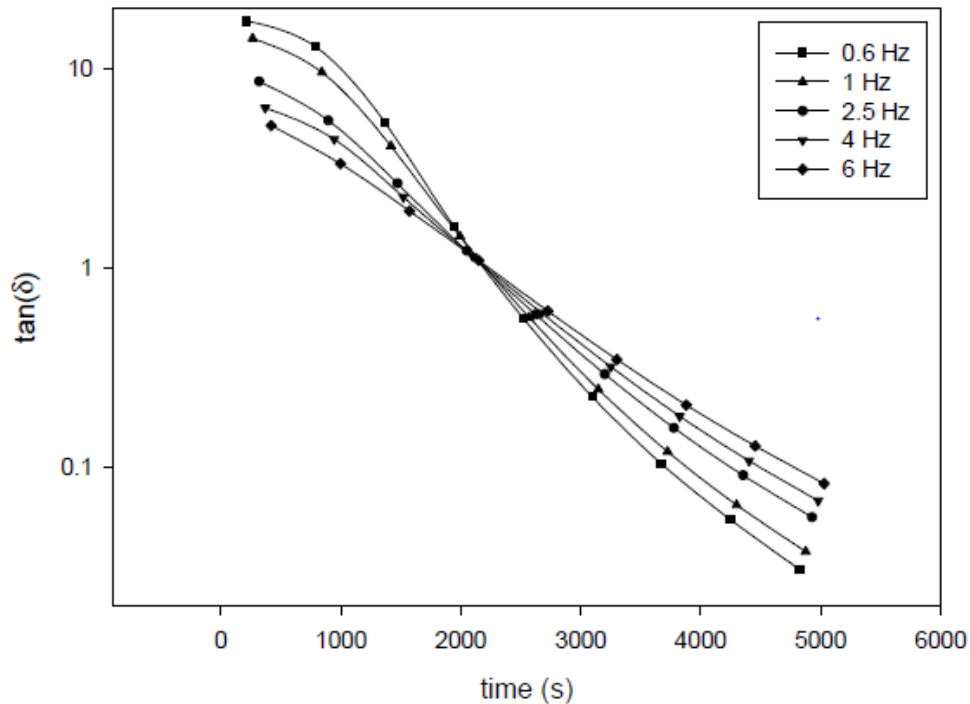


Figure A-5 Détermination du temps d'obtention du point de gel lors de la réticulation chimique de pullulane avec du trimétaphosphate de sodium¹.

1.3 Hydrogels chimiques et hydrogels physiques

La majorité des hydrogels synthétiques présentés dans la partie précédente sont réticulés par des liaisons covalentes. A l'inverse, la plupart des hydrogels naturels qui ont été abordés forment un réseau tridimensionnel par agrégation des chaînes selon des mécanismes impliquant des changements de conformation induits par la chaleur ou par la modification de l'environnement salin. Au-delà de leur origine, Il est donc relativement aisé de définir deux types d'hydrogels, à savoir, les hydrogels chimiques, dont les réticulations sont de nature covalente et les hydrogels physiques, dont le réseau est structuré par des liaisons faibles^{33,51}.

1.3.1 Hydrogels chimiques χ

1.3.1.1 Synthèse

Les hydrogels chimiques peuvent être obtenus de plusieurs manières⁵¹ : la copolymérisation d'un monomère avec un agent de réticulation a déjà été évoquée avec l'exemple du HEMA copolymérisé avec le diméthacrylate d'éthylène⁸. D'autres méthodes sont évidemment possibles, la post-fonctionnalisation de polymères linéaires hydrophiles avec des

groupements chimiques adéquats permettant d'établir des ramifications entre chaînes. Par exemple, l'utilisation de molécules multivalentes, pouvant réagir avec plusieurs groupes fonctionnels du polymère est une pratique courante et était déjà employée dans les années 50 par Kuhn *et coll.* sur leurs hydrogels à base de PAA : les fonctions acide carboxyliques du composé étaient alors estérifiées avec des polyols comme le glycérol en présence d'acide¹⁵. Ce type de procédé permet aussi d'obtenir des hydrogels chimiques avec des polymères d'origine naturelle ainsi que le montrent les nombreux exemples dans la littérature⁵². Citons par exemple la réticulation du pullulane et de l'acide hyaluronique, deux polysaccharides, par le trimétaphosphate de trisodium^{1,53} ou de la gélatine par le glutaraldéhyde⁵⁴. Ce procédé peut également être réalisé en deux temps, avec une première fonctionnalisation du polymère avec une molécule multivalente qui réagira ultérieurement avec un autre agent de réticulation. On peut citer à ce sujet la post-fonctionnalisation de l'acide hyaluronique avec de l'acide adipique dihydrazide suivi par l'ajout d'un diester activé⁵⁵. Les stratégies de fonctionnalisation sont très larges et l'on peut envisager d'utiliser des réactions d'addition, de condensation, de substitution ou d'ouverture de cycles adaptées aux groupes fonctionnels que l'on trouve régulièrement sur les polymères hydrophiles qui formeront le squelette de l'hydrogel, à savoir principalement les alcools, les acides carboxyliques, voire les amines^{51,52}.

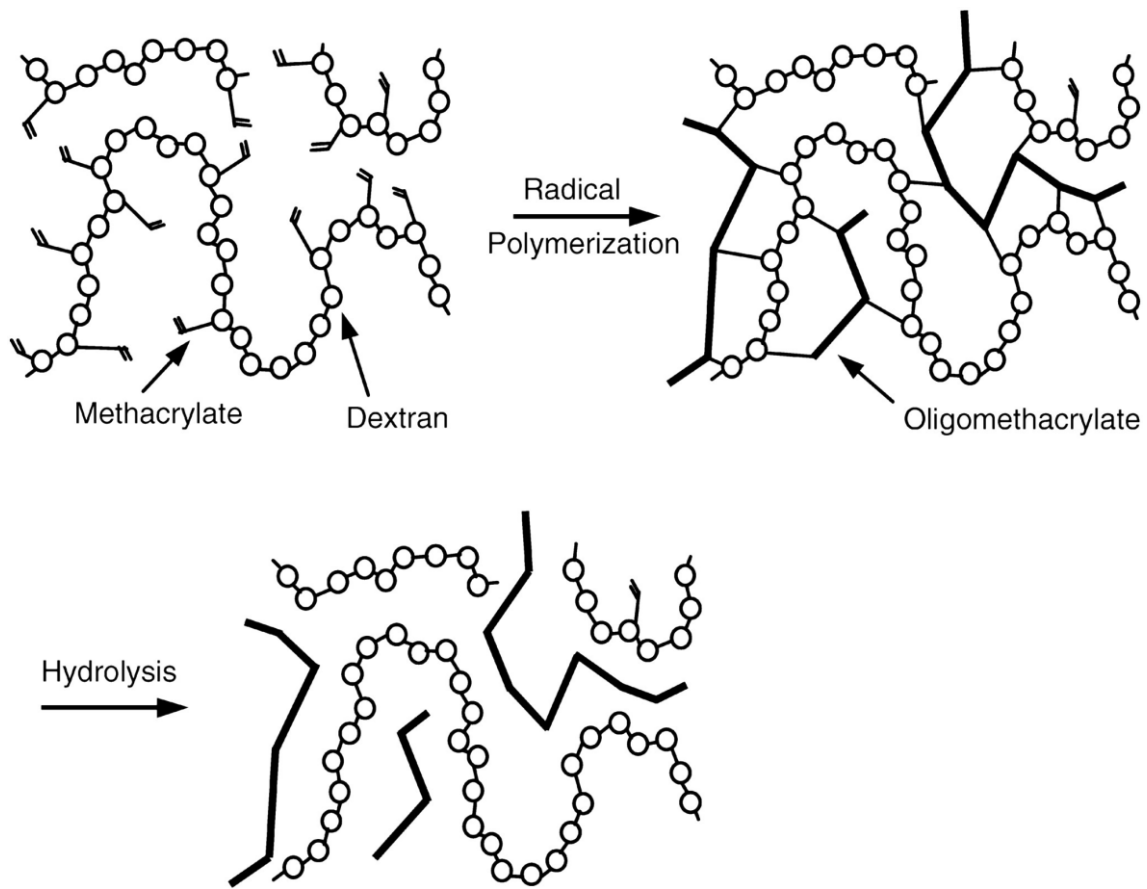


Figure A-6 Principe de la réticulation du dextrane fonctionnalisé par du HEMA en polymérisant ce dernier suivi par la dégradation du réseau obtenu par hydrolyse des liaisons entre le dextrane et l'HEMA⁵¹.

Une autre méthode de post-fonctionnalisation consiste à incorporer un monomère au sein de l'unité de répétition d'une macromolécule hydrophile, puis de le polymériser, ce qui aboutira à la formation de branchements⁵¹. Cette technique a notamment été développée sur le dextrane, qui a été fonctionnalisé avec du glycidylacrylate^{31,56}. La technique a ensuite été adaptée afin de fonctionnaliser le dextrane avec de l'HEMA par le biais de liaisons carbonates hydrolysables. L'hydrogel obtenu lors de la polymérisation du HEMA se dégradait ainsi au cours du temps (Figure A-6)⁵⁷. Cette voie nécessite cependant l'utilisation d'un amorceur, souvent toxique, qui devra être éliminé du gel. Une alternative consiste à employer des rayonnements de forte énergie (gamma ou faisceau d'électrons) mais elle ne fait que déplacer le problème, ces rayonnements pouvant potentiellement dégrader ou altérer le principe actif à séquestrer au sein du gel, voire le polymère squelette lui-même, ce qui implique que cette méthode est très

peu employée avec des polymères naturels, mais plutôt avec des polyacrylates, des polyalcools vinyliques ou des poly(éthylène glycol)⁵¹.

1.3.1.2 Propriétés mécaniques

L'un des avantages des hydrogels chimiques provient de leurs propriétés mécaniques généralement supérieures à celle des hydrogels physiques et plus faciles à ajuster. La capacité de l'hydrogel à retenir de l'eau a une influence capitale sur ses propriétés mécaniques : plus il est hydraté, plus ces dernières seront faibles et plus la structure résultante sera gonflée¹³. Ce degré d'hydratation peut être ajusté comme par exemple dans le cas de polymères synthétiques avec la modification de la balance hydrophile-lipophile de la structure, par le biais d'une copolymérisation avec un monomère hydrophobe¹³. *Kolařík et coll.* ont ainsi copolymérisé du HEMA avec des comonomères hydrophobes de faible température de transition vitreuse T_g comme l'acrylate d'éthyle, l'acrylate de *n*-butyle et le méthacrylate de dodécyle. Ceci a abouti à une augmentation du module de Young, de la contrainte maximale et de l'étirement à la rupture des hydrogels, la faible T_g assurant que le matériau ne soit pas trop rigide¹³. A l'inverse, l'incorporation de comonomères pouvant porter une charge selon le pH, comme l'acide méthacrylique (anionique en milieu basique) ou le méthacrylate de diéthylaminoéthyle (cationique en milieu acide), au sein du squelette d'un hydrogel à base de PHEMA réticulé neutre entraîne l'augmentation du taux de gonflement de l'hydrogel⁵⁸.

Une autre solution consiste à modifier le degré de réticulation i.e. la masse molaire moyenne de la chaîne macromoléculaire entre deux nœuds de réticulation (M_c), qui est un paramètre clef influant sur les propriétés du réseau hydrogel. Une M_c faible correspond à une rigidité accrue et à un gonflement par absorption d'eau réduit^{13,33,59}. Plus récemment, en prenant l'exemple de polyacrylamides et de poly(2-méthacryloyloxyethyl phosphorylcholine), une étude a suggéré que les hydrogels fortement réticulés étaient friables et qu'il suffisait de réduire le nombre de réticulation covalentes au sein d'un réseau hydrogel fortement enchevêtré ($C \gg C^{**}$) pour obtenir des structures à la fois dures et étirables⁴².

De façon alternative, les propriétés mécaniques de l'hydrogel peuvent être améliorées par l'ajout de renforts, comme des fibroïnes de soie, ce qui aboutit au développement d'une structure composite^{13,60}.

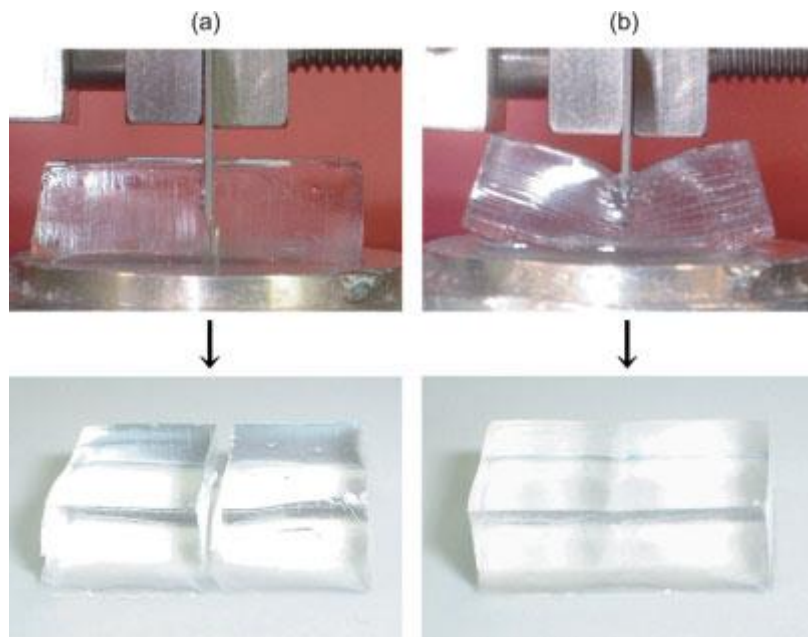


Figure A-7 a) Hydrogel de poly(2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonique) PAMPS découpé avec une contrainte de cisaillement de 0.2 MPa b) Hydrogel composé de deux réseaux enchevêtrés de PAMPS et de PAAm pouvant résister à des cisaillements allant jusqu'à 25 MPa⁶¹.

Une autre méthode visant à renforcer les propriétés mécaniques d'hydrogels chimiques a émergé au début des années 2000. Gong et son équipe ont en effet développé un hydrogel à double réseau, le premier étant constitué d'acide de poly(2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonique) PAMPS (polyélectrolyte) fortement réticulé au sein duquel un second polymère à base de polyacrylamide PAAm (polymère neutre) faiblement réticulé est synthétisé, ce qui aboutit à la formation de deux réseaux polymères enchevêtrés l'un dans l'autre⁶¹. Ce matériau a présenté des propriétés de résistance au cisaillement largement accrues comparé à un hydrogel composé seulement de PAMPS fortement réticulé (Figure A-7). Le PAMPS constitue un réseau rigide et friable là où le PAAm faiblement réticulé sera mou et ductile. La théorie derrière le fonctionnement de ce double-réseau est que le PAMPS servira à dissiper l'énergie reçue au cours d'une contrainte (cisaillement, traction, compression, etc.) en fournissant des liaisons sacrificielles tandis que le PAAm se déformera de façon élastique^{61,62}. Ces hydrogels présentent un potentiel pour être utilisés comme cartilage articulaire artificiel⁶¹. Ce principe est maintenant utilisé par d'autres groupes, dont certains ont utilisé un hydrogel naturel à base d'alginate de calcium (réticulations physiques) pour constituer l'un des deux

réseaux (et du PAAm réticulé chimiquement pour le second réseau)⁶³ mais le système original à base de PAMPS et de PAAm semble difficile à surpasser⁶².

Les hydrogels chimiques présentent donc l'avantage par rapport aux hydrogels physiques d'avoir des propriétés mécaniques supérieures. On peut aussi ajouter que leur structure est plus stable, car les réticulations sont constituées de liaisons covalentes de forte énergie. Ils ont aussi certains inconvénients, le principal d'entre eux étant qu'ils nécessitent d'être purifiés après leur formation afin d'éliminer les agents de réticulation, qui sont souvent toxiques et peuvent altérer les composés à incorporer au sein de l'hydrogel^{51,64-66}. De plus, si leur structure est stable, elle est irréversible en raison des liaisons covalentes qui assurent les nœuds du réseau⁶⁷. Dans le cas où les réticulations sont pensées pour être aisément rompues, comme dans l'exemple du PHEMA greffé sur du dextrane par des liaisons carbonates hydrolysables, ces dernières ne peuvent se reformer ce qui entraîne la déstructuration irréversible de l'hydrogel⁵¹. Enfin, ils sont moins bien adaptés pour des systèmes injectables, là où les hydrogels physiques rhéofluidifiants et souvent thixotropes permettent d'obtenir des systèmes où le gel pourra se reformer *in situ*^{65,66,68}.

1.3.2 Hydrogels physiques ϕ

1.3.2.1 Synthèse

Les hydrogels physiques présentent une structure non permanente avec une dynamique d'association-dissociation continue^{6,51}. En effet, au contraire des hydrogels chimiques, leurs réticulations sont composées de liaisons non covalentes de plus faible énergie. Elles peuvent être de type ionique, comme dans le cas de l'alginate de calcium (Figure A-8)⁶⁹ ou engendrées par des liaisons H^{51,70}. Elles peuvent également être obtenues par agrégation de structures hélicoïdales, comme dans le cas de la gélatine, de l'agarose ou du κ et ι -carraghénane^{6,26}, par cristallisation de polymères tel l'alcool polyvinylique PVA^{51,71} ou par la formation de complexes d'inclusion^{72,73}. Il est également possible d'obtenir des hydrogels par le biais de structures macromoléculaires amphiphiles, à savoir des copolymères blocs ou en peigne. Le réseau est alors formé en régime semi-dilué enchevêtré par les associations de type hydrophobe qui s'établissent en milieux aqueux^{68,74-76}. Le caractère amphiphile, et donc les propriétés de gels physiques peuvent également être modulés via des stimuli tels que la température. On peut citer par exemple l'incorporation de greffons à LCST, comme les Jeffamines[®], des polyétheramines, sur un squelette polymère qui formera alors des hydrogels thermosensibles

par élévation de la température^{74,77}. Des hydrogels physiques ont également été produits par ingénierie protéique ou par exploitation des interactions antigène – anticorps^{51,78,79}.

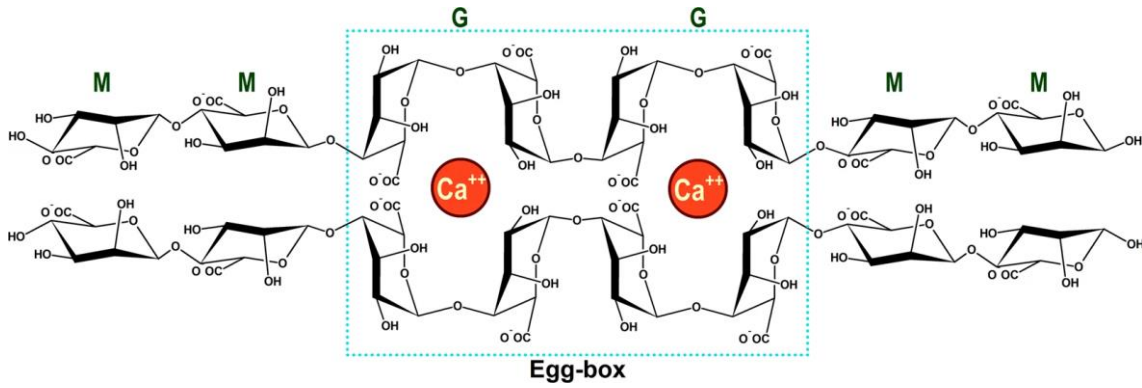


Figure A-8 Représentation de la structure « boîte à œuf » de l’alginate de calcium. L’alginate est composé de deux épimères, l’acide mannuronique (M) et l’acide gulonique. Les réticulations sont établies principalement entre unités G⁸⁰.

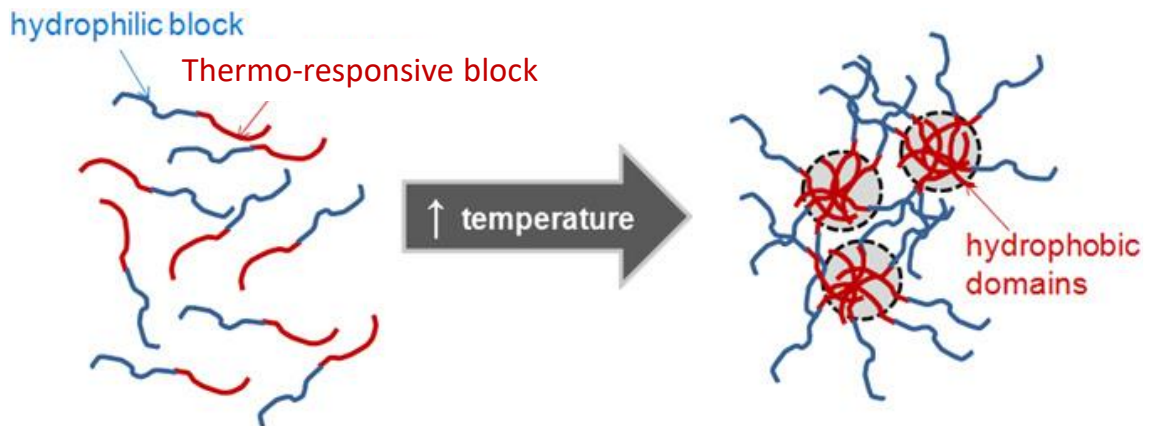


Figure A-9 Illustration du mécanisme de gélification de copolymères blocs thermosensibles par agrégation des domaines hydrophobes²⁰.

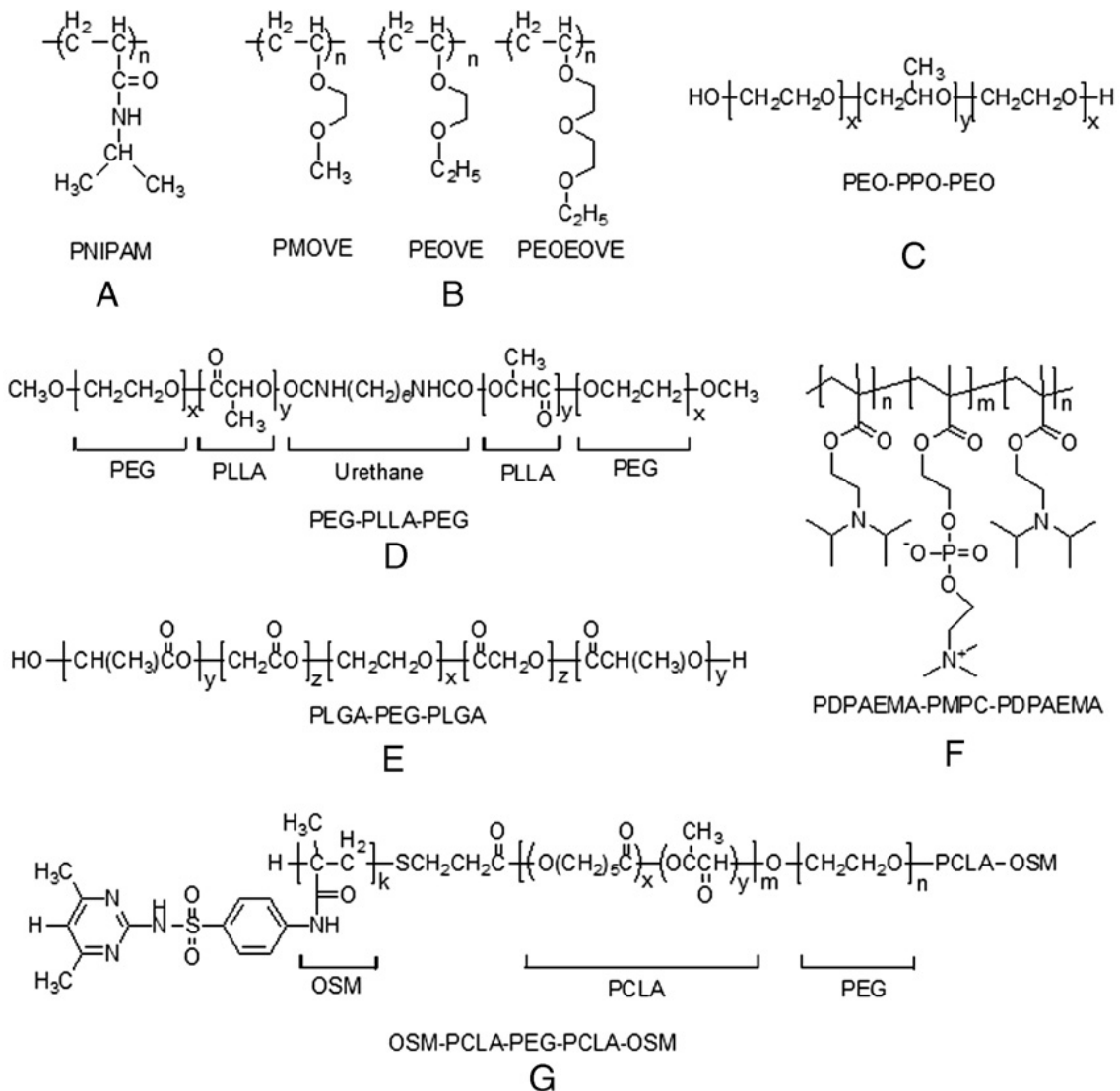


Figure A-10 Structure chimique de divers polymères thermosensibles (A à E) ou sensibles au pH (F et G)⁶⁸.

Nous avons vu précédemment que l'on pouvait réticuler chimiquement le PNIPAM, un polymère à LCST pour obtenir des hydrogels thermosensibles, qui vont précipiter lorsqu'ils sont exposés à des températures supérieures à la LCST. Une alternative consiste à le copolymériser avec du poly(éthylène)glycol (PEG), un polymère hydrophile, en une structure de type copolymère à bloc qui sera en solution à basse température (5 °C) et passera rapidement à un état gel à 37 °C pour une concentration massique de 20 %^{68,81}. Selon la structure du copolymère, le mécanisme de gélification peut être dû à du recouvrement micellaire (qui se forment à haute température du fait du caractère amphiphile que le matériau y acquiert) ou à l'agrégation des blocs PNIPAM au-dessus de la LCST^{68,81} (Figure A-9). Il existe de nombreuses autres combinaisons

de copolymères blocs, certaines étant même commercialisées comme les Pluronic® (BASF), composés de triblocs poly(éthylène)glycol-*b*-poly(propylène)glycol-*b*-poly(éthylène)glycol (PEG-*b*-PPG-*b*-PEG). On peut également citer les copolymères à base de polyéthers de vinyle comme les poly(2-(2-éthoxy)éthoxyéthyle éther de vinyle)-*b*-poly(2-méthoxyéthyle éther de vinyle) (PEOEOVE-*b*-PMOVE) ou ceux à base de poly(éthylène)glycol-*b*-acide polylactique (PEG-*b*-PLA)⁶⁸ (Figure A-10, structures A à E). Les structures de type copolymère à bloc permettent aussi l'obtention de structures sensibles au pH, plutôt qu'à la température. Ainsi, un tribloc constitué de poly(2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate)-*b*-poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-*b*-poly(2-diisopropylamino)ethyl methacrylate (PDPAEMA-*b*-PMPC-*b*-PDPAEMA, Figure A-10F) sera en solution à pH 2 (les blocs PDPAEMA ayant leurs fonctionnalités amines chargée à ce pH) mais formera un gel à pH 9 (les blocs PDPAEMA étant neutre et hydrophobes à ce pH) pour des concentrations massiques de l'ordre de 10 %. La formation du gel s'effectue par la formation d'un réseau réticulé de structures micellaires en fleur^{68,82}.

1.3.2.2 Propriétés réversibles

Du fait de la nature non covalente de leurs réticulations, les hydrogels physiques sont très sensibles à leur environnement physico-chimique, avec des paramètres comme la force ionique du milieu, la nature des sels en solution, le pH ou la température influant fortement sur la formation ou la déformation de la structure hydrogel ainsi que sur ses propriétés. Par exemple, les hydrogels à base d'alginate de calcium sont très sensibles au pH et au milieu salin : en effet, ce polysaccharide devient insoluble lorsque ses fonctionnalités acides carboxyliques sont sous la forme acide non chargée⁸³. De plus, un environnement riche en cations monovalents, comme le sodium ou le potassium, va entraîner la substitution du calcium, qui permet l'établissement de réticulations (Figure A-8), par ces derniers, entraînant ainsi la perte de la structure gel²⁸.

De même, la température aura un impact déterminant sur la structure d'un hydrogel physique. Elle va en effet impacter la conformation des chaînes macromoléculaires en solution, son augmentation favorisant l'établissement de structures moins ordonnées, associées à une entropie plus élevée, ce qui satisfera au second principe de la thermodynamique (le cas des polymères thermosensibles à LCST est particulier et sera expliqué plus en détail section 3.1.). Ainsi, dans le cas de gels à base d'agar-agar, le polysaccharide passera de façon réversible de conformation pelote à hélicoïdale en baissant la température²⁴ (Figure A-11). Dans le cas du greffage de polymères à LCST sur un squelette hydrophile, l'élévation de la température

favorisera les interactions intermoléculaires entre les greffons au détriment de celles qu'ils établissent avec l'eau, ce qui entraînera la formation d'un réseau tridimensionnel⁷⁴.

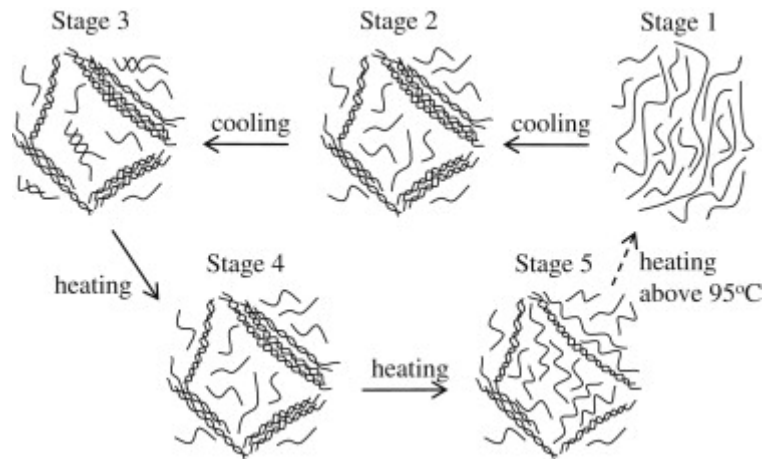


Figure A-11 Représentation du processus réversible de gélification de l'agar-agar dans l'eau induit par le passage d'une conformation pelote à une conformation hélicoïdale agrégative lors du refroidissement de la solution²⁴.

Si les stimuli basés sur la température et le pH sont les plus usités^{66,68,84}, il existe des alternatives. Par exemple, certains hydrogels physiques sont photosensibles et sont notamment basés sur l'établissement réversible de complexes d'inclusions. L'incorporation de fonctionnalités azobenzènes et d' α -cyclodextrines au sein de structures macromoléculaires est un exemple bien connu. L'azobenzène passe en effet de conformation *trans* à *cis* et inversement en fonction de la longueur d'onde à laquelle il est irradié. Or, il peut former un complexe d'inclusion 1:1 avec une α -cyclodextrine en conformation *trans* mais pas en conformation *cis*, ce qui implique que ce processus peut être déclenché par irradiation lumineuse⁸⁵. Ainsi, Tamesue *et coll.* ont fonctionnalisé un polymère synthétique, l'acide polyacrylique, avec des azobenzènes et un polymère naturel, le curdlane, avec des α -cyclodextrines, puis ont étudié la réversibilité des hydrogels physiques obtenus par irradiation (Figure A-12)⁷³.

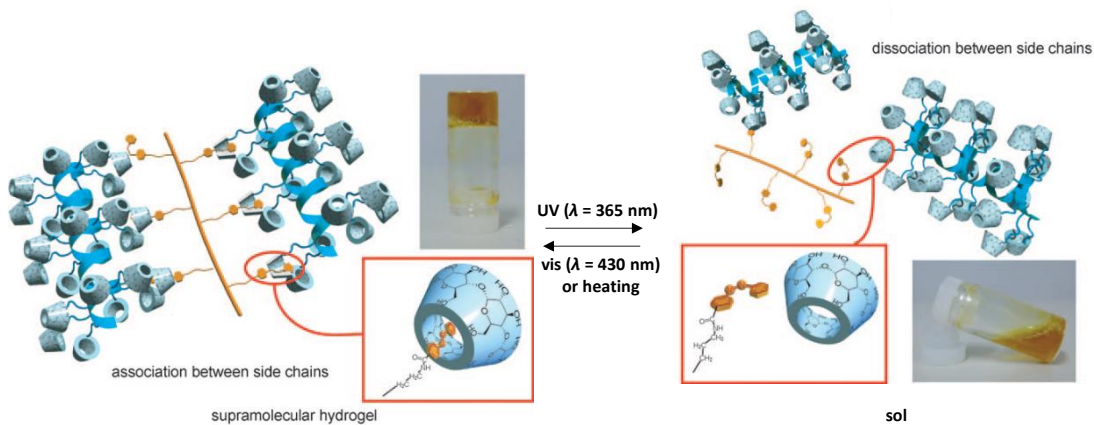


Figure A-12 Formation réversible d'hydrogels par établissement photo-sensible de complexes d'inclusion entre des chaînes de curdlane et de PAA fonctionnalisées respectivement avec des α -cyclodextrines et des azobenzènes⁷³

1.3.3 Hydrogels basés sur des liaisons covalentes dynamiques

Brièvement, on peut également mentionner les hydrogels qui sont obtenus par la formation de réticulations covalentes dynamiques, à savoir des jonctions fortes basées sur la mise en commun d'un doublet d'électrons entre deux atomes à la manière d'un hydrogel chimique, mais qui présentent également une dynamique d'association-dissociation à la manière d'un hydrogel physique⁸⁶⁻⁸⁸. Les liaisons covalentes dynamiques présentent un domaine d'application bien plus large que les seuls hydrogels : elles sont notamment à la base des matériaux vitrimères, des polymères similaires aux thermodurcissables du fait de la présence de réticulations mais qui peuvent être mis en forme à la manière de thermoplastique du fait de la nature dynamique de ces jonctions et qui présentent une variation de leur viscosité similaire à celle du verre à leur transition vitreuse, ce qui a inspiré leur nom^{89,90}.

Dans le cas des hydrogels, les réticulations font généralement intervenir l'établissement de liaisons imine (base de Schiff), hydrazone et acylhydrazone, oxime, ester de boronate, thioester, de ponts disulfure ou sont basées sur la réaction de Diels-Alder^{87,88}. Ils permettent l'obtention de structure pouvant s'auto-réparer à la manière d'hydrogels physiques (Figure A-13).

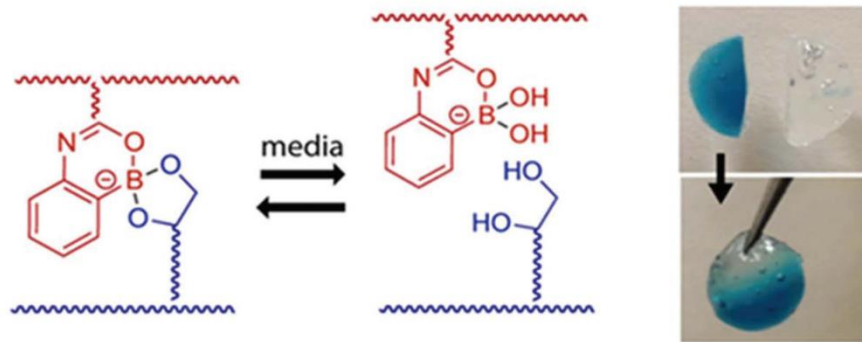


Figure A-13 Exemple de propriétés d'auto-réparation d'un hydrogel basé sur des liaisons covalentes réversibles d'ester de boronate⁹¹.

Il convient cependant de noter que leur domaine d'application est fortement dépendant des propriétés de leurs réticulations. Le pont disulfure par exemple se dissociera en présence de réducteur. Les esters de boronate sont sensibles au pH du milieu et nécessitent d'être fonctionnalisés afin d'ajuster leur pK_a ⁹². Quant aux réticulations basées sur les réactions de Diels-Alder, elles nécessitent d'employer des températures relativement élevées de plus de 60 °C^{93,94}.

1.4 Autres classifications des hydrogels

Nous venons de voir que les hydrogels pouvaient être principalement classifiés par la nature de leur liaison. Il existe cependant d'autres critères comme la présence ou non de charges sur la chaîne polymère, la structure physique, l'origine naturelle ou synthétique de l'hydrogel, s'il est obtenu par un réseau homopolymère ou copolymère, *etc.* (Figure A-14)^{10,33,95}. On notera en particulier la distinction de l'hydrogel selon sa dimension, qui aura une influence cruciale sur ses propriétés et son domaine d'application. On distingue ainsi les macrogels des microgels et des nanogels de la même manière que les matériaux classiques. La taille réduite des nanogels les rend plus facilement injectables et leur confère une plus grande superficie que les macrogels. Ils sont cependant également éliminés plus rapidement, ce qui peut être un inconvénient lors des injections intravasculaires par exemple⁹. Les nanogels sont ainsi étudiés pour la séquestration et la libération de principes actifs mais sont moins utilisés pour leurs propriétés rhéologiques⁹⁶.

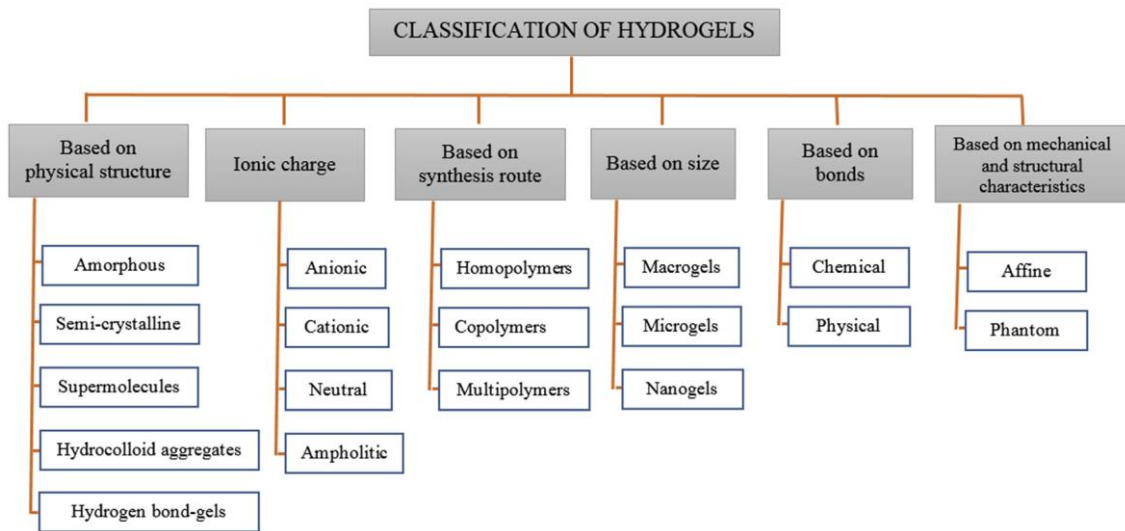


Figure A-14 Classification des hydrogels⁹⁵

1.5 Domaines d'application des hydrogels

Les applications historiques des hydrogels en tant que composants des lentilles de contact souples, des produits absorbants ou des pansements ont déjà été évoquées dans la section 1.1. On peut également mentionner des domaines de pointe comme la séquestration de principes actifs ou la régénération tissulaire. En effet, la proximité des propriétés des hydrogels avec celles des tissus biologiques et leur capacité à permettre la diffusion de métabolites tout en conservant leur structure en font des composés tout à fait adaptés pour ce type d'applications, pour lesquelles ils sont employés au même titre que les liposomes, les nanoparticules ou les membranes^{8,9,20,97}.

Pour des applications en séquestration de principes actifs, il est primordial pour le matériau de permettre la diffusion du composé séquestré sur une période de temps prolongée : il faut donc qu'il soit retenu au niveau des pores de la structure. Ces derniers ne doivent cependant pas totalement s'opposer à son passage. Dans le cas des hydrogels, leur grande hydrophilie conduit souvent à une diffusion trop rapide du principe actif sur des périodes allant de seulement quelques heures à plusieurs jours, surtout dans le cas de médicaments ne présentant pas de structure macromoléculaire^{9,20}. Certaines stratégies ont donc été développées pour améliorer l'affinité entre l'hydrogel et le composé à retenir²⁰. Les hydrogels à base de polyélectrolytes sont employés pour retenir des principes actifs chargés par interaction ionique qui seront libérés par l'action de l'environnement salin et/ou du pH du lieu d'injection du gel^{9,20,98,99}. Le composé à délivrer peut également être lié de façon covalente sur le polymère

constitutif du gel, le problème étant alors que cette liaison doit être facile à rompre^{9,20}. D'autres stratégies se focalisent sur l'amélioration des propriétés de rétention du réseau macromoléculaire enchevêtré du gel, par l'inclusion d'autres polymères en son sein (réseau semi-interpénétré) ou d'un réseau secondaire (réseau interpénétré)²⁰. Une autre possibilité vient de la fonctionnalisation de la surface de l'hydrogel par un composé stimuli-sensible, comme le PNIPAM qui passe de conformation pelote hydrophile à une conformation globule hydrophobe par élévation de température. La conformation hydrophile permettra le passage du principe actif tandis que la conformation hydrophobe s'y opposera (Figure A-15)^{20,60,100}. D'autres équipes se sont plutôt penchées sur l'inclusion au sein d'hydrogel de composés plus volumineux comme des liposomes, des nanoparticules ou des microgels, qui peuvent eux-mêmes retenir les principes actifs en leur sein²⁰. Dans ces systèmes, la libération peut alors être envisagée par érosion de la matrice (dégradation enzymatique par exemple)¹⁰¹.

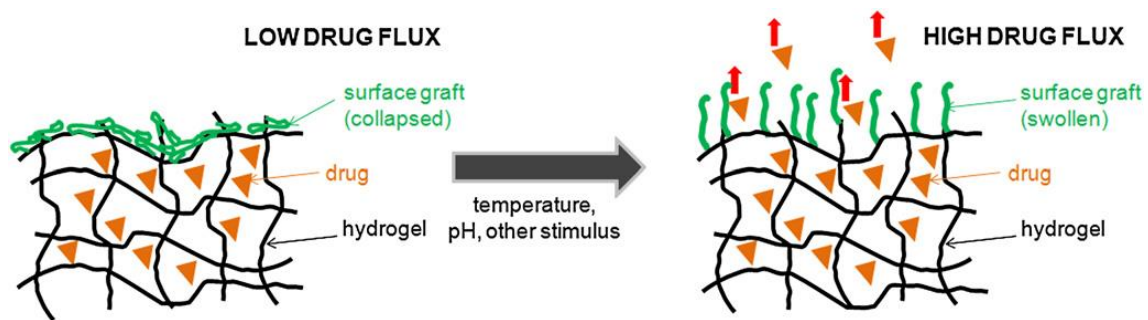


Figure A-15 Principe d'un hydrogel fonctionnalisé en surface avec un polymère stimuli-sensible afin d'ajuster la diffusion du principe actif séquestré en son sein selon l'environnement physico-chimique²⁰

Le problème que constitue la diffusion trop rapide des principes actifs au sein des hydrogels concerne surtout les dérivés hydrophiles de faible masse molaire. Les macromolécules comme les acides nucléiques ne présentent pas cet inconvénient. Quant aux molécules hydrophobes, elles ne sont miscibles ni avec les liquides biologiques ni avec les hydrogels. Une solution consiste alors à utiliser un hydrogel amphiphile dans le dessein de renforcer la compatibilité matrice/principe actif^{9,20}. Les stratégies communément employées dans ce sens consistent à fonctionnaliser des hydrogels avec des greffons hydrophobes, qui peuvent dès lors avoir un double emploi, à savoir l'établissement de réticulations et la rétention du principe actif. Une alternative vise à incorporer des fonctionnalités permettant de former des complexes d'inclusion avec le principe actif, un exemple bien connu est celui des cyclodextrines²⁰.

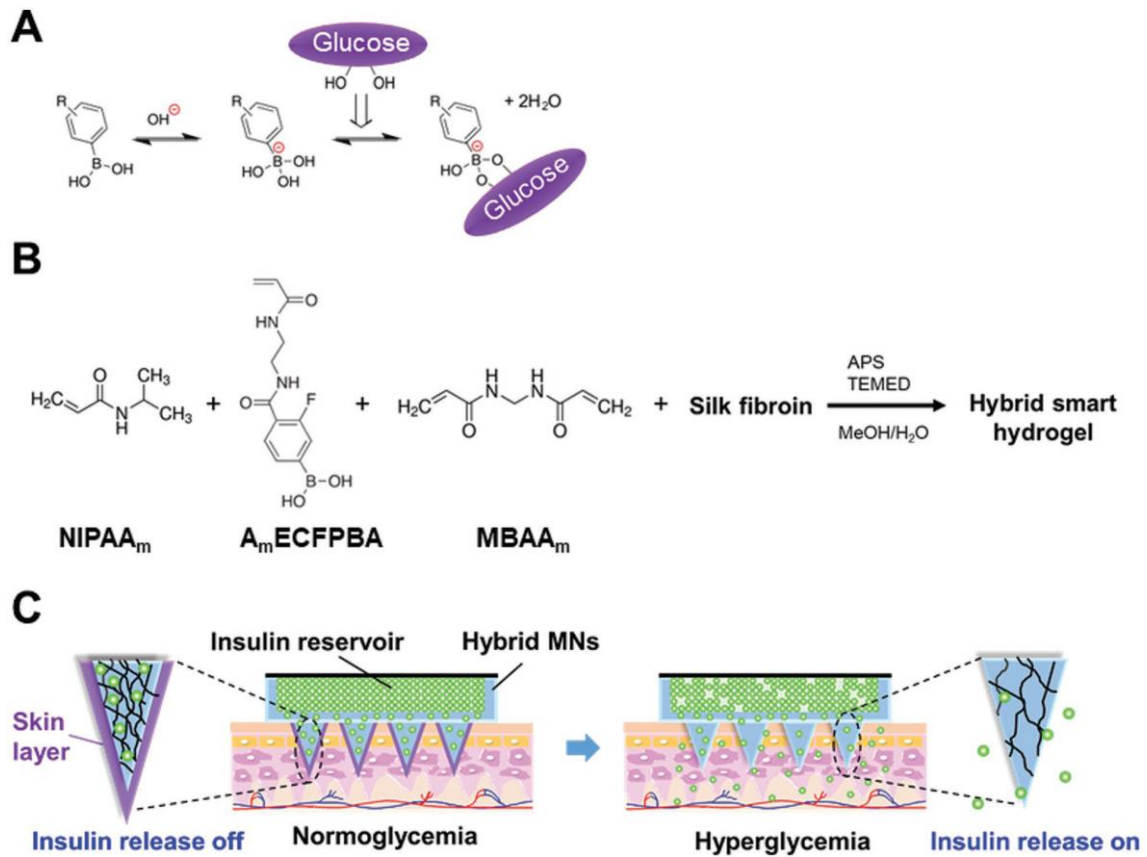


Figure A-16 A) Principe des équilibres de l'acide boronique entre forme non chargée et chargée (acido-basique) et avec le glucose ; **B)** Composition monomérique de l'hydrogel et renfort employé ; **C)** principe de fonctionnement du patch à réservoir d'insuline basé sur l'hydrogel de structure décrite en B⁶⁰.

Les hydrogels ont également été appliqués pour séquestrer des macromolécules, comme des acides nucléiques pour la thérapie génique⁹, des protéines comme l'insuline, voire même des cellules comme les îlots de Langerhans, situées dans le pancréas qui produisent l'insuline par le biais de leurs cellules bêta. Dans ce dernier exemple, des applications ont été envisagées pour lutter contre le diabète de type 1, dit insulino-dépendant (une maladie auto-immune aboutissant à la destruction des cellules bêta par le système immunitaire, empêchant la production d'insuline par l'organisme)¹⁰². Le seul traitement actuel consiste en l'injection d'insuline (hormone hypoglycémisante) d'origine animale par le patient qui doit dès lors constamment réguler sa glycémie¹⁰². Des études ont donc été menées en vue de développer un pancréas artificiel en encapsulant des îlots de Langerhans dans un hydrogel, afin de protéger ces derniers du système immunitaire¹⁰³⁻¹⁰⁵. Cependant, il est encore difficile de protéger les cellules ainsi séquestrées pour de longues périodes, des gels à base d'alginate ayant jusqu'ici permis

d'obtenir un délai de survie des cellules de l'ordre d'une centaine de jours¹⁰⁵. Il y a beaucoup de contraintes à surmonter pour séquestrer des cellules dans un hydrogel, à savoir que la porosité du gel ne doit pas permettre leur diffusion tout en autorisant celui des nutriments et de l'oxygène transporté par le sang, qui sont indispensables à la survie des cellules. De plus, dans le cadre de la lutte contre le diabète de type 1, il doit permettre à ces dernières d'être exposées à la glycémie afin qu'elles régulent leur production d'insuline^{102,105}. Matsumoto *et coll.* ont utilisé une autre approche visant à l'élaboration de patchs synthétiques pour la libération cutanée d'insuline en fonction de la glycémie⁶⁰. Leur hydrogel est constitué de PNIPAM (thermosensible) copolymérisé avec un acrylamide fonctionnalisé avec un dérivé fluoré d'acide phénylboronique (gluco-sensible) de pKa 7.2 et un diacrylamide (agent de réticulation) (Figure A-16B). L'acide phénylboronique est en équilibre acido-basique entre une forme chargée et une forme neutre. La présence de glucose (plus prononcée en cas d'hyperglycémie), qui peut s'associer avec la forme chargée de l'acide boronique, va entraîner un déplacement de l'équilibre de ce dernier en faveur de la forme chargée (Figure A-16A), ce qui va entraîner un gonflement et une meilleure hydratation de l'hydrogel, favorisant la libération de l'insuline, qui aura été préalablement séquestrée en son sein (Figure A-16C). A l'inverse, un faible taux de glucose va moins favoriser la présence de la forme chargée de l'acide boronique, entraînant de ce fait un abaissement de la température de transition de conformation pelote → globule du PNIPAM à la surface du gel et donc la formation d'une couche superficielle étanche à l'insuline contenue dans le gel. Par la suite, ils ont voulu réaliser un patch à partir de cet hydrogel. Ce patch est constitué de microaiguilles contenant l'hydrogel au niveau de la pointe. Afin qu'elles puissent pénétrer la peau et que la structure soit suffisamment solide, ils ont semi-interpénétré leur hydrogel avec des fibroïnes de soie cristallisées par traitement au méthanol^{60,106} (Figure A-16B et C).

Les hydrogels sont également employés pour la séquestration de cellules dans des applications visant à la régénération des tissus endommagés des os et des cartilages notamment, qui font usuellement intervenir un support qui contient des cellules ainsi qu'un facteur de croissance (Figure A-17)¹⁰⁷.

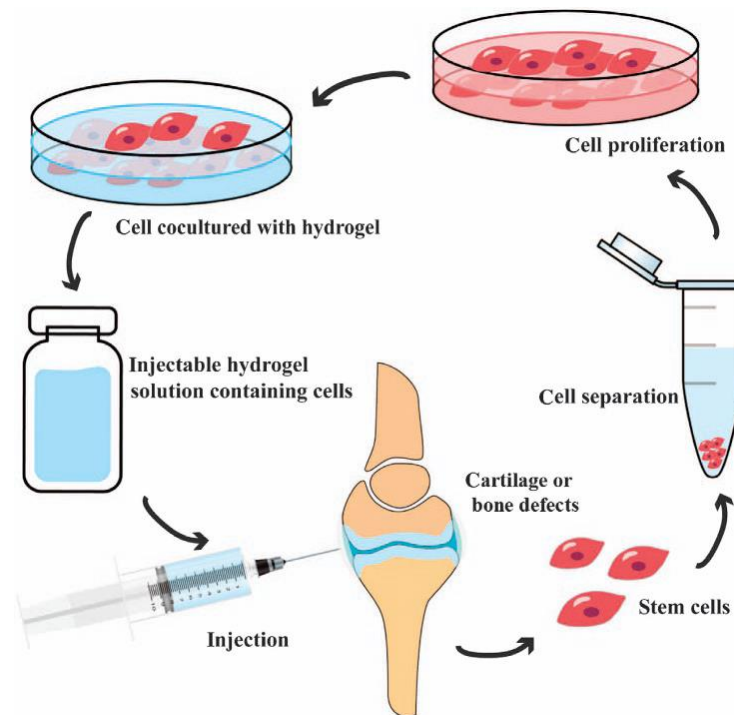


Figure A-17 Hydrogel injectable pour la régénération des tissus des os et des cartilages¹⁰⁷.

Le principal défi lié à ces applications dans le domaine biomédical est associé à la nécessité pour l'hydrogel d'être injectable, faute de quoi il faudrait le transplanter au cours d'une intervention chirurgicale⁹⁷. Certains hydrogels chimiques sont conçus pour réticuler après l'injection, cependant cette méthode est difficile à mettre en œuvre car elle nécessite souvent l'utilisation d'agents réticulants ou de fonctionnalités fortement réactives comme des aldéhydes utilisés pour la formation de bases de Schiff avec des amines^{9,107}. L'utilisation d'hydrogels physiques offre plus de flexibilité d'utilisation, du fait de leur comportement rhéo-fluidifiant réversible les rendant plus facilement injectable^{9,108}. Ce comportement peut être renforcé avec des systèmes thermosensibles, liquides à température ambiante mais gélifiant au-delà d'une température cible étant particulièrement étudiés^{9,107,109,110}. Il faut toutefois rappeler que l'inconvénient des hydrogels physique tient de leurs propriétés mécaniques moindres.

Les hydrogels sont également utilisés comme revêtement sur des capteurs employés *in vivo* afin d'éviter le déclenchement d'une réaction immunitaire quand ils ne sont pas eux-mêmes employés comme capteurs¹¹¹. On peut citer par exemple un hydrogel chimique fonctionnalisé avec de l'acide boronique sensible à la présence de glucose qui va provoquer l'apparition de charges sur le gel, qui seront détectées par l'électrode sur laquelle il aura été placé comme revêtement (Figure A-18)¹¹². On les retrouve aussi dans l'industrie agro-alimentaire, où ils sont

utilisés pour impacter la texture des aliments, dans les produits cosmétiques¹¹¹ ou comme biomatériaux, utilisés par exemple en rhinoplastie^{10,111}.

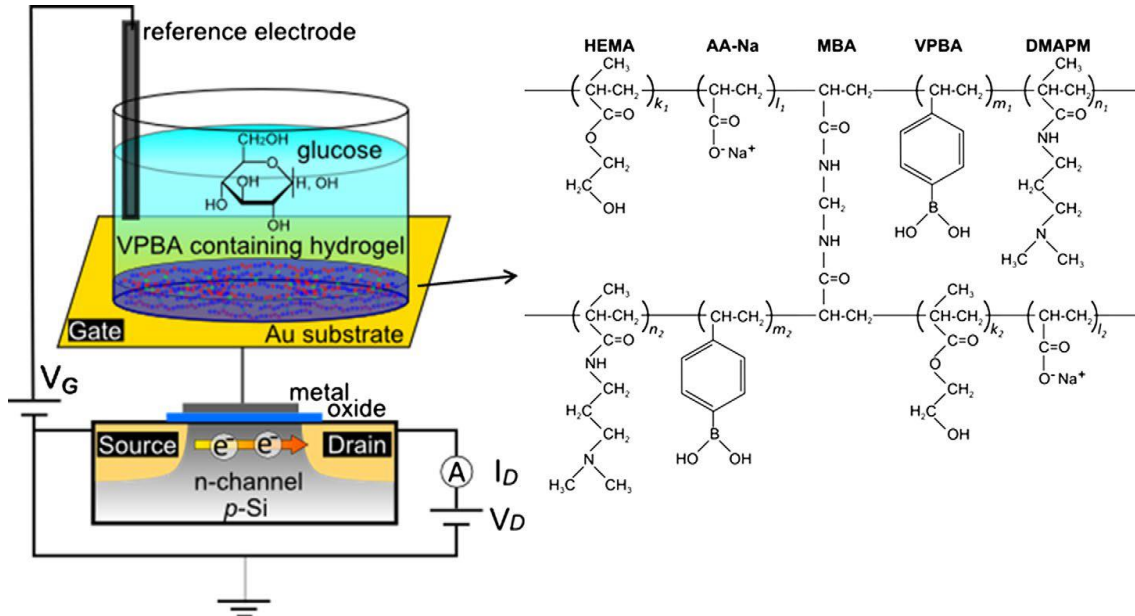


Figure A-18 Principe d'un hydrogel fonctionnalisé avec de l'acide boronique sensible à la présence de glucose placé comme revêtement sur une électrode¹¹²

Enfin, les hydrogels font l'objet d'études visant à élaborer des actionneurs mécaniques avec en ligne de mire la conception de muscles artificiels¹¹¹. Takashima *et coll.* ont ainsi réalisé un hydrogel à base de poly(acrylamide) réticulé chimiquement comportant également des fonctionnalités azobenzène et α -cyclodextrine ayant la possibilité de former des complexes d'inclusion ou non selon que l'azobenzène est en conformation *trans* (plus stable) ou *cis* (pouvant être obtenue par irradiation UV), ce qui aboutit à la formation de réticulations supplémentaires, cette fois de nature physique, entraînant une contraction de l'hydrogel comme cela a déjà été évoqué en section 1.2.2. ou 1.3.1.2. de ce manuscrit¹¹³. L'avantage de ce contrôle de la formation de complexe d'inclusion par rayonnement est qu'il permet de focaliser l'irradiation du gel sur certaines zones uniquement, ce qui va entraîner des déformations réversibles de sa structure macroscopique¹¹³. L'irradiation par UV (365 nm) sur une face de l'échantillon entraîne le basculement de l'azobenzène en conformation *cis* conduisant à la rupture de réticulations physiques sur la face irradiée qui va avoir plus d'affinité pour l'eau, ce qui va entraîner une déformation de l'hydrogel vers la direction opposée à l'irradiation (Figure A-19). Cette déformation est réversible par basculement de la fonction azobenzène en conformation *trans* par irradiation dans le visible (430 nm) de la face correspondante

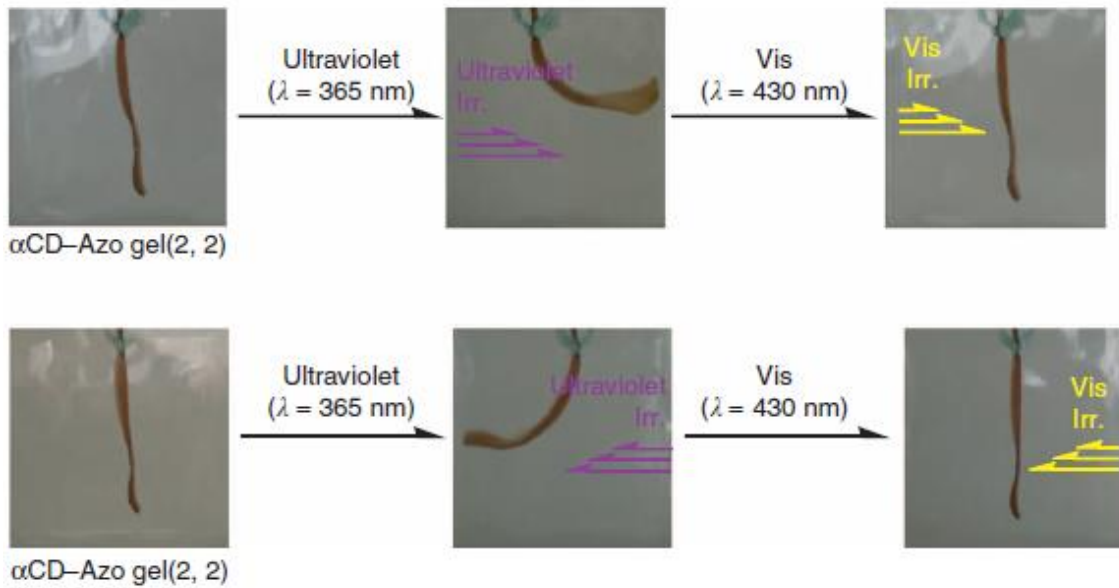


Figure A-19 Irradiation d'un hydrogel à base de polyacrylamide constitué de réticulations chimiques et physiques à base de complexe d'inclusion entre des fonctionnalités azobenzènes en conformation trans et des fonctionnalités α -cyclodextrine¹¹³.

2 Les polysaccharides

2.1 Historique

Les polysaccharides, polymères naturels issus de la polycondensation des oses, font partie des premiers polymères étudiés, et ce avant que Staudinger n'expose ses théories sur la structure macromoléculaire. Ils entraient dans la composition de remèdes ancestraux basés sur des préparations à base d'extrait de plantes médicinales^{114,115}. Les végétaux contenant de la cellulose étaient utilisés comme combustible (bois), comme composant des cordages (fibres de chanvre) et comme textile (coton, chanvre, lin)¹¹⁶. Il aura fallu attendre le XIX^{ème} siècle pour que les premiers polysaccharides soient isolés à partir de sources végétales ou animales. Ainsi les parois végétales peuvent contenir de la cellulose, des pectines, les graines quant à elles sont riches en amidon (composé d'amylose et d'amylopectine). Certaines graines renferment aussi de la gomme de guar, de caroube ou de tara, divers algues contiennent de l'alginate, de l'agar-agar ou encore des carraghénanes. Les exsudats de certains arbres peuvent être composés de gomme arabique ou de gomme karaya. On trouve des polysaccharides également au sein des cellules animales, tels l'acide hyaluronique ou la chitine, ou produits par des bactéries, voire des

champignons, comme le xanthane, le dextrane, le pullulane ou encore la gomme gellane^{74,114,117}. L'acide hyaluronique a été isolé au sein de l'humeur vitrée par Meyer et Palmer en 1934¹¹⁸. L'alginate, quant à lui, est extrait depuis la fin du XIX^{ème} siècle de certaines algues brunes (du type *laminaria* sp., *Macrocystis* sp., *Eklonia* sp. ou *Ascophyllum nodosum*) par traitements successifs en milieux acides et alcalins selon des procédés qui jouent sur son caractère insoluble quand il est sous forme acide et soluble quand il est chargé (Figure A-20)^{114,119-121}.

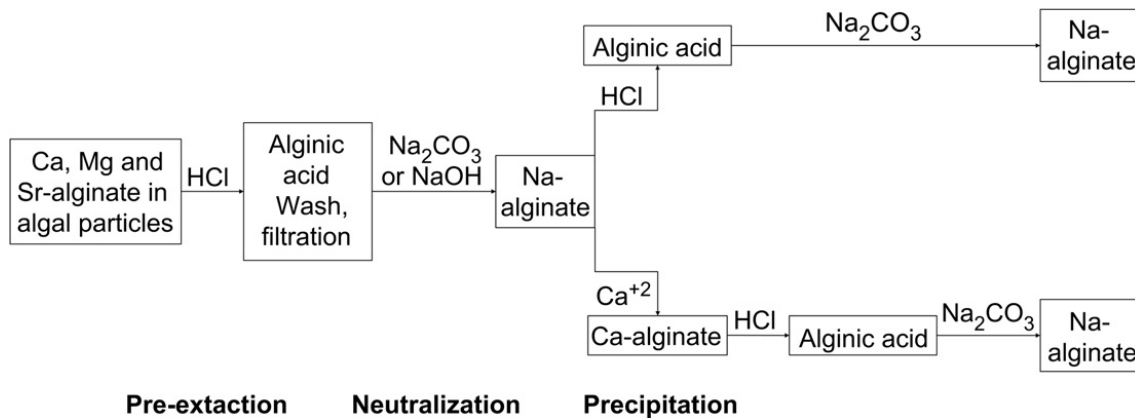


Figure A-20 Schéma explicatif du procédé d'extraction des alginates contenus dans certaines algues¹²⁰.

Si les oses constituant les polysaccharides ont assez rapidement pu être identifiés par dégradation, il aura fallu attendre les travaux de Staudinger au cours des années 1920 sur les macromolécules pour que se développe la recherche sur la nature des liaisons glycosides constitutives des polysaccharides¹¹⁶. Les progrès réalisés en cristallographie aux rayons X a également permis d'étudier leur structure cristalline¹²²⁻¹²⁴. De nombreuses structures de polysaccharides ont été déterminées dans les années 1960 sur la base d'études antérieures incomplètes^{2,125}, avec notamment l'élucidation de la succession de liaisons glycosides 1→3 et 1→4 entre les deux unités saccharides respectives des carraghénanes, des glycosaminoglycans et de l'agarose^{124,126-128} ou de l'alternance d'unités acides mannuroniques et acides guluroniques qui constituent l'alginate^{120,129-131}.

La cellulose, dont le motif de répétition est constitué de glucose, a un statut particulier au sein des polysaccharides et de leur histoire, car elle est le polymère naturel le plus abondant de la biomasse, présente dans certaines structures cellulaires et dans les fibres des végétaux. La cellulose a été l'un des premiers polymères modifié chimiquement par l'homme en vue de concevoir des matériaux semi-synthétiques aux propriétés inédites vers la fin du XIX^{ème} siècle, à

une époque où la bakélite, premier polymère artificiel à base de formol et de phénol n'avait pas encore été découvert (il le sera en 1907)²¹. Sous forme native, la cellulose représente plus de 80 % de la structure du lin et du chanvre et de 88 à 96 % de la structure du coton, utilisé notamment dans l'industrie textile, où son traitement par la soude la rend parfaitement adaptée à la pose de teinte. Elle est un composé essentiel du papier²¹. Si elle a été isolée dès 1837 par Anselme Payen¹¹⁶, elle ne sera synthétisée qu'en 1964 par voie enzymatique par l'équipe de William Hassid^{21,132}. Sa modification chimique a entraîné l'émergence de composés semi-synthétiques aux propriétés très différentes du composé naturel, telle la nitrocellulose, un explosif plus puissant que la poudre à canon, découverte de façon fortuite par Henri Braconnot en 1832 par action de l'acide nitrique sur des substances végétales¹¹⁶, le procédé ayant postérieurement été amélioré par Christian Schönbein en 1846, qui d'après l'anecdote aurait enflammé le tablier de coton de sa femme en essuyant un mélange d'acide nitrique et d'acide sulfurique qui s'était déversé dessus²¹. Additionné de camphre pour le stabiliser, ce composé a par la suite conduit à développer la première matière plastique, le celluloid, utilisé comme matériau des balles de tennis de tables ou des anciennes pellicules (brevet déposé en 1870 par les frères Hyatt). La cellulose régénérée, dite rayonne de viscose, obtenue par traitements successifs de la cellulose native en milieu alcalin puis acide, est utilisée comme soie artificielle dans l'industrie textile ou comme membrane de filtration et a permis l'obtention de la cellophane, utilisé notamment pour les emballages alimentaires, en étant comprimée entre deux rouleaux au cours du processus d'extraction de la viscose²¹. D'un autre côté, les éthers de cellulose, tels que la carboxyméthylcellulose, l'hydroxyéthylcellulose, la méthylcellulose par exemple, constituent une large gamme de polysaccharides semi-artificiels hydrosolubles aux multiples propriétés en particulier dans le domaine des épaississants très largement utilisés en formulation aqueuse¹³³⁻¹³⁶.

Pour ce qui est des autres polysaccharides, les premières applications concernaient également l'industrie textile¹³⁷ ou l'industrie agroalimentaire. Ainsi, outre l'agar-agar déjà évoqué, les alginates ont été utilisés dans les années 1930 comme stabilisateur pour crème glacée¹²¹. Les polysaccharides ont aussi été employés comme milieu de culture (à base d'agar-agar), comme promoteur de cicatrisation des plaies¹³⁷, comme coagulants pour les procédés de floculation¹³⁷ ou comme substituant du plasma¹³⁸.

2.2 Structure chimique et propriétés

Les polysaccharides sont des polymères naturels composés par des unités oses, aussi appelés glucides. Les oses de base comme le glucose sont caractérisés par une formule brute de type $C_n(H_2O)_n$, n étant généralement compris entre 3 et 9^{139,140}, d'où le terme anglais 'carbohydrate' utilisé pour les désigner. Ils sont répartis entre les aldoses, comprenant une fonction aldéhyde en forme ouverte comme le glucose (l'ose le plus abondant dans la nature¹¹⁷), et les cétooses, qui présentent eux une fonction cétone en forme ouverte. Les autres groupes chimiques de la molécule sont toutes des fonctions alcools. Les carbones sont généralement énumérés en fonction de leur position dans la structure moléculaire, avec respectivement le carbone de la fonction aldéhyde des aldoses et celui non asymétrique en α de la cétone des cétooses définissant la position 1 (Figure A-21a). Un autre point très important dans la dénomination d'un ose provient de la distinction entre deux énantiomères D ou L selon la conformation du carbone asymétrique en α du carbone le plus éloigné de l'aldéhyde ou de la cétone (ex : position 5 d'un hexose) et de son orientation dans la représentation de Fischer (Figure A-21b). Très souvent, l'un des énantiomères est majoritaire à l'état naturel, comme le D-glucose pour le glucose, ce que l'on retrouve également chez les acides aminés, à ceci près que c'est la forme L qui est privilégiée chez ces derniers. Enfin, on peut noter l'équilibre conformationnel des oses en une forme ouverte telle que représentée Figure A-21 et une forme cyclique s'accompagnant par la conversion de la fonction aldéhyde des aldoses en hémiacétal et de la fonction cétone des cétooses en cétal (Figure A-22). Il y a deux possibilités de formes cycliques : la forme furanosique, composée d'un cycle à cinq liaisons sur le modèle du furane (à partir des tétroses) et la forme pyranosique, composée d'un cycle à six liaisons sur le modèle du pyrane (à partir des pentoses) (Figure A-22). Les oses pouvant passer à la fois en forme furanosique et pyranosique privilégient généralement l'une des deux, donnant la structure la plus favorable énergétiquement. Par exemple, le glucose privilégie la forme pyranosique. Ces deux formes cycliques peuvent être en conformation α ou β selon l'orientation du groupe fonctionnel en C_1 par rapport à celui en C_4 (forme furanosique) ou C_5 (forme pyranosique) (Figure A-22). Il est à noter que le passage de la conformation α à β et réciproquement se fait de façon continue, du fait que les oses peuvent passer en forme ouverte. Cela n'est plus le cas quand la fonction C_1 a été modifiée au niveau de son groupe alcool ou au sein d'un polysaccharide (sauf au niveau de son unité terminale présentant une fonction hémiacétal ou cétal libre). Ces deux

conformations revêtent donc une importance cruciale sur la structure du polysaccharide comme nous le verrons par la suite.

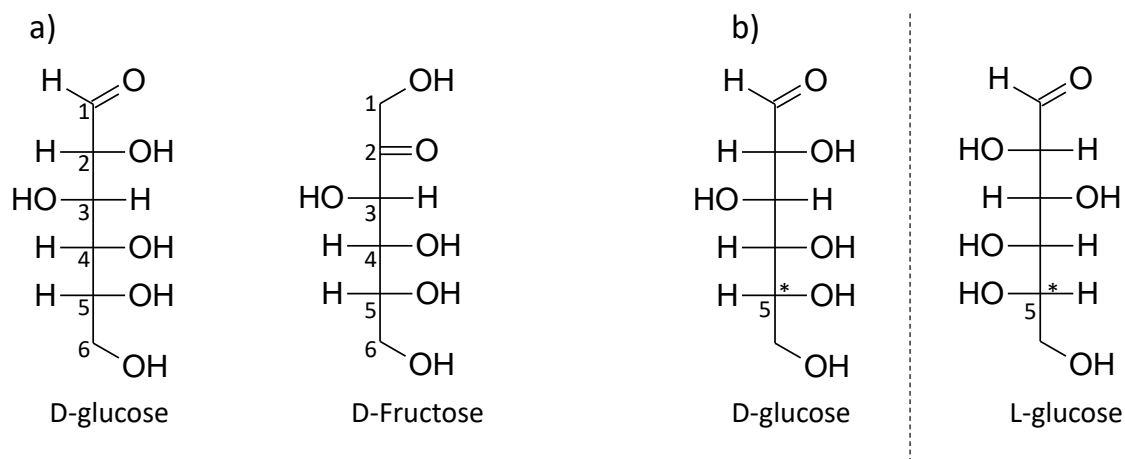


Figure A-21 a) Principe de la numérotation des carbones au sein d'un ose. **b)** Représentation du D-glucose et de son énantiomère, le L-glucose. (Représentation de Fischer)

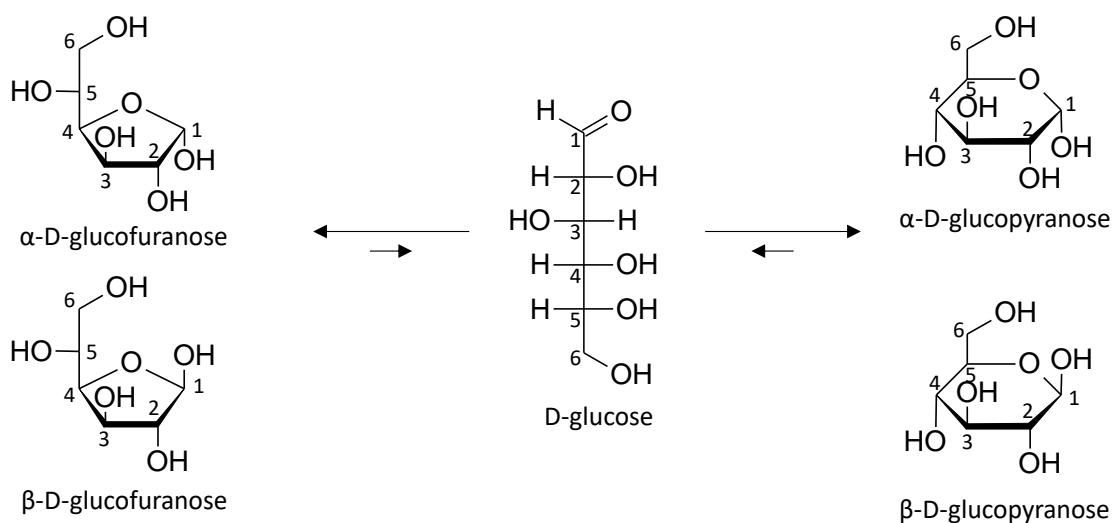


Figure A-22 Représentation de l'équilibre du glucose entre une forme ouverte et des formes cycliques de type pyranosique ou furanosique.

Il convient de noter qu'il existe également de nombreux glucides modifiés incorporant des hétéroatomes au sein de leur structure, tel le N-acétylglucosamine, ou ne respectant pas le modèle de la formule présentée, comme les acides uronique, issus de l'oxydation d'oses simples.

Plusieurs exemples de glucides sont représentés en forme cyclique (celle présente dans les polysaccharides) Figure A-23.

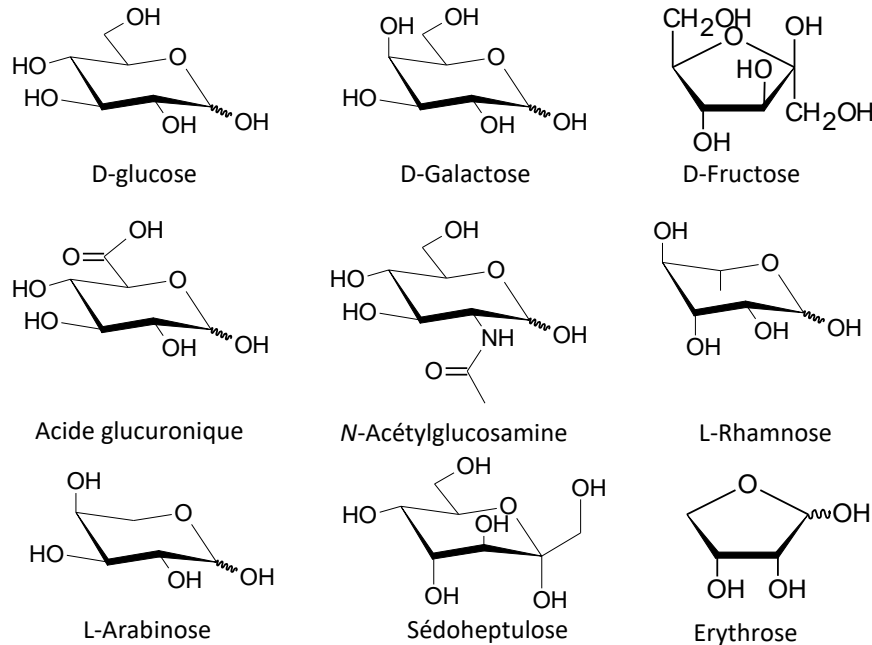


Figure A-23 Représentation de la structure de divers sucres (aldoses et cétoles) ainsi que de dérivés incorporant des hétéroatomes.

Les oses composant le motif de répétition des polysaccharides sont en forme cycliques et sont liés entre eux par une liaison de type glycoside C_1-O-C_n obtenue par réaction de condensation¹⁴¹. Ils présentent donc une conformation α ou β fixe (la forme ouverte n'étant accessible que pour le dernier ose de la chaîne appelé aussi sucre réducteur) qui va impacter la structure et les propriétés du polysaccharide. Ainsi, la cellulose et l'amylose (l'un des composants de l'amidon) sont des polysaccharides tous deux constitués de glucose. La seule différence est que les unités sont en conformation β dans le cas de la cellulose et en conformation α dans le cas de l'amylose. Il en résulte que la cellulose a une structure linéaire rigide, là où l'amylose est hélicoïdale. Cette dernière est assimilable par l'homme par dégradation enzymatique avec l'amylose et est soluble dans l'eau au contraire de la cellulose, non digeste et insoluble.

Les polysaccharides peuvent être linéaires (cellulose, alginate, chitine, acide hyaluronique) ou ramifiés (glycogène, amylopectine, dextrane). Ils peuvent avoir une structure neutre, comme la cellulose, le dextrane ou encore le pullulane ou anionique, comme l'alginate

ou l'acide hyaluronique, qui disposent de fonctions acide carboxylique. Il y a très peu de polysaccharides cationiques, le plus répandu et le plus utilisé est le chitosane, mais il n'existe pas à l'état naturel, il est donc un polysaccharide artificiel de la chitine¹³⁷. Plusieurs structures de divers polysaccharides sont représentées Figure A-24.

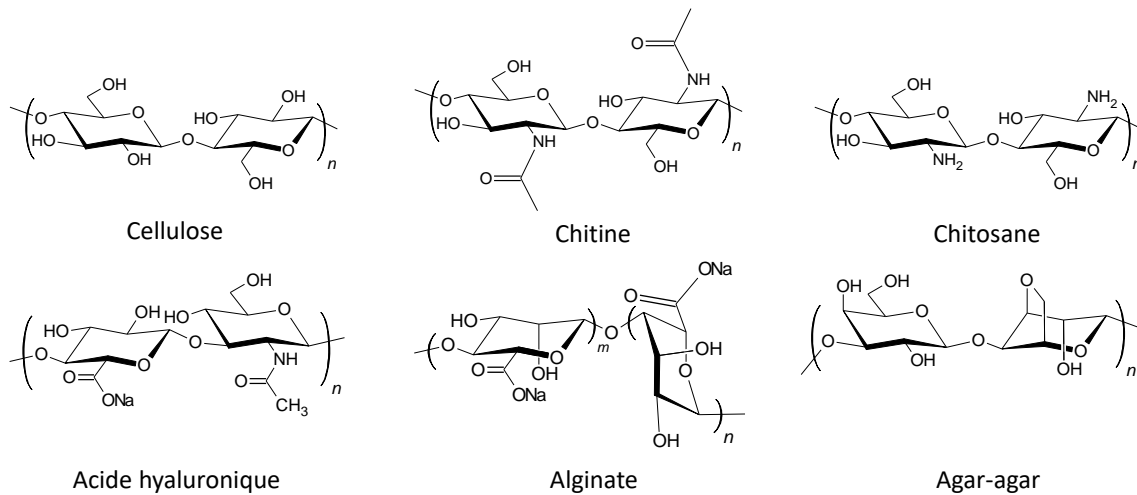


Figure A-24 Représentation de la structure de divers polysaccharides.

La structure et les fonctionnalités des différents polysaccharides impactent fortement leurs propriétés de même que leur solubilité dans l'eau. Ainsi, les polysaccharides chargés (polyélectrolytes) peuvent généralement être dissouts en milieu aqueux quand le pH correspond à un état où ils sont chargés. A l'inverse, au sein d'un milieu où ils ne sont pas chargés, certains seront solubles (acide hyaluronique en milieu acide) et d'autres non (alginate en milieu acide). Le degré de désacétylation de la chitine en chitosane aura un impact important sur sa solubilité¹⁴². En outre, chaque polysaccharide a des fonctions mécaniques ou biochimiques qui lui sont propres au sein des organismes dont ils sont issus. Ainsi, la cellulose est un élément essentiel de la paroi cellulaire des végétaux, la chitine est le composant principal de la carapace des crustacés, l'acide hyaluronique est impliqué dans les processus de prolifération et de motilité cellulaire et le glycogène sert au stockage du glucose dans le foie et les muscles.

Les polysaccharides sont des composés généralement assez biodégradables, très souvent du fait d'une action enzymatique spécifique : les chitinases pour la chitine (un polysaccharide autrement très résistant à l'hydrolyse)¹⁴³, l'amylase pour l'amidon, la cellulase pour la cellulose ou encore la hyaluronidase pour l'acide hyaluronique¹⁴⁴. Il convient cependant de noter que ces enzymes ne sont pas produites par tous les organismes : ainsi, l'organisme

humain ne génère pas de cellulase et ne peut donc pas digérer la cellulose. Cette biodégradabilité a été exploitée dans le domaine des matériaux avec l'élaboration de plastiques ou de mousses à base d'amidon, un polysaccharide pouvant être mis en forme par extrusion¹⁴⁵. Cependant, les matériaux basés sur ce composé présentent l'inconvénient d'être très sensibles à l'humidité pour ce qui est de leur tenue mécanique, ce qui demeure un défi de taille¹⁴⁵. Par contre, les polysaccharides sont particulièrement adaptés à des applications dans le domaine biomédical du fait de leur plus grande assimilabilité par rapport aux polymères synthétiques¹⁴⁴. Il y a un intérêt certain à utiliser ceux qui ont la plus grande compatibilité avec l'homme. A ce titre, l'acide hyaluronique, un glycosaminoglycane de la matrice extracellulaire chez l'animal, semble particulièrement approprié.

2.3 L'acide hyaluronique (HA)

2.3.1 Structure et propriétés

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane, non sulfaté ou lié à une protéine¹⁴⁶. Il est synthétisé au sein de la membrane plasmique, d'où il est extrudé, contrairement aux autres glycosaminoglycanes qui sont produits par l'appareil de Golgi¹⁴⁶. Pour rappel, il a été isolé en 1934 au sein de l'humeur vitrée par Meyer et Palmer¹¹⁸. Il est un constituant essentiel de la matrice extracellulaire chez les vertébrés et quelques bactéries, ce qui laisse supposer qu'il a été développé de façon précoce au cours de l'évolution naturelle¹⁴⁷. On le retrouve notamment au sein de l'humeur vitrée ($\sim 100\text{-}400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), du fluide synovial au niveau des articulations (à une concentration d'environ $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), de la peau (50 % de la masse de HA du corps s'y trouve), des cartilages et du cordon ombilical ($\sim 4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)^{144,146,148,149}. Originellement sa production industrielle se réalisait essentiellement à partir de l'humeur vitrée d'origine bovine ou de crête de coq, mais elle est maintenant de plus en plus obtenue par croissance bactérienne au sein de *streptococci*^{148,150,151}. Par rapport à d'autres polysaccharides comme les pectines ou l'alginate, présentant des structures variables selon la source d'où ils ont été extraits, l'acide hyaluronique a une structure régulière. Il est composé d'acide D-glucuronique (GlcA) alterné avec de la N-acétylglucosamine (GlcNAc) par des liaisons $\beta 1\rightarrow 3$ (GlcA \rightarrow GlcNAc) et $\beta 1\rightarrow 4$ (GlcNAc \rightarrow GlcA) sur une chaîne macromoléculaire linéaire (Introduction générale, Figure 2, page 4).

Du fait de la présence d'unités acides glucuroniques au sein de sa chaîne macromoléculaire et donc de fonctionnalités acides carboxyliques, le HA est un polyélectrolyte anionique et présente une forte affinité à l'eau. Il est également associé à une forte pression

osmotique, cette dernière augmentant de façon exponentielle pour des concentrations croissantes en HA^{146,152,153}. La présence de groupes donneurs et accepteurs de protons sur la structure du HA entraîne la possibilité de formation de liaisons hydrogène, qui sont principalement de nature intramoléculaire avec des ponts constitués par des molécules d'eau dans le cas de solutions aqueuses (Figure A-25)^{147,154}. Ce glycosaminoglycane dispose également de zones relativement hydrophobes au sein de sa structure secondaire. Ces deux propriétés entraînent l'arrangement des chaînes de HA en une structure tertiaire en double hélice en milieu aqueux, qui ont la particularité non usuelle d'être particulièrement rigides, ce qui conduit à une forte augmentation de la viscosité et affecte leur réactivité^{147,154}. Le HA est ainsi plus résistant à l'oxydation de son unité GlcA par le périodate par rapport à d'autres polysaccharides¹⁴⁷. Il convient de noter qu'une étude a montré que l'addition de fragments de HA de faible masse molaire à une solution contenant des fragments de plus forte masse molaire entraîne une diminution de l'élasticité ainsi que de la viscosité de cette solution^{153,154}.

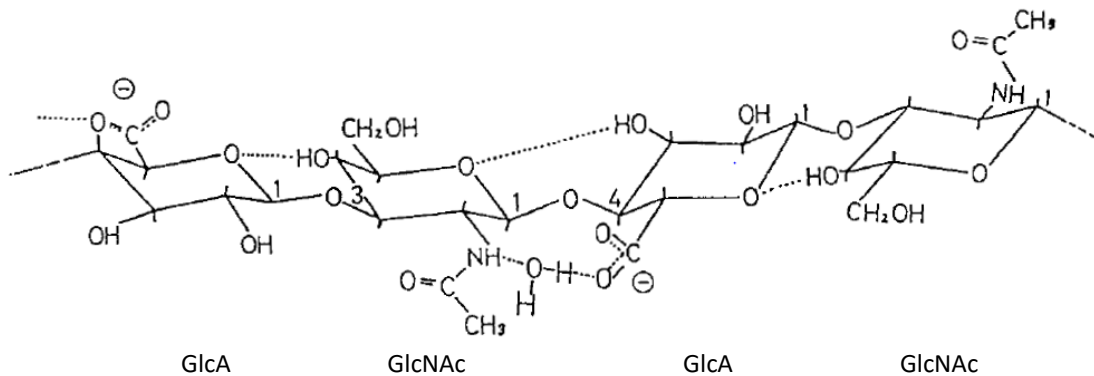


Figure A-25 Représentation des liaisons hydrogène intramoléculaires avec présence de ponts constitués par des molécules d'eau au sein de la structure du HA en solution aqueuse¹⁴⁷.

L'acide hyaluronique a un rôle important dans les mécanismes de prolifération et de motilité cellulaire, ainsi que lors des réponses inflammatoires¹⁴⁹. Certaines protéines, les hyaladhérines, peuvent en effet se lier spécifiquement à ce polysaccharide, ce qui va entraîner des réactions spécifiques¹⁵³. Il peut ainsi se fixer sur les récepteurs CD44 des lymphocytes^{149,155}, cette interaction jouant un rôle essentiel dans le processus de dégradation du HA qui se déroule au sein de la cellule par action de la hyaluronidase après endocytose¹⁵⁵. Il peut aussi être internalisé au sein des cellules du foie par endocytose après s'être lié avec des récepteurs HARE (HA receptor for endocytosis)^{156,157}. A ce sujet, le HA est remplacé au sein de l'organisme à hauteur d'un tiers de sa masse par jour^{146,149,158,159}. Il peut aussi se lier spécifiquement à d'autres

récepteurs cellulaires, les RHAMM (*'Receptor for hyaluronan-mediated motility'*)¹⁶⁰, qui sont impliqués dans la motilité cellulaire¹⁵³.

Il a également des propriétés en solution rappelant celles d'un tamis, laissant passer les molécules de faible masse molaire et retenant les larges particules¹⁵³. Son renouvellement rapide au sein de l'organisme peut laisser penser qu'un de ses rôles est de maintenir le liquide synovial non souillé par des particules qu'il retiendrait et qui pourraient être éliminées avec le HA¹⁵³.

L'acide hyaluronique est présent dans le milieu extracellulaire avec des masses molaires de l'ordre de plusieurs millions de daltons^{146,149,161}. Il a tendance à être dégradé au cours d'une réaction inflammatoire par oxydation ou par l'action d'enzymes libérées par des cellules mortes et les fragments de HA propagent la réponse inflammatoire^{149,162} par interaction avec les lymphocytes. Il est à noter que l'on ne sait pas si les HA de faibles masses molaires (< 100 kDa) sont pro-inflammatoires en tant que tel^{161,163} et que la structure des fragments de HA lors des réactions inflammatoires n'est pas totalement élucidée¹⁴⁹.

Des études ont montré que les récepteurs CD44 sont surexprimés chez certaines cellules cancéreuses (sein, ovaires, poumon, colon, œsophage), où ils provoquent une augmentation de la migration cellulaire par interaction avec le HA^{96,164}. Ce dernier a ainsi été utilisé dans le cadre de projets visant à éliminer les cellules cancéreuses en le fonctionnalisant avec des principes actifs utilisés en chimiothérapie, comme le taxol^{164,165}.

Au sein du liquide synovial, il a un rôle de lubrification des articulations. Le développement de l'arthrose est d'ailleurs associé avec la présence de HA dégradé au sein des jonctions articulaires, ce qui limite sa viscoélasticité ainsi que ses propriétés mécaniques¹⁶⁶. L'un des traitements contre l'arthrose consiste donc en l'injection régulière d'acide hyaluronique de forte masse molaire.

Du fait de ses propriétés hydratantes associées à une forte pression osmotique, l'acide hyaluronique est également utilisé dans de nombreuses formulations cosmétiques visant à l'atténuation des rides sur la peau¹⁶⁷. Il est également utilisé comme adjuvant pour l'administration de médicaments ophtalmiques, dans la régénération tissulaire^{162,165}, ou comme gélifiant dans des formulations contenant des liposomes pour la libération de principes actifs¹⁶⁸.

Enfin, l'acide hyaluronique a une structure plutôt fragile, pouvant être dégradée dans de nombreuses conditions. Outre les diverses hyaluronidases dégradant le polysaccharide sur une zone qui leur est spécifique, la chaîne est particulièrement sensible à des conditions basiques, où elle sera dégradée de façon aléatoire par β -élimination. Elle est également dégradée aux conditions acides, même si sa susceptibilité est moindre qu'avec les bases. Le HA est également sensible aux ultrasons, qui vont dégrader la chaîne de façon non aléatoire, résultant en une distribution bimodale. La température peut également entraîner une réduction de la taille de la chaîne, le traitement en autoclave à 128 °C entraînant par exemple une forte dégradation de cette dernière. Le stress oxydant a également un effet délétère sur l'intégrité de la chaîne de HA¹⁵⁹.

2.3.2 Modification chimique

L'acide hyaluronique peut être modifié chimiquement en vue de lui conférer des propriétés dont il ne dispose pas naturellement et ce pour des applications principalement à destination du domaine biomédical. Il dispose en effet de plusieurs fonctionnalités sur lesquelles des réactions peuvent être réalisées, comme des alcools secondaires, un alcool primaire, un amide ainsi qu'un acide carboxylique.

Le HA a, par exemple, été réticulé en émulsion par du trimétaphosphate de sodium afin d'obtenir des microparticules pouvant séquestrer du bleu de méthylène⁵³. L'avantage de cette méthode est qu'elle emploie un agent de réticulation peu toxique et permet de s'affranchir des dérivés plus usuels tels que le glutaraldéhyde ou des bisépoxydes¹⁶¹, par contre le milieu réactionnel, très fortement alcalin, peut induire une sensible dégradation du HA. D'autres méthodes de réticulation impliquent une fonctionnalisation préalable avec du dihydrazide adipique, suivie par la réaction avec une molécule bifonctionnelle entraînant la formation de liaisons covalentes intermoléculaires^{162,165}. Cette voie de synthèse a par exemple été employée afin de réticuler du HA avec des molécules de polyéthylène glycol téléchéliques comprenant des fonctions aldéhydes terminales¹⁶⁵. Une voie assez utilisée pour modifier le HA consiste en l'incorporation de fonctions thiols au sein de la structure. Cette méthode permet par exemple de former des hydrogels ou nanogels chimiques réversibles à base de ponts disulfure^{169,170}. Ce type d'hydrogel est très sensible aux conditions réductrices que l'on peut rencontrer au sein des cellules du fait de la présence d'antioxydants¹⁷⁰. Du fait de leur réactivité avec des disulfures, les

thiols permettent des réactions de post-fonctionnalisation, les dérivés de dithiopyridine étant très employés dans ce but^{170,171}.

Il est possible de fonctionnaliser le HA en générant une fonction amine au sein de ses unités disaccharides par désacétylation à la manière du chitosane. Cette méthode a été employée pour lui greffer de la tyramine-cellobiose labélisée avec de l'iode 125 afin d'étudier son métabolisme par l'organisme¹⁷². Elle présente cependant plusieurs inconvénients, à savoir la nécessité de réacétyler les fonctions amines n'ayant pas réagi pour ne pas altérer outre-mesure les propriétés physico-chimiques du HA¹⁷² ainsi que la dégradation de la chaîne polysaccharide par β -élimination du fait des conditions de réaction dures utilisées¹⁶².

Il est également possible d'oxyder l'acide hyaluronique par l'action du périodate, malgré la relative lenteur de la réaction par rapport à d'autres polysaccharides^{147,173}. Cette réaction, appliquée aux polysaccharides, aboutit généralement à l'ouverture du cycle ose au niveau des carbones C2 et C3, les fonctions alcools situées sur ces positions étant alors converties en aldéhyde, très réactives et pouvant aisément être fonctionnalisées. Dans le cas du HA, la réaction se produira principalement sur l'unité acide glucuronique, la présence d'une fonction amide en position 3 au sein de l'unité N-acétylglucosamine empêchant l'ouverture de cycle au sein de cette dernière (Figure A-26)^{173,174}. Cette réaction présente néanmoins un inconvénient du fait que la structure du HA sera fortement altérée de façon irréversible en cas d'oxydation poussée, qui doit donc rester limitée. Il existe des possibilités alternatives d'obtenir des fonctions aldéhydes au sein de l'unité disaccharide du HA sans provoquer d'ouverture de cycle qui consistent soit à réduire la fonction acide carboxylique de l'unité GlcA, soit à oxyder sélectivement l'alcool primaire de l'unité N-acétylglucosamine. Dans le premier cas, le réducteur employé est le 9-borabicyclo[3.3.1]nonane et dans le second, le système oxydant employé est le périodinane de Dess-Martin (un oxydant spécifique des alcools primaires) qui présente l'inconvénient de pousser l'oxydation vers la formation d'acide carboxylique comme sous-produit^{175,176}. Les fonctions aldéhydes peuvent alors être utilisées pour la formation de bases de Schiff par réaction avec les amines. Cependant, leur forte réactivité constitue également un problème potentiel, obligeant à prendre des précautions lors de la manipulation du HA ainsi modifié, en évitant notamment de l'exposer à la lumière sous peine de fortement altérer sa structure. Par conséquent, il convient de prêter une attention particulière à ce que toutes les fonctions aldéhydes aient bien réagi après la réaction de fonctionnalisation.

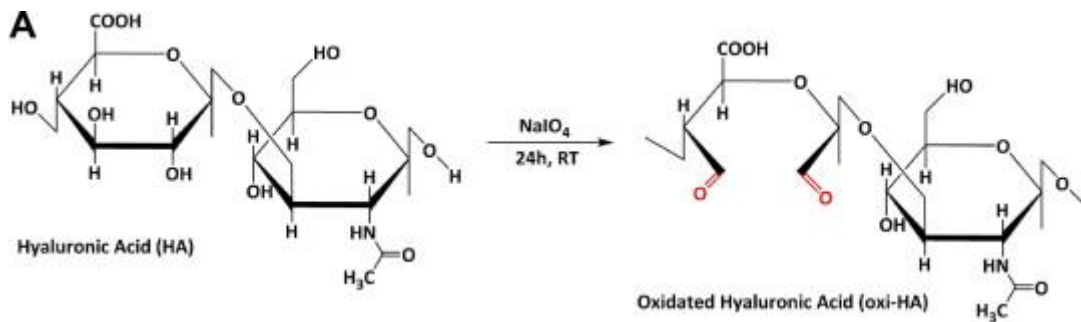


Figure A-26 Oxydation de l'acide hyaluronique par le périodate¹⁷⁷.

Le HA comprend également plusieurs fonctions alcool qui peuvent être fonctionnalisées en les faisant réagir avec des anhydrides par exemple, afin de former des esters^{96,174}. Il est également possible de former des éthers par réaction avec des époxydes ou des hémiacétals par réaction avec des aldéhydes¹⁷⁴. L'inconvénient est que les réactifs impliqués sont souvent toxiques et ne doivent pas demeurer comme impureté au sein du matériau.

La dernière possibilité consiste à fonctionnaliser le HA au niveau de son acide carboxylique, ce qui présente l'avantage de nécessiter des conditions généralement moins drastiques que pour les autres groupes fonctionnels. La méthode la plus couramment utilisée est la conversion de l'acide carboxylique en fonction amide par une réaction de condensation avec une amine, les amides ainsi formés présentant l'avantage d'être des fonctions peu réactives et ne risquent donc pas de s'hydrolyser. Pour ce faire, il convient dans un premier temps d'activer l'acide carboxylique par le biais d'un agent de couplage qui va introduire un groupe partant favorisant l'attaque nucléophile de l'amine. Il existe une pléthore d'agents de couplage, qui ont principalement été développés dans le cadre de la synthèse peptidique. Dans une revue de 2008, Eric Valeur et Mark Bradley en ont dénombré plus de 170, aux acronymes très variés tels le DepODhbt (diethyl 4-oxobenzo[*d*][1,2,3]triazin-3(4*H*)-yl phosphate) ou encore le TAPipU (1-(1-pyrrolidinyl-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-1-ylmethylene)pyrrolidinium tetrafluoroborate *N*-oxide). Ils ont conclu que la différence d'efficacité de ces divers agents de couplages était généralement minime et que pour des applications autres que la synthèse peptidique en phase solide pour lesquels ces dérivés ont été optimisés, il valait mieux s'en tenir aux recettes éprouvées en utilisant les molécules les plus simples et les plus connues, qui présentent l'avantage d'être adaptées à un large éventail de réactions¹⁷⁸. Les agents de couplages les plus répandus sont des dérivés de benzotriazole, des sels de phosphonium ou d'uronium, des carbonyldiimidazoles ainsi que des carbodiimides^{178,179}. Ces derniers présentent

l'avantage de pouvoir être utilisés dans des conditions variées selon leur groupe fonctionnel, y compris en milieu aqueux, avec l'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide), ou en milieu organique, avec le DCC (dicyclohexylcarbodiimide) ou le DIC (diisopropylcarbodiimide). Du fait de la tendance des acides carboxyliques activés sous forme d'*O*-acylurée à se réarranger en *N*-acylurée non réactive, les carbodiimides sont souvent employés en conjonctions d'autres molécules, comme des hydroxysuccinimides, qui vont réagir avec l'*O*-acylurée avant le réarrangement, ce qui aboutira à la formation d'un acide activé secondaire qui ne présente pas de risque de réarrangement^{74,162,180}. Il est à noter qu'en cas de réarrangement, la *N*-acylurée pourra être repérée par analyse RMN où ses groupes *N*-méthyles sortiront vers 2,18 ppm (Figure A-27)¹⁸⁰. En fait, il est assez délicat d'empêcher la formation de ce dérivé : on peut au choix travailler avec une faible quantité d'agent de couplage par rapport à l'unité disaccharide de l'acide hyaluronique afin d'avoir une bonne efficacité de la réaction avec un taux de greffage proche du taux maximal théorique⁷² ou on peut le supprimer au cours de l'étape de purification. Pour ce faire, Virginie Dulong *et coll.* ont développé une méthode basée sur des étapes de dialyse successives en milieu basique et acide lors de travaux portant sur le carboxyméthylpullulane, un autre polysaccharide avec des fonctions acides carboxyliques⁷⁴.

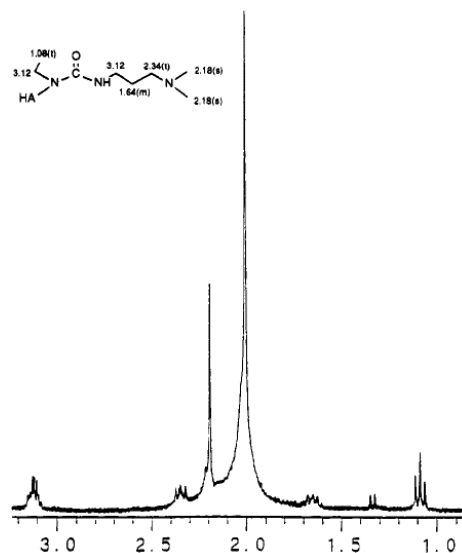


Figure A-27 Détection de la présence résiduelle d'EDC greffé sur du HA par RMN ¹H¹⁸⁰.

2.3.3 Application des HA modifiés

L'acide hyaluronique peut ainsi être fonctionnalisé de multiples façons, avec des finalités variées. Une protéine, l'anti-Fit1, lui a été conjuguée afin de former des nanoparticules

micellaires pouvant séquestrer des principes actifs utilisés pour traiter la néovascularisation rétinienne¹⁸¹. Du fait de la surexpression des récepteurs CD44 ou RHAMM au sein de certaines cellules cancéreuses, des stratégies visent également à conjuguer des médicaments anticancéreux sur le HA afin qu'ils ciblent plus efficacement ces dernières¹⁵⁶. L'un des anticancéreux les plus connus, le Paclitaxel a ainsi été greffé sur le HA par le biais de l'établissement de liaisons esters avec un degré de substitution évalué vers 20 %. Le composé obtenu a ensuite été appliqué *in vitro* sur des cellules cancéreuses de la vessie, au sein desquelles il a été correctement internalisé¹⁸². D'autres principes actifs ont été greffés au HA, comme l'ibuprofène, un anti-inflammatoire, le méthotrexate ou l'hydrocortisone, une hormone stéroïde utilisée pour traiter les insuffisances en cortisol¹⁶¹.

Très souvent, le HA est réticulé afin de former des hydrogels chimiques, présentant une meilleure durabilité dans l'organisme que le HA natif qui y est très rapidement dégradé¹⁸³. Ils pourront être utilisés comme traitement antiride ou pour être injectés au sein des articulations¹⁶¹. Les agents de réticulation les plus employés pour obtenir les hydrogels destinés à la commercialisation sont l'éther diglycidyle de butanediol, le divinylsulfone ainsi que le glutaraldéhyde. Ils présentent cependant tous l'inconvénient d'être toxiques¹⁶¹. Les hydrogels chimiques à base de HA peuvent aussi servir à transporter des facteurs de croissance pour la régénération des cartilages. Un hydrogel à base d'acide hyaluronique comportant des fonctions aldéhydes a ainsi pu être réticulé *in-situ* par la formation de bases de Schiff avec de l'alcool polyvinylique doté de groupes hydrazides afin de séquestrer des chondrocytes (cellules du cartilage)¹⁸⁴.

L'acide hyaluronique peut également être utilisé comme vecteur de petit ARN interférant (siRNA), ce dernier étant utilisé afin d'inhiber spécifiquement l'expression de certains gènes en protéines¹⁸⁵. Le HA a ainsi pu être directement fonctionnalisé avec du petit ARN interférant par l'établissement de ponts disulfures¹⁷¹, ou avec des liposomes qui vont contenir le siRNA¹⁸⁶. Le HA a également été complexé avec du chitosane pour former des nanoparticules pouvant contenir de l'ARN messager, qui a une bonne affinité pour le chitosane (polycation), là où l'acide hyaluronique (polyanion) permet aux nanoparticules d'être internalisées par les cellules¹⁸⁷.

Enfin, le HA a également été fonctionnalisé avec des polymères thermosensibles afin de former des hydrogels, nanogels ou structures micellaires par élévation de la température. On

peut citer l'exemple du PNIPAM avec une fonction amine terminale, qui a été greffé sur le HA en milieu organique par le biais du couplage au carbonyldiimidazole, ce qui a donné des structures devenant des hydrogels par élévation de la température¹⁷⁹. Un copolymère à base de méthacrylate de diéthylène glycol et d'oligoéthylène glycol, obtenu par polymérisation radicalaire contrôlée RAFT (reversible addition fragmentation), a également été greffé sur le HA par le biais d'une réaction de type thiol-ène, le thiol étant généré par aminolyse de l'agent RAFT terminal du copolymère, et l'alcène ayant été incorporé au sein du HA par estérification avec un anhydride. Le composé obtenu pouvait former des nanogels pouvant séquestrer des molécules hydrophobes⁹⁶.

3 Les polymères thermosensibles

3.1 Principe et propriétés

La plupart des polymères ont une solubilité dans un solvant donné qui dépend de la température. Il est possible de distinguer deux cas de figures : le plus intuitif correspondant aux polymères qui ne se solubilisent qu'au-delà d'une certaine température et celui plus surprenant des chaînes macromoléculaires qui vont devenir insolubles au-dessus d'une certaine température. Dans le premier cas, on parle de polymères à UCST (*'Upper Critical Solution Temperature'*) et dans le second, on parle de LCST (*'Lower Critical Solution Temperature'*). On peut représenter ces deux propriétés sur un diagramme de phase (Figure A-28). Dans les deux cas, l'UCST et la LCST correspondent à un point bien précis sur le diagramme de phase, à savoir respectivement la température minimale au-delà de laquelle le polymère devient soluble ou la température maximale au-delà de laquelle le polymère précipite, ces deux points étant obtenus pour une concentration en polymère bien précise¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. La transition est généralement attribuée à un changement de conformation, où la chaîne macromoléculaire sera en solution sous forme de pelote bien solvatée et précipitera en passant en conformation globule plus compacte (Figure A-28).

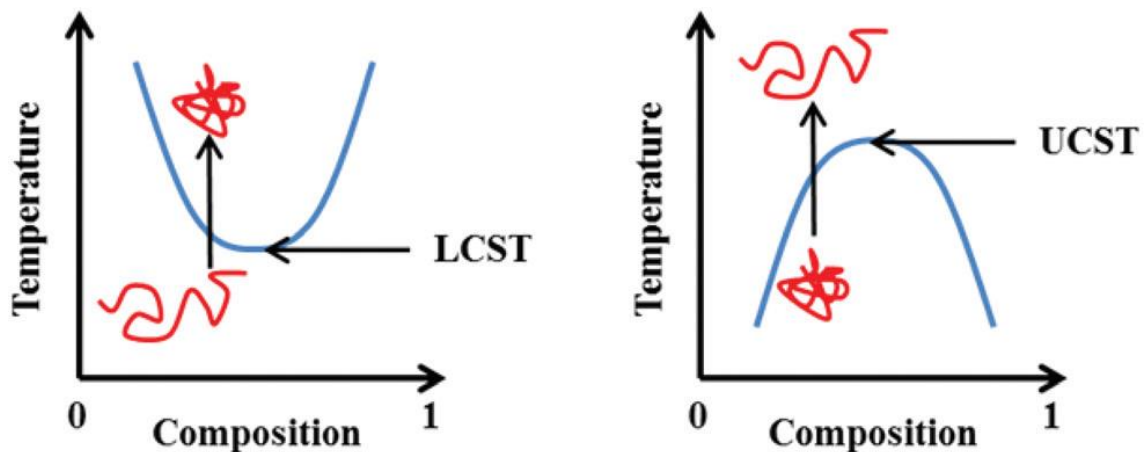


Figure A-28 Diagrammes de phase respectifs d'un polymère en solution avec LCST (gauche) ou avec UCST (droite)¹⁸⁹.

Le phénomène de l'UCST peut aisément se comprendre d'un point de vue thermodynamique en utilisant la théorie de Flory-Huggins¹⁹¹. Si l'on considère l'expression de l'enthalpie libre de mélange, on a :

$$\Delta G_{\text{mél}} = \Delta H_{\text{mél}} - T\Delta S_{\text{mél}} \quad (\text{A-13})$$

Où $G_{\text{mél}}$ est l'enthalpie libre de mélange, $H_{\text{mél}}$ l'enthalpie de mélange et $S_{\text{mél}}$ l'entropie de mélange. Un $\Delta G_{\text{mél}}$ négatif correspondra à un mélange favorable et inversement pour un $\Delta G_{\text{mél}}$ positif. L'enthalpie de mélange correspond à l'énergie à apporter pour rompre les interactions moléculaires solvant-solvant et polymère-polymère et former les liaisons solvant-polymère, ce qui constitue globalement un phénomène endothermique dans le cas d'un polymère à UCST (nécessitant un apport de chaleur). L'entropie de mélange est un terme positif, la dispersion des chaînes polymères au sein du solvant étant associée à une augmentation du désordre du système. Ainsi, on peut voir à partir de l'équation A-13 que l'augmentation de la température va favoriser la contribution entropique au détriment de celle de l'enthalpie libre, ce qui résultera en la solvation du polymère dans le solvant.

Le cas de la LCST est plus complexe, ce phénomène n'étant pas prédit par la théorie de Flory-Huggins. Ici, l'augmentation de la température provoque la démixtion du polymère en solution, ce qui contredit ce qui vient d'être présenté pour l'UCST. Le phénomène de la LCST n'est en fait pas encore bien élucidé. Les mesures en calorimétrie différentielle à balayage indiquent toutes qu'il s'agit d'un phénomène endothermique, associée donc à une variation positive de l'enthalpie^{74,179,192-194}. Afin que la démixtion se produise, il faut donc d'un point de

vue thermodynamique qu'elle soit associée à une augmentation du désordre, ce qui est contre-intuitif. Plusieurs explications ont été avancées selon la nature du polymère étudié : dans le cas du PNIPAM, le système à LCST dans l'eau le plus étudié, l'augmentation de la température est associée à une rupture des liaisons H que cette macromolécule établit au niveau de sa fonction amide avec les molécules d'eau, liaisons qui étaient associées à une augmentation de l'ordre du système (Figure A-29)^{190,195}. Des observations sur des solutions aqueuses de polyéthers de glycol ont mené à l'hypothèse de la présence locale de molécules d'eau dans un état ordonné autour des zones hydrophobes du polymère. L'élévation de la température entraîne la fusion de ces zones ordonnées, ce qui provoque la formation d'associations polymères-polymères au niveau des zones hydrophobes^{194,196}.

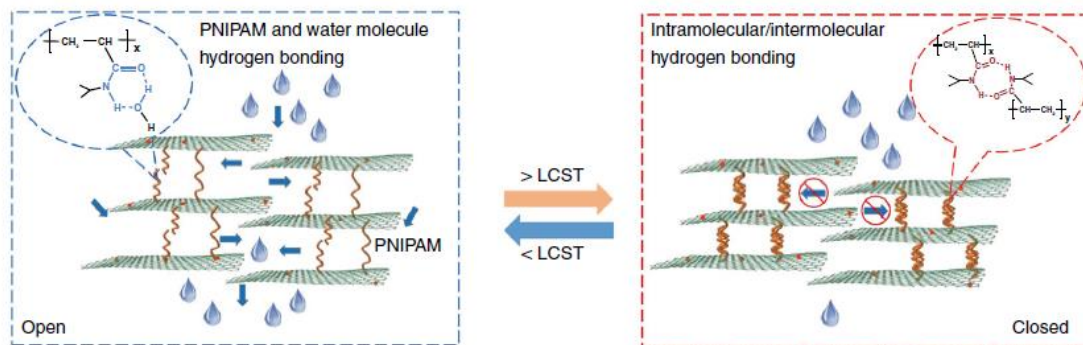


Figure A-29 Représentation des interactions préférentielles PNIPAM-H₂O ou PNIPAM-PNIPAM selon la température de la solution¹⁹⁵.

Dans le cadre de cette thèse, les polymères à LCST seront exploités car l'idée est ici d'obtenir des dérivés de HA qui gélifieront au-delà d'une certaine température. Des hydrogels ont en effet déjà été obtenus en fonctionnalisant des polysaccharides, dont le HA, avec des polymères à LCST, principalement le PNIPAM^{158,179,197}. Deux approches principales sont possibles, à savoir la méthode '*grafting from*' ou la méthode '*grafting to*' (Figure A-30).

Dans le cas de la *grafting from*, le monomère à polymériser est greffé sur le polysaccharide, qui va servir d'amorceur pour la réaction. L'un des premiers articles se focalisant sur la fonctionnalisation du HA avec le PNIPAM a été rédigé par Ohya *et coll.*¹⁹⁷ Ils ont opté pour cette stratégie *grafting from* en greffant un dithiocarbamate de type iniferter (à la fois amorceur, agent de transfert et de terminaison) sur la fonction alcool primaire de l'unité N-acétylglucosamine du HA, à partir de laquelle le NIPAM a été polymérisé par amorçage photonique. La longueur de la chaîne PNIPAM a pu être variée, avec des M_n allant de 5 à 84 kDa,

ces valeurs ayant pu être déterminées après hydrolyse basique du HA. Les HA-*g*-PNIPAM obtenus avaient tendance à précipiter autour de 34 °C (contre 32 °C pour le PNIPAM libre) (l'étude ne se focalise pas sur la gélification éventuelle du composé)¹⁹⁷.

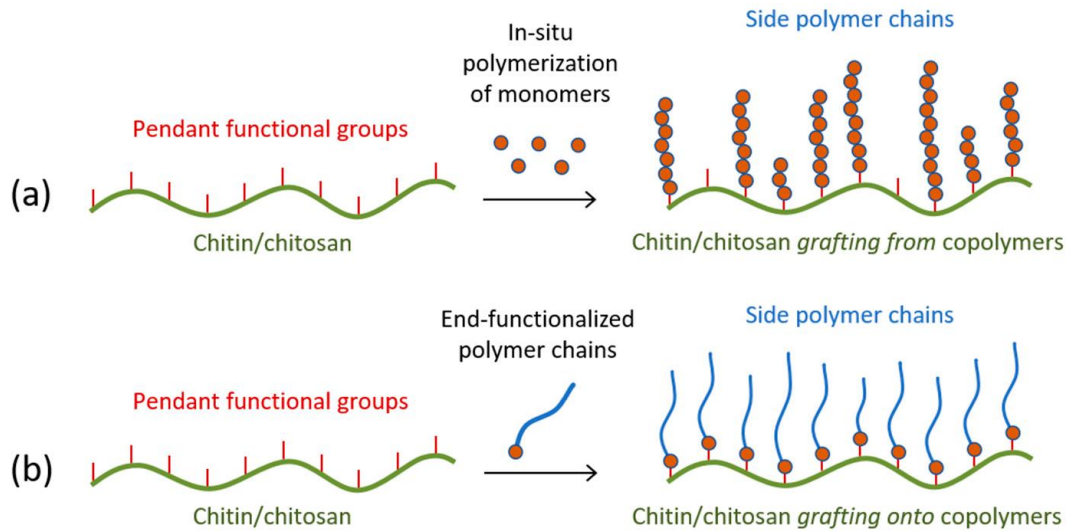


Figure A-30 Représentation des méthodes 'grafting from' (a) et 'grafting to' (b)¹⁹⁸.

Dans le cas de la grafting to, le polymère LCST sera greffé sur le polysaccharide via l'utilisation de fonctionnalités chimiques compatibles intrinsèquement présentes ou préalablement apportées. Du PNIPAM avec une fonction amine terminale a par exemple été greffé sur du HA de différentes masses molaires (1500 kDa et 300 kDa) au niveau de sa fonction acide carboxylique en utilisant le carbonyle diimidazole comme agent de couplage. Dans les deux cas, une augmentation des propriétés viscoélastiques des dérivés de HA (HA-*g*-PNIPAM) a été constatée autour de 30 °C¹⁷⁹. Des nanogels à base de HA-*g*-PNIPAM ont également été obtenus avec une stratégie de greffage légèrement différente, impliquant la cycloaddition de Huisgens, aussi appelée réaction click de par sa grande efficacité. Le PNIPAM était doté d'une fonction azoture -N₃ terminale, et le HA d'une fonction dibenzocyclooctyne, qui permet de se dispenser de l'utilisation d'un catalyseur au cuivre au contraire des fonctions alcynes qui sont couramment utilisées pour cette réaction¹⁵⁸.

Des hydrogels thermosensibles ont également pu être obtenus par l'établissement d'un simple réseau interpénétré, sans nécessiter de greffage du polymère thermosensible. Si ce type d'hydrogel serait probablement impropre à une utilisation biomédicale du fait de la probable diffusion du polymère thermosensible qui en résulterait, il peut intervenir dans d'autres

applications. Ainsi, les propriétés d'absorption de l'humidité ambiante d'un hydrogel d'alginate de calcium à l'état sec interpénétré avec du PNIPAM, puis la libération sous forme d'eau en passant la température de 27 °C à 50 °C, ont été évaluées. Le système a ainsi permis de réaliser la condensation de l'humidité contenue dans l'atmosphère sans nécessiter un fort apport en énergie, ce qui pourrait se révéler utile pour développer des échangeurs de chaleur². Malheureusement, le rendement de la condensation ne s'élevait qu'à 20 % et nécessite d'être amélioré.

Si le PNIPAM reste le polymère le plus utilisé pour obtenir des hydrogels/nanogels, il existe des alternatives, d'autant plus que ses limites en termes de biocompatibilité sont de plus en plus évoquées. Le PNIPAM n'est en effet pas biodégradable et ne peut être éliminé par voie rénale que si sa masse molaire est suffisamment basse^{9,199,200}. De même, l'hydrolyse de sa fonction amide entraînerait la libération non désirée de cette dernière au sein de l'organisme sous forme d'un amide primaire, composé généralement toxique²⁰¹.

Des alternatives existent. Ainsi, la Jeffamine® M2005, un polyétheramine commercial, a été greffée sur du carboxyméthylpullulane, un dérivé de pullulane comprenant des fonctions acides carboxyliques, sur lesquelles la réaction a été effectuée avec des taux de substitution pouvant atteindre 20 %⁷⁴. Une température de gélification aux alentours de 25 °C a ainsi été obtenue. Dans une autre approche, des copolymères à base de polyméthacrylate de polyéthylène glycol avec une fonction thiol terminale ont été additionnés par réaction thiol-ène sur du HA modifié chimiquement afin de contenir des groupes alcènes⁹⁶ ou par synthèse thiol-Michael sur du HA comportant une fonction maléimide greffée au niveau de l'acide carboxylique²⁰². Le composé thermosensible obtenu formait des nanogels par élévation de la température et a été utilisé pour séquestrer des molécules hydrophobes. D'autres types de polyéther de glycol couramment utilisés sont les Pluronic®, des triblocs de polyéthylène glycols (PEG) et de polypropylène glycol (PPG) (PEG-*b*-PPG-*b*-PEG) commercialisés par BASF. Un Pluronic® téléchélique doté de fonctions thiols terminales a ainsi été greffé sur du HA contenant un groupement catéchol au niveau de son acide carboxylique, ce qui a partiellement abouti à la formation de réticulations covalentes, toutefois insuffisantes pour empêcher la solution contenant le composé de s'écouler. L'élévation de la température a entraîné la formation d'associations entre les chaînes de Pluronic®, ce qui a conduit à la gélification de la solution²⁰³.

Parmi ces autres possibilités de polymères thermosensibles, cette thèse adaptera le protocole de greffage de la Jeffamine® M2005 sur le HA et se focalisera ensuite sur la piste prometteuse que constituent les polyoxazolines, des polymères qui présentent la particularité intéressante de voir leurs propriétés physico-chimiques être modifiées en fonction de leurs groupes fonctionnels ainsi qu'être aisément ajustables par copolymérisation^{204,205}.

3.2 Les poly(2-oxazoline)s

Les poly(2-oxazoline)s ont été découverts en 1966 par trois équipes différentes²⁰⁶⁻²⁰⁸. Les monomères constitutifs de ces chaînes macromoléculaires sont des molécules hétérocycliques à cinq atomes, dont trois de carbone, un d'azote et un d'oxygène. L'un des atomes de carbones est situé sur le cycle entre les deux hétéroatomes et comprend un groupe fonctionnel, généralement une chaîne alcane (Figure A-31). Les 2-oxazolines sont synthétisées à partir d'aminoéthanol avec qui l'on peut faire réagir soit un acide carboxylique, un chlorure d'acyle, ou un nitrile^{209,210}. Leur polymérisation se fait par ouverture de cycle cationique, d'acronyme CROP (pour '*cationic ring opening polymerization*'). L'amorceur utilisé est un électrophile, généralement du para-méthyltoluène sulfonate, du triflate de méthyle, du bromure de benzyle ou de l'iodure de méthyle^{204,211}. Le triflate de méthyle entraîne l'amorçage le plus rapide²⁰⁴, mais le para-méthyltoluène sulfonate est souvent utilisé du fait qu'il est moins cher et moins dangereux (le triflate de méthyle est mortel par inhalation)²¹²⁻²¹⁴, et que la réaction peut être moins contrôlée en employant du triflate de méthyle²⁰⁴. L'ouverture de cycle n'est pas déclenchée par le relâchement de la tension de cycle, mais plutôt par la stabilité accrue de la fonction amide formée par rapport à l'iminoéther initial²¹⁵. Lors de la propagation, la chaîne est terminée en son extrémité α par l'électrophile issu de l'amorceur (souvent une fonction méthyle ou benzyle) et en son extrémité ω soit par une fonction oxazolinium (mécanisme ionique), soit par le contre-ion issu de l'amorceur qui a ouvert l'oxazolinium terminal par attaque nucléophile (mécanisme covalent)²¹⁶. Plus le contre-ion est nucléophile, plus le mécanisme covalent sera privilégié et plus la cinétique de la réaction sera faible²⁰⁴. La terminaison peut être effectuée par l'ajout d'un nucléophile, comme une fonction amine, hydroxyle ou acide carboxylique, qui va effectuer selon le cas une attaque nucléophile sur l'oxazolinium terminal ou une substitution du contre-ion de l'amorceur si ce dernier est greffé en bout de chaîne²⁰⁵. La réaction s'effectue généralement dans un solvant organique polaire aprotique, comme le diméthylacétamide, le nitrobenzène ou l'acétonitrile, ce dernier étant le plus utilisé depuis quelques années²⁰⁴. Elle peut être réalisée soit de façon conventionnelle, par voie thermique, en chauffant le milieu

réactionnel sous gaz inerte à 70-80 °C (dans le cas où le solvant est de l'acétonitrile), soit dans un micro-onde sous pression, ce qui permet d'employer des températures plus élevées de l'ordre de 140 °C. La réaction est ainsi considérablement accélérée, passant de l'ordre d'une journée à une quinzaine de minutes^{217,218}.

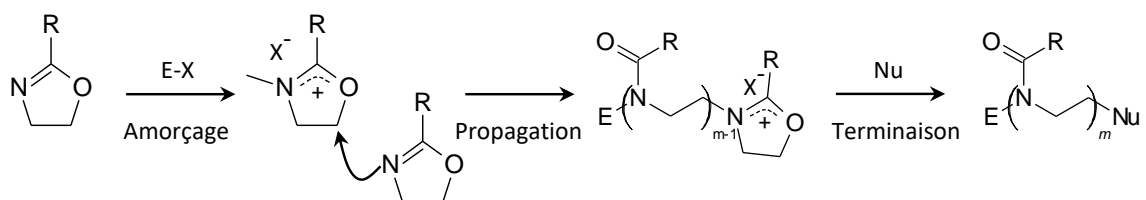


Figure A-31 Schéma général de la polymérisation des oxazolines (E : électrophile; X : contre-ion; Nu : nucléophile).

Les polymérisations ioniques permettent en général un meilleur contrôle sur la taille de la chaîne et des réactions de transferts bien moindres que leur pendantes radicalaires. La première polymérisation « vivante » avait d'ailleurs été obtenue avec la polymérisation anionique du polystyrène²¹⁹. Dans le cas des poly(2-oxazoline)s, la polymérisation est contrôlée uniquement pour des chaînes courtes, avec des dispersités inférieures à 1,3 (DP < 100)^{213,220}. Dès lors que l'on approche d'un DP de 100, il convient d'effectuer la réaction à une température réduite à 40 °C (au lieu de 70-80 °C), ce qui entraîne une augmentation considérable de la durée de la synthèse, qui peut alors se dérouler sur environ une semaine²¹³. Des protocoles ont été développés pour obtenir des chaînes de faible dispersité avec des degrés de polymérisation supérieurs à 100, mais ils sont restreints à certains polyoxazolines comme le poly(2-éthyl-2-oxazoline) PEOx²²¹ ou le poly(2-méthyl-2-oxazoline) PMeOx²²². Ce dernier n'a d'ailleurs pas pu être directement polymérisé de façon contrôlée et a nécessité de synthétiser une chaîne PEOx de la taille désirée, puis de la désacétyler par hydrolyse acide, obtenant ainsi une chaîne polyéthylène imine, avant de la réacétyler avec de l'anhydride acétique afin d'obtenir du PMeOx, ce qui semble fastidieux.

On voit donc ici qu'il peut être intéressant de combiner les propriétés de chaînes polyoxazolines de faible taille en les greffant sur un polymère biocompatible de plus grande taille. Outre le contrôle de leur polymérisation, cela permettrait d'augmenter leur temps de circulation au sein de l'organisme et les fragments de polyoxazolines pourraient être éliminés par voie rénale, le polymère n'étant pas biodégradable tout comme le PNIPAM²²².

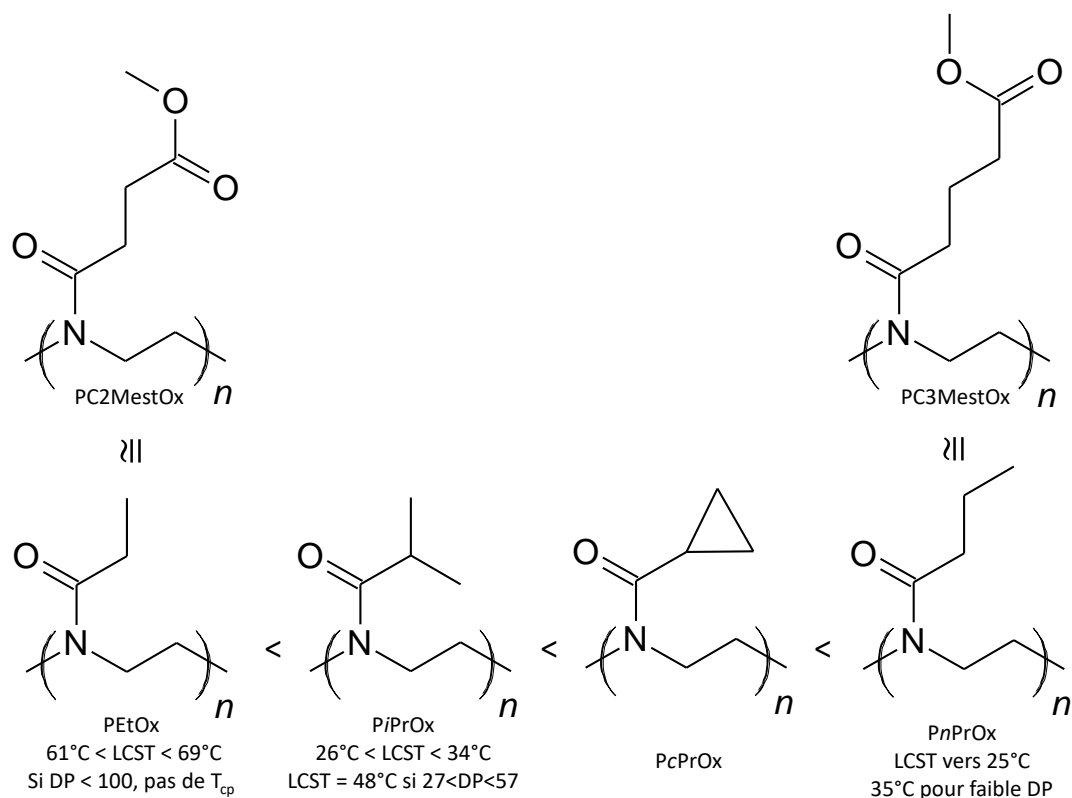


Figure A-32 Classement de poly(2-oxazoline) par LCST décroissante (adapté de la référence 188)

La longueur de la chaîne alcane de l'oxazoline va affecter ses propriétés une fois polymérisé. Ainsi, si le PMeOx est hydrophile, dès que l'on passe à une chaîne à deux carbones, il acquiert une LCST, qui va aller en décroissant avec l'augmentation du nombre de carbones de la chaîne latérale, jusqu'à devenir totalement insoluble à partir de quatre carbones. Il est à noter que les isomères de chaînes n'auront pas le même impact sur la LCST : ainsi, le poly(2-isopropyl-2-oxazoline) PiPrOx a une LCST plus faible que le poly(2-*n*-propyl-2-oxazoline) PnPrOx^{188,223} (voir Figure A-32). Il est possible d'ajuster cette LCST en synthétisant des copolymères^{213,223}. La transition est réversible et, au contraire du PNIPAM, ne présente pas d'hystérésis, ce qui constitue un avantage en terme de contrôle des propriétés du polymère^{188,224}. Il est important de noter que, pour les homopolymères de polyoxazolines, la transition d'un état soluble à insoluble par élévation de la température perd son caractère réversible si la macromolécule est maintenue dans son état insoluble pour une période prolongée : un phénomène de cristallisation irréversible s'opère en effet^{188,225}. Cette propriété dépend de la cristallinité des polyoxazolines, qui va fortement varier selon leur groupe fonctionnel. Des études ont notamment étudié l'impact de la longueur de chaîne de diverses fonctions alcanes sur la

température de transition vitreuse T_g et de fusion T_f . Elles ont notamment montré que les chaînes courtes (< 4 carbones) avaient la cristallinité la plus faible, avec notamment le PEtOx qui est quasi-amorphe^{226,227} (il cristallisera tout de même s'il est placé en solution au-delà de sa LCST, cette transition pouvant prendre plus d'une semaine²²⁸). La température de fusion varie peu avec la chaîne alcane et se situe vers 150 °C ou 200 °C selon les études considérées, qui n'ont pas employé les mêmes méthodes de synthèse et de mesure^{226,227}. La T_g diminue avec la longueur de la chaîne alcane et peut être ajustée en réalisant des copolymères, ce qui confère donc une certaine polyvalence aux polyoxazolines²²⁹.

Les polyoxazolines peuvent également être fonctionnalisées aux extrémités de la chaîne en fonction de l'amorceur et/ou de l'agent de terminaison utilisés afin d'ajuster leurs propriétés²⁰⁵. Certaines équipes ont ainsi étudié des systèmes micellaires à base de polyoxazoline qui a été polymérisée en utilisant un amorceur contenant une chaîne lipidique (lipid-*b*-POx) ou une longue chaîne d'alcane C_{16} (C_{16} -*b*-POx) pour former des structures amphiphiles de type copolymère à blocs^{217,230-232}. Il est possible de moduler les propriétés thermiques de ces micelles sans utiliser de copolymère, en utilisant simplement des systèmes mixtes : le point trouble de micelles mixte à base de lipid-*b*-PiPrOx et de lipid-*b*-PEtOx a ainsi pu être varié de façon linéaire jusqu'à une certaine teneur en lipid-*b*-PEtOx, à partir de laquelle deux points troubles étaient repérés, ce qui indiquait que le mélange micellaire était devenu hétérogène²¹⁷. Des micelles mixtes de C_{16} -*b*-PMeOx et de phospholipides ont été utilisées pour encapsuler un antioxydant, la quercétine pour des applications topiques^{231,233}. Elles ont également été comparées à des micelles commerciales à base de PEG, l'un des buts étant de remplacer ce composé^{231,233}.

En effet, les PEG sont très utilisés au sein des biomatériaux du fait de leur approbation par la FDA (food and drug agency) étatsunienne pour un usage médical, de leur hydrophilie qui ne déclenche pas de réaction immunitaire et de leur production à grande échelle²³⁴. Ils sont ainsi souvent utilisés pour fonctionnaliser la surface de particules dites furtives, pour les dissimuler du système immunitaire^{163,235}. Cependant, ils sont de plus en plus critiqués du fait de leur synthèse nécessitant l'emploi d'époxydes toxiques, de leur tendance à s'oxyder dans des conditions douces, de leur haute viscosité, de leur tendance à s'accumuler dans les organes et de leur susceptibilité à déclencher des réactions allergiques dans de rares cas comme la récente campagne de vaccination contre la COVID 19 a pu le rappeler, les PEGs étant utilisés comme adjuvants dans certains vaccins^{209,233-237}. Des alternatives ne seraient donc pas inutiles et, à ce

sujet, des études ont montré que la cytocompatibilité ainsi que l'hémostotoxicité des polyoxazolines était prometteuse^{233,236}. Le PEOx est d'ailleurs déjà approuvé par le FDA comme additif indirect pour des utilisations en contact avec les aliments (il peut être présent à l'état de traces pour ce type d'applications)²⁰⁹. Des copolymères de polyoxazolines (constitués majoritairement de PEOx) ont été récemment employés comme vecteur de rotigotine, un traitement contre la maladie de Parkinson et ont passé la phase 1 des essais cliniques²³⁷. Il convient cependant de nuancer que la grande majorité des études de biocompatibilité concernent le PMeOx ou le PEOx du fait de leur solubilité en solution aqueuse, ce qui limite les connaissances sur les dérivés plus hydrophobes, qui doivent être intégrés au sein de structures plus complexes²³⁶.

Les polyoxazolines ont déjà été greffés sur des polysaccharides, les premières études sur le sujet remontant aux années 90. Dans la plupart des cas, l'approche retenue consistait à utiliser le polysaccharide comme agent de terminaison au cours de la polymérisation de l'oxazoline, ce qui présente l'avantage de limiter les étapes de réactions. Le chitosane a tout d'abord été employé pour terminer la polymérisation de PMeOx et de PEOx amphiphiles²³⁸, du fait de la présence de fonctions amines au sein de son unité, puis la réaction a été étendue à des copolymères amphiphiles de poly(2-phényl-2-oxazoline)-*b*-poly(2-méthyl-2-oxazoline)²³⁹. Cependant, ces études ne visaient pas à doter le chitosane ainsi modifié de propriétés thermosensibles. Par la suite, une autre équipe a utilisé divers polysaccharides comme le β -glucane ou le glycogène (des chaînes de D-glucose), ou des carraghénanes pour terminer des chaînes copolymères de poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-*co*-poly(2-*n*-butyl-2-oxazoline). Contrairement au chitosane, aucun de ces composés ne comporte de fonction amine. Les fonctions alcools de ces polysaccharides ont donc été converties en alcoolates par le biais d'hydrure de sodium afin de devenir suffisamment nucléophiles pour réagir sur le groupe oxazolinium terminal²⁴⁰⁻²⁴³. Les composés obtenus présentaient des points troubles, et dans le cas du carraghénane, la formation d'agrégats en présence de sels de potassium (une caractéristique native de ce polysaccharide), mais leurs propriétés rhéologiques n'ont pas été étudiées²⁴⁰⁻²⁴³, ce qui aurait permis d'observer si les composés pouvaient former des hydrogels ou non.

Une partie de cette thèse s'inspirera de ces protocoles et les adaptera afin de fonctionnaliser l'acide hyaluronique avec des polyoxazolines thermosensibles. Ceci ne constitue

pas notre unique stratégie pour former des hydrogels stimuli-sensibles: nous avons en effet prévu de greffer également des groupes chromophores (photosensible) sur le HA.

4 Les fonctionnalités photosensibles

4.1 Deux catégories principales

Les matériaux photosensibles constituent une catégorie intéressante pour des applications dans le domaine biomédical, de par la possibilité de déclencher leurs propriétés par l'application d'un rayonnement, qui peut aisément être focalisé sur une zone précise⁸⁵. Par exemple, certains groupes chimiques, comme l'antracène, la coumarine ou encore la thymine se dimérisent sous l'effet d'un rayonnement UV, ce qui a pu être utilisé pour obtenir des hydrogels par réticulation chimique²⁴⁴⁻²⁴⁷. D'autres fonctionnalités voient leur structure chimique être modifiée sous l'action d'un rayonnement, de façon réversible ou non, ce qui conduit à un changement de leur polarité. Ces fonctions peuvent ainsi être greffées sur des chaînes macromoléculaires afin de faire varier leur balance hydrophile/lipophile. Elles ont notamment été utilisées sur des systèmes micellaires, afin de pouvoir renforcer leur structure ou au contraire les dégrader (Figure A-33)²⁴⁸. Certains groupes fonctionnels sont en fait des groupes partants et entraînent des modifications irréversibles de la chaîne polymère sur laquelle elles sont greffées. L'exemple le plus connu est celui des *o*-nitrobenzoyles, qui sont greffés sous la forme d'une structure ester qui sera hydrolysée sous l'action d'un rayonnement UV ou en proche infrarouge à deux photons^{248,249}. Les esters de coumarine ont une réactivité similaire et ont été utilisés sur des systèmes micellaires à base de HA²⁵⁰.

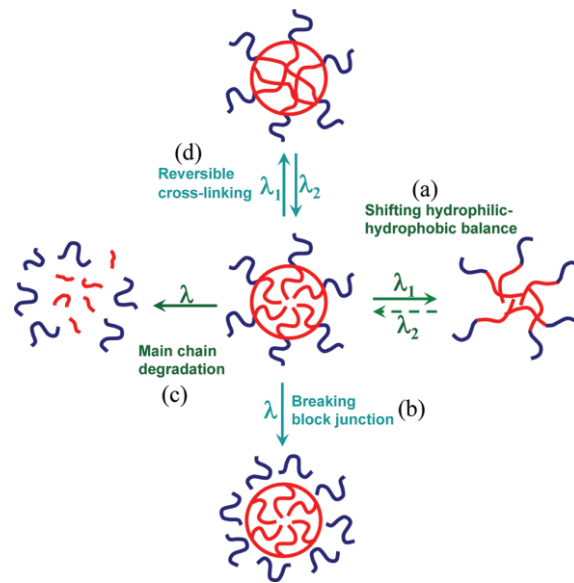


Figure A-33 Représentations des diverses possibilités de modification des propriétés de systèmes macromoléculaires micellaires par stimulus photosensible²⁴⁸.

D'autres molécules, sous l'action d'un rayonnement incident, passent de façon réversible d'une conformation stable à une conformation de plus haute énergie⁸⁵. Cette transition entraîne une forte variation de leur spectre d'absorption de la lumière et l'on parle ainsi de groupes photochromiques^{251,252}. Ce phénomène a été découvert en 1867 sur une solution de tétracène qui se décolorait lorsqu'elle était exposée à la lumière du jour et se recolorait dans le noir²⁵². Ce domaine d'étude s'est ensuite développé au cours des années 40-60 de façon concomitante avec les techniques d'analyses usuelles de caractérisation des liaisons chimiques et des structures cristallines (IR, RMN, UV, rayons X), l'un des défis étant de développer des molécules ne s'altérant pas de façon irréversible lorsqu'elles sont soumises à plusieurs cycles d'irradiation, ce qui sera résolu dans les années 80 avec l'apparition des dérivés de spiroxazine et de chromènes²⁵². Il existe actuellement cinq groupements principaux de ce type à être employés au sein de polymères, les azobenzènes, les spiropyranes, les spirooxazines, les diaryléthylènes ainsi que les fulgides (Figure A-34). Les mécanismes d'isomérisation diffèrent selon le groupe considéré : ainsi, les azobenzènes passent d'une conformation *trans* apolaire à une conformation *cis* plus polaire et les spiropyranes passent d'une forme fermée non chargée à une forme ouverte zwitterionique par un mécanisme d'ouverture de cycle électrocyclique⁸⁵.

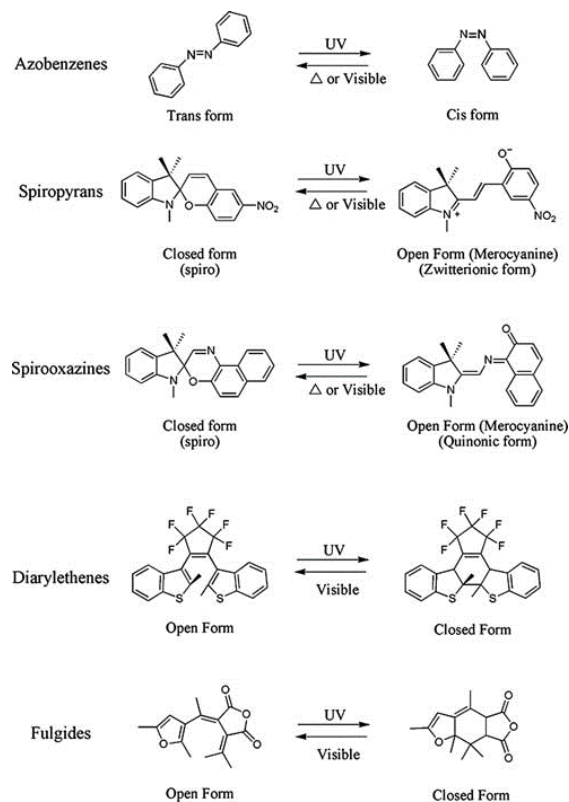


Figure A-34 Groupes fonctionnels photochromiques communément utilisés au sein de polymères⁸⁵.

4.2 Applications des molécules photochromiques

Ces structures rencontrent des applications diverses : elles sont par exemple incorporées au sein de cristaux liquides afin de déclencher un changement d'alignement réversible de ces derniers vers un état isotrope (favorisé par la conformation *cis*) par simple irradiation lumineuse, la température de transition de la phase nématique vers la phase isotropique se trouvant réduite²⁵³. La demande la plus forte pour les molécules photochromiques provient de l'industrie optique, qui utilise des composants héliochromiques pour développer des verres correcteurs pouvant noircir s'ils sont directement exposés au soleil^{85,252,254,255}. Leur utilisation pour des applications visant au stockage optique 3-D de données est également étudiée^{256,257}. Les matériaux photochromiques peuvent altérer l'indice de réfraction du matériau au sein duquel ils sont dispersés lors de leur changement de conformation, ce qui a pu être utilisé dans l'élaboration de guides d'ondes photo-ajustables au sein de fibres optiques²⁵⁸.

4.3 Les azobenzènes

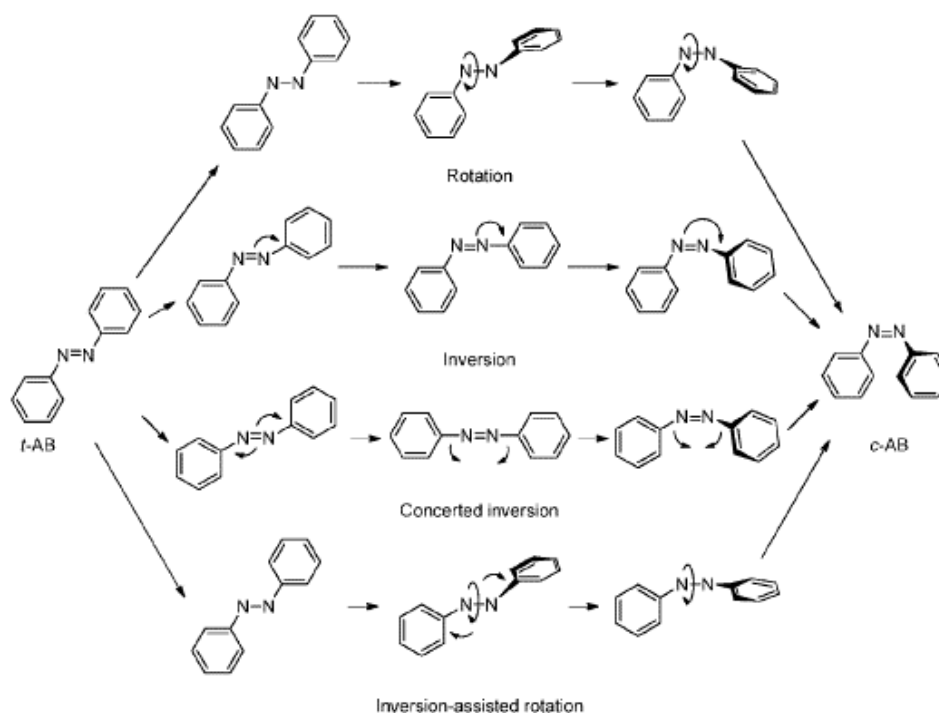


Figure A-35 Mécanismes proposés pour le changement de conformation de l'azobenzène²⁵⁹.

Parmi les molécules photochromiques, l'azobenzène est un composé intéressant de par la simplicité de sa structure, symétrique et associée à un relativement faible encombrement stérique. Le mécanisme de son isomérisation n'est pas totalement élucidé, quatre possibilités ayant été proposées (Figure A-35)²⁵⁹. Elle se produit selon une cinétique de premier ordre que ce soit de la forme *trans* vers la forme *cis* ou réciproquement²⁶⁰. Sa rapidité dépendra de la longueur d'onde et de l'intensité du rayonnement incident, mais également du solvant employé²⁶¹. La forme *trans* présente un maximum d'absorption à 320 nm, qui correspond à la transition entre deux orbitales liantes et antiliantes π - π ^{*261}, ainsi qu'à 230 nm²⁶². L'absorption d'un rayonnement incident de longueur d'onde similaire entraînera le passage de la conformation *trans* à la conformation *cis*, qui présente elle un maximum d'absorption à 440 nm, correspondant à une transition d'une orbitale non liante à une orbitale liante n - π ^{*261}, et un autre vers 254 nm²⁶³ (Figure A-36). Le retour à la conformation *trans* peut se faire spontanément par action de la chaleur ou par l'action d'un rayonnement à 440 nm²⁶¹ le plus couramment utilisé, voire à 254 nm (d'énergie supérieure)^{263,264}.

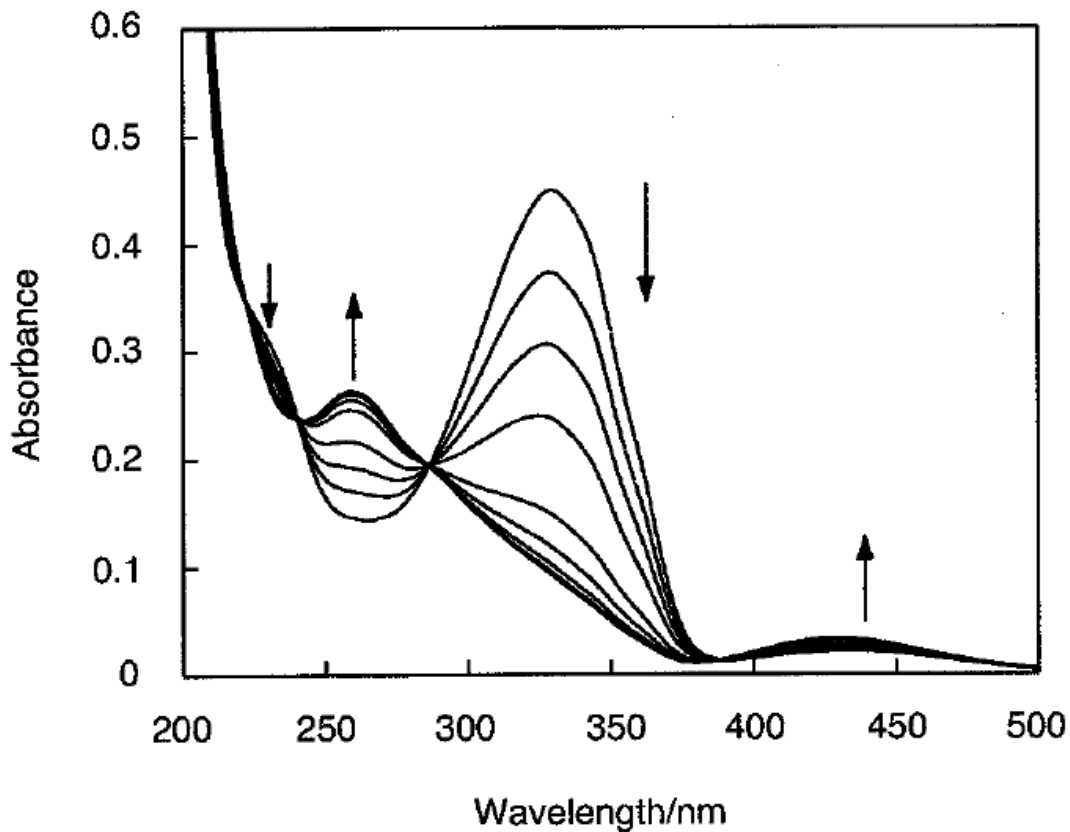


Figure A-36 Spectre d'absorption typique d'un dérivé d'azobenzène. Les flèches indiquent le passage d'une conformation *trans* en une conformation *cis*²⁶⁵.

Les azobenzènes ont pu être employés afin de fonctionnaliser des polysaccharides en vue de leur conférer des propriétés photosensibles. Ainsi, de l'hydroxypropyl methylcellulose, un dérivé thermosensible de la cellulose, a été fonctionnalisée avec des dérivés d'azobenzènes comportant un groupe chlorure d'acyle. Le composé obtenu a une LCST qui varie d'environ 10 °C selon l'état conformationnel du groupement azobenzène²⁶⁶. De plus, la LCST pouvait être augmentée par l'ajout d' α -cyclodextrine (α -CD), un oligomère cyclique composé de 6 molécules de D-glucose dont la cavité est hydrophobe et peut former des complexes d'inclusion²⁶⁶. L' α -CD forme en effet un complexe d'inclusion avec la forme *trans* alors que la forme *cis* présente moins d'affinité et est exclue de la cavité^{73,267,268}. Des hydrogels photosensibles ont ainsi également pu être synthétisés sur cette base : un dérivé d'azobenzène a été greffé sur du HA au niveau de sa fonction acide carboxylique avec un taux de greffage de l'ordre de 3,4 %. Afin d'obtenir l'hydrogel, ce dérivé de HA a ensuite été associé à un bactériophage M13 fonctionnalisé avec de la β -cyclodextrine (β -CD), ce qui, aux dires des auteurs, permettait d'obtenir une transition sol-

gel par irradiation UV²⁶⁹. Il convient toutefois de noter qu'ils ont employé de la β -CD, qui comprend une molécule supplémentaire de D-glucose par rapport à l' α -CD et dispose donc d'une cavité plus large, ce qui modifie ses interactions avec les azobenzènes. Les complexes d'inclusions entre la β -CD et les dérivés d'azobenzènes en conformation *trans* sont toujours possibles, mais il y a également une certaine affinité avec la fonction *cis*, qui, d'après des mesures en dichroïsme circulaire, ne serait pas totalement incluse au sein de la cavité, mais interagirait au bord de la molécule^{265,270}. L' α -CD, formant des complexes uniquement avec la conformation *trans* des azobenzènes, est donc plus sélective que la β -CD et est donc *a priori* plus appropriée pour la formation d'hydrogels photosensibles.

5 Conclusion

Le but de cette thèse est de concevoir des hydrogels stimuli-sensibles basés sur l'acide hyaluronique qui pourraient être utilisés comme systèmes injectables.

Au cours de ce chapitre, la notion d'hydrogels ainsi que leurs applications ont été introduites : ils consistent en des réseaux tridimensionnels de polymères hydrophiles réticulés capables de retenir et d'absorber une quantité importante d'eau, ce qui leur confère des propriétés physico-chimiques semblables aux tissus biologiques. Ils sont ainsi parfaitement appropriés pour être utilisés dans des applications biomédicales car ils n'entraînent pas de réaction inflammatoire ni de thrombose par accumulation de plaquettes des vaisseaux sanguins sur leur surface contrairement aux plastiques usuels, de structure plus rigide. Il existe deux types principaux d'hydrogels : les hydrogels chimiques et les hydrogels physiques. Les hydrogels chimiques sont constitués de liaisons covalentes au contraire des hydrogels physiques qui eux sont obtenus par l'établissement de réticulations non covalentes. Ces derniers sont donc réversibles et peuvent aisément être conçus de façon à être stimuli-sensibles en jouant sur des paramètres comme le pH, la température ou encore l'irradiation lumineuse.

Afin d'améliorer la biocompatibilité des hydrogels, il vaut mieux qu'ils soient basés sur des matériaux naturels, assimilables par l'organisme, plutôt que sur des matériaux synthétiques qui sont très souvent non-biodégradables (à l'exception des polyesters). Les polysaccharides constituent un choix intéressant de par leur abondance naturelle, la diversité de leurs groupes fonctionnels, de longueur de chaîne et de structure spatiale. L'acide hyaluronique, en particulier, est un polysaccharide de la famille des glycosaminoglycanes produit au sein de la matrice extracellulaire chez les vertébrés (dont l'homme) et certaines bactéries. Il est de ce fait

parfaitement assimilable, sa dégradation se produisant par l'action d'enzymes. Il est en outre impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires, du fait de ses interactions avec des récepteurs. Il est constitué par une alternance d'unités acide glucuronique et N-acétylglucosamine, deux dérivés du D-glucose. L'acide glucuronique, en particulier, comprend une fonction acide carboxylique, sur laquelle il est possible de réaliser des réactions de greffage, notamment en vue d'obtenir des fonctions esters ou amides.

A l'état natif, l'acide hyaluronique ne présente pas la possibilité d'établir des réticulations réversibles et nécessite donc d'être fonctionnalisé. Afin de réaliser des hydrogels thermosensibles, il est possible de lui greffer des polymères présentant une LCST dans l'eau, c'est-à-dire une température au-delà de laquelle ils deviendront fortement associatifs et se désolvateront. Si le PNIPAM et les polyéthers de glycol sont les polymères à LCST de référence, les polyoxazolines présentent une alternative émergente à ces systèmes, du fait de l'aisance à contrôler leur thermosensibilité par la synthèse de copolymères, de l'absence d'hystérésis lors de leur transition thermique et de leur potentielle meilleure biocompatibilité par rapport aux polyéthers de glycols qui sont de plus en plus décriés à cause de leur mauvaise stabilité. L'avantage d'un tel système de copolymères en peigne HA-*g*-POx est que la longueur de la chaîne latérale ne nécessite pas d'être très longue, ce qui lui permettrait donc être éliminée de l'organisme par voie rénale, d'autant qu'il devient compliqué d'obtenir des chaînes polyoxazolines de dispersité faible au-delà d'un DP de 100.

Pour ce qui est des molécules photosensibles, dont la structure peut être modifiée sous l'action d'un rayonnement, il en existe deux types. Certaines vont subir des modifications irréversibles quand d'autres vont passer d'un isomère de conformation à un autre, ce qui constitue une transition réversible. Parmi ces molécules, les azobenzènes présentent l'avantage d'une structure simple relativement peu encombrée stériquement avec de nombreux dérivés commerciaux disponibles. Ils peuvent en outre former des complexes d'inclusion au sein d' α -cyclodextrines, ce qui permettrait la formation d'hydrogels photosensibles si ces dernières sont greffées sur des chaînes HA.

6 Bibliographie

1. S. Lack, V. Dulong, D. Le Cerf, L. Picton, J.F. Argillier, G. Muller, Hydrogels Based on Pullulan Crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): Rheological study, Polym.

- Bull. 52 (2004) 429–436.
2. K. Matsumoto, N. Sakikawa, T. Miyata, Thermo-responsive gels that absorb moisture and ooze water, *Nat. Commun.* 9 (2018) 2315–2321.
 3. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications, in: J. D. Andrade (Eds.), *Hydrogels for Medical and Related Applications*, ACS Symposium Series 31, 1976, pp. 1-36.
 4. S.D. Bruck, Aspects of Three Types of Hydrogels for Biomedical Applications, *J. Biomed. Mater. Res.* 7 (1973) 387–404.
 5. H. Niu, F. Wang, R.A. Weiss, Hydrophobic/Hydrophilic Triblock Copolymers: Synthesis and Properties of Physically Cross-Linked Hydrogels, *Macromolecules* 48 (2015) 645–654.
 6. M. Djabourov, Chapter 1: Gels, in: Y. De Deene (Eds.), *NMR and MRI of Gels*, New Developments in NMR, 2020, pp. 1–44.
 7. T. Graham, Liquid Diffusion applied to Analysis, *Philos. Trans. R. Soc. London* 151 (1861) 183-224.
 8. O. Wichterle, D. Lím, Hydrophilic Gels for Biological Use, *Nature* 185 (1960) 117-118.
 9. J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat. Rev. Mater.* 1 (2016) 16071.
 10. J. Kopeček, Hydrogels: From Soft Contact lenses and Implants to Self-Assembled Nanomaterials, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 47 (2009) 5929-5946.
 11. P.C. Nicolson, J. Vogt, Soft contact lens polymers: an evolution, *Biomaterials* 22 (2001) 3273-3283.
 12. M.F. Refojo, H. Yasuda, Hydrogels from 2-Hydroxyethyl Methacrylate and Propylene Glycol Monoacrylate, *J. Appl. Polym. Sci.* 9 (1965) 2425-2435.
 13. J. Kolařík, Mechanical properties of hydrophilic copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate with ethyl acrylate, *n*-butyl acrylate, and dodecyl methacrylate, *J. Biomed. Mater. Res.* 17 (1983) 757-767.
 14. S. Friedrich, Superabsorbent Polymers (SAP), in: V. Mechtcherine, H. W. Reinhardt (Eds.), *Application of Superabsorbent Polymers (SAP) in Concrete Construction*, RILEM State-of-the-Art Reports, Springer, 2012, pp. 13-20.
 15. W. Kuhn, B. Hargitay, Reversible Dilation and Concentration by Changing the State of Ionization of High-Polymer Acid Networks, *Nature* 165 (1950) 514-516.
 16. R.G. Miekka, Polycation-Polyanion Complexes: Preparation and Properties of

- Poly(Vinylbenzyl-Trimethyl Ammonium)-Poly(Styrene Sulfonate), Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Dept. of Chemical Engineering (1961).
17. S.D. Bruck, Sterilization Problems of Synthetic Biocompatible Materials, *J. Biomed. Mater. Res.* 5 (1971) 139-158.
 18. K. Kataoka, T. Tsuruta, Biomedical Behavior of Synthetic Polyion Complexes toward Blood Platelets, *Makromol. Chem.* 181 (1980) 1363-1373.
 19. A.S. Hoffman, A. Afrassiabi, L.C. Dong, Thermally Reversible Hydrogels: II. Delivery and Selective Removal of Substances from Aqueous Solutions, *J. Controlled Release* 4 (1986) 213-222.
 20. T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, *Polymer* 49 (2008) 1993-2007.
 21. H.F. Mark, *les polymères*, Robert Laffont, Paris, 1970.
 22. E.L. Hirst, J.K.N. Jones, W.O. Jones, The Structure of Alginic Acid. Part I., *J. Chem. Soc.* 0 (1939) 1880-1885.
 23. S.P. Saric, R.K. Schofield, The dissociation constants of the carboxyl and hydroxyl groups in some insoluble and sol-forming polysaccharides, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 185 (1946) 431-447.
 24. B. Dai, S. Matsukawa, NMR studies of the gelation mechanism and molecular dynamics in agar solutions, *Food Hydrocolloids* 26 (2012) 181-186.
 25. A.P. Hitchens, M.C. Leikind, The Introduction of Agar-Agar into Bacteriology, *J. Bacteriol.* 37 (1939) 485-493.
 26. M. Djabourov, J. Leblond, P. Papon, Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation, *J. Phys. France* 49 (1988) 319-332.
 27. M. Kierstan, C. Bucke, The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles, and Enzymes in Calcium Alginate Gels, *Biotechnol. Bioeng.* 3 (1977) 387-397.
 28. J.L. Mongar, A. Wasserman, Fully Swollen Alginate Gels as Permutites: Kinetics of Calcium-Sodium Ion Exchange, *Discussions. Faraday Soc.* 7 (1949) 118-123.
 29. L.J. Allen, Oral Use of Absorbable Alginate Derivatives to Arrest and Prevent Postextraction Hemorrhage, *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.* 2 (1953) 336-338.
 30. D. Saha, S. Bhattacharya, Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review, *J. Food Sci. Technol. (New Delhi, India)* 47 (2010) 587-597.
 31. P. Edman, B. Ekman, I. Sjöholm, Immobilization of Proteins in Microspheres of

- Biodegradable Polyacryldextran, *J. Pharm. Sci.* 69 (1980) 838-842.
32. G.B. McKenna, F. Horkay, Effect of crosslinks on the thermodynamics of poly(vinyl alcohol) hydrogels, *J. Pharm. Sci. Polymer* 35 (1994) 5737-5742.
 33. N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 27-46.
 34. G.B. McKenna, K.M. Flynn, Swelling in crosslinked naturel rubber: experimental evidence of the crosslink density dependance of χ , *Polymer* 31 (1990) 1937-1945.
 35. P. Woisel, *Physico-Chimie Macromoléculaire*, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille.
 36. M. Patenaude, T. Hoare, Injectable, Mixed Natural-Synthetic Polymer Hydrogels with Modular Properties, *Biomacromolecules* 13 (2012) 369-378.
 37. L.M. Geever, M.J.D. Nugent, C.L. Higginbotham, The effect of salts and pH buffered solutions on the phase transition temperature and swelling of thermoresponsive pseudogels based on *N*-isopropylacrylamide, *J. Mater. Sci.* 42 (2007) 9845-9854.
 38. H. Lange, Determination of the degree of swelling and crosslinking of extremely small polymer gel quantities by analytical ultracentrifugation, *Colloid Polym. Sci.* 264 (1986) 488-493.
 39. H. Park, X. Guo, J.S. Temenoff, Y. Tabata, A.I. Capaln, F.K. Kasper, A.G. Mikos, Effect of Swelling Ratio of Injectable Hydrogel Composites on Chondrogenic Differentiation of Encapsulated Rabbit Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vitro, *Biomacromolecules* 10 (2009) 541-546.
 40. I.-W. Jung, S. Lone, Chitosan-Gelatin Hydrogels for heavy metal adsorption and chitosan-gelatin hydrogels manufactured by the same method, Korean Patent KR 10-2019-0027661 (2017, September 7).
 41. T. Begam, A.K. Nagpal, R. Singhal, A study on copolymeric hydrogels based on acrylamide-methacrylate and its modified vinyl-amine-containing derivative, *Des. Monomers Polym.* 7 (2004) 311-330.
 42. C. Norioka, Y. Inamoto, C. Hajime, A. Kawamura, T. Miyata, A universal method to easily design tough and stretchable hydrogels, *NPG Asia Mater.* 13 (2021) 34.
 43. P.G. De Gennes, Dynamics of Etangled Polymer Solutions. I. The Rouse Model, *Macromolecules* 9 (1976) 587-593.
 44. T. Canal, N.A. Peppas, Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling

- of polymeric networks, *J. Biomed. Mater. Res.* 23 (1989) 1183-1193.
45. L. Picton, *Rhéologie : Science de la matière en écoulement*, Master chimie, Université de Rouen Normandie.
 46. T.G. Mezger, *The Rheology Handbook*, third revised ed., Vincentz Network, Hanover, Germany, 2011.
 47. M. Meyers, K.K. Chawla, Chapter 2: Elasticity and Viscoelasticity, in: M. Meyers, K.K. Chawla (Eds.), *Mechanical Behavior of Materials*, Second ed., Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 2009, pp. 71–155.
 48. H.H. Winter, Gel Point, in: H.F. Mark (Eds.), *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Fourth ed., John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2016.
 49. M. Mours, H.H. Winter, Relaxation Patterns of Nearly Critical Gels, *Macromolecules* 29 (1996) 7221-7229.
 50. N.V. Pogodina, H.H. Winter, Polypropylene Crystallization as a Physical Gelation Process, *Macromolecules* 31 (1998) 8164-8172.
 51. W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv. Drug Delivery Rev.* 64 (2012) 223-236.
 52. Z. Souguir, E. About-Jaudet, L. Picton, D. Le Cerf, Anionic Polysaccharide Hydrogels with Charges Provided by the Polysaccharide of the Crosslinking Agent, *Drug Delivery Lett.* 2 (2012) 240-250.
 53. V. Dulong, S. Lack, D. Le Cerf, L. Picton, J.P. Vannier, G. Muller, Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization, *Carbohydr. Polym.* 57 (2004) 1-6.
 54. Y. Tabata, Y. Ikada, Synthesis of Gelatin Microspheres Containing Interferon, *Pharm. Res.* 6 (1989) 422-427.
 55. T. Pouyani, G.S. Harbison, G.D. Prestwich, Novel Hydrogels of Hyaluronic Acid: Synthesis, Surface Morphology, and Solid-State NMR, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 7515-7522.
 56. W.N.E. van Dijk-Wolthuis, O. Franssen, H. Talsma, M.J. van Steenbergen, J.J. Kettenes-van den Bosch, W.E. Hennink, Synthesis, Characterization, and Polymerization of Glycidyl Methacrylate Derivatized Dextran, *Macromolecules* 28 (1995) 6317-6322.
 57. W.N.E. van Dijk-Wolthuis, S.K.Y. Tsang, J.J. Kettenes-van den Bosch, W.E. Hennink, A new class of polymerizable dextrans with hydrolysable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer, *Polymer* 38 (1997) 6235-6242.

58. J. Kopeček, J. Vacík, D. Lím, Permeability of membranes containing ionogenic groups, *J. Polym. Sci., Part A-1: Polym. Chem.* 9 (1971) 2801-2815.
59. J.E. Elliott, M. Macdonald, J. Nie, C.N. Bowman, Structure and swelling of poly(acrylic acid) hydrogels: effect of pH, ionic strength, and dilution on the crosslinked polymer structure, *Polymer* 45 (2004) 1503-1510.
60. S. Chen, H. Matsumoto, Y. Moro-oka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto, Microneedle-Array Patch Fabricated with Enzyme-Free Polymeric Components Capable of On-Demand Insulin Delivery, *Adv. Funct. Mater.* 29 (2019) 1807369.
61. J.P. Gong, Y. Katsuyama, T. Kurokawa, Y. Osada, Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength, *Adv. Mater.* 15 (2003) 1155-1158.
62. J.P. Gong, Why are double network hydrogels so tough?, *Soft Matter*. 6 (2010) 2583-2590.
63. J.Y. Sun, X. Zhao, W.R.K. Illeperuma, O. Chaudhuri, K.H. Oh, D.J. Mooney, J.J. Vlassak, Z. Suo, Highly stretchable and tough hydrogels, *Nature* 489 (2012) 133-136.
64. S.J. de Jong, B. van Eerdenbrugh, C.F. van Nostrum, J.J. Kettenes-van den Bosch, W.E. Hennink, Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior, *J. Controlled Release* 71 (2001) 261-275.
65. A. Vashist, A. Vashist, Y.K. Gupta, S. Ahmad, Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 147-166.
66. Y. Tang, C.L. Heaysman, S. Willis, A.L. Lewis, Physical hydrogels with self-assembled nanostructures as drug delivery systems, *Expert Opin. Drug Delivery* 8 (2011) 1141-1159.
67. K.R. Kamath, K. Park, Biodegradable hydrogels in drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.* 11 (1993) 59-84.
68. C. He, S.W. Kim, D.S. Lee, In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery, *J. Controlled Release* 127 (2008) 189-207.
69. O. Smidsrød, G. Skjåk *Bræk*, Alginate as immobilization matrix for cells, *Trends Biotechnol.* 8 (1990) 71-78.
70. D. Eagland, N.J. Crowther, C.J. Butler, Complexation Between Polyoxyethylene and Polymethacrylic Acid – The Importance of The Molar Mass of Ployoxyethylene, *Eur. Polym. J.* 30 (1994) 767-773.
71. F. Yokoyama, I. Masada, K. Shimamura, T. Ikawa, K. Monobe, Morphology and structure

- of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting, *Colloid Polym. Sci.* 264 (1986) 595-601.
72. A. Charlot, A. Heraud, P. Guenot, M. Rinaudo, R. Auzély-Velty, Controlled Synthesis and Inclusion Ability of a Hyaluronic Acid Derivative Bearing β -Cyclodextrin Molecules, *Biomacromolecules* 7 (2006) 907-913.
73. S. Tamesue, Y. Takashima, H. Yamaguchi, S. Shinkai, A. Harada, Photoswitchable Supramolecular Hydrogels Formed by Cyclodextrins and Azobenzene Polymers, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 7461-7464.
74. V. Dulong, G. Mocanu, L. Picton, D. Le Cerf, Amphiphilic and thermosensitive copolymers based on pullulan and Jeffamine®: Synthesis, characterization and physicochemical properties, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1522-1531.
75. P.M. Niang, Z. Huang, V. Dulong, Z. Souguir, D. Le Cerf, L. Picton, Thermo-controlled rheology of electro-assembled polyanionic polysaccharide (alginate) and polycationic thermo-sensitive polymers, *Carbohydr. Polym.* 139 (2016) 67-74.
76. G. Mocanu, D. Mihai, V. Dulong, L. Picton, D. Le Cerf, New anionic amphiphilic thermosensitive pullulan derivatives, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 276-281.
77. M. Madau, D. Le Cerf, V. Dulong, L. Picton, Hyaluronic Acid Functionalization with Jeffamine® M2005: A Comparison of the Thermo-Responsiveness Properties of the Hydrogel Obtained through Two Different Synthesis Routes, *Gels* 7 (2021) 88.
78. J. Cappello, J.W. Crissman, M. Crissman, F.A. Ferrari, G. Textor, O. Wallis, J.R. Whitley, X. Zhou, D. Burman, L. Aukerman, E.R. Stedronsky, In-Situ self-assembling protein polymer gel systems for administration, delivery, and release of drugs, *J. Controlled Release* 53 (1998) 105-117.
79. T. Miyata, N. Asami, T. Urugami, Preparation of an Antigen-Sensitive Hydrogel Using Antigen-Antibody Bindings, *Macromolecules* 32 (1999) 2082-2084.
80. H.R. Lee, S.M. Jung, S. Yoon, W.H. Yoon, T.H. Park, S. Kim, H.W. Shin, D.S. Hwang, S. Jung, Immobilization of planktonic algal spores by inkjet printing, *Sci. Rep.* 9 (2019) 12357.
81. H.H. Lin, Y.L. Cheng, In-Situ Thermoreversible Gelation of Block and Star Copolymers of Poly(ethylene glycol) and Poly(N-isopropylacrylamide) of Varying Architectures, *Macromolecules* 34 (2001) 3710-3715.
82. Y. Ma, Y. Tang, N.C. Billingham, S.P. Armes, Synthesis of Biocompatible, Stimuli-Responsive, Physical Gels Based on ABA Triblock Copolymers, *Biomacromolecules* 4

- (2003) 864-868.
83. T. Schlee, M. Madau, D. Roessner, Synthesis enhancements for generating highly soluble tetrabutylammonium alginates in organic solvents, *Carbohydr. Polym.* 114 (2014) 493-499.
 84. E.S. Gil, S.M. Hudson, Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates, *Prog. Polym. Sci.* 29 (2004) 1173-1222.
 85. F. Ercole, T.P. Davis, R.A. Evans, Photo-responsive systems and biomaterials: photochromic polymers, light-triggered self-assembly, surface modification, fluorescence modulation and beyond, *Polym. Chem.* 1 (2010) 37-54.
 86. M. Xu, B. Cheng, Y. Sheng, J. Zhou, M. Wang, X. Jiang, X. Lu, High-Performance Cross-Linked Self-Healing Material Based on Multiple Dynamic Bonds, *ACS Appl. Polym. Mater.* 2 (2020) 2228-2237.
 87. J. Ye, S. Fu, S. Zhou, M. Li, K. Li, W. Sun, Y. Zhai, Advances in hydrogels based on dynamic covalent bonding and prospects for its biomedical application, *Eur. Polym. J.* 139 (2020) 110024.
 88. M.M. Perera, N. Ayres, Dynamic covalent bonds in self-healing, shape memory, and controllable stiffness hydrogels, *Polym. Chem.* 11 (2020) 1410-1423.
 89. D. Montarnal, M. Capelot, F. Tournilhac, L. Leibler, Silica-Like Malleable Materials from Permanent Organic Networks, *Science* 334 (2011) 965-968.
 90. W. Denissen, J.M. Winne, F.E. Du Prez, Vitrimers: permanent organic networks with glass-like fluidity, *Chem. Sci.* 7 (2016) 30-38.
 91. M.E. Smithmyer, C.C. Deng, S.E. Cassel, P.J. LeValley, B.S. Sumerlin, A.M. Kloxin, Self-Healing Boronic Acid-Based Hydrogels for 3D Co-cultures, *ACS Macro Lett.* 7 (2018) 1105-1110.
 92. T. Figueiredo, J. Jing, I. Jeacomine, J. Olsson, T. Gerfaud, J.G. Boiteau, C. Rome, C. Harris, R. Auzély-Velty, Injectable Self-Healing Hydrogels based on Boronate Ester Formation between Hyaluronic Acid Partners Modified with Benzoxaborin Derivatives and Saccharides, *Biomacromolecules* 7 (2018) 1105-1110.
 93. C. Lin, D. Sheng, X. Liu, S. Xu, F. Ji, L. Dong, Y. Zhou, Y. Yang, NIR induced self-healing electrical conductivity polyurethane/grapheme nanocomposites based on Diels-Alder reaction, *Polymer* 140 (2018) 150-157.
 94. M. Abu-Laban, R.R. Kumal, J. Casey, J. Becca, D. LaMaster, C.N. Pacheco, D.G. Sykes, L.

- Jensen, L.H. Haber, D.J. Hayes, Comparison of Thermally Actuated Retro-Diels-Alder Release Groups for Nanoparticle Based Nucleic Acid Delivery, *J. Colloid Interface Sci.* 526 (2018) 312-321.
95. M. Mahinroosta, Z.J. Farsangi, A. Allahverdi, Z. Shakoori, Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications, *Mater. Today Chem.* 8 (2018) 42-55.
96. T.F. Stefanello, A. Szarpak-Jankowska, F. Appaix, B. Louage, L. Hamard, B.G. De Geest, B. van der Sanden, C.V. Nakamura, R. Auzély-Velty, Thermoresponsive hyaluronic acid nanogels as hydrophobic drug carrier to macrophages, *Acta Biomater.* 10 (2014) 4750-4758.
97. C.A. Dreiss, Hydrogel design strategies for drug delivery, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 48 (2020) 1-17.
98. T. Sato, R. Uchida, H. Tanigawa, K. Uno, A. Murakami, Application of Polymer Gels Containing Side-Chain Phosphate Groups to Drug-Delivery Contact Lenses, *J. Appl. Polym. Sci.* 98 (2005) 731-735.
99. R. Rodríguez, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Interactions of ibuprofen with cationic polysaccharides in aqueous dispersions and hydrogels: Rheological and diffusional implications, *Eur. J. Pharm. Sci.* 20 (2003) 429-438.
100. I. Ankareddi, C.S. Brazel, Synthesis and characterization of grafted thermosensitive hydrogels for heating activated controlled release, *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* 336 (2007) 241-247.
101. D. Li, X. An, Y. Mu, A liposomal hydrogel with enzyme triggered release for infected wound, *Chem. Phys. Lipids* 223 (2019) 104783.
102. L. Wang, M. Neumann, T. Fu, W. Li, X. Cheng, B.L. Su, Porous and responsive hydrogels for cell therapy, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 38 (2018) 135-157.
103. P. Prevost, S. Flori, C. Collier, E. Muscat, E. Rolland, Applications of AN69® Hydrogel to Islet Encapsulation. Evaluation in Streptozotocin-induced Diabetic Rat Model, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 831 (2006) 344-349.
104. H. Park, K. Park, Biocompatibility Issues of Implantable Drug Delivery Systems, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1770-1776.
105. T. Desai, L.D. Shea, Advances in islet encapsulation technologies, *Nat. Rev. Drug Discovery* 16 (2017) 338-350.

106. A. Matsumoto, T. Ishii, J. Nishida, H. Matsumoto, K. Kataoka, Y. Miyahara, A synthetic Approach Toward a Self-Regulated Insulin Delivery System, *Angew. Chem., Int. Ed.* 51 (2012) 2124-2128.
107. M. Liu, X. Zeng, C. Ma, H. Yi, Z. Ali, X. Mou, S. Li, Y. Deng, N. He, Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering, *Bone Res.* 5 (2017) 17014.
108. M. Guvendiren, H. D. Lu, J.A. Burdick, Shear-thinning hydrogels for biomedical applications, *Soft Matter* 8 (2012) 260-272.
109. Y. Cao, C. Zhang, W. Shen, Z. Cheng, L. Yu, Q. Ping, Poly(N-isopropylacrylamide)-chitosan as thermosensitive in situ gel-forming system for ocular drug delivery, *J. Controlled Release* 3 (2007) 186-194.
110. R. Tan, Z. She, M. Wang, Z. Fang, Y. Liu, Q. Feng, Thermo-sensitive alginate-based injectable hydrogel for tissue engineering, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1515-1521.
111. P. Calvert, Hydrogels for Soft Machines, *Adv. Mater.* 21 (2009) 743-756.
112. T. Kajisa, T. Sakata, Glucose-responsive hydrogel electrode for biocompatible glucose transistor, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 18 (2017) 26-33.
113. Y. Takashima, S. Hatanaka, M. Otsubo, M. Nakahata, T. Kakuta, A. Hashidzume, H. Yamaguchi, A. Harada, Expansion-contraction of photoresponsive artificial muscle regulated by host-guest interactions, *Nat. Commun.* 3 (2012) 1270.
114. J.E.G. van Dam, L.A. M. van den Broek, C.G. Boeriu, Polysaccharides in Human Health Care, *Nat. Prod. Commun.* 12 (2017) 821-830.
115. H.P. Ramesh, R.N. Tharanathan, Carbohydrates – The Renewable Raw Materials of High Biotechnological Value, *Crit. Rev. Biotechnol.* 23 (2003) 149-173.
116. D.N.-S. Hon, Cellulose: a random walk along its historical path, *Cellulose* 1 (1994) 1-25.
117. S. Al-Assaf, Polysaccharides: Origin, Source and Properties, in: S. Al-Assaf, X. Coqueret, K. Z.H.M. Dahlan, M. Sen, P. Ulanski (Eds.), *The Radiation Chemistry of Polysaccharides*, International Atomic Energy Agency, Vienna, 2016, pp. 5-24.
118. K. Meyer, J.W. Palmer, The Polysaccharide of the Vitreous Humor, *J. Biol. Chem.* 107 (1934) 629-634.
119. U. Remminghorst, B.H.A. Rehm, Bacterial alginates: from biosynthesis to applications, *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 1701-1712.
120. S.N. Pawar, K.J. Edgar, Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications, *Biomaterials* 33 (2012) 3279-3305.

121. D.F. Day, Chapter 5: Alginates, in: D. L. Kaplan (Eds.), *Biopolymers from Renewable Resources*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998, pp. 119-143.
122. H.J. Wellard, Variation in the Lattice Spacing of Cellulose, *J. Polym. Sci. (Hoboken, NJ, U. S.)* 13 (1954) 471-476.
123. R.D. Preston, X-Ray Analysis and the Structure of the Components of Plant Cell Walls, *Phys. Rep.* 4 (1975) 183-226.
124. E.D.T. Atkins, J.K. Sheehan, Structure for Hyaluronic Acid, *Nature (London), New Biol.* 235 (1972) 253-254.
125. B. Weissmann, K. Meyer, The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord, *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 1753-1757.
126. D.A. Rees, Conformational Analysis of Polysaccharides. Part II. Alternating Copolymers of the Agar-Carrageenan-Chondroitin type by Model Building in the Computer with Calculation of Helical Parameters, *J. Chem. Soc. B* 0 (1969) 217-226.
127. D.A. Rees, The Carrageenan System of Polysaccharides. Part I. The Relation between the κ - and λ -Components, *J. Chem. Soc. O* (1963) 1821-1832.
128. E.L. McCandless, J.S. Craigie, J.A. Walter, Carrageenans in the Gametophytic and Sporothytic Stages of *Chondrus crispus*, *Planta* 112 (1973) 201-212.
129. M. Brzezińska, G. Szparaga, The Effect of Sodium Alginate Concentration on the Rheological Parameters of Spinning Solutions, *Autex Res. J.* 15 (2015) 123-126.
130. A. Haug, B. Larsen, A Study on the Constitution of Alginic Acid by Partial Acid Hydrolysis, *Proceedings of the Fifth International Seaweed Symposium, Halifax, (1966)* pp. 271-277.
131. O. Smidsrød, A. Haug, S. Westman, S. Gronowitz, H. Christiansen, U. Rosén, A Light Scattering Study of Alginate, *Acta Chem. Scand.* 22 (1968) 797-810.
132. G.A. Barber, A.D. Elbein, W.Z. Hassid, The Synthesis of Cellulose by Enzyme Systems from Higher Plants, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 4056-4061.
133. D. Saha, S. Bhattacharya, Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review, *J. Food Sci. Technol. (New Delhi, India)* 47 (2010) 587-597.
134. W. Sun, D. Sun, Y. Wei, S. Liu, S. Zhang, Oil-in-water emulsions stabilized by hydrophobically modified hydroxyethylcellulose: Adsorption and thickening effect, *J. Colloid Interface Sci.* 311 (2007) 228-236.
135. B.V. de Lima, R.R.L. Vidal, N.D.N. Marques, A.M.S. Maia, R.D.C. Balaban, Temperature-induced thickening of sodium carboxymethylcellulose and poly(N-isopropylacrylamide)

- physical blends in aqueous solution, *Polym. Bull.* 69 (2012) 1093-1101.
136. P.A. Williams, G.O. Phillips, Chapter 1 – Introduction to food hydrocolloids, in: G.O. Phillips, P.A. Williams (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids*, Third ed., Woodhead Publishing, Elsevier, 2021, pp. 3-26.
 137. R.A.A. Muzzarelli, E.R. Pariser, *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, MIT Sea Grant Program, 1978.
 138. M. Dubniks, J. Persson, P.-O. Grände, Comparison of the plasma volume-expanding effects of 6% dextran 70, 5% albumin, and 6% HES 130/0.4 after hemorrhage in the guinea pig, *J. Trauma: Inj., Infect., Crit. Care* 67 (2009) 1200-1204.
 139. J.Y. Nogret, *Biologie – Réussir sa première année de Médecine – Acquérir les connaissances en biologie cellulaire, biochimie et biologie moléculaire enseignées en première année d'étude médicale*, ellipses, France, 2019.
 140. A. Blanco, G. Blanco, Chapter 4 – Carbohydrates, in: A. Blanco, G. Blanco (Eds.), *Medical Biochemistry*, Academic Press, Elsevier, 2017, pp. 73-97.
 141. M. Rinaudo, R. Auzely, K. Mazeau, Polysaccharides and carbohydrate polymers, in: H. F. Mark (Eds.), *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2004, pp. 200-264.
 142. A. Aljawish, *Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères*, Université de Lorraine, France, 2013.
 143. C. Jeuniaux, M.F. Voss-Foucart, J.C. Bussers, La production de chitine par les crustacés dans les écosystèmes marins, *Aquat. Living Resour.* 6 (1993) 331-341.
 144. A. Jain, Y. Gupta, S.K. Jain, Perspectives of Biodegradable Natural Polysaccharides for Site-Specific Drug Delivery to the Colon, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10 (2007) 86-128.
 145. T. Jiang, Q. Duan, J. Zhu, H. Liu, L. Yu, Starch-based biodegradable materials: Challenges and opportunities, *Adv. Ind. Eng. Polym. Res.* 3 (2020) 8-18.
 146. J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, U.B.G. Laurent, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *J. Intern. Med.* 242 (1997) 27-33.
 147. J.E. Scott, Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications, *Ciba Found. Symp.* 143 (1989) 6-15.
 148. J. A. Vázquez, L. Pastrana, C. Piñeiro, J.A. Teixeira, R.I. Pérez-Martin, I.R. Amado, Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* on Protein Substrates

- Obtained from *Scylliorhinus canicula* Discards, Mar. Drugs 13 (2015) 6537-6549.
149. S.S.M. Lee-Sayer, Y. Dong, A.A. Arif, M. Olsson, K.L. Brown, P. Johnson, The where, when, how, and why of hyaluronan binding by immune cells, *Front. Immunol.* 6 (2015) 150.
 150. J.W. Bracke, K. Thacker, Hyaluronic Acid from Bacterial Culture, United States Patent US 467,925 [4,517,295] (1985, May 14).
 151. H. Knopf-Marques, M. Pravda, L. Wolfova, V. Velebny, P. Schaaf, N.E. Vrana, P. Lavalley, Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Coating and Delivery Systems: Applications in Tissue Engineering, Regenerative Medicine and Immunomodulation, *Adv. Healthcare Mater.* 5 (2016) 2841-2855.
 152. F. Horkay, P.J. Basser, D.J. Londono, A.M. Hecht, E. Geissler, Ions in hyaluronic acid solutions, *J. Chem. Phys.* 131 (2009) 184902.
 153. T.C. Laurent, U.B.G. Laurent, J.R.E. Fraser, Functions of hyaluronan, *Ann. Rheum. Dis.* 54 (1995) 429-432.
 154. J.E. Scott, Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues, *FASEB J.* 6 (1992) 2639-2645.
 155. M. Culty, H.A. Nguyen, C.B. Underhill, The Hyaluronan Receptor (CD44) Participates in the Uptake and Degradation of Hyaluronan, *J. Cell Biol.* 116 (1992) 1055-1062.
 156. A. Banzato, S. Bobisse, M. Rondina, D. Renier, F. Bettella, G. Esposito, L. Quintieri, L. Meléndez-Alafort, U. Mazzi, P. Zanovello, A. Rosato, A Paclitaxel-Hyaluronan Bioconjugate Targeting Ovarian Cancer Affords a Potent In vivo Therapeutic Activity, *Biomaterials* 123 (2017) 155-171.
 157. H. Kim, H. Jeong, S. Han, S. Beack, B.W. Hwang, M. Shin, S.S. Oh, S.K. Hahn, Hyaluronate and its derivatives for customized biomedical applications, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 3598-3606.
 158. P. Maudens, S. Meyer, C.A. Seemayer, O. Jordan, E. Alléman, Self-assembled thermoresponsive nanostructures of hyaluronic acid conjugates for osteoarthritis therapy, *Nanoscale* 10 (2018) 1845-1854.
 159. R. Stern, G. Kogan, M.J. Jedrzejas, L. Šoltés, The many ways to cleave hyaluronan, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 537-557.
 160. W.-F. Cheung, T.F. Cruz, E.A. Turley, Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors, *Biochem. Soc. Trans.* 27 (1999) 135-141.

161. C. E. Schanté, G. Zuber, C. Herlin, T.F. Vandamme, Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 25 (2007) 537–557.
162. P. Bulpitt, D. Aeschlimann, New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels, *J. Biomed. Mater. Res.* 47 (1999) 152–169.
163. G. Tripodo, A. Trapani, M.L. Torre, G. Giammona, G. Trapani, D. Mandracchia, Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97 (2015) 400–416.
164. C. Chen, S. Zhao, A. Karnad, J.W. Freeman, The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications, *J. Hematol. Oncol.* 11 (2018) 64.
165. Y. Luo, G.D. Prestwich, Synthesis and Selective Cytotoxicity of a Hyaluronic Acid–Antitumor Bioconjugate, *Bioconjugate Chem.* 10 (1999) 755-763.
166. S. Bowman, M.E. Awad, M.W. Hamrick, M. Hunter, S. Fulzele, Recent advances in hyaluronic acid based therapy for osteoarthritis, *Clin. Transl. Med.* 10 (1999) 755-763.
167. R. Lubart, I. Yariv, D. Fixler, A. Lipovsky, Topical Hyaluronic Acid Facial Cream with New Micronized Molecule Technology Effectively Penetrates and Improves Facial Skin Quality: Results from *In-vitro*, *Ex-vivo*, and *In-vivo* (Open-label) Studies, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 12 (2019) 39-44.
168. N. El Kechai, S. Geiger, A. Fallacara, I.C. Infante, V. Nicolas, E. Ferrary, N. Huang, A. Bochot, F. Agnely, Mixtures of hyaluronic acid and liposomes for drug delivery: Phase behavior, microstructure and mobility of liposomes, *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* 523 (2017) 246-259.
169. X. Z. Shu, Y. Liu, Y. Luo, M.C. Roberts, G.D. Prestwich, Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels, *Biomacromolecules* 3 (2002) 1304-1311.
170. S.S. Pedrosa, C. Gonçalves, L. David, M. Gama, A Novel Crosslinked Hyaluronic Acid Nanogel for Drug Delivery, *Macromol. Biosci.* 14 (2014) 1556-1568.
171. K. Park, J.-A. Yang, M.-Y. Lee, H. Lee, S.K. Hahn, Reducible Hyaluronic Acid-siRNA Conjugate for Target Specific Gene Silencing, *Bioconjugate Chem.* 24 (2013) 1201-1209.
172. L.B. Dahl, T.C. Laurent, B. Smedsrød, Preparation of Biologically Intact Radiolabeled Hyaluronan of High Specific Radioactivity: Coupling of ¹²⁵I-Tyramine-Cellobiose to Amino Groups after Partial N-Deacetylation, *Anal. Biochem.* 175 (1988) 397-407.

173. R. Montgomery, S. Nag, Periodate oxidation of hyaluronic acid, *Biochim. Biophys. Acta* 137 (2019) 853-869.
174. S. Khunmanee, Y. Jeong, H. Park, Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications, *J. Tissue Eng.* 8 (2017) 1-16.
175. P. Šedová, R. Buffa, S. Kettou, G. Huerta-Angeles, M. Hermannová, V. Leierová, D. Šmejkalová, M. Moravcová, V. Velebný, Preparation of hyaluronan polyaldehyde—a precursor of biopolymer conjugates, *Carbohydr. Res.* 371 (2013) 8-15.
176. D. Aeschlimann, P. Bulpitt, Functionalized Derivatives of Hyaluronic Acid, Formation of Hydrogels in Situ Using Same, And Methods for Making and Using Same, United States Patent US 6,630,457 [7,196,180] (2007, March 27).
177. W.Y. Su, Y.C. Chen, F.H. Lin, Injectable oxidized hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide hydrogel for nucleus pulposus regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 3044-3055.
178. E. Valeur, M. Bradley, Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 606-631.
179. M. D'Este, M. Alini, D. Eglin, Single step synthesis and characterization of thermoresponsive hyaluronan hydrogels, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1378–1385.
180. J.W. Kuo, D.A. Swarm, G.D. Prestwich, Chemical Modification of Hyaluronic Acid by Carbodiimides, *Bioconjug. Chem.* 2 (1991) 232–241.
181. E.J. Oh, J.S. Choi, H. Kim, C.K. Joo, S.K. Hahn, Anti-Flt1 peptide–Hyaluronic conjugate for the treatment of retinal neovascularization and diabetic retinopathy, *Biomaterials* 32 (2011) 3115–3123.
182. A. Rosato, A. Banzato, G. De Luca, D. Renier, F. Bettella, C. Pagano, G. Esposito, P. Zanovello, P. Bassi, HYTAD1-p20: A new paclitaxel-hyaluronic acid hydro-soluble bioconjugate for treatment of superficial bladder cancer, *Urol. Oncol. : Semin. Orig. Invest.* 24 (2006) 207–215.
183. I. Sall, G. Féraud, Comparison of the sensitivity of 11 crosslinked hyaluronic acid gels to bovine testis hyaluronidase, *Polym. Degrad. Stab.* 92 (2007) 915–919.
184. C. Aulin, K. Bergman, M. Jensen-Waern, P. Hedenqvist, J. Hilborn, T. Engstrand, In situ cross-linkable hyaluronan hydrogel enhances chondrogenesis, *J. Tissue Eng. Regener. Med.* 5 (2011) e188–e196.
185. I. Serrano-Sevilla, A. Artiga, S.G. Mitchell, L. De Matteis, J.M. de la Fuente, Natural Polysaccharides for siRNA Delivery: Nanocarriers Based on Chitosan, Hyaluronic Acid, and

- Their Derivatives, *Molecules* 24 (2019) 2570.
186. S. Taetz, A. Bochot, C. Surace, S. Arpicco, J.M. Renoir, U.F. Schaefer, V. Marsaud, S. Kerdine-Roemer, C.M. Lehr, E. Fattal, Hyaluronic Acid-Modified DOTAP/DOPE Liposomes for the Targeted Delivery of Anti-Telomerase siRNA to CD44-Expressing Lung Cancer Cells, *Oligonucleotides* 19 (2009) 103-115.
187. E. Lallana, J.M. Rios de la Rosa, A. Tirella, M. Pelliccia, A. Gennari, I.J. Stratford, S. Puri, M. Ashford, N. Tirelli, Chitosan/Hyaluronic Acid Nanoparticles: Rational Design Revisited for RNA Delivery, *Mol. Pharmaceutics* 14 (2017) 2422-2436.
188. R. Hoogenboom, H. Schlaad, Thermoresponsive poly(2-oxazoline)s, polypeptoids, and polypeptides, *Polym. Chem.* 8 (2017) 24-40.
189. D.J. Phillips, M.I. Gibson, Towards being genuinely smart: 'isothermally-responsive' polymers as versatile, programmable scaffolds for biologically-adaptable materials, *Polym. Chem.* 6 (2015) 1033-1043.
190. Q. Zhang, C. Weber, U.S. Schubert, R. Hoogenboom, Thermoresponsive polymers with lower critical solution temperature: from fundamental aspects and measuring techniques to recommended turbidimetry conditions, *Mater. Horiz.* 4 (2017) 109-116.
191. K.M. Ruff, S. Roberts, A. Chilkoti, R.V. Pappu, Advances in Understanding Stimulus-Responsive Phase Behavior of Intrinsically Disordered Protein Polymers, *J. Mol. Biol.* 430 (2018) 4619-4635.
192. H.G. Schild, D.A. Tirrell, Microcalorimetric Detection of Lower Critical Solution Temperature in Aqueous Polymer Solutions, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 4352-4356.
193. J. Armstrong, B. Chowdhry, R. O'Brien, A. Beezer, J. Mitchell, S. Leharne, Scanning Microcalorimetric Investigations of Phase Transitions in Dilute Aqueous Solutions of Poly(oxypropylene), *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 4590-4598.
194. M. Vadrone, G. Amidon, S. Lindenbaum, J.L. Haslam, Thermodynamic studies on the gel-sol transition of some pluronic polyols, *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* 22 (1984) 207-218.
195. J. Liu, N. Wang, L.J. Yu, A. Karton, W. Li, W. Zhang, F. Guo, L. Hou, Q. Cheng, L. Jiang, D.A. Weitz, Y. Zhao, Bioinspired graphene membrane with temperature tunable channels for water gating and molecular separation, *Nat. Commun.* 8 (2017) 2011.
196. N.M. Mitchard, A.E. Beezer, J.C. Mitchell, J.K. Armstrong, B.Z. Chowdhry, S. Leharne, G. Buckston, Thermodynamic Analysis of Scanning Calorimetric Transitions Observed for

- Dilute Aqueous Solutions of ABA Block Copolymers, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 9507-9512.
197. S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive Artificial Extracellular Matrix for Tissue Engineering: Hyaluronic Acid Bioconjugated with Poly(*N*-isopropylacrylamide) Grafts, *Biomacromolecules* 2 (2001) 856-863.
198. W.M. Argüelles-Monal, J. Lizardi-Mendoza, D. Fernández-Quiroz, M.T. Recillas-Mota, M. Montiel-Herrera, Chitosan Derivatives: Introducing New Functionalities with a Controlled Molecular Architecture for Innovative Materials, *Polymers* 10 (2018) 342.
199. H. Vihola, A. Laukkanen, L. Valtola, H. Tenhu, J. Hirvonen, Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(*N*-isopropylacrylamide), poly(*N*-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(*N*-vinylcaprolactam), *Biomaterials* 26 (2005) 3055-3064.
200. L. Jun, W. Bochu, W. Yazhou, Thermo-sensitive Polymers for Controlled-release Drug Delivery Systems, *Int. J. Pharmacol.* 2 (2006) 513-519.
201. J. Ramos, A. Imaz, J. Forcada, Temperature-sensitive nanogels: poly(*N*-vinylcaprolactam) versus poly(*N*-isopropylacrylamide), *Polym. Chem.* 3 (2012) 852-856.
202. J. Jing, D. Alaimo, E. De Vlieghe, C. Jérôme, O. De Wever, B.G. De Geest, R. Auzély-Velty, Tunable self-assembled nanogels composed of well-defined thermoresponsive hyaluronic acid-polymer conjugates, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 3883-3887.
203. Y. Lee, H.J. Chung, S. Yeo, C.H. Ahn, H. Lee, P.B. Messersmith, T.G. Park, Thermo-sensitive, injectable, and tissue adhesive sol-gel transition hyaluronic acid/pluronic composite hydrogels prepared from bio-inspired catechol-thiol reaction, *Soft Matter* 6 (2010) 977-983.
204. R. Hoogenboom, M.W.M. Fijten, U.S. Schubert, Parallel Kinetic Investigation of 2-Oxazoline Polymerizations with Different Initiators as Basis for Designed Copolymer Synthesis, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 42 (2004) 1830-1840.
205. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J. J. Robin, How to Modulate the Chemical Structure of Polyoxazolines by Appropriate Functionalization, *Macromol. Rapid Commun.* 33 (2012) 1600-1612.
206. D.A. Tomalia, D.P. Sheetz, Homopolymerization of 2-alkyl- and 2-aryl-2-oxazolines, *J. Polym. Sci., Part A-1: Polym. Chem.* 4 (1966) 2253-2265.
207. W. Seeliger, E. Aufderhaar, W. Diepers, R. Feinauer, R. Nehring, W. Their, H. Hellmann, Recent syntheses and reactions of cyclic imidic esters, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 5 (1966) 875-888.

208. T. Kagiya, S. Narisawa, T. Maeda, K. Fukui, Ring-opening polymerization of 2-substituted 2-oxazolines, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Lett.* 4 (1966) 441-445.
209. O. Sedlacek, B.D. Monnery, S.K. Filippov, R. Hoogenboom, M. Hruby, Poly(2-Oxazoline)s – Are They More Advantageous for Biomedical Applications Than Other Polymers, *Macromol. Rapid Commun.* 33 (2012) 1648-1662.
210. J.S. Park, Y. Akiyama, F.M. Winnik, K. Kataoka, Versatile Synthesis of End-Functionalized Thermosensitive Poly(2-isopropyl-2-oxazolines), *Macromolecules* 37 (2004) 6786-6792.
211. V.V. Jerca, K. Lava, B. Verbraeken, R. Hoogenboom, Poly(2-cycloalkyl-2-oxazoline)s: high melting temperature polymers solely based on Debye and Keesom van der Waals interactions, *Polym. Chem.* 7 (2016) 1309-1322.
212. J.S. Park, K. Kataoka, Precise Control of Lower Critical Solution Temperature of Thermosensitive Poly(2-isopropyl-2-oxazoline) via Gradient Copolymerization with 2-Ethyl-2-oxazoline as a Hydrophilic Comonomer, *Macromolecules* 39 (2006) 6622-6630.
213. J.S. Park, K. Kataoka, Comprehensive and Accurate Control of Thermosensitivity of Poly(2-alkyl-2-oxazoline)s via Well-Defined Gradient or Random Copolymerization, *Macromolecules* 40 (2007) 3599-3609.
214. F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, M.A.M. Leenen, M.A.R. Meier, U.S. Schubert, Investigation of the Living Cationic Ring-Opening Polymerization of 2-Methyl-, 2-Ethyl-, 2-Nonyl-, and 2-Phenyl-2-oxazoline in a Single-Mode Microwave Reactor, *Macromolecules* 38 (2005) 5025-5034.
215. J.S. Hrkach, K. Matyjaszewski, Reaction of 2-Methyl-2-oxazoline with Trimethylsilyl Initiators. An Unusual Mode of Ring Opening, *Macromolecules* 25 (1992) 2070-2075.
216. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.J. Robin, Novel Investigations on Kinetics and Polymerization Mechanism of Oxazolines Initiated by Iodine, *Macromolecules* 43 (2010) 5964-5970.
217. A. El Asmar, O. Gimello, G. Morandi, D. Le Cerf, V. Lapinte, F. Burel, Tuning the Thermo-Sensitivity of Micellar Systems through a Blending Approach, *Macromolecules* 42 (2016) 4307-4315.
218. F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, C.H. Abeln, U.S. Schubert, Single-Mode Microwave Ovens as New Reaction Devices: Accelerating the Living Polymerization of 2-Ethyl-2-Oxazoline, *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004) 1895-1899.
219. M. Szwarc, M. Levy, R. Milkovich, Polymerization Initiated by Electron Transfer to

- Monomer. A New Method of Formation of Block Polymers, *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 2656-2657.
220. B.D. Monnery, S. Shaunak, M. Thanou, J.H.G. Steinke, Improved Synthesis of Linear Poly(ethylenimine) via Low-Temperature Polymerization of 2-Isopropyl-2-oxazoline in Chlorobenzene, *Macromolecules* 48 (2015) 3197-3206.
221. B.D. Monnery, V.V. Jerca, O. Sedlacek, B. Verbraeken, R. Cavill, R. Hoogenboom, Defined High Molar Mass Poly(2-Oxazoline)s, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57 (2018) 15400-15404.
222. O. Sedlacek, B.D. Monnery, R. Hoogenboom, Synthesis of defined high molar mass poly(2-methyl-2-oxazoline), *Polym. Chem.* 10 (2019) 1286-1290.
223. S. Huber, R. Jordan, Modulation of the lower critical solution temperature of 2-Alkyl-2-oxazoline copolymers, *Colloid Polym. Sci.* 286 (2008) 395-402.
224. R. Hoogenboom, H.M.L. Thijs, M.J.H.C. Jochems, B.M. van Lankvelt, M.W.M. Fijten, U.S. Schubert, Tuning the LCST of poly(2-oxazoline)s by varying composition and molecular weight: alternatives to poly(*N*-isopropylacrylamide)?, *Chem. Commun.* (2008) 5758-5760.
225. Y. Katsumoto, A. Tsuchiizu, X. Qiu, F.M. Winnik, Dissecting the Mechanism of the Heat-Induced Phase Separation and Crystallization of Poly(2-isopropyl-2-oxazoline) in Water through Vibrational Spectroscopy and Molecular Orbital Calculations, *Macromolecules* 45 (2012) 3531-3541.
226. T.G. Bassiri, A. Levy, M. Litt, Polymerization of Cyclic Imino Ethers. I. Oxazolines, *Polym. Lett.* 5 (1967) 871-879.
227. E.F.-J. Rettler, J.M. Kranenburg, H.M.L. Lambermont-Thijs, R. Hoogenboom, U.S. Schubert, Thermal, Mechanical, and Surface Properties of Poly(2-*N*-alkyl-2-oxazoline)s, *Macromol. Chem. Phys.* 211 (2010) 2443-2448.
228. P.T. Güner, A. Miko, F.F. Schweinberger, A.L. Demirel, Self-assembled poly(2-ethyl-2-oxazoline) fibers in aqueous solutions, *Polym. Chem.* 3 (2012) 322-324.
229. K. Kempe, E.F.-J. Rettler, R.M. Paulus, A. Kuse, R. Hoogenboom, A systematic investigation of the effect of side chain branching on the glass transition temperature and mechanical properties of aliphatic (co-)poly(2-oxazoline)s, *Polymer* 54 (2013) 2036-2042.
230. L. Hespel, G. Morandi, M. Grosse, L. Lecamp, L. Picton, F. Burel, Synthesis of lipid-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) and successive study of pH- and thermo-sensitive mixed micelles by combination with lipid-*b*-poly(acrylic acid), *Polym. Chem.* 5 (2014) 4009-4015.

231. L. Simon, M. Vincent, S. Le Saux, V. Lapinte, N. Marcotte, M. Morille, C. Dorandeu, J.M. Devoisselle, S. Bégu, Polyoxazolines based mixed micelles as PEG free formulations for an effective quercetin antioxidant topical delivery, *Polym. Chem.* 5 (2014) 4009-4015.
232. A. Gontier, F. Renou, O. Colombani, F. Burel, G. Morandi, Hybridization of Poly(oxazoline) and Poly(ethylene oxide)-Based Amphiphilic Copolymers into Thermosensitive Mixed Micelles of Tunable Cloud Point, *Langmuir* 5 (2021).
233. L. Simon, V. Lapinte, L. Lionnard, N. Marcotte, A. Aouacheria, K. Kissa, J.M. Devoisselle, S. Bégu, Polyoxazolines based lipid nanocapsules for topical delivery of antioxidants, *Int. J. Pharm. (Amsterdam, Neth.)* 579 (2020) 119126.
234. M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, M.J. Vicent, Overcoming the PEG-addiction: well-defined alternatives to PEG, from structure-property relationships to better defined therapeutics, *Polym. Chem.* 2 (2011) 1900-1918.
235. M. Bauer, C. Lautenschlaeger, K. Kempe, L. Tauhardt, U.S. Schubert, D. Fischer, Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as Alternative for the Stealth Polymer Poly(ethylene glycol): Comparison of in vitro Cytotoxicity and Hemocompatibility, *Macromol. Biosci.* 12 (2012) 986-998.
236. T. Lorson, M. Lübtow, E. Wegener, M. S. Haider, S. Borova, D. Nahm, R. Jordan, M. Sokolski-Papkov, A. V. Kabanov, R. Luxenhofer, Poly(2-oxazoline)s based biomaterials: A comprehensive and critical update, *Biomaterials.* 178 (2018) 204-280.
237. R.W. Moreadith, T.X. Viegas, M.D. Bentley, J.M. Harris, Z. Fang, K. Yoon, B. Dizman, R. Weimar, B.P. Rae, X. Li, C. Rader, D. Standaert, W. Olanow, Clinical development of a poly(2-oxazoline) (POZ) polymer therapeutic for the treatment of Parkinson's disease – Proof of concept of POZ as a versatile polymer platform for drug development in multiple therapeutic indications, *Eur. Polym. J.* 88 (2017) 524-552.
238. K. Aoi, A. Takasu, M. Okada, Synthesis of novel chitin derivatives having poly(2-alkyl-2-oxazoline) side chains, *Macromol. Chem. Phys.* 195 (1994) 3835-3844.
239. K. Aoi, A. Takasu, M. Okada, T. Imae, Synthesis and assembly of novel chitin derivatives having amphiphilic polyoxazoline block copolymer as a side chain, *Macromol. Chem. Phys.* 200 (1999) 1112-1120.
240. A. Pospisilova, S. K. Filippov, A. Bogomolova, S. Tumer, O. Sedlacek, N. Matsushkin, Z. Cernochova, P. Štěpánek, M. Hruby, Glycogen-*graft*-poly(2-alkyl-2-oxazolines) – the new versatile biopolymer-based thermoresponsive macromolecular toolbox, *RSC Adv.* 4

- (2014) 61580-61588.
241. L. Loukotková, J. Kucka, M. Rabyk, A. Höcherl, K. Venclikova, O. Janouskova, P. Paral, V. Kolarova, T. Heizer, L. Sefc, P. Štěpánek, M. Hrubý, Thermoresponsive β -glucan-based polymers for bimodal immunoradiotherapy – Are they able to promote the immune system? *J. Controlled Release*, 268 (2017) 78-91.
 242. L. Loukotová, R. Konefał, K. Venclíková, D. Machová, O. Janoušková, M. Rabyk, M. Netopilík, E. Mázl Chánová, P. Štěpánek, M. Hrubý, Hybrid thermoresponsive graft constructs of fungal polysaccharide β -glucan: Physico-chemical and immunomodulatory properties, *Eur. Polym. J.* 106 (2018) 118-127.
 243. L. Loukotová, A. Bogomolova, R. Konefal, M. Špírková, P. Štěpánek, M. Hrubý, Hybrid κ -carrageenan-based polymers showing “schizophrenic” lower and upper critical solution temperatures and potassium responsiveness, *Carbohydr. Polym.* 210 (2019) 26-37.
 244. R. Beninatto, C. Barbera, O. De Lucchi, G. Borsato, E. Serena, C. Guarise, M. Pavan, C. Luni, S. Martewicz, D. Galesso, N. Elvassore, Photocrosslinked hydrogels from coumarin derivatives of hyaluronic acid for tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng., C* 96 (2019) 625-634.
 245. Z. Hou, W.M. Nau, R. Hoogenboom, Reversible covalent locking of a supramolecular hydrogel *via* UV-controlled anthracene dimerization, *Polym. Chem.* 12 (2021) 307–315.
 246. K. Yang, M. Zeng, Multiresponsive hydrogel based on polyacrylamide functionalized with thymine derivatives, *New J. Chem.* 37 (2013) 920-926.
 247. M.A. Azagarsamy, D.D. McKinnon, D.L. Alge, K.S. Anseth, Coumarin-Based Photodegradable Hydrogel: Design, Synthesis, Gelation, and Degradation Kinetics, *ACS Macro Lett.* 3 (2014) 515-519.
 248. Y. Zhao, Light-Responsive Block Copolymer Micelles, *Macromolecules* 45 (2012) 3647-3657.
 249. Y. Zhao, Photocontrollable block copolymer micelles: what can we control?, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 4887-4895.
 250. T.F. Stefanello, B. Couturaud, A. Szarpak-Jankowska, D. Fournier, B. Louage, F.P. Garcia, C.V. Nakamura, B.G. De Geest, P. Woisel, B. van der Sanden, R. Auzély-Velty, Coumarin-containing thermoresponsive hyaluronic acid-based nanogels as delivery systems for anticancer chemotherapy, *Nanoscale* 9 (2017) 12150-12162.
 251. J.A. Delaire, K. Nakatani, Linear and Nonlinear Optical Properties of Photochromic

- Molecules and Materials, Chem. Rev. 100 (2000) 1817-1845.
252. H. Bouas-Laurent, H. Dürr, Organic Photochromism (IUPAC Technical Report), Pure Appl. Chem. 73 (2001) 639-665.
253. Y. Yu, T. Ikeda, Alignment modulation of azobenzene-containing liquid crystal systems by photochemical reactions, J. Photochem. Photobiol., C 5 (2004) 247-265.
254. M.M. Oliveira, C. Moustrou, L.M. Carvalho, J.A.C. Silva, A. Samat, R. Guglielmetti, R. Dubest, J. Aubard, A.M.F. Oliveira-Campos, Synthesis and photochromic behaviour under flash photolysis and continuous irradiation of novel 2*H*-chromenes derived from hydroxydibenzothiophenes, Tetrahedron 58 (2002) 1709-1718.
255. J.C. Crano, T. Flood, D. Knowles, A. Kumar, B. Van Gemert, Photochromic compounds: Chemistry and application in ophthalmic lenses, Pure Appl. Chem. 68 (1996) 1395-1398.
256. T. Fukaminato, S. Kobatake, T. Kawai, M. Irie, Three-dimensional erasable optical memory using a photochromic diarylethene single crystal as the recording medium, Proc. Japan Acad. Ser. B 77 (2001) 30-35.
257. C.C. Corredor, Z.L. Huang, K.D. Belfield, A.R. Morales, M.V. Bondar, Photochromic Polymer Composites for Two-Photon 3D Optical Data Storage, Chem. Mater. 19 (2007) 5165-5173.
258. M. Irie, Diarylethenes for Memories and Switches, Chem. Rev. 10 (2000) 1685-1716.
259. H.M.D. Bandara, S.C. Burdette, Photoisomerization in different classes of azobenzene, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 1809-1825.
260. A. Miniewicz, H. Orlikowska, A. Sobolewska, S. bartkiewicz, Kinetics of thermal *cis-trans* isomerization in a phototropic azobenzene-based single-component liquid crystal in its nematic and isotropic phases, Phys. Chem. Chem. Phys. 20 (2018) 2904-2913.
261. F. Serra, E.M. Terentjev, Effects of Solvent Viscosity and Polarity on the Isomerization of Azobenzene, Macromolecules 41 (2008) 981-986.
262. F. Cicogna, I. Domenichelli, S. Coiai, F. Bellina, M. Lessi, R. Spiniello, E. Passaglia, Structural, thermal and photo-physical data of azo-aromatic TEMPO derivatives before and after their grafting to polyolefins, Data in Brief 6 (2016) 562-570.
263. J.H. Kim, E. Koo, S.Y. Ju, W.D. Jang, Multimodal Stimuli-Responsive Poly(2-isopropyl-2-oxazoline) with Dual Molecular Logic Gate Operations, Macromolecules 48 (2015) 4951-4956.
264. H.-K. Shin, J.-M. Kim, Y.-S. Kwon, E. Park, C. Kim, Optical behavior and surface morphology

- of the azobenzene functionalized dendrimer in Langmuir and Langmuir-Blodgett monolayers, *Opt. Mater. (Amsterdam, Neth.)* 21 (2002) 389-394.
265. W.-S. Lee, A. Ueno, Photocontrol of the Catalytic Activity of a β -Cyclodextrin Bearing Azobenzene and Histidine Moieties as a Pendant Group, *Macromol. Rapid Commun.* 22 (2001) 448-450.
266. P. Zheng, X. Hu, X. Zhao, L. Li, K.C. Tam, L.H. Gan, Photoregulated Sol-Gel Transition of Novel Azobenzene-Functionalized Hydroxypropyl Methylcellulose and Its α -Cyclodextrin Complexes, *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004) 678-682.
267. L. Li, J. Johannes, M. Scheiger, P.A. Levkin, Design and Applications of Photoresponsive Hydrogels, *Adv. Mater.* 31 (2019) 1807333.
268. I. Tomatsu, A. Hashidzune, A. Harada, Contrast Viscosity Changes upon Photoirradiation for Mixtures of Poly(acrylic acid)-Based α -Cyclodextrin and Azobenzene Polymers, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2226-2227.
269. L. Chen, X. Zhao, Y. Lin, Z. Su, Q. Wang, Dual stimuli-responsive supramolecular hydrogel of bionanoparticles and hyaluronan, *Polym. Chem.* 5 (2014) 6754-6760.
270. A.M. Sanchez, R.H. de Rossi, Effect of β -Cyclodextrin on the Thermal Cis-Trans Isomerization of Azobenzenes, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 3446-3451.

Chapitre B : Matériels et méthodes

Sommaire

1	Liste des produits chimiques employés	101
2	Méthodes de caractérisation chimique	102
2.1	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	102
2.2	Spectroscopies d'absorption de la lumière	108
2.2.1	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	109
2.2.2	Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-vis)	112
2.2.2.1	Principe.....	112
2.2.2.2	Mesure de points troubles	114
2.2.2.3	Cinétique de l'absorbance d'un dérivé d'azobenzène soluble en milieu acide.....	114
3	Méthodes de caractérisation physico-chimique	115
3.1	Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée MALLS.....	115
3.2	Viscosimétrie à faible cisaillement	121
3.3	Rhéologie	122
3.4	Diffusion dynamique de la lumière (DDL).....	124
4	Caractérisation des composés employés	127
4.1	L'acide hyaluronique.....	127
4.1.1	Propriétés physico-chimiques	127
4.1.2	Conversion en sel de tétrabutylammonium.....	130
4.1.2.1	Contexte	130
4.1.2.2	Réaction.....	130
4.2	La Jeffamine® M2005.....	133
4.3	Les polyoxazolines	136
4.4	Les azobenzènes	146
4.4.1	Modification chimique	146
4.4.2	Caractérisation.....	150
5	Références	156

1 Liste des produits chimiques employés

Quatre acides hyaluroniques de masses molaires différentes ont été utilisés : l'un provenait de Sigma-aldrich (France), le HA_{1200k} (M_n : 1200 kg.mol⁻¹) et les trois autres ont été gracieusement offerts par la société Givaudan France SAS (Pomacle, France), le HA_{990k} (990 kg.mol⁻¹), le HA_{140k} (140 kg.mol⁻¹) et le HA_{38k} (38 kg.mol⁻¹). Ceci nous a permis d'étudier l'impact de la longueur de la chaîne principale lors de la formation d'hydrogels. La Jeffamine® M2005 a quant à elle été gentiment offerte par Huntsman Holland BV (Botlek Rotterdam, Pays-Bas). Les échantillons HA_{1200k} et HA_{990k} ont des propriétés très proches comme nous le verrons par la suite (section 4.1.1). Le 2-méthyl-2-oxazoline (MeOx), le 2-*n*-isopropyl-2-oxazoline (*i*PrOx), le 2-*n*-butyl-2-oxazoline (*n*BuOx), le 2-*n*-propyl-2-oxazoline (*n*PrOx), le *p*-toluènesulfonate de méthyle, le diméthylsulfoxyde (DMSO) (anhydre), l'acétonitrile (anhydre), le *n*-butanol, le chloroforme (dénaturé avec de l'éthanol), le chlorure de sodium, le 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), le *N*-hydroxysuccinimide (NHS), l'hydroxyde de tétrabutylammonium (54,0-56,0 % dans l'eau) (TBAOH), les tablettes de tampon phosphate salin (PBS) (pour obtenir des solutions de pH 7,4 de concentrations 0,137 M en NaCl, 0,0027 M en KCl et 0,01 M en phosphate, soit 0,15 M en sels), le phosphate de sodium monobasique monohydraté (NaH₂PO₄.H₂O), le chlorure de 4-(Phénylazo)benzoyle, l'éthylène diamine, l'oxyde de deutérium (D₂O), la solution de deutéroxyde de sodium (30 % en masse dans le D₂O) (NaOD), le chloroforme deutéré (CDCl₃) et l'acétone-d₆ ont été acquis auprès de Sigma-Aldrich. L'acide chlorhydrique à 36,5 %, les pastilles de soude, la résine amberlite échangeuse d'ions (IRN77, type cationique, H⁺), le carbonate de sodium, l'acétone, le N,N-Diméthylformamide anhydre (DMF) et l'éthanol absolu (96 %) ont été obtenus auprès de VWR. L'anhydride propylphosphonique (T3P®, 50 % en masse dans le DMF) et le nitrate de lithium ont été obtenus chez ACROS Organics™. La triéthylamine (TEA) a été achetée chez Fluka et l'hydrogénophosphate de sodium dihydraté (Na₂HPO₄.2H₂O) a été acquis chez Merck. L'eau a été purifiée avec le système de purification Milli-Q®.

2 Méthodes de caractérisation chimique

2.1 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique (RMN) est une méthode d'analyse basée sur le moment magnétique de spin des atomes^{1,2}. En effet, les noyaux des atomes sont dotés d'un spin qui va s'orienter s'il est placé au sein d'un champ magnétique.

Selon leur composition nucléaire, à savoir le nombre de nucléons (protons et neutrons) qu'ils contiennent, les atomes n'auront pas la même réponse au sein du champ magnétique. En effet, les protons et les neutrons possèdent eux-mêmes un spin. Le nombre quantique de spin global (I) de l'atome dépend donc de sa composition nucléaire selon trois cas. Si le nombre de masse A d'un atome (nombre de nucléons) est impair, I est un demi-entier (ex : $1/2$ pour l'hydrogène ^1H et le carbone ^{13}C , ou $5/2$ pour l'oxygène ^{17}O). Dans le cas où A est pair, il y a deux possibilités selon le numéro atomique Z (ou nombre de charge, correspondant au nombre de protons) de l'atome : s'il est impair, I est un entier (ex : 1 pour l'azote ^{14}N), par contre, dans le cas où il serait pair, I est nul, l'atome ne dispose donc pas de moment de spin et n'est ainsi pas aimanté. Il ne pourra donc pas interagir avec un champ magnétique et n'est donc pas analysable par RMN. C'est notamment le cas du carbone ^{12}C et de l'oxygène ^{16}O . Il reste possible de les analyser en utilisant leurs isotopes ^{13}C et ^{17}O , cependant, leur abondance naturelle très réduite ($1,1\%$ pour le ^{13}C et $0,037\%$ pour le ^{17}O) diminue nettement la sensibilité de la technique pour ces deux éléments.

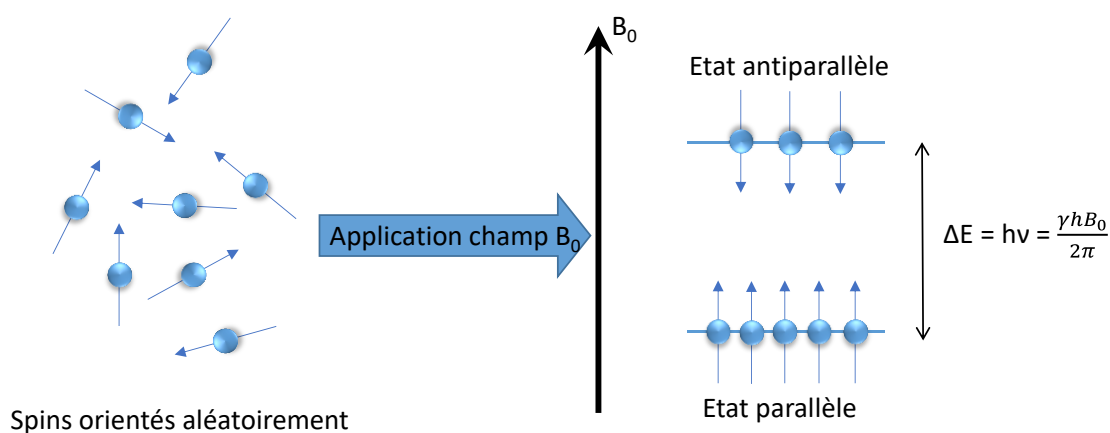


Figure B-1 Orientation des spins au sein d'un champ permanent B_0 .

Les éléments couramment étudiés en RMN sont l'hydrogène ^1H (également nommé proton du fait de la structure de son noyau), le carbone ^{13}C , le fluor ^{19}F et le phosphore ^{31}P . Tous ont un nombre de spin de $1/2$, qui va correspondre avec la présence de deux possibilités d'orientation de leur spin par rapport à un champ magnétique permanent, parallèlement ou antiparallèlement (effet Zeeman). A chacune des deux orientations est associé un niveau d'énergie, l'orientation parallèle étant celle de plus basse énergie et donc la plus stable (Figure B-1). L'écart d'énergie entre les deux niveaux dépendra du champ appliqué et sera associé à une fréquence de résonance ν_0 , spécifique à chaque isotope, telle que :

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (\text{B1})$$

Où B_0 est l'intensité du champ magnétique en T et γ le rapport gyromagnétique en C.kg^{-1} . Dans le cas du ^1H , cette fréquence vaut 100 MHz pour un champ de 2,35 T. Les appareillages RMN sont d'ailleurs désignés par la valeur fréquence de la précession du ^1H plutôt que par celle de leur champ. Les modèles les plus courants affichent des fréquences de 300 MHz ou 400 MHz. Si une perturbation est appliquée sur l'atome, écartant son spin de sa position d'équilibre, ce dernier va se mettre à tourner autour de l'axe représenté par le champ à la manière d'une toupie avec une fréquence de rotation égale à celle de résonance ν_0 : c'est le phénomène de la précession de Larmor (Figure B-2).

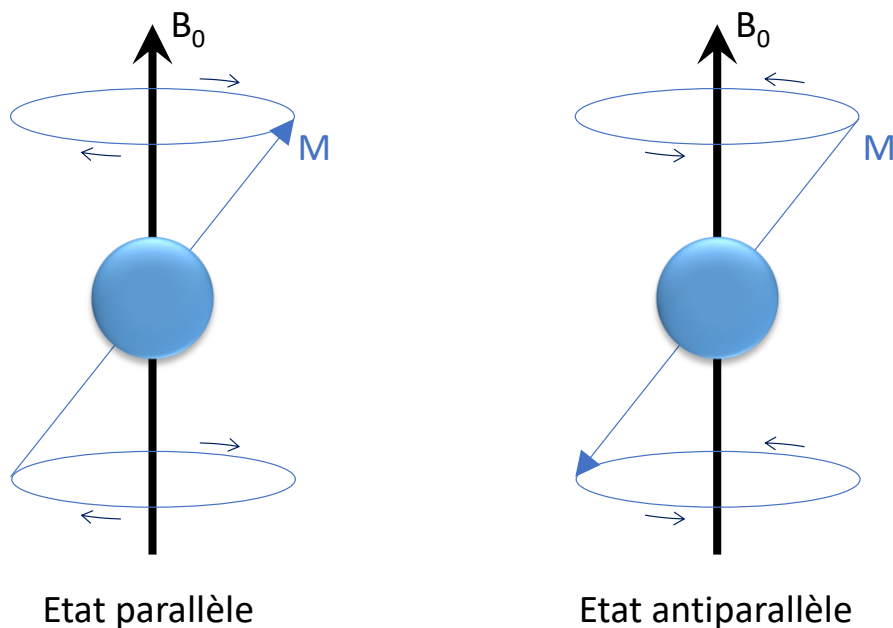


Figure B-2 Représentation du phénomène de la précession de Larmor.

L'intérêt de la spectroscopie RMN réside dans le fait que cette fréquence de résonance variera légèrement selon l'environnement électronique de l'atome qui est notamment très influencé par les liaisons covalentes avoisinantes, résultant de la mise en commun d'un doublet d'électrons entre deux atomes. L'environnement électronique de l'atome va en effet induire un écrantage local du champ B_0 , ce qui va se traduire dans l'expression de ν_0 de la façon suivante :

$$\nu_0 = \frac{\gamma(1-\sigma)B_0}{2\pi} \quad (\text{B2})$$

Où σ est la constante d'écran. Afin de s'affranchir de la valeur de ν_0 qui varie selon B_0 , une autre grandeur, le déplacement chimique δ , a été définie comme suit :

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{réf}}}{\nu_0} 10^6 \quad (\text{B3})$$

Où ν est la fréquence de précession de l'atome étudié, $\nu_{\text{réf}}$ celle d'un même atome dans un environnement électronique de référence et ν_0 celle de l'atome où le champ n'aurait pas été altéré. δ s'exprime en ppm du fait du facteur 10^6 appliqué au sein de la formule (B3), qui sert à obtenir des valeurs modérées. δ ne dépend ainsi pas du champ du spectromètre employé. Par contre, il faut garder à l'esprit que plus le champ appliqué sera fort, plus l'écart entre les fréquences des atomes sera important, ce qui améliorera la résolution du spectre quand bien même les valeurs de déplacement chimique affichées ne sont pas modifiées. Ainsi, selon le groupe chimique où ils se situent, les atomes auront des déplacements chimiques différents.

Les spins des atomes qui sont reliés par une ou plusieurs liaisons covalentes vont également interagir entre eux par le biais d'interaction indirecte faisant intervenir l'orientation de leurs spins par rapport à ceux des électrons impliqués dans les liaisons. Dans le cas des spins 1/2, ce phénomène va se traduire par l'apparition de deux états énergétiques, associés à une fréquence de couplage J . Selon l'état dans lequel se trouvent les deux atomes, leur fréquence de résonance respective sera décalée de plus ou moins $J/2$, ce qui va se traduire par un dédoublement des deux pics sur le spectre RMN correspondant (Figure B-3). Dans le cas où le spin 1/2 d'un atome interagirait avec plusieurs atomes de spin 1/2, on verrait apparaître un multiplet. Dans le cas du ^1H , les couplages spin-spin peuvent être géminaux, où les deux H sont sur le même carbone, noté 2J (à condition que les deux protons ne soient pas équivalents, comme au sein d'un carbone asymétrique, insaturé ou compris dans un cycle), ou vicinaux, où les deux H sont sur des carbones différents, souvent voisins (couplage 3J), ils sont en effet rarement observables au-delà de trois liaisons.

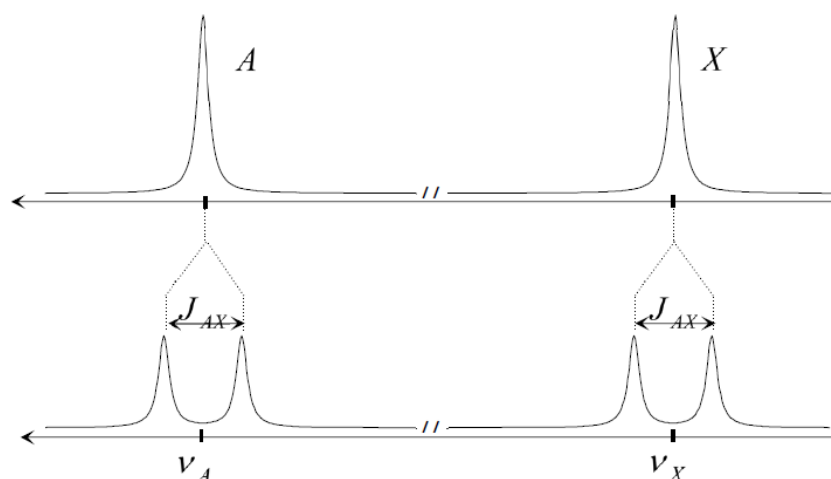


Figure B-3 Impact du couplage entre les spins 1/2 de deux atomes sur le spectre RMN¹.

Le déplacement chimique qui varie selon le groupement où se situe un atome d'une molécule donnée et la multiplicité des pics par couplage spin-spin permettent d'identifier de façon très précise la structure d'une molécule, l'un des premiers exemples donnés étant celui de l'éthanol³. Des tables ont ainsi pu être constituées qui facilitent grandement l'interprétation des spectres.

Pour ce qui est de la pratique, les composés sont dissouts dans des solvants deutérés, ou les hydrogènes ont été substitués par des deutériums, afin de minimiser la présence de pics dus au solvant sur les spectres ¹H (il reste des ¹H résiduels au sein du solvant, le prix augmentant avec le pourcentage de deutération). L'échantillon est ensuite placé dans un tube RMN qui sera placé dans la sonde de mesure au sein du champ permanent B_0 généré par le spectromètre par le biais de bobines supraconductrices. L'échantillon est mis en rotation grâce à un flux d'air comprimé, ce qui améliore la résolution du signal. Afin de générer ce dernier, une bobine émettrice applique pendant une courte période (quelques μs) un champ incident B_1 perpendiculaire à B_0 , tournant dans le même sens que le spin à étudier. Si la vitesse angulaire ω de ce champ B_1 est égale à $2\pi\nu_0$, les spins des protons de la molécule à étudier vont entrer en résonance et s'orienter selon un certain angle par rapport au champ incident qui peut être ajusté avec l'impulsion : dans le cas où cet angle est de 90° , on parle d'une impulsion $\pi/2$ (en radian). Une fois l'impulsion achevée, les spins vont retourner à leur état d'équilibre au cours d'une étape de relaxation. Cette relaxation va se traduire par une diminution progressive selon une loi sinusoïdale exponentiellement amortie de l'intensité du courant induit par les spins au sein de la bobine générant le courant incident (Figure B-4). Ce signal, appelé 'free induction decay' (FID),

est recueilli par une bobine réceptrice puis est enregistré par l'appareil et permet de remonter au spectre RMN de la molécule par l'application d'une transformée de Fourier⁴.

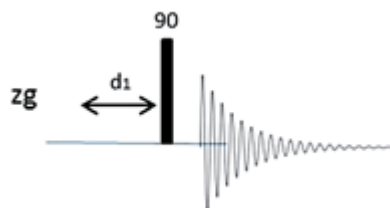


Figure B-4 Représentation d'une séquence d'analyse RMN du proton avec une impulsion $\pi/2$ suivi de l'enregistrement du signal FID⁵.

Outre des acquisitions permettant de retrouver le spectre d'un type d'atome donné au sein de l'analyte (^1H , ^{13}C), il est possible de réaliser des spectres en deux dimensions en réalisant plusieurs impulsions séparées par des temps donnés avant de récupérer le signal obtenu, ce qui permet de faire intervenir des variables temporelles supplémentaires au temps d'acquisition du FID. Ils permettent de rendre compte des interactions entre mêmes atomes (correlation spectroscopy COSY), entre atomes différents (heteronuclear single-quantum correlation HSQC pour les atomes séparés par une liaison covalente et heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy HMBC pour les couplages de plus longue distance). D'autres méthodes ont également été développées pour détecter les interactions entre deux atomes situés à proximité l'un de l'autre sans être directement liés de façon covalente (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy NOESY). Toutes ces méthodes permettent une analyse plus fine de la structure moléculaire.

Dans le cadre de cette thèse, la majorité des spectres acquis seront des séquences ^1H . L'appareil utilisé est un spectromètre 300 MHz Avance 300 de chez Bruker (MA, USA), mis à disposition par Jean-François Brière (COBRA, équipe Hétérocycles) que nous tenons à remercier ici. Les séquences appliquées seront donc de routine, avec l'emploi d'une impulsion de type zg30 décalant les spins de 30° par rapport au champ B_0 . 8 scans sont alors effectués à 298 K. Les échantillons de 2-alkyl-2-oxazolines, poly(2-alkyl-2-oxazoline)s et azobenzènes ont été préparés dans du chloroforme deutéré CDCl_3 et ont été analysés dès que possible. Tous les dérivés d'acide hyaluronique ont été préparés par dissolution dans de l'eau deutérée D_2O pendant une nuit. Puis de la soude deutérée NaOD à 30 % en masse a été ajoutée dans la solution de façon à obtenir une concentration en NaOD de $0,125 \text{ mol.L}^{-1}$ et en HA de 5 g.L^{-1} . Cet ajout se justifie par

le fait que la force ionique de la solution est ainsi augmentée, ce qui aura pour effet de diminuer la viscosité de la solution de HA en écrantant les charges de ce polyélectrolyte, et améliorera donc la mobilité des protons de la structure moléculaire, entraînant ainsi une hausse de la résolution du spectre obtenu⁶. De plus, le nombre de scans a été porté de 8 à 64, afin d'améliorer la sensibilité du spectre.

Des analyses de 'Diffusion Ordered Spectroscopy' (DOSY) ont également été réalisées sur les HA fonctionnalisés avec des chaînes de poly(2-méthyl-2-oxazoline)s en complément des analyses de chromatographie par exclusion stérique. La DOSY est une technique RMN 2D un peu particulière, au sens où elle relie les pics des atomes du spectre 1D à leur coefficient de diffusion dans le solvant : dans le cas d'une réaction de greffage réussie, tous les atomes du copolymère doivent être associés à un unique coefficient de diffusion. Brièvement, un gradient de champ pulsé est appliqué après l'impulsion initiale et va entraîner un déphasage de l'aimantation des spins selon leur position au sein du gradient. Un deuxième gradient de champ pulsé va remettre les spins en phase (Figure B-5). Cependant, ces derniers se seront déplacés entre temps dans le tube selon leur coefficient de diffusion, par conséquent, il subsistera un léger décalage au niveau des spins et l'aimantation totale associée à un même atome sera atténuée. Plus la molécule est petite, plus elle diffuse et l'atténuation de son intensité sera d'autant plus prononcée. Elles peuvent donc être séparées en fonction de leur coefficient de diffusion. En ce sens, la DOSY est une technique discriminante selon la taille de l'analyte de la même façon que la chromatographie d'exclusion stérique.

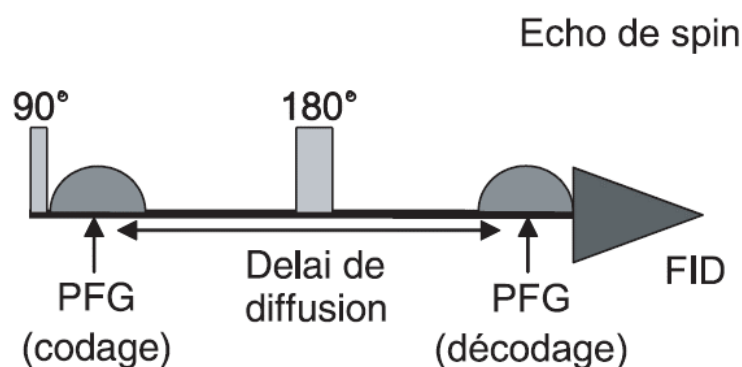


Figure B-5 Représentation d'une séquence d'impulsion basique pour mesurer la diffusion en RMN. L'impulsion à 180° entre les deux gradients de champ pulsé va inverser les spins et constitue une étape nécessaire pour leur rephasage⁷.

Pour les acquisitions DOSY, l'appareil utilisé est un spectromètre 500 MHz Avance 500 de chez Bruker (MA, USA). Une séquence de type ledbpgp2s a été employée en utilisant 16 incréments de durée t_1 sur un total de 32 000 points. La durée d'acquisition était de 1,7 s et le temps de relaxation D1 était de 3,0 s. Le temps de diffusion était de 1,5 s (durée adaptée au solvant utilisé, le D₂O) et la durée des gradients de champ pulsés (rectangulaires) était de 2,5 ms (P30), après lesquels un délai de 0,2 ms était observé. Les données ont été accumulées pour 16 incréments de gradients de champ pulsés en variant de façon linéaire les gradients codant de diffusion sur une portée de 2 à 95 %. Les échantillons ont été préparés dans du D₂O à des concentrations respectives de 5 g.L⁻¹ (HA et HA-g-PMeOx) et 10 g.L⁻¹ (PMeOx). Il n'y a pas d'ajout de soude deutérée pour les échantillons contenant du HA afin d'éviter l'hydrolyse des liaisons esters entre le HA et le PMeOx. Un mélange physique d'acide hyaluronique et de PMeOx a également été préparé en ajustant le ratio massique entre les deux polymères afin de les comparer avec le HA-g-PMeOx. Les acquisitions ont été réalisées par l'équipe de Hassan Oulyadi (COBRA, équipe analyse et modélisation), que nous tenons à remercier ici.

2.2 Spectroscopies d'absorption de la lumière

Les deux méthodes qui vont suivre, à savoir la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et la spectrophotométrie ultraviolet-visible sont toutes deux basées sur l'absorption de la lumière par les molécules à analyser. Pour autant, ces deux techniques donnent des informations différentes car elles emploient des rayonnements de longueurs d'onde différentes et donc de niveaux d'énergie différents, liés selon la formule :

$$E = h\nu \text{ (B4)}$$

Les rayonnements proches ultraviolet et visible (200 – 800 nm) seront plus énergétiques que les infrarouges (800 nm – 1000 μ m) et ne provoqueront pas les mêmes transitions au sein de la molécule (Figure B-6).

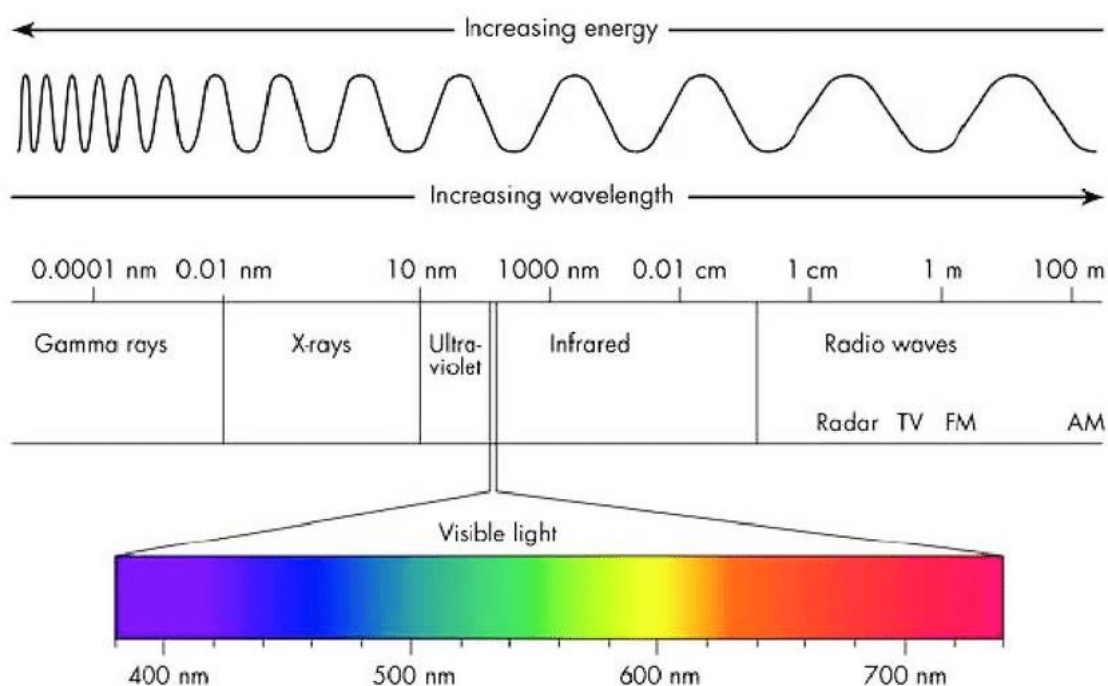


Figure B-6 Représentation du spectre de la lumière⁸.

2.2.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge est associée aux transitions vibrationnelles au sein des liaisons covalentes d'une molécule^{9,10}. Ainsi, les liaisons reliant deux atomes ont un mouvement de vibration qui va faire osciller la distance entre les deux atomes autour de sa position d'équilibre de moindre énergie. Les niveaux d'énergie associés à la vibration d'une liaison sont quantifiés (Figure B-7), ce qui signifie qu'elle pourra absorber l'énergie de photons lui permettant de passer à un état excité. Les niveaux d'énergie impliqués correspondent au domaine de l'infrarouge moyen (2,5 – 25 μm , soit 400 – 4000 cm^{-1}). Il faut toutefois préciser que pour qu'il y ait absorption, le moment dipolaire de la molécule doit varier au cours de la vibration. Ainsi, le diazote ne donnera aucun signal en infrarouge, son dipôle demeurant nul. A l'inverse, le dioxyde de carbone présente un dipôle induit par la vibration, il pourra donc être analysé par IR (Figure B-8a). Les longueurs d'ondes absorbées sont spécifiques aux liaisons reliant deux atomes donnés. En effet, ces liaisons peuvent être assimilées à des ressorts qui présenteraient des constantes de raideurs spécifiques, ce qui aura un impact sur l'énergie à apporter pour les faire passer à un état excité (la masse des atomes étant l'autre paramètre déterminant). Par exemple, les liaisons triples auront les raideurs les plus importantes, suivies des liaisons doubles

puis des liaisons simples. Il faut donc apporter plus d'énergie pour qu'une liaison triple passe à un état excité, elle absorbera donc à une longueur d'onde plus faible (et donc à un nombre d'onde plus élevé). Une liaison triple de type alcyne absorbera ainsi vers 2100 cm^{-1} tandis qu'une liaison double de type alcène absorbera vers 1600 cm^{-1} . La fréquence de la longueur d'onde absorbée correspond à la fréquence de vibration de la molécule. Il est donc possible d'identifier la nature des liaisons covalentes au sein d'une molécule à partir d'un spectre d'absorption (ou de transmission) des infrarouges. Il existe plusieurs modes de vibration classés en deux types : d'élongation (symétrique ou asymétrique, la longueur des liaisons varie pour un angle constant) et de déformation (cisaillement, rotation plane, balancement et torsion, l'angle des liaisons varie, la longueur reste constante) (Figure B-8b).

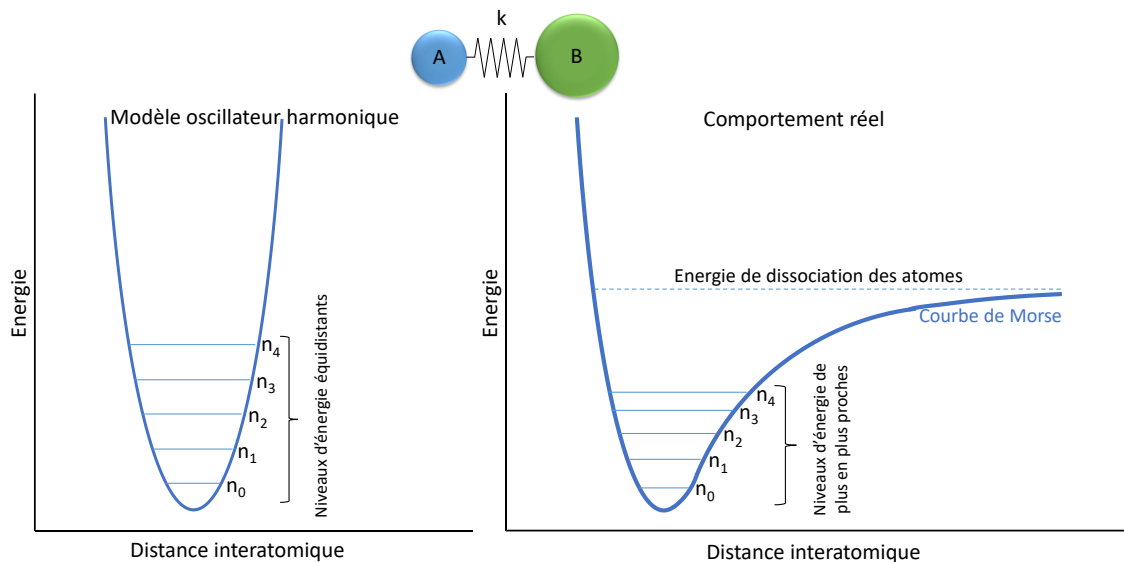


Figure B-7 Représentation des états d'énergie de vibration d'une liaison entre deux atomes selon le modèle de l'oscillateur harmonique (gauche) et selon le cas réel (droite).

Les vibrations de la liaison entre deux atomes étant similaire à celles d'un ressort, elles peuvent être modélisées à la manière d'un oscillateur harmonique (Figure B-7). Ce modèle représente l'énergie de la liaison associée à la distance intermoléculaire par une courbe parabolique d'équation :

$$E = \frac{1}{2}k(d - d_{eq})^2 \quad (B5)$$

Où k est la raideur de la liaison, d la distance entre les deux atomes et d_{eq} la distance optimale entre les deux atomes, d'énergie minimale.

L'oscillation, quant à elle, est représentée par une fonction sinusoïdale dont la fréquence ν est décrite par la relation :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (\text{B6})$$

Où μ est la masse réduite du système composé par les deux atomes A et B (Figure B-7), telle que :

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B} \quad (\text{B7})$$

Où m_A est la masse de l'atome A et m_B la masse de l'atome B. Des atomes lourds vont donc entraîner des fréquences de résonance de plus faibles valeurs. On retrouve dans cette formule la variabilité de la fréquence de résonance en fonction de la constante de raideur et de la masse des atomes impliqués dans la liaison. Les niveaux d'énergie de vibration sont équidistants (Figure B-7).

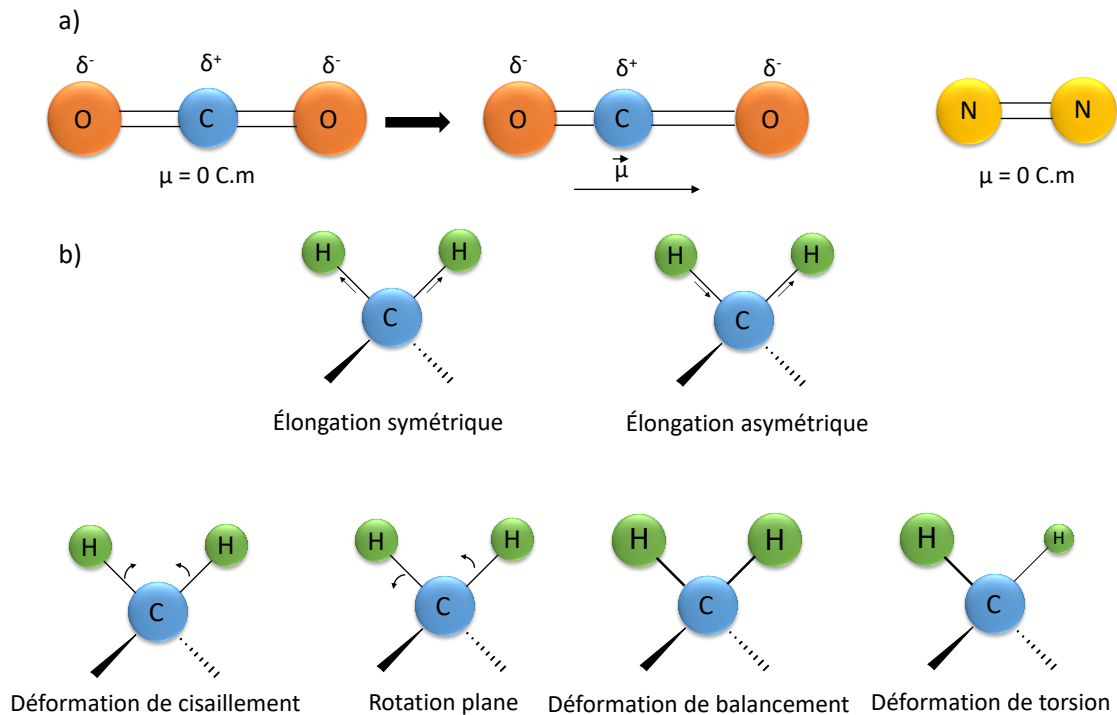


Figure B-8 a) Représentation des moments dipolaires au sein du dioxyde de carbone et du diazote et b) Représentation des modes de vibration d'un groupement méthylène.

Cependant, en réalité l'oscillation de la vibration est anharmonique et l'évolution de l'énergie de liaison est représentée par une courbe asymétrique appelée courbe de Morse. L'une

des caractéristiques notable de cette courbe est la présence d'une limite énergétique pour les distances interatomiques importantes. Elle correspond en fait à l'énergie de dissociation des deux atomes. Les niveaux d'énergie sont de plus en plus rapprochés (Figure B-7). Le modèle de l'oscillateur harmonique n'est donc valable que pour les niveaux les plus bas.

Au cours de la présente thèse, les spectres infrarouges ont été acquis sur un spectromètre Nicolet IS50 FT-IR (Thermo Scientific, USA). Les échantillons ont été analysés tels quels (solides ou liquides) en transmission avec le logiciel OMNIC de 500 à 4000 cm^{-1} en réalisant 32 scans avec une résolution de 2 cm^{-1} .

2.2.2 Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-vis)

2.2.2.1 Principe

Les rayonnements ultraviolets-visible (200 – 800 nm, seuls les UV proches sont utilisables) sont plus énergétiques que les infrarouges¹¹. Ils vont générer des transitions au niveau des couches électroniques des molécules. L'apport énergétique sera suffisant pour que les électrons de valence passent à une orbitale d'énergie plus élevée. Plusieurs types de transitions peuvent être observées : on distingue ainsi le passage d'une orbitale liante π à une orbitale anti-liante π^* , que l'on observe au sein des molécules présentant des liaisons doubles conjuguées (ex : carotènes) ou des cycles aromatiques (ex : azobenzène); le passage d'une orbitale non liante n à une orbitale anti-liante π^* , que l'on observe au sein des composés comprenant un hétéroatome (O, N, S, halogène) appartenant ou conjugué à un système insaturé et le passage d'une orbitale non liante n à une orbitale anti-liante σ^* , que l'on observe au sein des composés comprenant un hétéroatome (O, N, S, halogène). Les électrons des couches d des métaux de transition peuvent également générer des bandes d'absorption (ex : permanganate de potassium). Les transitions d'une orbitale liante σ vers une orbitale anti-liante σ^* (ex : chaîne alcanes) nécessitent plus d'énergie que ne peuvent en fournir les ondes dans le proche UV. Pour les autres transitions, elles sont normalement plutôt visibles dans l'UV mais la présence de conjugaisons de type π - σ - π va tendre à réduire l'énergie de transition et donc à déplacer la bande d'absorption vers le visible (Figure B-9).

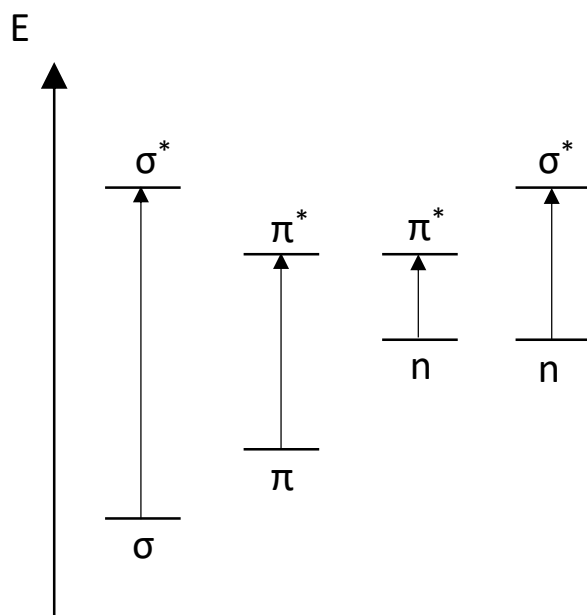


Figure B-9 Représentation des différents types de transitions orbitales.

Dans le cadre de cette thèse, l'instrument utilisé est un Cary 100 UV-Vis Spectrophotometer de chez Agilent Technologies (CA, USA) muni d'un contrôleur de température (Cary Temperature Controller), permettant de réaliser des mesures en rampe thermique. Une source lumineuse (lampe à arc au deutérium pour les UV, lampe halogène au tungstène pour le visible) émet un rayonnement qui est décomposé par un monochromateur puis orienté par un jeu de miroirs réfléchissants et semi-réfléchissants vers deux cuves (en quartz pour une transmission totale ou en polystyrène au cas où la mesure ne nécessite pas de descendre en-dessous de 340 nm), l'une contenant l'analyte et l'autre une référence, qui vont retenir une partie du rayonnement selon la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon l C \quad (\text{B8})$$

Où A est l'absorbance, ε le coefficient d'extinction molaire (en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et l la largeur de la cuve en cm^{-1} . Les intensités des rayonnements transmis respectivement par l'échantillon et par la référence sont ensuite mesurées avec un détecteur (Figure B-10).

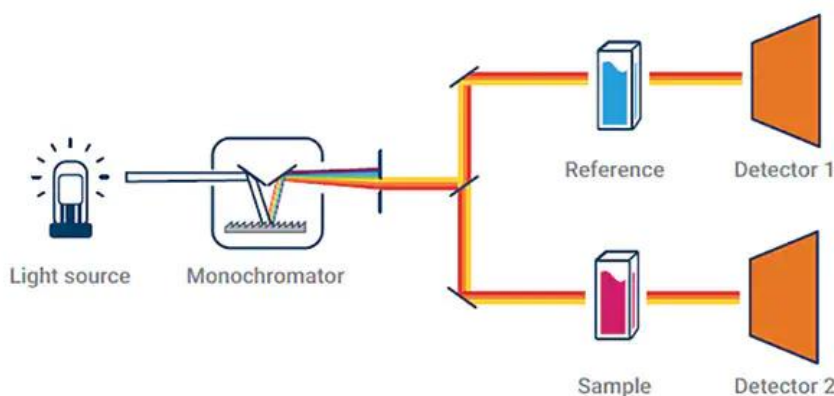


Figure B-10 Schéma du principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-vis¹².

2.2.2.2 Mesure de points troubles

L'apparition du point trouble des polymères thermosensibles utilisés au cours de cette thèse a pu être déterminée par spectroscopie UV-vis. En effet, étant donné que certains des polymères étudiés précipitent ou s'agrègent au-delà de cette température, ils auront tendance à fortement réduire l'intensité du rayonnement lumineux incident. La longueur d'onde n'est donc pas ici un paramètre déterminant et a été fixée à 600 nm. A titre d'exemple, les copolymères de *PiPrOx-co-PnBuOx* ont été dissouts soit dans l'eau MQ, soit dans une solution de NaCl à 0,15 M à des concentrations de 10 g.L⁻¹ ou de 2 g.L⁻¹. L'évolution de l'absorbance des solutions au cours d'une rampe de montée en température de 0,5 °C.min⁻¹ a été collectée à hauteur d'un point par °C. Le point trouble a été déterminé comme l'intersection de la ligne de base avec la tangente au point d'inflexion de la courbe d'absorbance. L'évolution de l'absorbance des HA-*g*-(*PiPrOx-co-PnBuOx*) a été suivie de façon similaire, certains échantillons présentant également des points troubles.

2.2.2.3 Cinétique de l'absorbance d'un dérivé d'azobenzène soluble en milieu acide

Un dérivé de l'azobenzène, le *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (Figure B-11) synthétisé au cours de cette thèse est soluble en milieu acide du fait de la présence d'une charge sur la fonction amine (le détail de la synthèse sera présenté section 4.4).

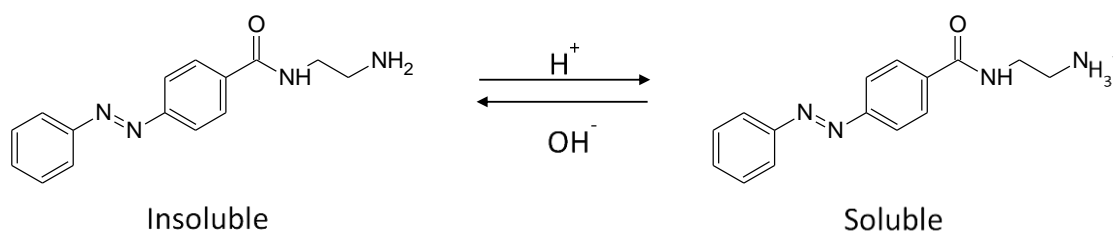


Figure B-11 Solubilité du N-(2-aminoéthyl)-4-azoamide en solution aqueuse selon le pH.

L'étude cinétique a été réalisée sur une solution contenant $0,015 \text{ g.L}^{-1}$ de N-(2-aminoéthyl)-4-azoamide dans $0,05 \text{ M}$ de HCl (la concentration a été déterminée de telle sorte que l'absorbance soit proche de l'unité vers 323 nm (maximum d'absorption transition $\pi \rightarrow \pi^*$). La dissolution a pris plusieurs jours. L'échantillon a d'abord été placé 10 min sous irradiation UV à 254 nm (lampe 4 W , $\sim 0,2 \text{ mW/cm}^2$ (seuil de détection), utilisée pour la chromatographie sur couche mince) afin d'être totalement converti en conformation *trans*. Une première acquisition de spectre est lancée juste après sur un domaine de 500 nm à 200 nm (en ordre décroissant) avec un balayage à 1000 nm/min . La transition de la lampe visible à la lampe UV a été fixée à 390 nm , au lieu de la grandeur par défaut de 350 nm , afin de se trouver au sein d'un creux où l'échantillon absorbe très peu. L'échantillon est ensuite placé sous une lampe UV à 365 nm (100 W , $\sim 5,0 \text{ mW/cm}^2$) pendant 7 min au cours desquelles des acquisitions de spectres sont effectuées avec les mêmes paramètres décrits précédemment toutes les 5 s jusque 30 s, puis 45 s, 60 s, puis toutes les 30 s jusque 240 s, puis toutes les minutes jusque 7 min, où un dernier scan est effectué pour la courbe aller après avoir bien vérifié qu'il n'y ait plus de variation du spectre obtenu. L'échantillon est ensuite immédiatement placé sous la lampe UV à 254 nm et, à nouveau, des spectres sont acquis toutes les 5 s jusque 30 s, puis 45 s, 60 s, puis toutes les 30 s jusque 4 min et vérification que le spectre ne varie plus et a retrouvé ses valeurs initiales.

3 Méthodes de caractérisation physico-chimique

3.1 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée

MALLS

La chromatographie d'exclusion stérique est une technique d'analyse des macromolécules, basée sur la séparation de ces dernières par rapport à leur volume hydrodynamique. Cette technique permet, à l'aide d'un étalonnage adapté, notamment la détermination des masses molaires moyennes en nombre (M_n), en masse (M_w) et en viscosité

(M_v), ainsi que la dispersité des masses molaires \mathfrak{D} d'un polymère, cette dernière étant définie par la relation suivante :

$$\mathfrak{D} = \frac{M_w}{M_n} \text{ (B9), avec}$$

$$M_w = \sum_i \frac{m_i M_i}{m_i} = \sum_i \frac{n_i M_i^2}{n_i M_i} \text{ (B10) et } M_n = \sum_i \frac{n_i M_i}{n_i} \text{ (B11).}$$

$\frac{M_w}{M_n}$ est forcément supérieur ou égal à l'unité, qui serait atteinte pour des chaînes entièrement monodisperses, ce qui est impossible dans la pratique (au mieux \mathfrak{D} est compris entre 1,01 et 1,1 dans le cadre de certaines polymérisations contrôlées).

La séparation s'effectue concrètement sur des colonnes contenant une structure matricielle à base de polymère réticulé macroporeuse constituant la phase stationnaire. Le polymère à analyser est placé en solution dans un éluant et les macromolécules le constituant seront plus ou moins retenues selon leur taille par les pores de la structure matricielle. Celles de plus faible taille seront les plus retenues, du fait de leur plus grande facilité à pénétrer les pores. A l'inverse, celles de grande taille pénétreront moins au sein des pores et élueront donc plus rapidement. L'élution se fera donc des chaînes de plus forte taille vers celles de moindre taille (Figure B-12).

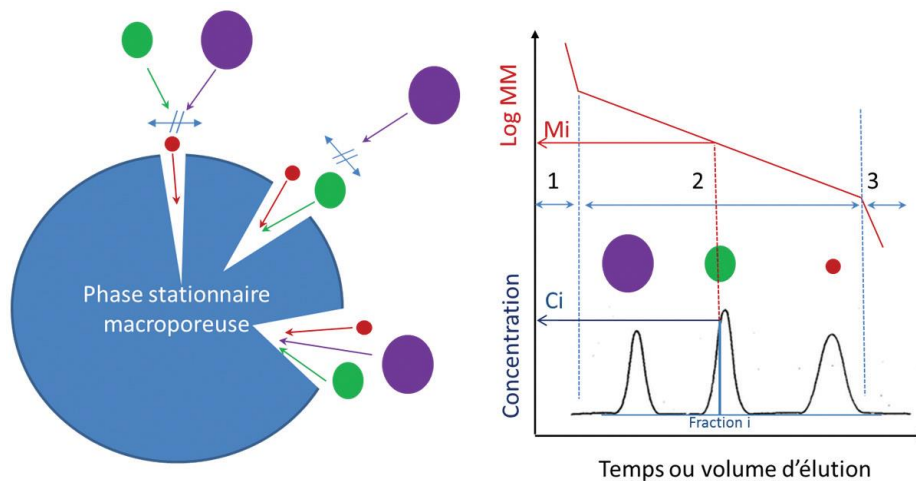


Figure B-12 Principe de la séparation de chaînes macromoléculaires en chromatographie d'exclusion stérique¹³.

Cette méthode de séparation dépend donc de la taille des macromolécules et donc de leurs masses molaires, qui sont directement liées à leur degré de polymérisation. Cependant, un autre paramètre exerce une influence primordiale sur l'élution, à savoir la conformation de

la chaîne. En effet, selon que la chaîne présente une conformation pelote (expansée) ou globule (contractée), le rapport du volume hydrodynamique à la masse molaire sera alors très différent. Ainsi des polymères de même masse molaire mais de conformations différentes dans un solvant donné ne présenteront pas le même volume hydrodynamique et seront donc élués à des volumes différents. Comme évoqué au début de cette section, les macromolécules sont séparées en fonction de leur volume hydrodynamique, qui représente le volume de la sphère équivalente à la chaîne polymère. La détermination des masses molaires nécessite donc de connaître la conformation du polymère en solution ou sa viscosité intrinsèque, le produit de la viscosité intrinsèque et de la masse molaire étant proportionnel au volume hydrodynamique (étalonnage de Benoit). La solution la plus couramment utilisée est d'étalonner l'instrument avec des standards de calibration de masses molaires connues. Dans l'idéal, il faudrait des étalons adaptés pour chaque type de polymère à analyser, ce qui est peu commode. L'alternative consiste donc à déterminer la masse molaire absolue de chaque fraction éluee par l'installation d'un système de diffusion statique multi-angle de la lumière ('*multi-angle laser light scattering*' (MALLS)) en sortie de colonne. Cette technique consiste à mesurer l'intensité de la diffusion de la lumière d'un échantillon à divers angles, ce qui permet de remonter à la M_w mais également au rayon de giration R_g selon l'équation suivante :

$$\frac{KC}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda_0^2} R_g^2 \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) + \dots \right) + 2A_2C + \dots \quad (\text{B12})$$

Où $\Delta R(\theta)$ est la variation de l'indice de Rayleigh à l'angle θ (ce facteur est lié à l'intensité diffusée par le polymère à cet angle θ), λ_0 la longueur d'onde du rayonnement incident, A_2 le second coefficient du viriel, C la concentration massique en polymère et K est une constante optique définie par l'équation :

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{1}{N_A} \quad (\text{B13})$$

Où n_0 est l'indice de réfraction du milieu, dn/dc l'incrément d'indice de réfraction et N_A le nombre d'Avogadro. L'équation (B9) permet d'obtenir la courbe de Zimm, où M_w peut être déduit par extrapolation des courbes à concentration et angle nuls. Le rayon de giration peut être obtenu par extrapolation à concentration nulle dans le cas d'une diffusion anisotrope, obtenue pour des objets de taille supérieure à $\lambda_0/20$ (~20 nm) dans le cas de l'utilisation d'un laser rouge comme rayonnement incident.

Le couplage SEC/MALLS permet ainsi de s'affranchir de l'étalonnage, la SEC conduisant à la séparation stérique de l'échantillon et la MALLS déterminant directement les masses molaires. Le couplage utilisé au cours de cette thèse comprend également un détecteur viscosimétrique (VD), un réfractomètre différentiel (DRI) et un détecteur UV (l'un ou l'autre nécessaire à la détermination de la concentration des fractions éluées). L'extrapolation à angle nul des fractions éluées, de concentrations si faibles qu'elles sont généralement associées à une concentration nulle, permet l'accès à la distribution des masses molaires et des rayons de giration. L'exploitation de ces résultats permet alors de déterminer les masses molaires et rayons de giration moyens en nombre et en masse. Le viscosimètre permet de son côté et sur le même principe de remonter à la viscosité intrinsèque de l'échantillon. Ainsi avec la connaissance des masses molaires des fractions éluées, il est possible de remonter aux paramètres de Mark-Houwink, obtenus par la relation suivante :

$$[\eta]_i = KM_i^a \quad (\text{B14})$$

Où $[\eta]_i$ est la viscosité intrinsèque de la fraction i , M_i la masse molaire de la fraction i et K et a les deux paramètres de Mark-Houwink. En particulier, a est associé à la conformation du polymère dans l'éluant, une pelote statistique étant obtenue pour une valeur de a comprise entre 0,5 et 0,8; au-dessus de 0,8, la chaîne adopte une conformation en bâtonnets; pour $a = 0,5$, on parle de condition θ (conformation sphérique à la limite de la précipitation). Le détecteur DRI permet quant à lui de déterminer la concentration massique de polymère au sein de la fraction éluee. Enfin, le détecteur UV permet de détecter les composés qui absorbent à certaines longueurs d'onde. Dans le cadre de cette thèse, il sera employé pour les dérivés de type HA- g -azobenzène en utilisant une onde incidente à 320 nm (correspondant au maximum d'absorption de la conformation *trans*). La viscosité intrinsèque permet également de déterminer le rayon hydrodynamique du polymère en utilisant l'équation de Einstein-Simha :

$$R_{hi} = \sqrt[3]{\frac{3[\eta]_i M_i}{4\pi\nu N_A}} \quad (\text{B15})$$

Où R_{hi} est le rayon hydrodynamique de la fraction éluee i , $[\eta]_i$ la viscosité intrinsèque et M_i la masse molaire de cette même fraction, ν est un paramètre de conformation (de valeur 2,5 dans le cas d'une sphère) et N_A est le nombre d'Avogadro.

Au cours de cette thèse, le système employé était composé d'unités SEC/MALLS/VD/DRI en série. L'éluant employé était du nitrate de lithium LiNO_3 0,1 M, préféré au chlorure de sodium

usuel du fait qu'il empêche la croissance bactérienne au sein de la phase stationnaire des colonnes immergées dans l'éluant. Le LiNO_3 est en outre moins corrosif pour les parties métalliques de l'instrument (notamment les pistons de la pompe). L'éluant est filtré par une unité de filtration à $0,1 \mu\text{m}$, dégazé par passage au sein d'une unité dédiée (DGU-20A3, Shimadzu, Japon) et élué usuellement avec un débit de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (avec une pompe LC10Ai de chez Shimadzu, Japon).

Les solutions à analyser ont été préparées dans l'éluant en ajustant la concentration selon le composé à analyser : $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour les dérivés de $\text{HA}_{1200\text{k}}$ ou $\text{HA}_{990\text{k}}$ (qu'il s'agisse du matériau brut, converti en sel de tétrabutylammonium, ou fonctionnalisé avec de la Jeffamine® M2005, des polyoxazolines ou des azobenzènes), $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour les dérivés de $\text{HA}_{140\text{k}}$ et de $\text{HA}_{38\text{k}}$, et $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour les polyoxazolines. Les composés ont été dissouts pendant une nuit puis ont été filtrés avec un filtre de $0,45 \mu\text{m}$ et placés dans des piluliers. $100 \mu\text{L}$ de la solution ont été injectés avec un injecteur automatique (SIL-20A, Shimadzu). Dans le cas des dérivés de HA, deux colonnes OHPAK SB-806HQ et SB-804HQ (adaptées pour les masses molaires comprises entre $10 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $1000 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) ont été utilisées (Shodex Showa Denko K.K., Japon). Pour les polyoxazolines, des colonnes OHPAK SB-804HQ et SB-802.5HQ ont été privilégiées (la SB-802.5HQ est adaptée pour les masses molaires comprises entre $1 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ et $10 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$). La phase stationnaire au sein des colonnes était composée de gel de polyméthacrylate de 2-hydroxyéthyle. Le détecteur MALLS était un DAWN Heleos-II de chez Wyatt Technology Inc. (CA, USA) contenant une cellule K5 de $50 \mu\text{L}$ et 18 photodiodes calibrées relativement au détecteur à 90° en utilisant de l'albumine de sérum bovin. Le détecteur viscosimétrique était un ViscoStar II de chez Wyatt Technology Inc. (CA, USA). Les données collectées ont été analysées avec le logiciel Astra® version 6.1.7.16. Les masses molaires ont été obtenues avec la méthode de Zimm à l'ordre 1. La concentration massique de chaque fraction éluee a été déterminée avec un DRI (RID 10A shimadzu, Japon).

La détermination des incréments d'indice de réfraction dn/dC , paramètre indispensable pour réaliser la courbe de Zimm (voir équations B12 et B13), a été effectuée en injectant directement le polymère à analyser dans le détecteur DRI à diverses concentrations massiques dans une solution de LiNO_3 à $0,1 \text{ M}$. L'intensité de la détection est proportionnelle à la concentration massique avec une pente égale à dn/dC . Dans le cas du PMeOx , par exemple, les concentrations utilisées ont été de $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $1,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,625 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et de $0,3125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (échantillon : PMeOx_{28}). Nous avons obtenu une droite, dont le coefficient directeur correspond

à l'incrément d'indice de réfraction, de 0.16 mL.g^{-1} (Figure B-13), soit une valeur très proche de celles obtenues par Alice Gontier au cours de sa thèse au sein du laboratoire PBS avec d'autres chaînes de polyoxazolines¹⁴. Ces valeurs sont elles-mêmes très proches de la valeur du dn/dc connue du HA de 0.15 mL.g^{-1} .

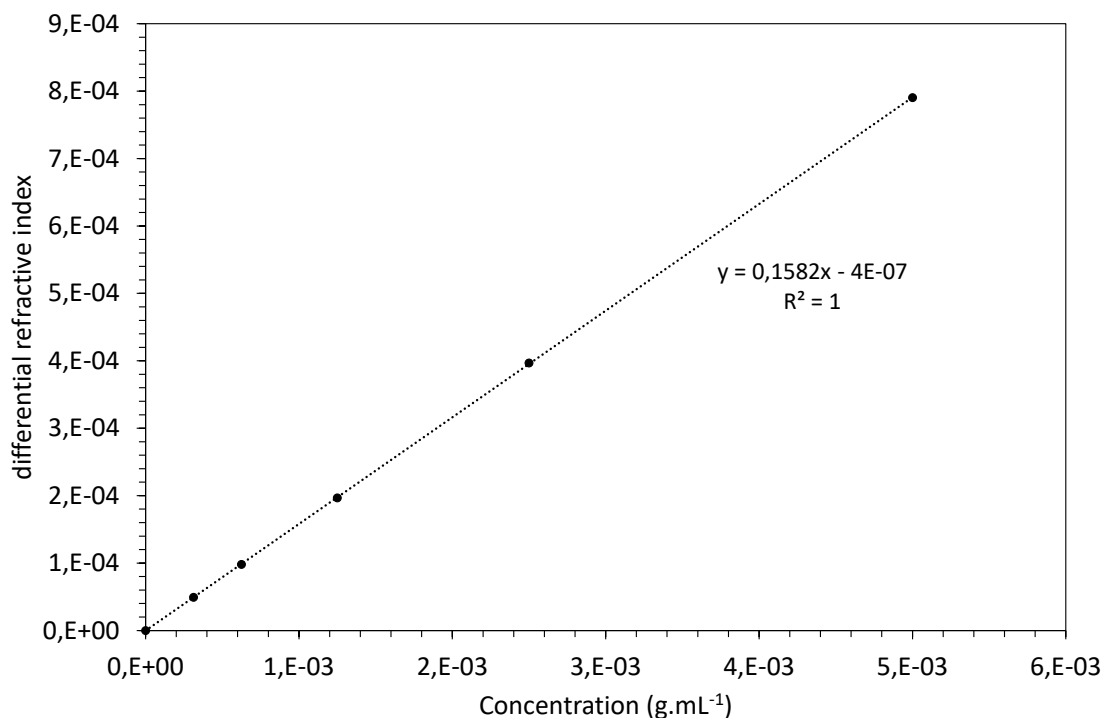


Figure B-13 Détermination du dn/dc du PMeOx₂₈ par détection DRI (merci à Christophe Rihouey pour les conseils et l'opération de l'instrument).

Il y a eu au cours de cette thèse un cas où l'éluant en solution aqueuse de notre ligne n'était pas adapté pour l'échantillon à analyser, à savoir pour l'analyse des masses molaires des polyoxazolines thermosensibles. Dans ce cas, nous avons utilisé une autre ligne SEC dédiée en solvant organique, ici le dichlorométhane. L'instrument était un Varian PL-GPC50, équipé d'une précolonne (Polymer Laboratories, PL gel 5 μm Guard, 50 x 7,5 mm), de deux colonnes (Polymer Laboratories, PL gel 5 μm MIXED-C, 300 x 7,5 mm). Le débit d'élution était de 1 mL.min^{-1} . L'instrument ne disposant pas de détecteur MALLS, une calibration a été effectuée avec des standards de polyméthacrylate de méthyle, les masses molaires obtenues ne seront donc pas absolues. Le réfractomètre était un RID-10A de chez Shimadzu. Les mesures ont été réalisées par Alice Gontier et Catherine Legrand que nous tenons à remercier ici.

3.2 Viscosimétrie à faible cisaillement

La viscosimétrie est la mesure de la viscosité d'un fluide. On distingue la viscosité cinématique, qui est obtenue par mesure de la vitesse d'écoulement du système à étudier à travers un capillaire (la valeur dépend donc de la gravité), de la viscosité dynamique, obtenue en réalisant les mesures par l'application d'une contrainte ou d'un gradient de cisaillement (aucune influence de la gravité). Au cours de cette thèse, nous mesurerons la viscosité dynamique.

Le viscosimètre LOW SHEAR LS 400 de Lamy Rheology (France) utilisé au cours de cette thèse est un viscosimètre à rotation suivant le principe de Couette : le liquide à analyser est versé dans une cuve, au sein de laquelle est placé un cylindre de dimensions légèrement inférieures à celles de la cuve. Le fluide occupe ainsi une surface importante. Le cylindre est immobile et la cuve suit un mouvement de rotation (Figure B-14). La vitesse est ajustée afin d'être dans les conditions d'un cisaillement laminaire. L'appareil permet de fixer des gradients de cisaillement faibles (typiquement de 10^{-2} à 10^2 s^{-1}) et est adapté pour la mesure de faibles viscosités et/ou des mesures de viscosité dans le régime newtonien. La géométrie utilisée était une LS11 (rayon : 5,5 mm; longueur : 8 mm). Le gradient de cisaillement était adapté en fonction de l'échantillon (lecture stable sur l'appareil).

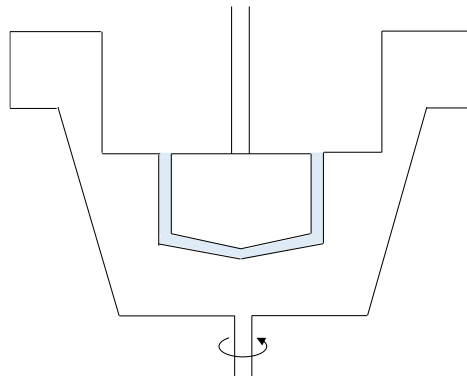


Figure B-14 Représentation d'un viscosimètre en rotation selon Couette.

Cet instrument a été utilisé pour déterminer la concentration critique de recouvrement C^* des différents échantillons d'acide hyaluronique. Cette concentration correspond au passage des chaînes polymère d'un état dilué où les molécules sous forme de pelote sont isolées les unes des autres à un état semi-dilué où elles commencent à entrer en contact, puis à un état enchevêtré où elles commencent à se recouvrir (C^{**}) (Figure B-15). En raison de la dispersité

des masses molaires, Il arrive que l'on ne parvienne pas à déterminer avec précision C^* et C^{**} , on obtient alors une concentration critique moyenne située entre ces deux concentrations caractéristiques. Ces mesures nous ont ainsi surtout permis d'estimer à quelle concentration il fallait se placer afin de travailler avec des chaînes semi-diluées enchevêtrées pour former des hydrogels.

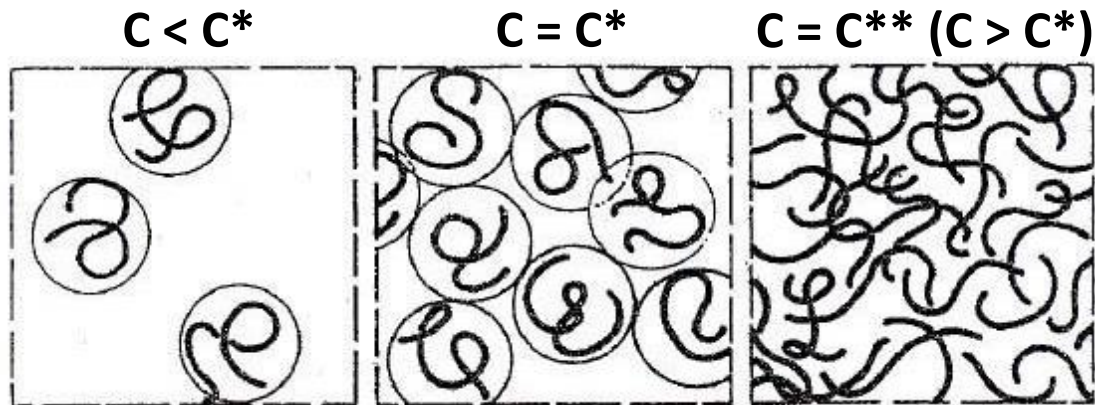


Figure B-15 Représentation de l'évolution de la conformation d'un polymère en solution en fonction de sa concentration¹⁵.

3.3 Rhéologie

La rhéologie a déjà été abordée dans la partie bibliographie section 1.2.4 de ce manuscrit car il fallait introduire la notion de module de conservation G' , de module de perte G'' et de $\tan(\delta)$ ainsi que leur utilisation pour caractériser un hydrogel, avec G' qui est supérieur à G'' du fait de la prépondérance de la réponse élastique sur la réponse visqueuse au sein de ces matériaux. La section présente développera davantage les géométries pouvant être utilisées ainsi que les méthodes employées au cours de cette thèse.

Le rhéomètre employé était un Discovery HR-2 hybride de chez TA Instruments (U.K.), contrôlé avec le logiciel TRIOS v4.1.1.33073. Les supports destinés à recevoir les échantillons étaient un Peltier plan et un Peltier pour cylindres concentriques (TA Instruments, U.K.). Ils permettent de contrôler très précisément la température (chauffage ou refroidissement) par l'application d'un courant entre deux types différents de matériaux conducteurs par effet Peltier. Divers systèmes de mesure peuvent être utilisés : les géométries cône-plan, caractérisées par leur surface conique tronquée sont les plus courantes et sont destinées à être utilisées sur des surfaces planes. Elles peuvent être utilisées dans un grand nombre d'applications et elles

répondent à la norme ISO 3219. Leur forme conique permet en effet d'homogénéiser la contrainte de cisaillement au sein de la surface de l'échantillon. Le cône est légèrement tronqué à son sommet afin d'éviter qu'il y ait contact entre la géométrie et le support. Son autre avantage est qu'elle nécessite seulement un faible volume de solution à analyser. Cependant, cette géométrie n'est pas adaptée pour la mesure de dispersion contenant des particules de taille trop importante par rapport à l'entrefer entre la géométrie et le plateau lors d'une mesure (valeur fixe dépendant des dimensions de la géométrie) ou pour des polymères à l'état fondu (pour ces applications, les géométries plan-plan sont privilégiées). Elle n'est pas non plus adaptée pour des mesures sur des solutions peu visqueuses qui risquent de s'écouler hors de la surface de contact qui ne sera alors plus entièrement recouverte. Pour ce type d'applications, les géométries cylindriques, comme les cylindres concentriques et les doubles-entrefers, sont privilégiés car elles permettent de réaliser des mesures sur une surface d'échantillon plus importante. Afin d'homogénéiser la contrainte appliquée sur l'échantillon, l'écart de dimensions entre le cylindre externe et le cylindre interne est minimisé, avec le rayon externe devant valoir au maximum 1,0847 (cylindres concentriques) ou 1,15 (double-entrefer) fois la valeur du rayon interne¹⁶. Du fait que le fluide à analyser est en contact avec les deux parois d'une géométrie double-entrefer, cette dernière est plus appropriée encore que les cylindres concentriques pour appliquer de faibles contraintes.

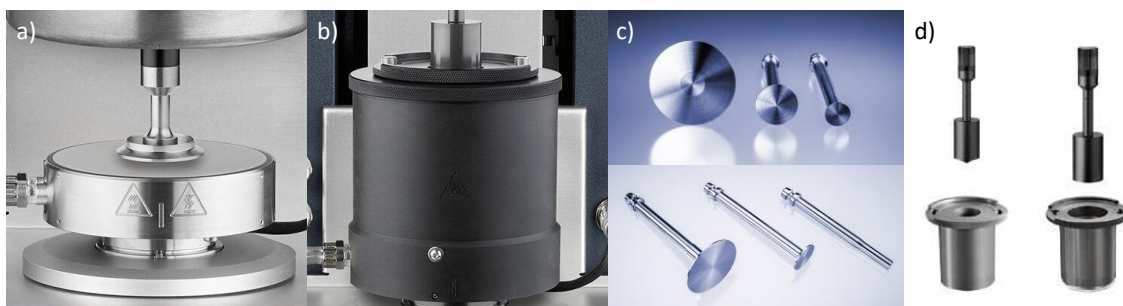


Figure B-16 Systèmes Peltier utilisés au cours de cette thèse : a) Peltier plan, b) Peltier cylindres et diverses géométries : c) cône-plan (dessus), plan-plan (dessous), d) cylindre concentrique (gauche) et double entrefer (droite)¹⁷.

Au cours de cette thèse, la géométrie double-entrefer (aluminium – gap : 500 μm) a été majoritairement utilisée car les HA thermosensibles en solution présentaient une viscosité relativement faible ($< 10 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) aux basses températures. Dans le cas de solutions concentrées ($> 50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), du fait de la forte consommation en matériau, la géométrie cône-plan (aluminium –

gap : 50 μm) aura toutefois été adoptée. Les dérivés thermosensibles du HA ont été dissouts soit dans de l'eau Milli-Q, soit dans des solutions salines de NaCl (0,15 M) ou de tampon PBS (0,15 M). Les concentrations massiques en HA ont été ajustées en fonction de la masse molaire du HA de départ et seront détaillées au sein des sections dédiées. Afin d'observer la formation d'hydrogels par élévation de la température, des mesures en mode dynamique (en oscillation) à fréquence et contrainte constantes au cours d'une rampe de température ont été effectuées. La fréquence était de 1 Hz, la contrainte était généralement de 0,1 Pa (elle a pu être ajustée en fonction du domaine de linéarité viscoélastique ou de l'allure de la courbe de déformation affichée par l'instrument au cours des mesures, qui doit être sinusoïdale du fait de l'application d'une contrainte oscillante) et la température variait par incréments de 0,5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (chauffage et refroidissement). L'augmentation de température pouvant provoquer l'évaporation du solvant au sein de l'échantillon, ce qui fausserait les mesures, la température a généralement été conservée en-deçà de 60 $^{\circ}\text{C}$ (seuil au-delà duquel l'évaporation du solvant devient difficile à endiguer) et un piège à solvant a été utilisé. Il consiste en la pose d'un couvercle au-dessus de la géométrie et au remplissage d'une cavité au sein de la géométrie avec de l'eau distillée afin de saturer la zone en vapeurs d'eau.

3.4 Diffusion dynamique de la lumière (DDL)

La DDL consiste à irradier une cellule contenant l'analyte avec un rayon incident issu d'un laser puis à mesurer les fluctuations temporelles sur des temps très courts de l'intensité de la lumière diffusée à un angle donné par les particules de faible taille par rapport à la longueur d'onde du rayon incident. L'ordre de grandeur de la taille des particules que l'on peut mesurer est donné par la fonction d'onde q :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{B16})$$

Où λ est la longueur d'onde du rayonnement incident et θ l'angle d'observation. On parle de diffusion dynamique car c'est la fluctuation temporelle de l'intensité diffusée du fait du mouvement brownien des particules que l'on va mesurer sur des temps très courts avec cette méthode. Les particules de faible taille seront sujettes à des mouvements browniens plus rapides par rapport aux particules de taille plus élevée, l'intensité diffusée fluctuera donc plus rapidement. Grâce à un traitement de fonction d'autocorrélation, on peut remonter ainsi au coefficient de diffusion de la particule qui est relié à son rayon hydrodynamique R_H par la relation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (\text{B17})$$

Où k est la constante de Boltzmann, η la viscosité du milieu solvant et D le coefficient de diffusion. Les mesures sont réalisées à un angle de diffusion de 173° (rétrodiffusion), qui permet d'éviter que le laser ne traverse tout l'échantillon, ce qui entraînerait l'apparition de diffusion multiple, où le rayon diffusé par une particule serait à nouveau diffusé par une autre particule (Figure B-17). On peut ainsi travailler à des concentrations plus élevées. On minimise également l'impact des poussières que pourrait contenir l'échantillon.

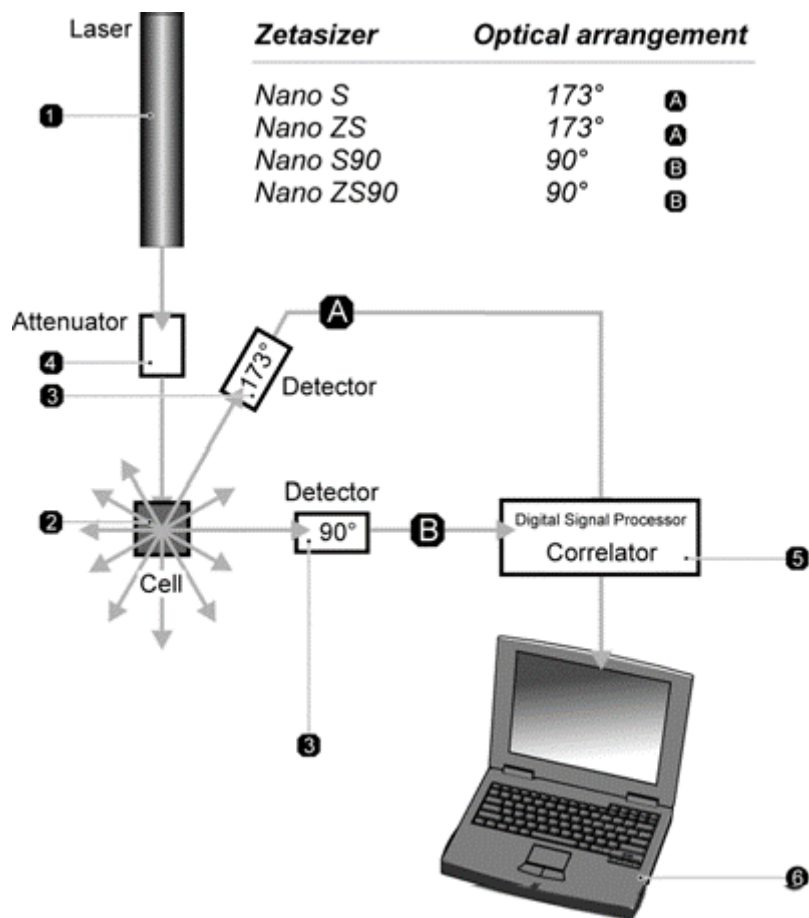


Figure B-17 Principe de fonctionnement de la DDL sur le Zetasizer¹⁸.

Les données obtenues peuvent être analysées de plusieurs façons (Figure B-18). La méthode la plus proche de la réalité est celle basée sur l'intensité de la diffusion des différentes populations de l'échantillon car elle repose sur l'exploitation des données brutes de l'instrument. Cette méthode présente toutefois un inconvénient du fait de la plus forte intensité diffusée par les particules de forte taille par rapport à celles plus petites (l'intensité est proportionnelle au

diamètre de la particule exposant 6 d'après l'approximation de Rayleigh), ce qui peut conduire à une mauvaise appréciation de la distribution des populations et entraîner un impact non négligeable de la présence de poussières sur la qualité de courbe de distribution, ces dernières entraînant une forte diffusion. Il est possible de convertir cette distribution en intensité en une distribution en volume par le biais d'algorithmes s'appuyant sur la théorie de Mie, puis en une distribution en nombre, qui facilitera l'estimation de la taille des diverses population mais qui peut être faussée du fait de l'emploi d'algorithmes.

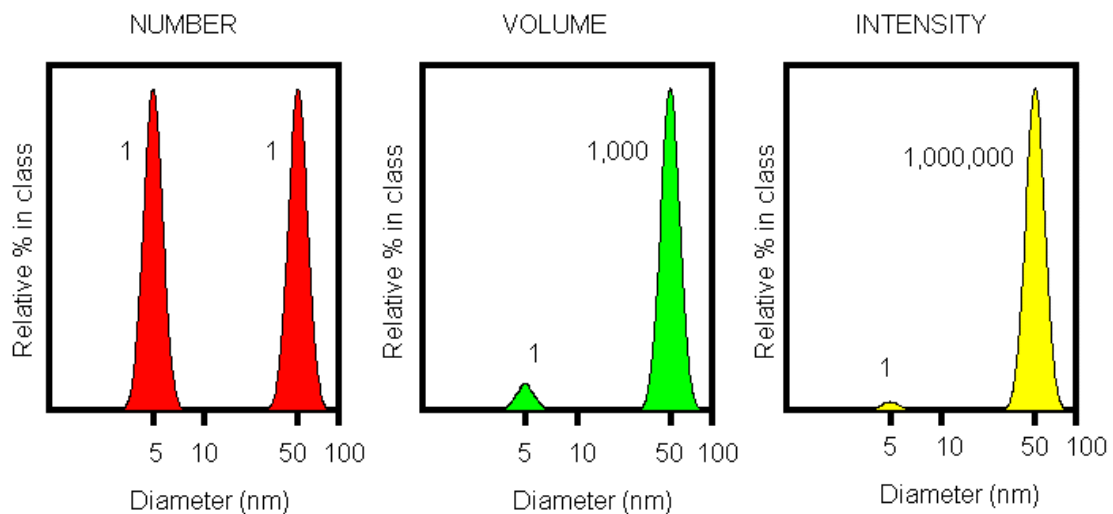


Figure B-18 Représentation des échelles de réponses pour un même échantillon en DDL selon la méthode d'analyse employée¹⁸.

Au cours de cette thèse, les mesures ont été réalisées sur un Zetasizer Nano ZS de chez Malvern avec une détection à 173 ° en faisant varier la température. Les mesures ont été répétées 5 fois à une température fixe (ajustée selon l'échantillon étudié). Les polymères thermosensibles étudiés, à savoir la Jeffamine® M2005 et les copolymères de PiPrOx-co-PnBuOx ont été dissouts à froid dans de l'eau Milli-Q, du tampon PBS ou du HCl 0,01 M à des concentrations de 10 g.L⁻¹. Les solutions ont été filtrées à basse température (0,45 µm) afin de supprimer d'éventuelles poussières. Les distributions ont été analysées en volume et en intensité.

4 Caractérisation des composés employés

4.1 L'acide hyaluronique

4.1.1 Propriétés physico-chimiques

Les différents acides hyaluroniques (HA_{38k}, HA_{140k}, HA_{990k} de chez Givaudan et HA_{1200k} de chez Sigma-Aldrich) utilisés au cours de cette thèse ont tout d'abord été caractérisés par SEC/MALLS et par viscosimétrie à faible cisaillement. Leur masses molaires et leur C* ont ainsi pu être déterminés. Les résultats sont regroupés dans le Tableau B-1 :

Tableau B-1 Propriétés physico-chimiques des HA employés au cours de cette thèse

	M _n (g/mol) ^a	M _w (g/mol) ^a	Đ ^a	C* (g/L, MQ) ^b	C* (g/L, 0,15 M NaCl) ^b	[η] (mL.g ⁻¹) ^b (0,15 M NaCl)	[η] _w (mL.g ⁻¹) ^a
HA _{38k}	38 000	64 000	1,68	8,5	31	75	150
HA _{140k}	140 000	210 000	1,50	4.8	10	143	415
HA _{990k}	990 000	1 300 000	1,36	0.8	1.9	1458	1574
HA _{1200k}	1 200 000	1 500 000	1,25	0.8	2.3	1045	1717

^a valeurs obtenues par SEC/MALLS (éluant : 0,1 M LiNO₃)

^b valeurs obtenues par viscosimétrie à faible cisaillement

La SEC/MALLS a permis de déterminer les valeurs des masses molaires des différents HA mais également leur viscosité intrinsèque en masse [η]_w, qui s'accroît avec la longueur de la chaîne comme ce qui est attendu. La viscosimétrie à faible cisaillement permet la détermination du C*, qui est la concentration à l'intersection des deux droites correspondant respectivement au régime dilué et au régime semi-dilué sur la courbe log(η_{spe}) = f(log([C])) (Figure B-19), où C est la concentration massique (en g.L⁻¹) et η_{spe} la viscosité spécifique, définie par la relation :

$$\eta_{spe} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (\text{B18})$$

Où η est la viscosité de la solution et η₀ la viscosité du solvant. La C* a ainsi été déterminée dans l'eau Milli-Q et dans une solution de NaCl 0,15 M pour tous les échantillons. Nous n'avons distingué qu'une seule intersection, il n'est donc pas possible dans ce cas de distinguer le C* du C**. L'acide hyaluronique étant un polyélectrolyte, la présence de sel doit impacter les valeurs obtenues. Le HA est un polyanion, les charges négatives présentes au sein de chaque unité vont

tendre à maximiser la distance les séparant les unes par rapport aux autres et la chaîne va donc être étendue. La présence de sel va apporter des charges positives et négatives supplémentaires au sein de l'environnement, qui vont interagir avec celles du polyélectrolyte, qui seront ainsi écrantées. Les répulsions électrostatiques au sein du polymère sont ainsi amoindries et ce dernier pourra adopter une conformation en pelote moins expansée. Lorsque la concentration critique de recouvrement est atteinte, les chaînes polymères isolées entrent en contact et finissent par être enchevêtrées entièrement au-delà de la concentration critique d'enchevêtrement C^{**} (Figure B-15). Les polyélectrolytes sont plus étendus en l'absence de sel, leur volume hydrodynamique sera donc plus important et ils se recouvriront à des concentrations plus basses. C'est ce qui a été observé, avec une augmentation systématique du C^* en présence de sel pour chaque HA testé (Tableau B-1). On observe également de façon logique que la C^* diminue lorsque la longueur de chaîne du polysaccharide augmente.

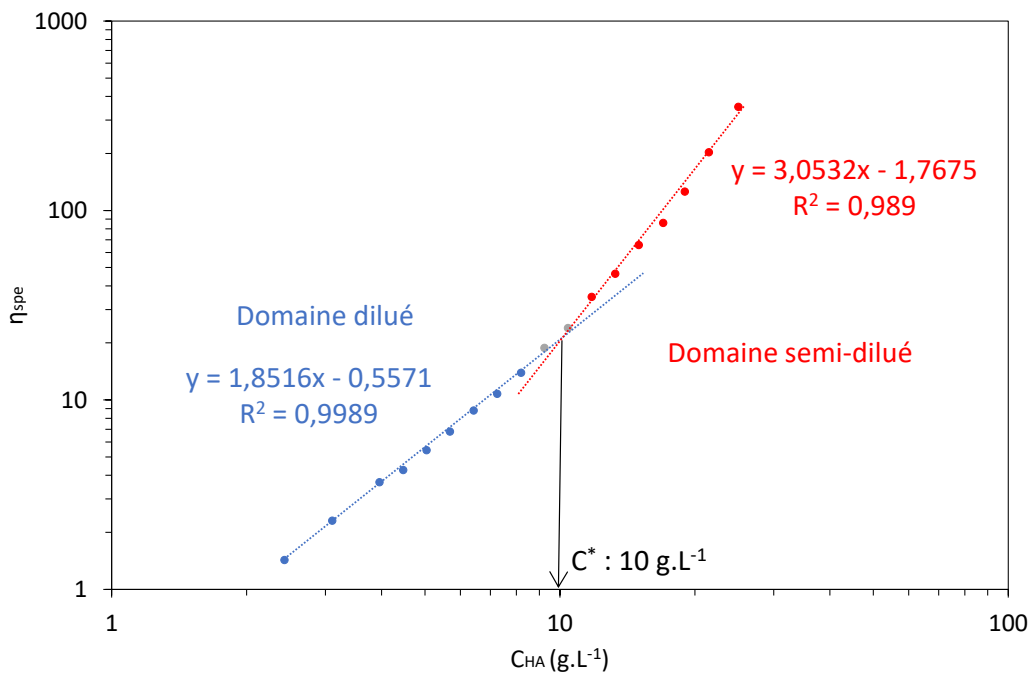


Figure B-19 Mesure de la C^* du HA_{140k} dans une solution de NaCl 0,15 mol.L⁻¹.

Il est également possible de déterminer la viscosité intrinsèque $[\eta]$ à partir des mesures viscosimétriques en traçant la courbe de Huggins, à savoir la représentation de l'évolution de la viscosité réduite η_{red} en fonction de la concentration massique (Figure B-20). η_{red} est défini par la relation suivante :

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{spe}}{C} \quad (B19)$$

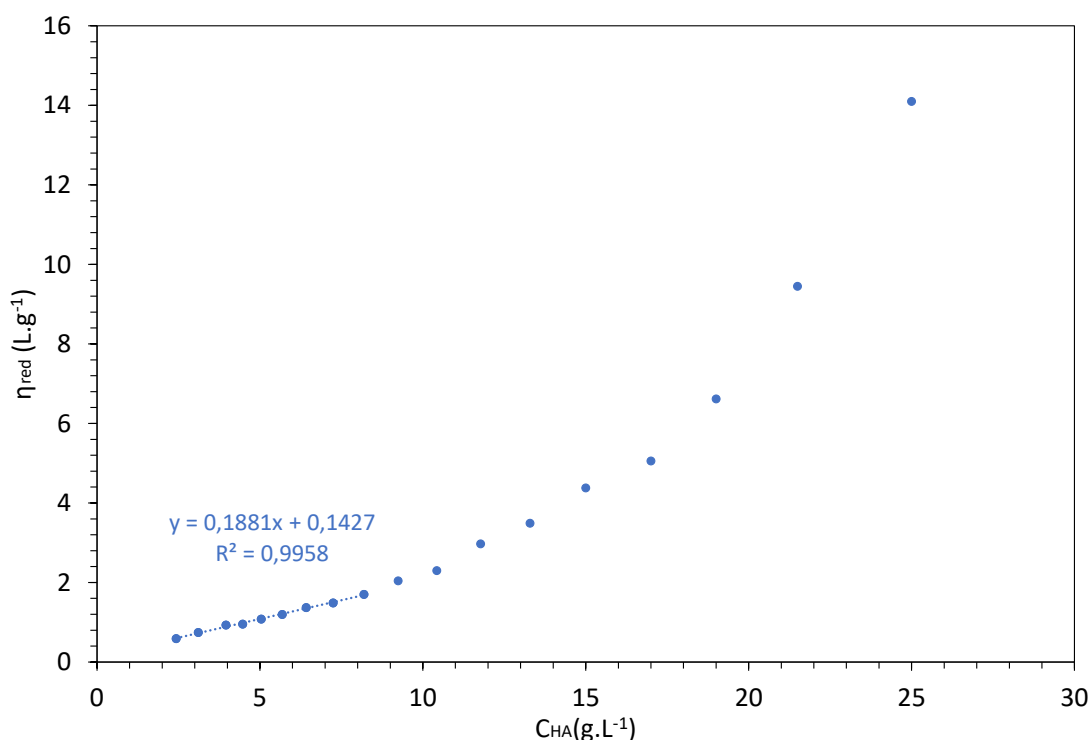


Figure B-20 Mesure de $[\eta]$ à partir de la courbe de Huggins (HA_{140k} dans NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$).

$[\eta]$ s'obtient à partir de la courbe de Huggins en extrapolant la valeur de η_{red} à concentration nulle (Figure B-20). Ces mesures sont effectuées en présence d'une force ionique suffisante (ici NaCl $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$) pour éviter un effet électrovisqueux provoqué par les répulsions électrostatiques des charges du polyélectrolyte aux faibles concentrations. Ce phénomène conduit en effet à une détermination très délicate de la viscosité intrinsèque (nécessitant d'employer la méthode de Fuoss ou de Fedors). On observe de façon attendue que la viscosité intrinsèque augmente avec la longueur de la chaîne (Tableau B-1). La viscosité intrinsèque en masse $[\eta]_w$ a été quant à elle déterminée par SEC/MALLS et a également été reportée dans le Tableau B-1. On observe la même évolution, par contre, on peut constater un écart entre les valeurs de $[\eta]_w$ et $[\eta]$, avec des valeurs systématiquement plus élevées de $[\eta]_w$. Il convient de noter toutefois que la concentration en électrolyte était plus faible dans l'éluant employé en SEC/MALLS, qui consistait en une solution de LiNO_3 $0,1 \text{ M}$, de concentration plus faible donc, ce qui va entraîner un effet d'écran moins marqué sur les chaînes polyélectrolyte. De plus $[\eta]_w$, liée à M_w , n'est pas tout à fait équivalente à $[\eta]$, liée à M_v (masse molaire moyenne viscosimétrique). Cette valeur est donc donnée pour indication.

4.1.2 Conversion en sel de tétrabutylammonium

4.1.2.1 Contexte

Les fonctionnalisations de l'acide hyaluronique entreprises au cours de cette thèse ont été effectuées soit en milieu aqueux, soit en milieu organique aprotique polaire (DMSO, DMF et acétonitrile). Sous forme de sel de sodium, le HA est parfaitement soluble en milieu aqueux, bien que sa dissolution puisse prendre du temps dans le cas des dérivés de forte masse du fait de la haute viscosité des solutions obtenues. Il est par contre insoluble dans les solvants organiques et nécessite d'être converti soit sous forme acide, soit sous forme de sel de tétrabutylammonium pour pouvoir être dissout en milieu organique aprotique polaire. La forme de sel de tétrabutylammonium est plus avantageuse car les ions carboxylates seront *a priori* plus nucléophiles que les acides carboxyliques.

4.1.2.2 Réaction

La conversion de l'acide hyaluronique sous forme de sel de tétrabutylammonium a été effectuée en deux étapes : le HA a tout d'abord été acidifié avec une résine Amberlite échangeuse d'ions cationique (H^+), puis a été neutralisé avec de l'hydroxyde de tétrabutylammonium (Figure B-21).

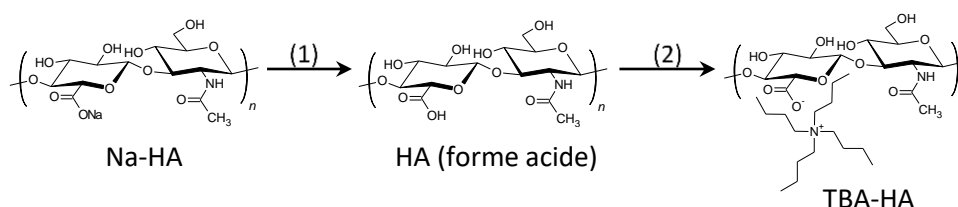


Figure B-21 Conversion du Na-HA en TBA-HA en deux étapes : (1) acidification avec une résine échangeuse d'ions (H^+) et (2) neutralisation avec du TBA-OH.

A notre connaissance, peu d'études mentionnent le pH où l'acide hyaluronique est neutralisé (entièrement sous forme de carboxylate) sans excès de base, qui serait alors présente en temps qu'impureté et pourrait engendrer une dégradation du HA par β -élimination. Un dosage d'une solution d'acide hyaluronique ($0,099 \text{ mol.L}^{-1}$, 10 mL), converti au préalable sous forme acide, a ainsi été réalisé avec de la soude 0,1 M (merci à mes deux stagiaires, Bilel Bennacer et Koceila Boundaoui pour leur initiative). La courbe de dosage est présentée Figure B-22. Le pH à l'équivalence est situé vers 7,7. L'importance est donc de se placer à un pH proche qui soit dans la zone du saut de pH (où une très faible variation de la quantité de base entraînera

une forte variation du pH). (Note : le volume équivalent n'est que de 8,3 mL, mais peut s'expliquer par la présence d'humidité au sein du HA employé ce qui a pu fausser les masses. Le but était ici surtout de mesurer le pH à l'équivalence et non d'effectuer un dosage précis).

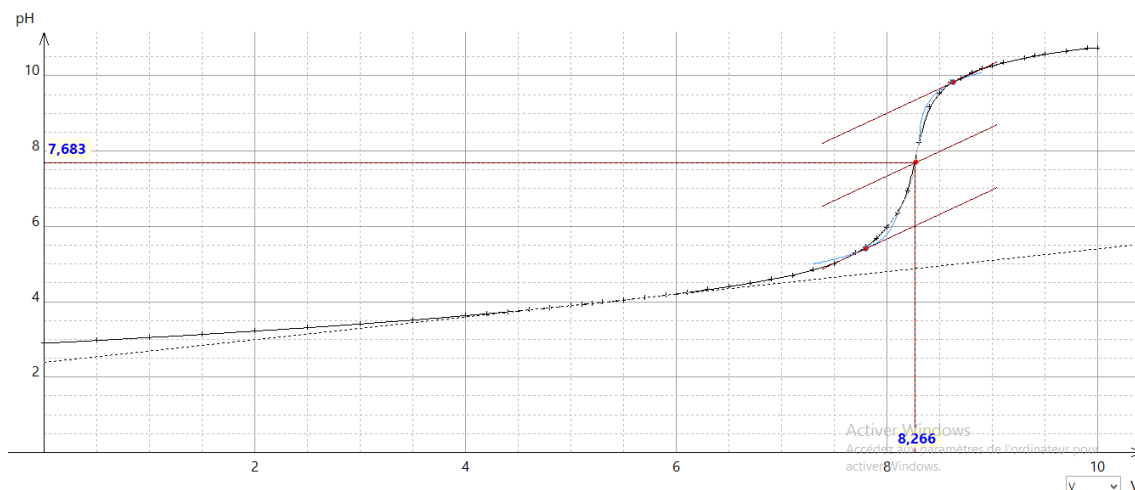


Figure B-22 Courbe de neutralisation de l'acide hyaluronique ($0,099 \text{ mol.L}^{-1}$) par la soude ($0,1 \text{ M}$).

Protocole de conversion du Na-HA en TBA-HA.

Acidification du HA (forme sel de sodium) :

Le protocole est identique pour tous les différents lots d'acide hyaluronique. 5 g de HA sont dissouts pendant une nuit dans 830 mL d'eau distillée à température ambiante. La viscosité des solutions de HA rend très délicat leur acidification par passage sur une colonne. La résine cationique échangeuse d'ions (H^+) a donc été directement versée de la colonne vers la solution de HA, qui a été laissée sous agitation pendant une nuit. La résine est ensuite retirée de la solution par filtration sur verre fritté de porosité 2. La solution obtenue est ensuite directement neutralisée en suivant le protocole ci-après.

Neutralisation du HA (forme acide) par de l'hydroxyde de tétrabutylammonium :

La solution de HA acide est placée dans un grand b cher et mise sous agitation (agitateur magnétique). Le pH de cette solution est alors mesuré : il est généralement compris entre 2.5 et 3 (si la valeur est plus  lev e, il se peut que l'acidification n'ait pas été complète). La solution de TBAOH (54.0-56.0 % en masse) est d'abord dilu e 5 fois (8 mL + 32 mL d'eau Milli-Q) afin d'éviter les transitions de pH trop brutales. Elle est ensuite vers e goutte à goutte jusqu'à environ pH 8. Dans un premier temps, l'addition peut se faire rapidement car le pH n'évoluera que peu. Vers

un pH compris entre 4,5 et 5, le pka est dépassé et il faut commencer à ajouter le TBAOH plus prudemment, avant de devoir vérifier le pH après chaque goutte ajoutée (vers pH 6,5-7). Pour le HA_{990k} et le HA_{1200k}, les solutions sont très visqueuses, ce qui rend l'addition de TABOH plus délicate car l'homogénéisation de la solution prend alors plus de temps. L'utilisation d'un agitateur mécanique au lieu de l'agitateur magnétique serait dans ce cas peut être plus efficace, elle n'a cependant pas été tentée. Une fois la neutralisation achevée, le contenu du bécher est immédiatement versé dans des barquettes qui sont placées au congélateur à -20 °C. La solution de TBA-HA est alors lyophilisée. Le rendement de la réaction est généralement très élevé avec des valeurs obtenues d'environ 90 %.

Note : la masse molaire de l'unité disaccharide du Na-HA est de 401.3 g.mol⁻¹ et celle du TBA-HA est de 620.8 g.mol⁻¹.

Afin de vérifier la bonne conversion du HA sous forme de sel de tétrabutylammonium, la RMN a été la méthode employée. Pour ce faire, le protocole de Ret *et coll.*, présenté section 2.1 de ce chapitre, a été utilisé⁶. Pour rappel, le TBA-HA à analyser est d'abord dissout dans du D₂O une nuit, puis du NaOD (30 % en masse dans le D₂O) est ajouté de façon à obtenir une concentration en NaOD de 0.125 M. La concentration massique finale en TBA-HA est de 5 g.L⁻¹. Un exemple de spectre obtenu est présenté Figure B-23.

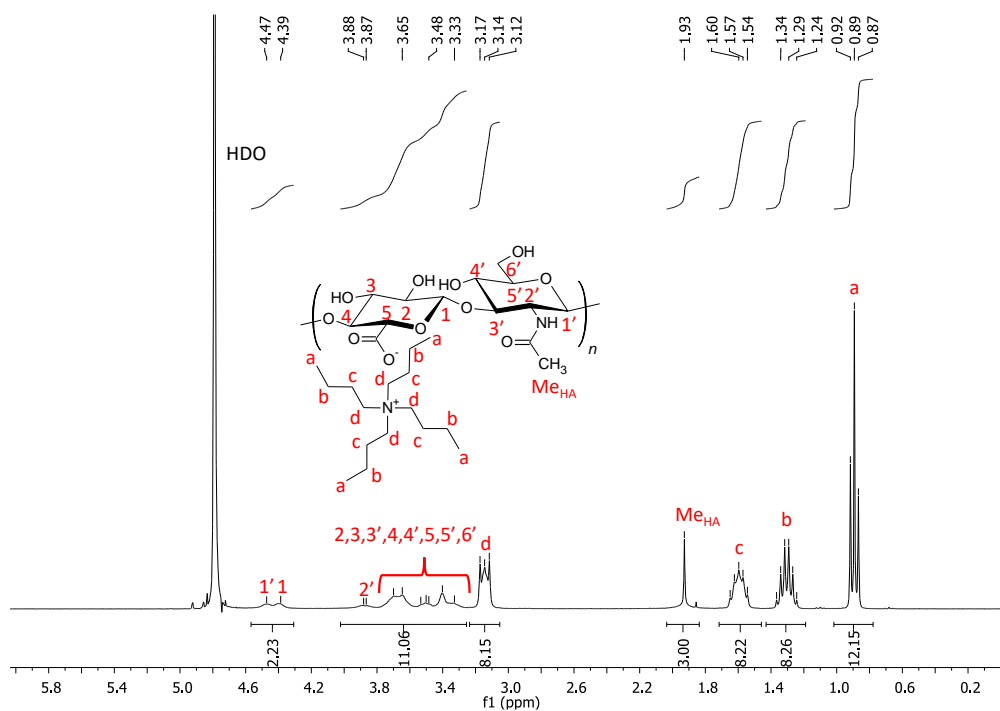


Figure B-23 Spectre RMN du TBA-HA_{990k} (5 g.L⁻¹, D₂O, NaOD 0,125 M).

La conversion en TBA-HA est complète lorsque l'intégration totale des pics correspondant aux protons H_b, H_c ou H_d du tétrabutylammonium se situant respectivement à 3,14, 1,57 ou 1,29 ppm valent 8 et lorsque celle du pic correspondant au H_a du TBA à 0,89 ppm vaut 12 (pic de référence pour l'intégration : méthyle du HA à 1,93 ppm). C'est le cas sur le spectre présenté. Le TBA-HA obtenu peut être dissout dans du DMSO ou du DMF, ce qui va permettre d'effectuer certaines réactions qui seront présentées par la suite.

4.2 La Jeffamine[®] M2005

La Jeffamine[®] M2005 nous a été gracieusement fournie par Huntsman Holland BV. C'est un copolymère bloc de type polyétheramine et plus précisément de polypropylène glycol PPG (29 unités) et de polyéthylène glycol PEG (6 unités), le bloc PPG étant terminé par une fonction amine, tandis que le bloc PEG est terminé par une fonction méthyle (Figure B-24).

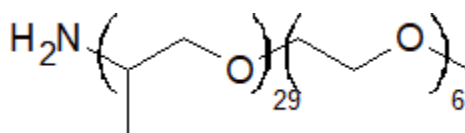


Figure B-24 Structure de la Jeffamine[®] M2005.

D'après les données du fabricant, la M2005 présente une LCST à 14 °C. Pour rappel, il s'agit de la température de point trouble la plus basse du composé en solution à une concentration donnée. Des mesures de points troubles ont été réalisées avec le spectrophotomètre UV-vis à des concentrations en M2005 de 0,1 g.L⁻¹ dans diverses solutions, à savoir l'eau Milli-Q (pH : 10,5, du fait de la présence d'une fonction amine), le tampon PBS (pH : 7,4 tamponné ; concentration saline : 0,15 mol.L⁻¹) et dans du HCl à 0,01 M (pH : 2,5). La rampe de chauffage a été effectuée à 1 °C.min⁻¹. Le rayonnement incident était de 600 nm. Les mesures ont été réalisées en absorption et les points troubles ont été définis comme la température à l'intersection de la ligne de base et de la tangente au point d'inflexion de la courbe d'absorbance. Les résultats sont présentés Figure B-25. On observe dans l'eau Milli-Q un point trouble vers 18,7 °C, valeur qui est supérieure à 14 °C. Nous n'étions donc pas dans les conditions de concentration où l'on obtient la LCST. Sur la courbe de refroidissement, on observe une légère hystérésis avec une redissolution du composé à une température inférieure à celle de précipitation. Dans le cas de la solution dans le PBS, la température de point trouble est légèrement inférieure que dans l'eau Milli-Q, avec une valeur de 16,8 °C. Ceci peut s'expliquer par la présence de sels lyotropes, comme le NaCl, contenu dans le tampon PBS. Ses

derniers ont en effet tendance à « accaparer » le solvant, provoquant ainsi la précipitation des autres substances moins solubles présentes dans la solution par un phénomène de relargage, déjà observé sur d'autres polymères thermosensibles comme le PNIPAM^{19,20}. La courbe de refroidissement présente une pente nettement plus faible que la courbe de chauffage et peut indiquer une sédimentation de l'échantillon. Dans le cas de la solution en milieu acide, le comportement observé est surprenant, deux transitions étant visibles sur la courbe aller, avec l'échantillon qui présente un point trouble vers 18,7 °C (la mesure est moins précise, car la pente est moins marquée) et qui se redissout vers 35,5 °C. La courbe de refroidissement, quant à elle, est superposée à la ligne de base et ne présente qu'une très légère remontée de l'absorbance vers 17 °C pour rediminuer juste après vers la ligne de base. Il est difficile de comprendre les phénomènes impliqués à cette échelle macroscopique d'observation même si le rôle des fonctions amines protonées à ce pH est probablement impliqué. Il est à noter que les résultats sont cohérents avec ce qu'avait observé Christophe Pottier au cours de sa thèse au sein du même laboratoire avec la Jeffamine® D2000 thermosensible, composée uniquement de PPG, de masse molaire similaire à la M2005 et présentant deux fonctions amines terminales²¹.

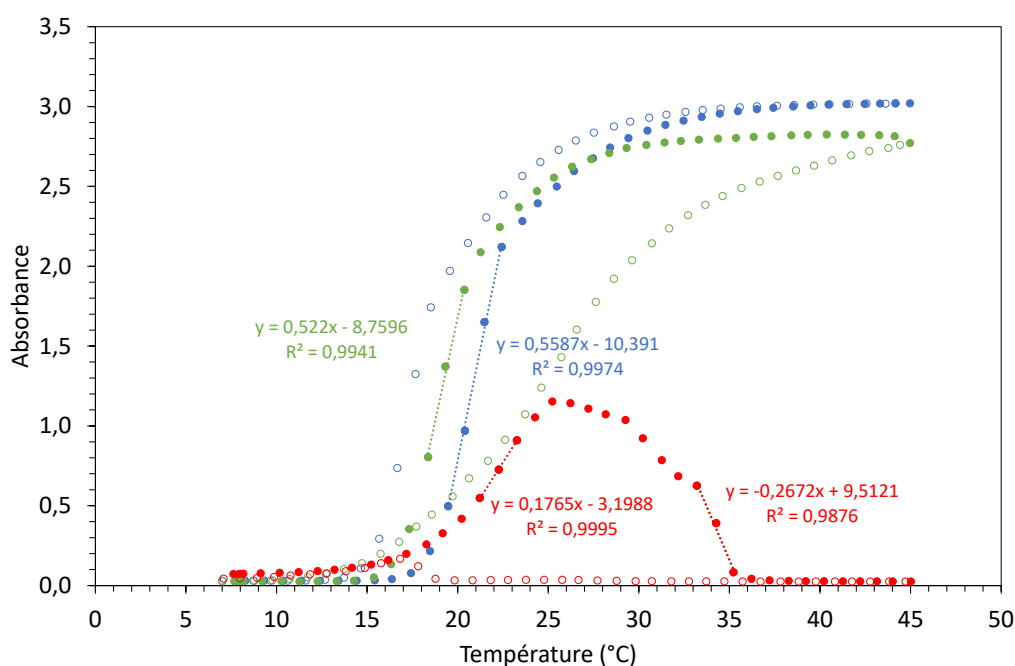


Figure B-25 Détection des points troubles de diverses solutions de M2005 à 10 g.L⁻¹ (aller : symboles pleins, retour : symboles vides, bleu : Milli-Q, vert : tampon PBS et rouge : HCl 0,01 M) avec le spectrophotomètre UV-vis

Afin de mieux comprendre les phénomènes observés avec le spectrophotomètre UV-vis, des mesures ont été réalisées en DDL avec le Zetasizer à l'échelle nanoscopique, qui peut révéler des différences notables avec l'échelle macroscopique²². Les solutions ont été filtrées à basse température (0,45 μm) afin de supprimer d'éventuelles poussières. Les résultats sont représentés Figure B-26 (eau Milli-Q), Figure B-27 (tampon PBS) et Figure B-28 (HCl 0,01M). Aux faibles températures, la M2005 est essentiellement présente sous la forme d'unimères d'environ 2,9 nm de diamètre. On constate dans les trois cas l'apparition d'agrégats de plus de 100 nm à des températures inférieures au point trouble que ce soit en distribution en volume ou en intensité, ce qui s'explique par la différence d'échelle d'observation, leur taille demeurant inférieure au μm à cette température. Comme il a déjà été expliqué section 3.4 de ce chapitre, il y a une disparité assez marquée entre les distributions en volume et en intensité, cette dernière rendant les distributions de forte taille plus visibles par rapport à celles de faible taille.

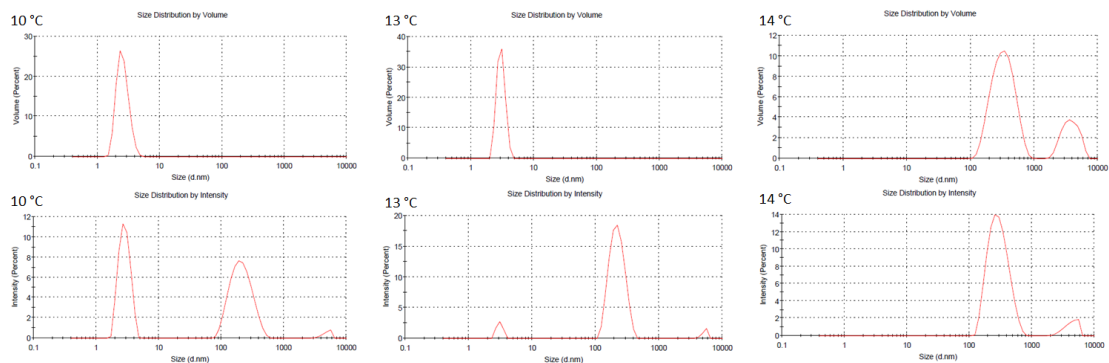


Figure B-26 Evolution des distributions de taille des particules de M2005 (dans l'eau Milli-Q) avec la température (haut : distribution en volume, bas : distribution en intensité).

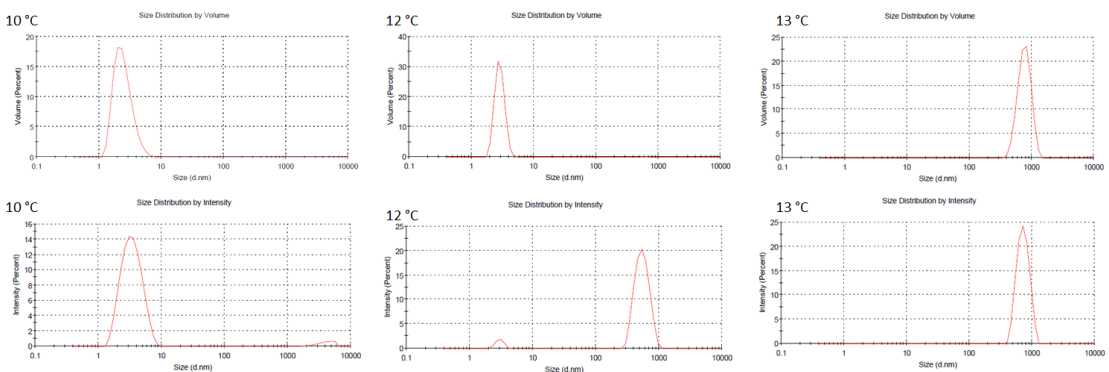


Figure B-27 Evolution des distributions de taille des particules de M2005 (dans le PBS) avec la température (haut : distribution en volume, bas : distribution en intensité).

Dans le cas de la solution de M2005 dans du HCl à 0,01 M on observe une réduction de la taille des particules au-delà de 35 °C, avec notamment la présence d'une population d'environ 11 nm prédominante lorsque l'on considère la distribution en volume. Cette taille a également été observée en refroidissant le mélange à 30 °C (courbe non montrée pour ne pas surcharger le graphique). Si le mélange est limpide à l'échelle macroscopique, il semble donc qu'il n'y ait pas présence d'unimères en solution, mais de structures plus complexes. En milieu acide, l'amine terminale de la M2005 sera protonée et donc hydrophile, là où la chaîne polymère est rendue hydrophobe par action de la température. On peut donc supposer que ces structures sont de nature micellaire. Lors du refroidissement, une augmentation de la taille des particules au-delà de 100 nm a été observée vers 14 °C, ce qui coïncide bien avec la légère augmentation de l'absorbance observée sur la courbe retour en spectroscopie UV-vis (Figure B-25, cercles rouges vides).

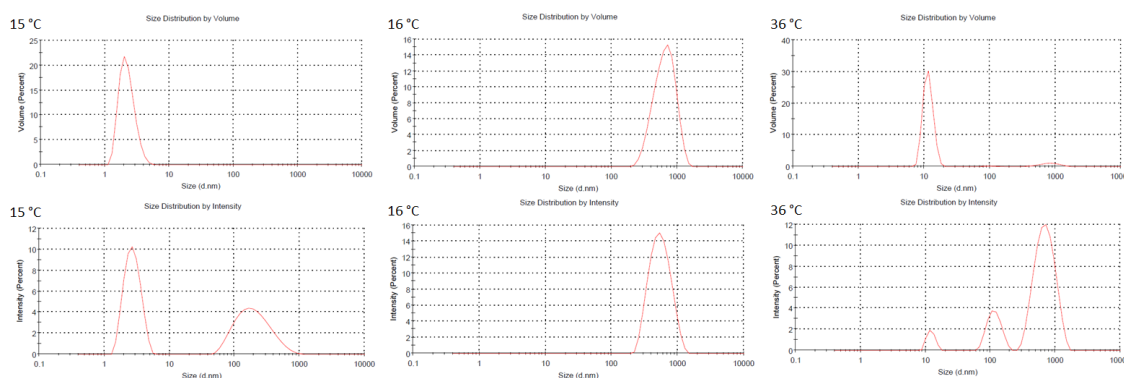


Figure B-28 Evolution des distributions de taille des particules de M2005 (dans HCl 0,01 M) avec la température (haut : distribution en volume, bas : distribution en intensité).

4.3 Les polyoxazolines

Les oxazolines utilisées au cours de cette thèse ont été la 2-méthyl-2-oxazoline (MeOx), la 2-isopropyl-2-oxazoline (*i*PrOx), la 2-*n*-butyl-2-oxazoline (*n*BuOx) ainsi que la 2-*n*-propyl-2-oxazoline (*n*PrOx). La MeOx permet d'obtenir par polymérisation du PMeOx qui est très hydrophile et n'a aucune propriété thermosensible. Cependant, sa structure est la plus simple du fait qu'elle a la chaîne alcane la plus courte et elle est meilleur marché que les deux autres. Elle a donc été retenue pour effectuer les premiers tests de greffage sur l'acide hyaluronique, ce qui sera traité chapitre D. L'*i*PrOx donne la P*i*PrOx, qui est thermosensible avec un point trouble estimé dans la littérature à 47 °C à 20 g.L⁻¹ en solution aqueuse pour un DP de 25²³ et de 39 °C à 10 g.L⁻¹ en milieu tampon PBS pour un DP de 88²⁴. Ce point trouble peut être abaissé si

ce monomère est copolymérisé avec un comonomère plus hydrophobe, comme le *n*BuOx. Il a été jugé plus intéressant que le *n*PrOx qui donne des points troubles inférieurs vers 24-25 °C une fois polymérisé (DP : 25 à 20 g.L⁻¹ en solution aqueuse²³ et DP : 88 à 10 g.L⁻¹ en milieu tampon PBS²⁴). Ainsi les copolymères de *Pi*PrOx-co-*Pn*BuOx (le *Pn*BuOx est totalement hydrophobe) donneront une plus large gamme de températures de points troubles dans le cadre de cette étude par rapport à un copolymère de *Pn*PrOx-co-*Pn*BuOx. En outre, le système *Pi*PrOx-co-*Pn*BuOx a déjà été bien étudié, ce qui nous donne une bonne base de départ^{23,25}. Enfin, les chaînes alcane de l'*i*PrOx et du *n*BuOx n'ont qu'un seul atome de carbone d'écart, ce qui devrait nous permettre de contrôler relativement aisément la température de point trouble avec la composition monomérique du copolymère. En effet, l'incorporation d'une oxazoline encore plus hydrophobe, de chaîne alcane plus longue, telle la 2-nonyl-2-oxazoline, entraînerait une trop forte variation du point trouble : une étude a ainsi montré l'incorporation d'une seule unité de ce monomère au sein d'une chaîne de *Pi*PrOx de DP 25 a fait passer le point trouble de la chaîne de 47 °C à 15 °C²³. D'plus, pour des chaînes aussi courtes, il y a une forte probabilité que le copolymère le moins long ne soit pas présent au sein de toutes les chaînes²⁶. Ces dernières auront donc des propriétés fortement hétérogènes.

Pour rappel, la polymérisation des oxazolines est effectuée par ouverture de cycle cationique (CROP). L'amorçage est effectué avec une molécule capable de générer un acide de Lewis et, à l'inverse, la terminaison est effectuée avec une base de Lewis (Figure A-31)²⁷. Deux conditions de polymérisation ont été employées au cours de cette thèse : par irradiation micro-onde ou par voie thermique. L'avantage du micro-onde est qu'il permet d'employer une température et une pression plus élevées, ce qui accroît considérablement la cinétique de la réaction, une polymérisation complète pouvant être réalisée en 30 min, au lieu d'une journée pour la voie thermique. L'inconvénient est que les tubes pouvant être employés pour réaliser la réaction ne permettent pas d'utiliser de grandes quantités de solvant, ce qui limite l'échelle de la réaction. La polymérisation de copolymères de *Pi*PrOx-co-*Pn*BuOx a donc été réalisée dans un premier temps au micro-onde sur de petites quantités en faisant varier la composition et la longueur de chaîne afin d'évaluer les propriétés thermosensibles de ces derniers. Les deux monomères ont été polymérisés simultanément afin d'obtenir des copolymères statistiques.

Polymérisation du *PiPrOx-co-PnBuOx* au micro-onde :

Le protocole est décrit pour obtenir un DP cible de 40 et pour un ratio *iPrOx/nBuOx* de 80/20. Il est basé sur des travaux antérieurs au sein de l'équipe Matériaux Macromoléculaires MM du laboratoire PBS^{14,28,29}. Du *p*-toluènesulfonate de méthyle (18,6 mg, 0,1 mmol) est dissout dans 1,5 mL d'acétonitrile anhydre et introduit dans un tube adapté au micro-onde. L'*iPrOx* (362,11 mg, 3,2 mmol) et le *nBuOx* (101,74 mg, 0,8 mmol) sont ensuite ajoutés dans le tube sous agitation. On fait ensuite buller du diazote pendant environ 15 min au sein de la solution, puis le tube est immédiatement transféré au sein du système micro-onde, où la polymérisation est effectuée pendant une demi-heure avec les paramètres suivants : la température est fixée à 140 °C, la puissance du micro-onde à 150 W et la pression à 6 bars. Une fois la pression relâchée par l'appareil après que le programme ait été effectué, le tube est retiré, un très léger volume du milieu réactionnel est prélevé à la seringue afin d'être analysé par la suite en RMN pour vérifier le DP (Figure B-29). Le contenu du tube est ensuite placé dans un ballon monocol, mis sous agitation à température ambiante, puis on y ajoute 800 µL d'une solution d'hydroxyde de potassium KOH dans le méthanol (1 M). La solution est laissée sous agitation pendant 24 h. Elle est ensuite évaporée sous vide, le précipité dissout dans de l'eau Milli-Q et dialysé pendant plusieurs jours contre de l'eau Milli-Q dans des membranes de seuil de rétention de 500-1000 Da (Repligen, MA, USA), en changeant l'eau régulièrement. Le contenu des membranes est ensuite congelé puis lyophilisé. Du fait du changement trop fréquent de l'eau distillée (afin d'avoir une conductivité des eaux de dialyse aussi proche de celle de l'eau Milli-Q que possible) et de la faible M_n théorique du polymère trop proche du seuil de rétention des membranes (3511 g.mol⁻¹ pour le cas décrit dans ce protocole), le rendement obtenu n'était que de l'ordre de 25-30 %. Cela ne nous a pas empêché d'effectuer les analyses que nous souhaitions. Il serait délicat à ce niveau d'essayer de réduire davantage le seuil de rétention des membranes car on se rapprocherait de la masse molaire de certaines molécules employées (notamment celle du *p*-toluènesulfonate de méthyle, qui est de 186,23 g.mol⁻¹). Etant donné que par la suite, ces polymères seront greffés sur une chaîne de HA bien plus longue, ce n'est pas un problème majeur dans notre cas. Par la suite, les échantillons seront dénommés de la façon suivante : *PiPrOx*_{DP(*PiPrOx*)}-*CO-PnBuOx*_{DP(*PnBuOx*)}, où DP(*PiPrOx*) est le DP de la chaîne *PiPrOx* et DP(*nBuOx*) et le DP de la chaîne *PnBuOx*.

Le DP ainsi que le ratio *iPrOx/nBuOx* peuvent être déterminés par RMN (Figure B-29) à partir du volume prélevé juste avant l'étape de terminaison. Les pics ont été attribués en

s'aidant d'études déjà existantes²⁴. Le solvant employé est le CDCl_3 . On observe sur le spectre RMN les pics caractéristiques du copolymère : les méthylènes (CH_2) du squelette polymère à 3,43 ppm, le méthyle à l'extrémité α de la chaîne à 3,05 ppm, le CH du *PiPrOx* à 2,64 et 2,87 ppm, les deux méthyles du *PiPrOx* à 1,08 ppm, le méthyle du *PnBuOx* à 0,90 ppm et les méthylènes du *PnBuOx* à respectivement 1,22 ppm, 1,57 ppm et 2,24 ppm. On observe également des pics associés au tosylate provenant de l'amorceur, qui est présent sous forme de paire d'ions avec l'oxazolinium terminal du polyoxazoline qui n'a pas été terminé par l'action d'un nucléophile à ce stade de la réaction. Le méthyle du tosylate est ainsi visible sous forme de singulet à 2,33 ppm, et les protons aromatiques sont visibles sous forme de doublet à respectivement 7,15 ppm (position ortho par rapport au méthyle) et à 7,68 ppm (en position méta par rapport au méthyle). On notera qu'il n'y a qu'une seule distribution de pics aromatiques, ce qui signifie que l'amorceur est présent exclusivement sous la forme tosylate et a donc bien amorcé la réaction.

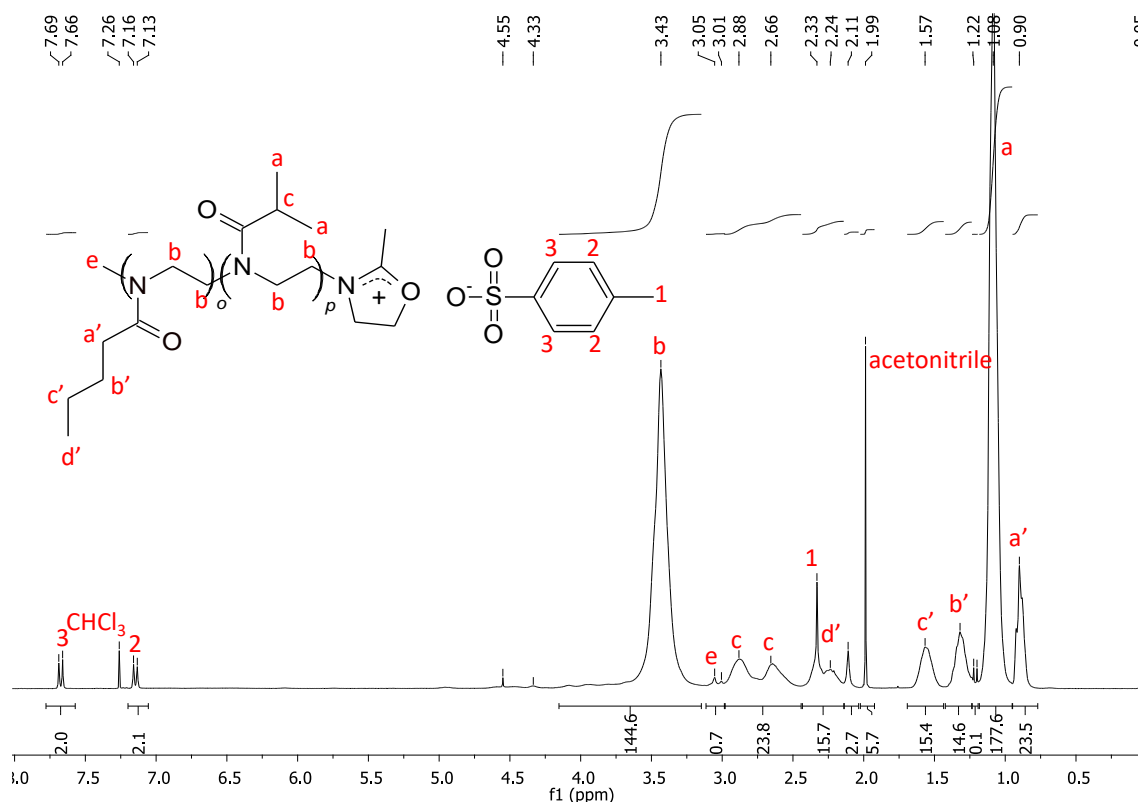


Figure B-29 Spectre RMN ^1H du $\text{PiPrOx}_{28}\text{-co-PnBuOx}_8$ DP = 36 (solvant : CDCl_3).

Le degré de polymérisation peut être estimé en comparant la valeur de l'intégration d'un pic correspondant à une fonctionnalité présente au sein de l'unité de répétition à celle d'une fonctionnalité présente en bout de chaîne, à l'extrémité α (amorçage) ou ω (terminaison).

L'idéal serait de pouvoir se servir du méthyle à l'extrémité α , car ce dernier est présent en bout de chaîne. Cependant, le pic est présent sous plusieurs distributions (3,05 ppm et 3,01 ppm) et est assez élargi, ce qui rendrait le calcul peu précis. De plus, dans le cas du *PiPrOx-co-PnBuOx*, il est très proche du pic associé au CH du *PiPrOx*, dont la valeur d'intégration est nettement supérieure, ce qui va davantage diminuer la précision de la mesure. Notre choix s'est donc porté sur les pics aromatiques du tosylate, nettement mieux résolus et sortant dans une zone dégagée du spectre. Nous avons opté pour le pic à 7,68 ppm car il est le plus écarté du pic associé à la fraction hydrogénée du solvant à 7,26 ppm (CHCl_3). Pour ce qui est du pic associé à une fonctionnalité du motif de répétition, notre choix s'est naturellement porté sur les méthylènes du squelette polymère, qui sortent dans une zone relativement dégagée à 3,5 ppm et présentent l'avantage d'être présents au sein des deux unités du copolymère. Le DP est donc finalement déterminé par la formule suivante :

$$DP_{POx} = \frac{I_{3,5ppm}}{4} \times \frac{2}{I_{7,68ppm}} \quad (\text{B20})$$

Où $I_{3,5ppm}$ correspond à la valeur de l'intégration du pic associé aux méthylènes du squelette du copolymère et $I_{7,68ppm}$ correspond à celle du pic associé aux protons aromatiques du tosylate en position méta par rapport au méthyle. Dans le cas du spectre montré Figure B-29, le DP_{POx} vaut donc 36. La polymérisation a été effectuée avec les valeurs du protocole décrit précédemment, avec un degré de polymérisation théorique de 40. La valeur expérimentale est donc très proche de ce que l'on devrait obtenir.

Il reste maintenant à déterminer le ratio *iPrOx/nBuOx*. Pour ce faire, il faut à nouveau comparer les valeurs de deux intégrations, cette fois-ci associées à des pics de fonctionnalités présentes respectivement au sein de l'unité *iPrOx* et *nBuOx*. Notre choix s'est porté sur le pic associé aux deux méthyles de l'*iPrOx* et à celui associé au méthyle du *nBuOx*, car ils donnent les valeurs d'intégration les plus élevées. Les formules utilisées sont les suivantes :

$$iPrOx\% = \frac{\frac{I_{1,1ppm}}{6}}{\frac{I_{1,1ppm}}{6} + \frac{I_{0,9ppm}}{3}} \quad (\text{B21})$$

$$nBuOx\% = \frac{\frac{I_{0,9ppm}}{3}}{\frac{I_{1,1ppm}}{6} + \frac{I_{0,9ppm}}{3}} \quad (\text{B22})$$

Où $I_{1,1ppm}$ correspond à la valeur de l'intégration associée aux deux méthyles de l'*iPrOx* et $I_{0,9ppm}$ est associé à celle du méthyle du *nBuOx*. Dans le cas présenté Figure B-29, on a 79 % d'unités

*i*PrOx et 21 % d'unités *n*BuOx, ce qui est très proche de ce qui était visé (80 % *i*PrOx et 20 % *n*BuOx). Les masses molaires des copolymères ont ensuite été déterminées par SEC avec le dichlorométhane pour éluant. Les résultats seront discutés par la suite dans cette section.

Une série de copolymères a ainsi pu être synthétisée. Leurs points troubles ont été étudiés par spectroscopie UV-vis. Une rampe de température de $0,5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ a été appliquée. La longueur d'onde du rayonnement incident était de 600 nm. Un exemple de courbe obtenue est présenté Figure B-30. Le point trouble a été mesuré dans l'eau Milli-Q et dans une solution de NaCl 0,15 M à des concentrations de $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et de $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

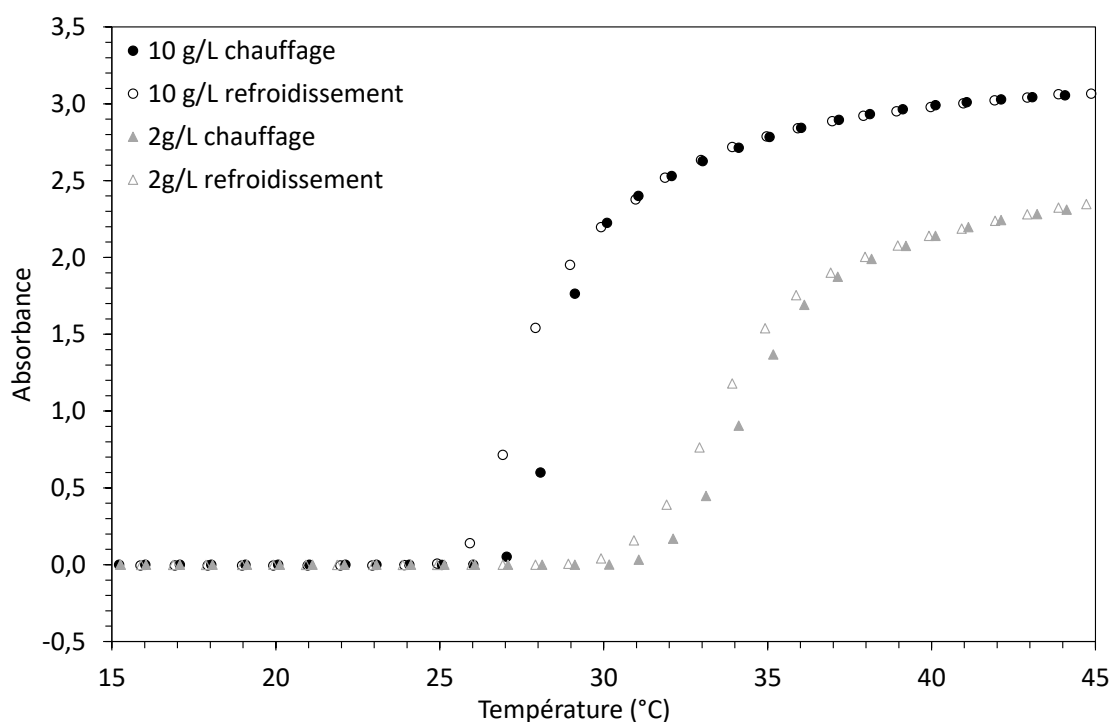


Figure B-30 Evolution de l'absorbance du $PiPrOx_{28}\text{-co-PnBuOx}_8$ dans l'eau Milli-Q ($C : 10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (noir) ou $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (gris)) avec la température.

On peut voir sur la Figure B-30 que l'absorbance suit la ligne de base aux basses températures avant d'augmenter brutalement à partir d'un certain seuil. Cette transition est réversible : l'absorbance finit par rejoindre la ligne de base au cours du refroidissement. La figure met en évidence l'impact de la concentration en polymère sur la réponse thermique : on peut ainsi y voir que le point trouble est situé à une température plus élevée à une concentration de $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ par rapport à $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et que l'absorbance atteint des valeurs moins élevées du fait que la solution est plus diluée et devient donc moins opaque. Les points troubles ont été déterminés

de la même manière que pour la Jeffamine® M2005 (section 4.2 de ce chapitre). Les résultats ont été regroupés au sein du Tableau B-2. On peut y observer que la T_{cp} décroît lorsque l'on augmente le ratio de $nBuOx$ au sein du copolymère. Ceci correspond au comportement attendu, car le $nBuOx$ est plus hydrophobe que l' $iPrOx$ du fait de sa chaîne alcane plus longue. Pour une concentration à 10 g.L^{-1} dans l'eau Milli-Q, les valeurs de T_{cp} sont comprises entre 30 °C pour le copolymère le plus hydrophile (ratio $iPrOx/nBuOx$ de 87/13) et 11 °C pour le plus hydrophobe (ratio $iPrOx/nBuOx$ de 50/50). Les données ont confirmé l'impact de la concentration, avec des valeurs de T_{cp} augmentant de $4\text{-}6 \text{ °C}$ lorsque l'on passe de 10 g.L^{-1} à 2 g.L^{-1} . A l'inverse, ni l'utilisation d'un sel lyotrope (solution de NaCl $0,15 \text{ M}$), ni la modification du DP (de 17 à 36) n'ont eu d'impact sur le T_{cp} , du moins dans le domaine étudié.

Tableau B-2 Evolution de la T_{cp} de copolymères de $PiPrOx-co-PnBuOx$ en fonction de la composition monomérique et du DP.

$iPrOx/nBuOx$ ratio	DP_{POx}	T_{cp} ($^{\circ}\text{C}$) (10 g.L^{-1} in MQ)	T_{cp} ($^{\circ}\text{C}$) (2 g.L^{-1} in MQ)	T_{cp} ($^{\circ}\text{C}$) (10 g.L^{-1} in $0,15 \text{ M}$ NaCl)	T_{cp} ($^{\circ}\text{C}$) (2 g.L^{-1} in $0,15 \text{ M}$ NaCl)	M_n (g.mol^{-1}) (GPC, DCM)	M_w (g.mol^{-1}) (GPC, DCM)
87/13	27	30	36	31	36	1017	2333
72/28	27	25	31	-	-	-	-
58/42	27	14	18	13	18	2063	2364
50/50	27	11	15	11	16	2398	2724
78/22	17	28	32	27	32	1417	1931
79/21	36	28	32	26	31	2600	2972

L'évolution de la T_{cp} en fonction de la teneur en $nBuOx$ au sein du copolymère est représentée Figure B-31. Comme attendu, on voit qu'elle diminue au fur et à mesure que l'hydrophobie du copolymère augmente. Il est donc possible d'ajuster la T_{cp} en faisant varier le ratio entre les monomères.

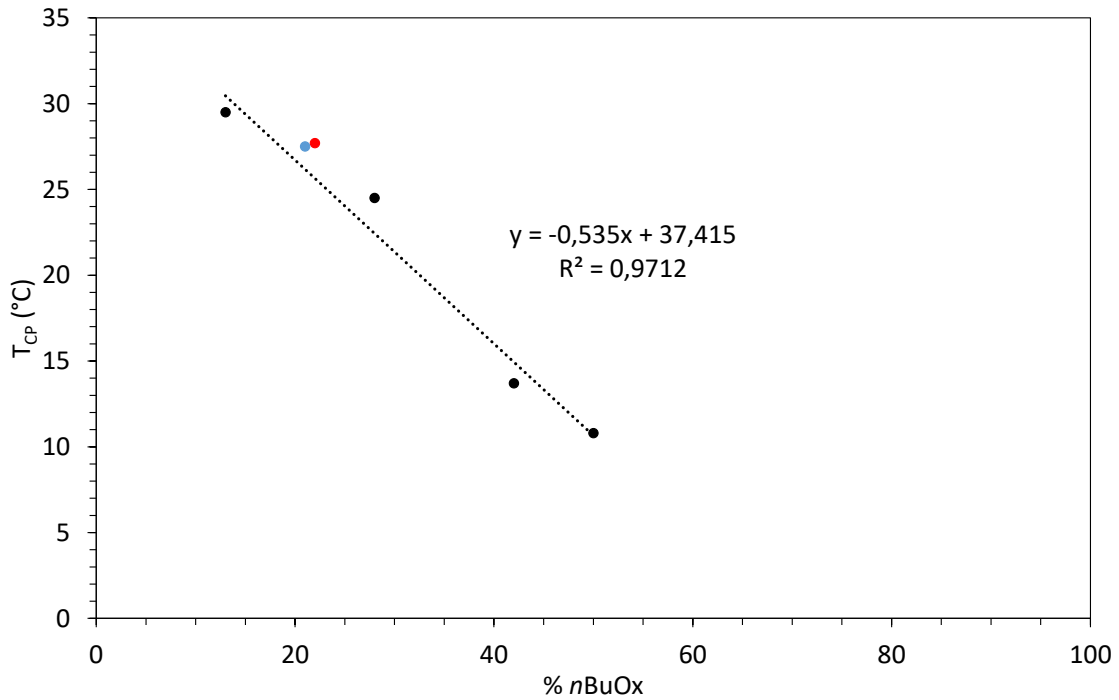


Figure B-31 Evolution de la température de point trouble de *PiPrOx-co-PnBuOx* avec le % d'unités nBuOx au sein du copolymère (symboles noirs : DP 27; symboles bleus : DP 36 et symboles rouges : DP 17) à 10 g.L⁻¹ dans l'eau Milli-Q.

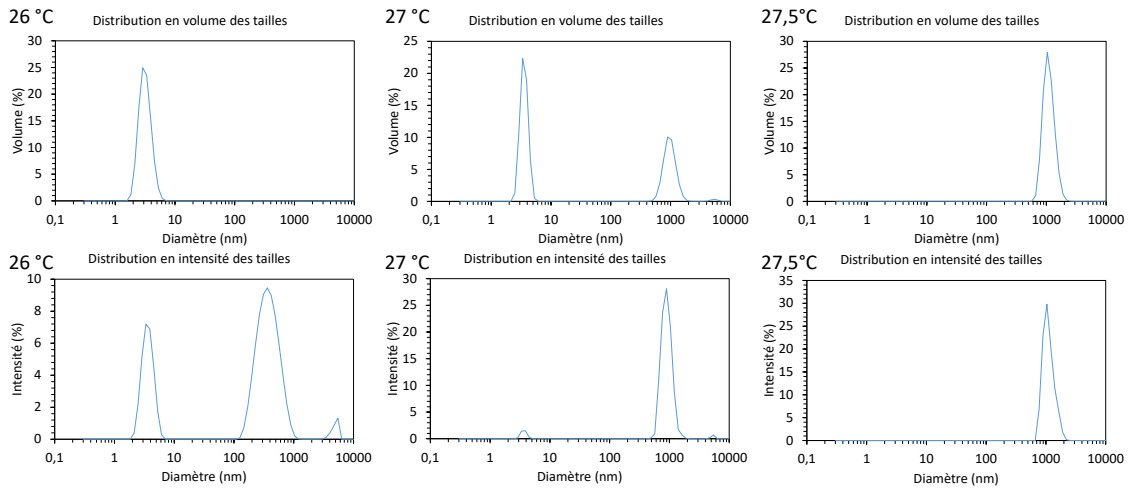


Figure B-32 Evolution des distributions de taille des particules de *PiPrOx₂₈-co-PnBuOx₈* (10 g.L⁻¹, Milli-Q) avec la température (haut : distribution en volume, bas : distribution en intensité).

Les échantillons ont également été analysés par DDL au zetasizer. Des courbes de distribution du *PiPrOx₂₈-co-PnBuOx₈* (DP : 36; ratio *iPrOx/nBuOx* : 79/21) en solution à 10 g.L⁻¹

dans l'eau Milli-Q au niveau de la transition thermique sont représentées Figure B-32. Si la distribution en intensité révèle la présence d'agglomérats y compris à des températures basses (20 °C), la distribution en volume montre une transition nette entre 27 °C et 27.5 °C, ce qui est très proche la T_{cp} ayant été déterminée par spectroscopie UV-vis (28 °C).

On peut observer sur le Tableau B-3 que les transitions en DDL sont observées à des températures très proches des T_{cp} déterminés par UV-vis. Ces résultats sont différents de ceux obtenus pour la Jeffamine® M2005 dans l'eau Milli-Q, où l'on pouvait voir des particules de taille moyenne comprise entre 100 et 1000 nm à des températures inférieures à la T_{cp} , qui finissaient par dépasser les 1000 nm en augmentant davantage la température. Dans le cas des polyoxazolines, la transition est plus abrupte, la taille des particules augmentant brutalement autour de la T_{cp} .

Tableau B-3 Comparaison des T_{cp} des copolymères obtenues avec spectrophotométrie UV-vis et DDL (10 g.L⁻¹, Milli-Q)

Echantillon	<i>i</i> PrOx/ <i>n</i> BuOx ratio	DP _{POx}	T_{cp} (°C) (UV-vis)	T_{cp} (°C) (DDL) ^a	T_{cp} (°C) (DDL) ^b
PiPrOx ₁₉ -co-PnBuOx ₈	72/28	27	25	26	24
PiPrOx ₁₆ -co-PnBuOx ₁₁	58/42	27	14	12	12.5
PiPrOx ₁₄ -co-PnBuOx ₁₃	50/50	27	11	11.5	11.5
PiPrOx ₂₈ -co-PnBuOx ₈	79/21	36	28	27.5	27

^a Estimée à la température du passage d'une distribution en volume prédominante de faible taille à une forte taille

^b Estimée à la température où le diamètre moyen déterminé par l'instrument atteint 1000 nm

Les masses molaires des différents échantillons sont également reportées Tableau B-2. Globalement, ces masses sont inférieures aux résultats théoriques qui auraient dû être obtenus (les M_n devraient être supérieures à 3000 g.mol⁻¹ pour un DP 27). Si l'on compare les échantillons de façon relative, on voit que le copolymère avec le DP le plus élevé (36) présente les masses molaires les plus élevées et, à l'inverse, le copolymère avec le DP le plus faible (17) présente les masses molaires les plus basses. L'échantillon PiPrOx₂₃-co-PnBuOx₄ (ratio *i*PrOx/*n*BuOx : 87/13, DP : 27) est particulier, car sa dispersité est extrêmement élevée et sa M_n de 1017 g.mol⁻¹, largement inférieure à la valeur théorique qui aurait dû être obtenue d'après la RMN (3143 g.mol⁻¹). Il est à noter que cet échantillon, ayant un point trouble supérieur à 30 °C, a également pu être analysé en phase aqueuse au SEC/MALLS, où il a donné une M_n de 4400 g.mol⁻¹

(supérieure à la valeur théorique) et une M_w de $5500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, pour une \bar{D} nettement plus raisonnable de 1,26.

Par la suite, la polymérisation a été effectuée par amorçage thermique afin de polymériser des quantités plus importantes.

Polymérisation du *PiPrOx-co-PnBuOx* par voie thermique :

La procédure est décrite pour obtenir un DP cible de 30 et pour un ratio *iPrOx/nBuOx* de 60/40. La verrerie (ballon monocol, flacons...) est séchée à l'étuve la veille de la réaction à $170 \text{ }^\circ\text{C}$. Une fois retirée de l'étuve, elle est placée sous azote le temps qu'elle se refroidisse et maintenue close (sauf en cas de besoin dans le cas des flacons où sont réalisées les pesées). Du *p*-toluènesulfonate de méthyle (124,15 mg, 0,67 mmol) est dissout dans 4 mL d'acétonitrile anhydre dans un flacon et introduit dans un ballon monocol. L'*iPrOx* (1,358 g, 12 mmol) et le *nBuOx* (1,017 g, 8 mmol) sont ensuite pesés dans des flacons et introduits simultanément au sein du ballon sous agitation. 2 mL d'acétonitrile sont utilisés pour rincer les flacons et introduit dans le ballon. On fait ensuite buller de l'azote au sein du ballon pendant environ 15 min, puis ce dernier est placé dans un bain d'huile à $70 \text{ }^\circ\text{C}$ (le bain est préchauffé au préalable) et on laisse sous agitation pendant 24 h. Une infime fraction du milieu réactionnel est prélevée avec une seringue pour la RMN, puis la terminaison est effectuée en ajoutant au sein du ballon environ 3,4 mL de KOH à 1M dans le méthanol. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et le précipité est purifié par lavage à l'eau Milli-Q, ce qui est rendu possible dans ce cas par son hydrophobicité et permet de s'affranchir de l'étape de dialyse. Le rendement était aux alentours de 61 %.

Le ratio *iPrOx/nBuOx* obtenu était de 56/44 et le DP de 29. L'échantillon présentait une M_n de $2430 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et une M_w de $2930 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (SEC avec le dichlorométhane comme éluant). La méthode de polymérisation par voie thermique donne donc des résultats similaires à celle effectuée au micro-onde. Du fait qu'elle permet d'utiliser de plus grandes quantités de monomère, elle sera employée par la suite pour polymériser les chaînes de *PiPrOx-co-PnBuOx* avant leur greffage sur les chaînes de HA qui sera effectué au cours de la terminaison (voir chapitre D).

4.4 Les azobenzènes

4.4.1 Modification chimique

Des essais préliminaires au sein de l'équipe ont porté sur la fonctionnalisation de l'acide hyaluronique avec du 4-aminoazobenzène (Figure B-33). Ce dérivé d'azobenzène comporte en effet une fonction amine et peut donc réagir avec la fonction acide carboxylique de l'acide hyaluronique (activée avec un agent de couplage) pour former un amide. Cependant, la réaction se heurte à deux obstacles : le 4-aminoazobenzène est insoluble dans l'eau, ce qui nécessite d'utiliser de l'éthanol comme co-solvant et la nucléophilie de sa fonction amine est réduite du fait de sa position en α du cycle azobenzène, ce qui va aboutir à la délocalisation de son doublet non liant par effet mésomère (Figure B-33). On peut aussi noter que le groupe azobenzène va générer de l'encombrement stérique. Au final, le degré de substitution de la réaction est limité à environ 1 %, déterminés par dosage UV-vis.

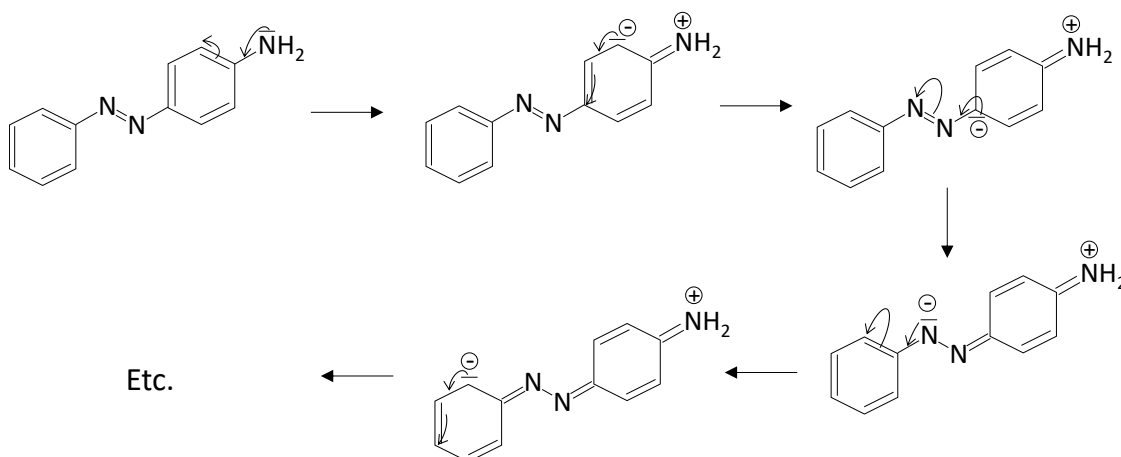


Figure B-33 Représentation de certaines formes mésomères du 4-aminoazobenzène.

Une autre stratégie a donc été définie afin d'obtenir un dérivé d'azobenzène pouvant être greffé sur le HA. L'idée est d'ajouter un bras espaceur entre la fonction amine et le groupe azobenzène et de procéder à la même réaction de couplage sur le HA. Aucun dérivé commercial d'azobenzène n'étant disponible, il a fallu modifier chimiquement un composé existant. L'idéal est d'avoir à réaliser le moins d'étape de synthèse possible. Un groupe a déjà eu cette approche en fonctionnalisant le 4-aminoazobenzène avec de l'anhydride succinique (obtention d'une fonction acide carboxylique terminale), puis avec de l'éthylène diamine afin d'obtenir une amine terminale (Figure B-34)³⁰. Les inconvénients sont qu'il y a besoin de deux étapes de synthèse et

que les deux étapes ne semblent pas permettre d'obtenir des réactions totales, ce qui va impliquer la nécessité de purifier les composés obtenus et de faibles rendements. En effet, le 4-aminoazobenzène est peu nucléophile pour la première étape et en ce qui concerne la seconde, les réactions d'obtention d'un amide par réaction entre une amine et un acide carboxylique par activation avec un carbodiimide peuvent présenter un faible taux de conversion y compris avec les molécules de faible masses molaires^{31,32}. D'autres stratégies en une étape visent à directement greffer un dérivé d'azobenzène avec une fonctionnalité chlorure d'acyle ou acide carboxylique sur un polysaccharide (hydroxypropyl methylcellulose ou acide hyaluronique) par l'établissement de liaisons esters avec ses fonctions alcools^{33,34}. La réaction est alors directe, mais présente tout de même des inconvénients, les liaisons esters étant plus hydrolysables que les amines, les fonctions alcool des polysaccharides n'étant pas les plus réactives et du fait de la difficulté de contrôler sur quel alcool de l'unité saccharide la réaction aura lieu (l'alcool primaire en C₆ des polysaccharides basés sur le glucose et ses dérivés étant le site le plus probable, mais pas nécessairement celui qui sera sélectionné^{35,36}).

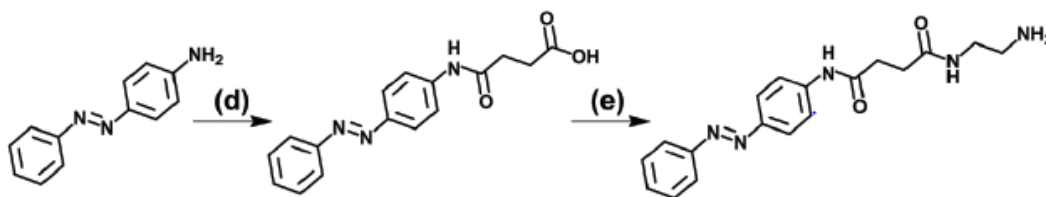


Figure B-34 Stratégie de synthèse d'une étude visant à intégrer un bras espaceur entre le groupe azobenzène et la fonction amine terminale³⁰.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc plutôt opté pour la modification du chlorure de 4-(Phénylazo)benzoyle, qui constitue un choix intéressant du fait de sa très forte réactivité. Il présente en effet une fonction chlorure d'acyle facile à modifier avec des nucléophiles. L'utilisation d'une diamine permettrait ainsi d'obtenir un azobenzène avec une amine en une étape de moins que pour la stratégie présentée Figure B-34, en utilisant de surcroît une réaction qui serait potentiellement totale en employant un large excès de diamine. La stratégie ainsi retenue est résumée Figure B-35.

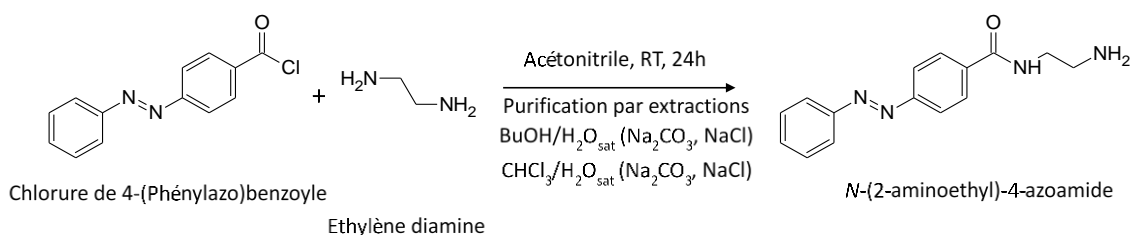


Figure B-35 Synthèse de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide à partir de chlorure de 4-(Phénylazo)benzoyle.

Cette voie de synthèse n'a toutefois pas été aussi évidente à mettre en place qu'il pouvait le sembler de prime abord. L'idée de départ, inspirée par les travaux de Chen et al. (Figure B-34), était d'effectuer la réaction directement dans l'éthylène diamine qui est présente à l'état liquide à température ambiante et est plus volatile que les diamines de chaîne aliphatique plus longue et donc plus aisée à éliminer par évaporation. Cependant, le chlorure de 4-(Phénylazo)benzoyle n'est pas soluble dans l'éthylène diamine et il est peu commode d'effectuer une réaction en milieu hétérogène quand ça peut être évité. Nous avons donc finalement opté pour l'acétonitrile comme solvant. La purification n'a pas été aisée non plus. En effet, les dérivés d'azobenzène en conformation *trans* (la plus stable) sont généralement insolubles en milieu aqueux. L'éthylène diamine, au contraire, est très hydrophile et hygroscopique. Il suffirait donc *a priori* d'effectuer une extraction liquide-liquide, l'éthylène diamine serait dans la phase aqueuse et la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide irait plutôt dans la phase organique. Cependant, il se trouve que ce composé acquiert en fait une certaine hydrophilie et peut donc aller dans la phase aqueuse en plus de la phase organique. De plus, la réaction s'accompagne de la formation très rapide d'un précipité qui est difficile à redissoudre. Au final, il a fallu optimiser les solvants employés pour réaliser l'extraction liquide-liquide.

Protocole de synthèse de la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide :

45 mL d'acétonitrile anhydre sont placés dans un ballon mis sous agitation. 4,10 mL (61,3 mmol) d'éthylène diamine et 1,424 mL (10,2 mmol) de triéthylamine sont ajoutés au ballon, qui est ensuite placé dans un bain de glace. Le chlorure de 4-(Phénylazo)benzoyle (500 mg, 2,043 mmol) est ensuite dissout dans 50 mL d'acétonitrile anhydre. La solution est ensuite ajoutée goutte-à-goutte au ballon contenant la solution d'éthylène diamine. Un précipité se forme au cours de l'addition. 5 mL d'acétonitrile anhydre sont ensuite utilisés pour rincer le récipient ayant contenu la solution de chlorure de 4-(Phénylazo)benzoyle et également ajouté goutte-à-

goutte dans le milieu réactionnel (volume total de solvant : 100 mL). Au bout de 5-10 min après l'addition, le bain de glace est ôté et la dispersion laissée sous agitation pendant 24 h. Puis, le milieu réactionnel est versé dans une ampoule à décanter. On y introduit ensuite 200 mL de *n*-butanol et 100 mL de solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 saturée. On agite bien l'ampoule à décanter, ce qui aboutit à la formation de trois phases : la phase organique, moins dense, au-dessus (couleur orange), la phase aqueuse, plus dense, au-dessous (incolore) et une émulsion située entre les deux (couleur jaunâtre). Il y a aussi une précipitation relativement importante de sel lors de la première extraction. Afin de dissoudre le sel et de casser l'émulsion, de l'eau Milli-Q est ajoutée petit à petit, prudemment (il faut éviter que la phase aqueuse ne commence à se colorer). La phase aqueuse est ensuite vidée, puis l'extraction est répétée deux fois avec 100 mL de solution de carbonate de sodium saturée et une fois avec une solution de NaCl saturée. Il est difficile de totalement supprimer l'émulsion : elle est donc vidée lors du dernier retrait de la phase aqueuse dans un récipient séparé. Elle peut alors être réextraite au besoin avec du *n*-butanol et une solution de Na_2CO_3 saturée. La phase organique, de couleur orange légèrement trouble est alors évaporée sous vide. Un précipité hétérogène est récupéré : il reste des sels. Le protocole d'extraction est alors recommencé en remplaçant cette fois-ci le *n*-butanol par du chloroforme. La phase organique, plus dense dans ce cas, se retrouve au fond de l'ampoule, elle est donc vidée puis replacée dans cette dernière après vidange de la phase aqueuse à chaque fois. Le solvant est ensuite évaporé sous vide, puis le précipité orange homogène obtenu est séché sous vide généré par une pompe à palette une nuit avant d'être analysé. Le rendement massique de la réaction est généralement compris entre 50 et 60 %.

Si l'on observe les deux réactifs impliqués (Figure B-35), on peut voir qu'il est possible que la réaction s'effectue sur les deux fonctionnalités amine de l'éthylène diamine. Afin d'éviter cela, cette dernière a été utilisée en large excès (30 équivalents par rapport à l'azobenzène) et l'azobenzène a été ajouté goutte-à-goutte dans la solution contenant la diamine, elle-même placée dans un bain de glace. Pour ce qui est de l'extraction, le premier solvant organique sélectionné, à savoir le *n*-butanol, semblait le plus compatible avec le produit de la réaction au cours de tests. Ce solvant présente l'avantage d'être polaire en plus d'être immiscible à l'eau. Or, le *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide formé au cours de la réaction présente une partie apolaire (l'azobenzène) et une partie polaire (la *N*-aminoéthylamide), ce qui explique sa compatibilité avec le solvant. De plus, contrairement à d'autres solvants moins polaires, le butanol n'est pas totalement incompatible avec les sels formés, qui sont fortement colorés et contiennent donc

une partie du produit qui doit en être extraite. La solution de carbonate de sodium saturée permettait d'éviter que le *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide ne se répande en phase aqueuse en jouant sur deux plans. Le fait que cette dernière soit saturée entraîne un effet de relargage, les molécules d'eau étant accaparées par le sel. De plus, cette solution est basique, ce qui va diminuer la compatibilité du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide avec elle. La réaction d'une amine sur un chlorure s'accompagne en effet de la libération de proton, ce qui va acidifier le milieu. Il se trouve que ces protons peuvent être captés par la fonction amine du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide formé. C'est ce qui explique la formation du précipité coloré en début de réaction alors que tous les réactifs pris séparément étaient solubles/miscibles avec le solvant de la réaction (l'acétonitrile). De plus, la formation d'une fonction ammonium chargée va renforcer l'affinité du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide pour l'eau. L'utilisation d'une phase aqueuse basique va donc neutraliser l'ammonium et contribuer à extraire le produit du précipité, ce qui va aboutir à la formation de l'émulsion observée. Une fois le produit purifié de la sorte, il est plus aisé de recommencer l'extraction avec un solvant moins polaire, le chloroforme, afin d'éliminer les impuretés observées lors de l'évaporation du butanol (probablement des sels).

4.4.2 Caractérisation

Le produit est ensuite analysé par RMN en utilisant l'acétone-d₆ comme solvant (Figure B-36). Les pics aromatiques ont été attribués à l'aide de tables RMN. On peut y voir les pics associés aux deux méthylènes de la fonction *N*-aminoéthylamide à respectivement 3,45-3,40 et 3,65-3,61 ppm. Par rapport à l'éthylène diamine, ils ne sont maintenant plus équivalents et donnent bien deux distributions distinctes de même valeur d'intégration, signe que la réaction s'est bien produite et que l'éthylène diamine a bien été extraite par la phase aqueuse. On peut voir également les pics aromatiques associés à l'azobenzène, avec les deux protons en ortho de la fonction amide à 8,11-8,08 ppm, les deux protons en méta de l'amide ainsi que les deux autres en méta de l'azo à 7,99-7,97 ppm et finalement les deux protons en ortho de l'azo ainsi que celui en para de l'azo à 6,91-6,87 ppm. Les valeurs des intégrations entre les protons amenés par l'éthylène diamine et ceux amenés par l'azobenzène concordent, il semble donc également ne plus rester de chlorure de 4-(Phénylazo)benzoyl initial.

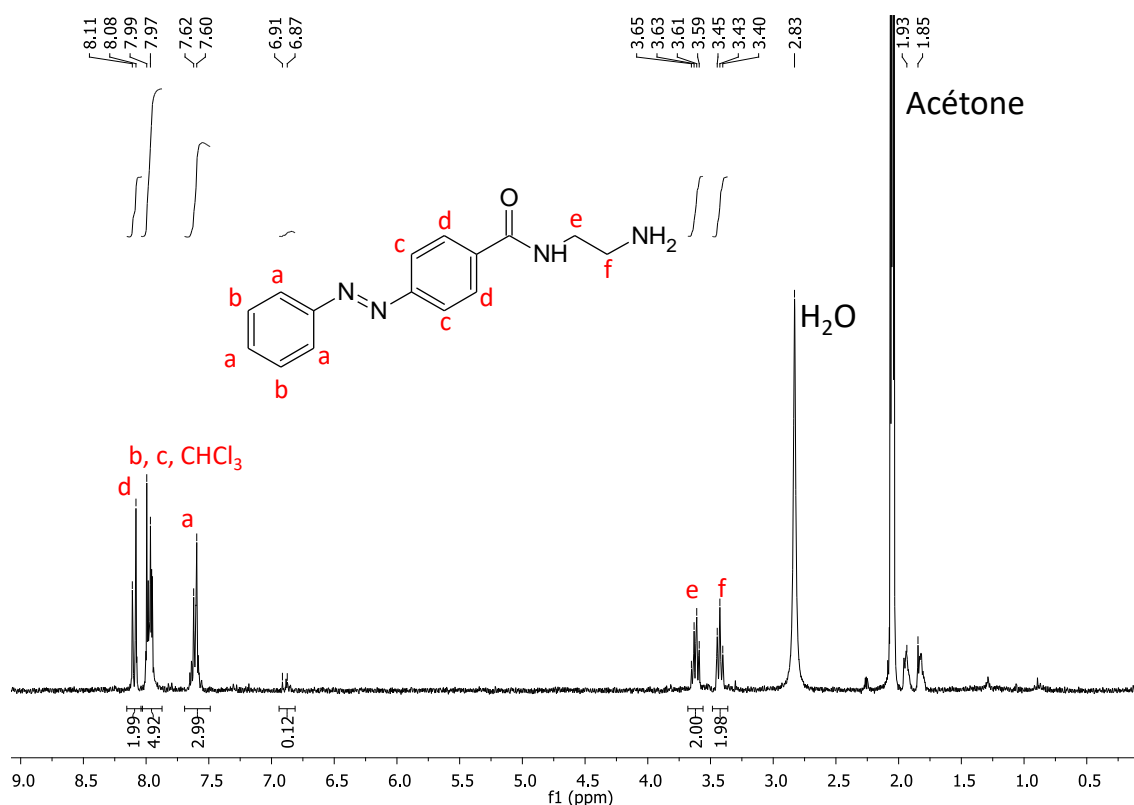


Figure B-36 Spectre RMN ^1H de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide obtenu (solvant : acétone- d_6).

Le *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide est soluble dans l'eau sous sa forme protonée. Afin d'étudier sa cinétique de transition *trans*→*cis* par spectrophotométrie UV-vis, nous avons travaillé dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,05 M. La concentration de la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide était de 0,015 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ajustée afin d'obtenir une absorbance aux alentours de l'unité en conformation *trans* au maximum d'absorption à 323 nm (voir section 2.2.2.3 pour le protocole détaillé). Le composé est d'abord passé en conformation *trans* par irradiation de la solution à 254 nm. Une première acquisition est alors réalisée. Puis la solution est placée sous une lampe UV à 365 nm, ce qui va entraîner le passage de la molécule à la conformation *cis*, et des spectres sont alors acquis à des intervalles réguliers. Les résultats sont représentés Figure B-37. On constate qu'ils sont très similaires à ce qui avait déjà été observés dans d'autres études sur des dérivés d'azobenzène (voir Figure A-36)³⁷. On retrouve notamment les maxima d'absorption de la conformation *trans* à 323 nm (transition $\pi\rightarrow\pi^*$) et à 230 nm, pour lesquels les valeurs d'absorbance tendent à diminuer au cours de la transition avec disparition du pic une fois celle-ci achevée, ainsi que les maxima associés à la conformation *cis* à 423 nm (transition $n\rightarrow\pi^*$) et à 253 nm, pour lesquels les valeurs d'absorbance tendent à augmenter au cours de la transition avec apparition progressive du maximum à 253 nm. On peut

également parfaitement observer la présence de points isobestiques à 223 nm, 239 nm, 280 nm et 387 nm où l'absorbance restera constante au cours de la transition. Avec la lampe utilisée (365 nm, 100 W, $\sim 5.0 \text{ mW/cm}^2$), la transition est complète au bout d'environ 4 min.

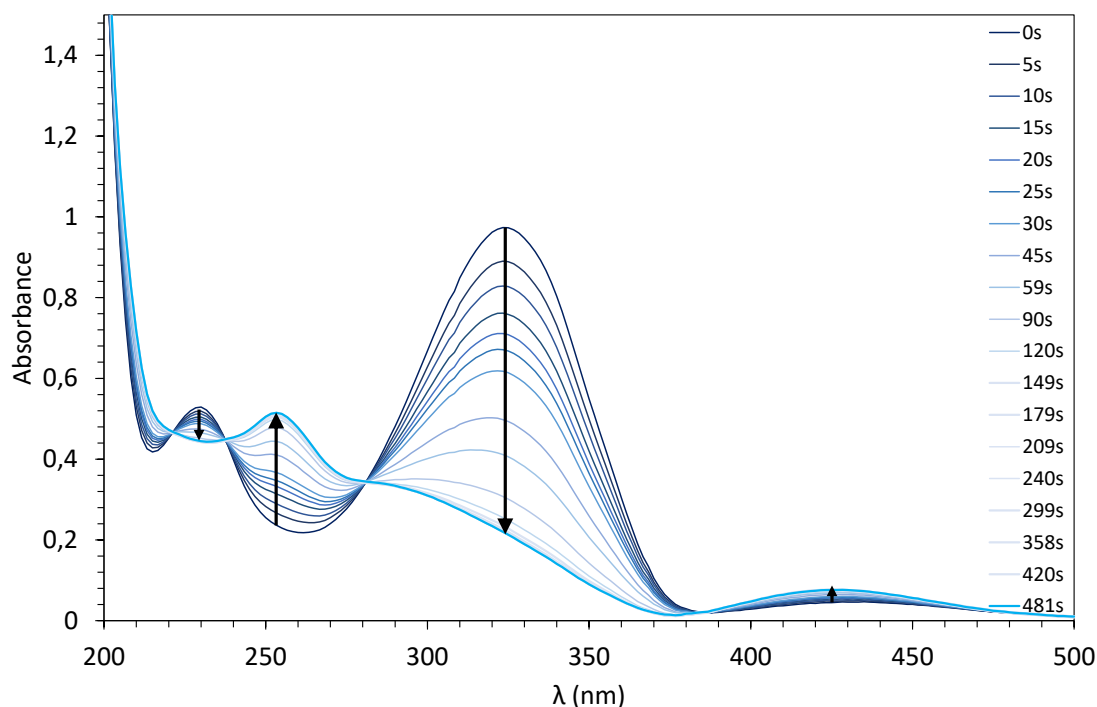


Figure B-37 Evolution du profil de l'absorbance d'une solution de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide ($0,015 \text{ g.L}^{-1}$ dans du HCl $0,05 \text{ M}$) lors de la transition *trans*→*cis*.

Directement après la mesure finale, la cuve contenant la solution est cette fois-ci placée sous la lampe UV à 254 nm afin d'effectuer la transition inverse *cis*→*trans*, de façon beaucoup plus rapide et contrôlée que si la cuve était laissée à l'abri de la lumière où elle devrait s'effectuer spontanément (ce qui est plutôt long dans les faits, une nuit n'ayant pas suffi dans notre cas). Des spectres ont été acquis à des intervalles réguliers et les résultats sont représentés Figure B-38. On peut constater que l'on retrouve bien l'évolution inverse à la transition *trans*→*cis* et que l'on finit par retourner à l'état initial. Cette fois, avec la lampe utilisée (254 nm, 4W, $\sim 0.2 \text{ mW/cm}^2$), de puissance très inférieure à celle de 365 nm, la transition est complète au bout d'environ 2 min et est donc plus rapide. La transition nécessite donc moins d'apport d'énergie pour être effectuée (il convient également de noter que la lampe de 365 nm n'irradie pas à la longueur d'onde optimale pour la transition *trans*→*cis*, qui serait de 323 nm).

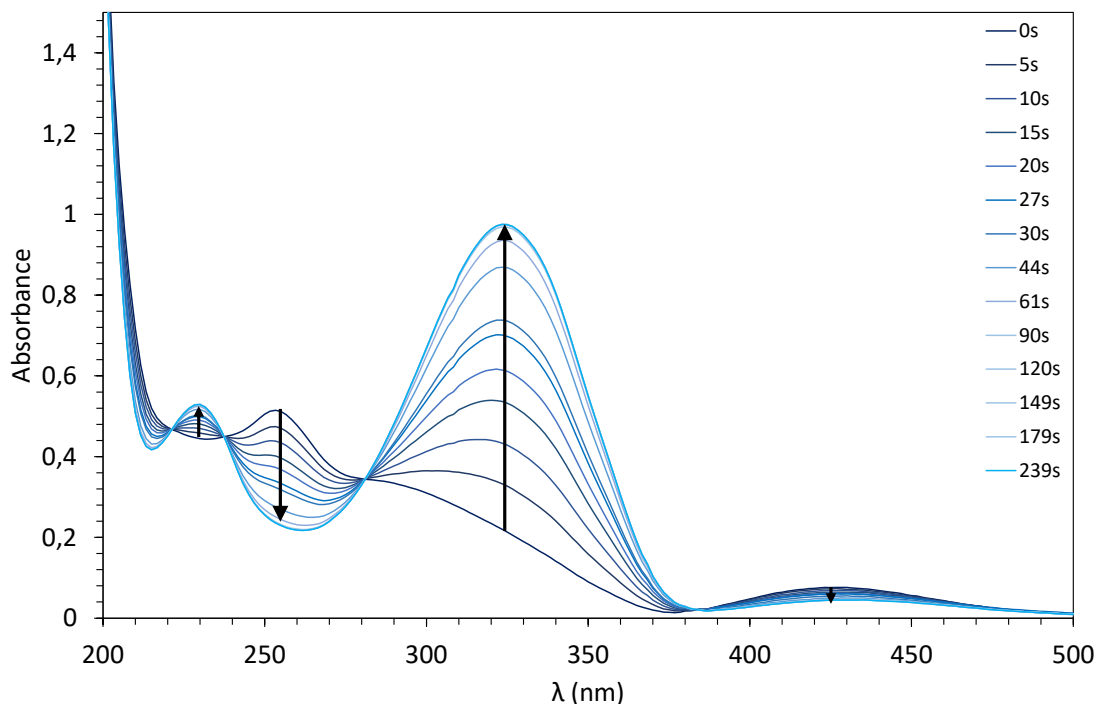


Figure B-38 Evolution du profil de l'absorbance d'une solution de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (0,015 g.L⁻¹ dans du HCl 0,05 M) lors de la transition *cis*→*trans*.

Il a fallu irradier au préalable la solution de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide à 254 nm afin que le composé soit entièrement en conformation *trans*, ce qui semble indiquer qu'à l'équilibre, le composé est en réalité présent à la fois en *trans* (de façon majoritaire) et en *cis*. Il est possible d'estimer cet équilibre en comparant l'absorbance à 323 nm de l'échantillon avant traitement sous UV avec celles où il est entièrement dans l'une des deux conformations en utilisant la formule suivante :

$$\%trans = \frac{A - A_{cis}}{A_{trans} - A_{cis}} \times 100 \quad (B23)$$

Où %*trans* est le pourcentage de molécules en conformation *trans*, *A* est l'absorbance à 323 nm de la solution de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide à l'équilibre, *A_{cis}* celle de cette même solution lorsque l'échantillon est totalement en conformation *cis*, et *A_{trans}* celle de la solution lorsque l'échantillon est en conformation *trans*. Les valeurs respectives de *A*, *A_{cis}* et *A_{trans}* étant de 0,81, 0,22 et 0,97, on obtient un ratio *trans/cis* de 79/21.

L'étude cinétique des transitions *trans*→*cis* et *cis*→*trans* a été réalisée dans les deux cas avec les valeurs des absorbances obtenues à une même longueur d'onde (323 nm ou 428 nm).

Pour les dérivés d'azobenzène, elle est normalement d'ordre 1 d'après les études antérieures^{38,39}. En prenant l'exemple de la transition *trans*→*cis*, elle suit donc une formule du type :

$$\frac{-d[trans]}{dt} = k[trans] \quad (B24)$$

Où $[trans]$ est la concentration du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide en conformation *trans* et k , la constante de vitesse.

Cette formule aboutit à l'expression suivante :

$$\ln \left(\frac{[trans]_0}{[trans]_t} \right) = kt \quad (B25)$$

Où $[trans]_0$ est la concentration initiale du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide en conformation *trans* et $[trans]_t$ celle à l'instant t . N'ayant pas directement accès à la concentration lors des mesures spectrophotométriques, il est plus simple de reformuler l'expression en fonction de l'absorbance grâce à la loi de Beer-Lambert (voir équation B8 page 108). On a en effet $[trans]_0 \propto (A_0 - A_\infty)$, où A_0 est l'absorbance initiale à une longueur d'onde donnée du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide en conformation *trans* et A_∞ l'absorbance résiduelle mesurée lorsque le *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide a été entièrement converti en conformation *cis*, et, de façon similaire, $[trans]_t \propto (A_t - A_\infty)$, où A_t est l'absorbance à une longueur d'onde donnée de la solution mesurée au temps t , ce qui permet d'aboutir à la formule suivante :

$$\left(\frac{[trans]_0}{[trans]_t} \right) = \left(\frac{A_0 - A_\infty}{A_t - A_\infty} \right) \quad (B26)$$

La loi cinétique de premier ordre devient donc :

$$\ln \left(\frac{A_0 - A_\infty}{A_t - A_\infty} \right) = kt \quad (B27)$$

En reprenant les valeurs d'absorbances obtenues précédemment, on obtient la courbe suivante :

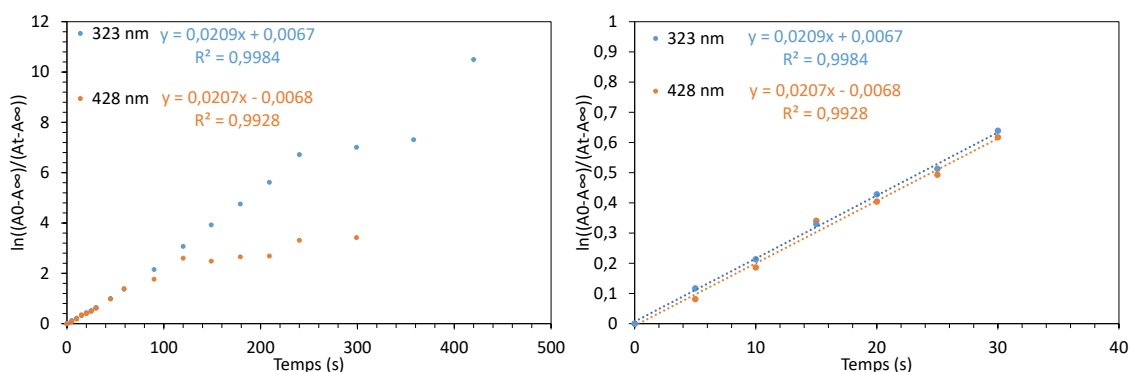


Figure B-39 Cinétique de la transition *trans*→*cis* d'une solution de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (0,015 g.L⁻¹ dans du HCl 0,05 M) au cours d'une exposition aux UV (365 nm) (gauche : vue d'ensemble; droite : zoom aux temps courts).

Que la mesure ait été réalisée à 323 nm ou 428 nm, on peut observer dans les deux cas que la droite est linéaire aux temps courts, ce qui est compatible avec une cinétique du premier ordre, qui est ainsi confirmée. De plus, la longueur d'onde sélectionnée n'a aucun impact sur la pente de la courbe, ce qui est le comportement attendu. Dans les conditions utilisées, nous obtenons donc une constante de vitesse k de 0.02 s⁻¹.

De la même manière, nous avons obtenu la courbe suivante pour la cinétique de transition *cis*→*trans* :

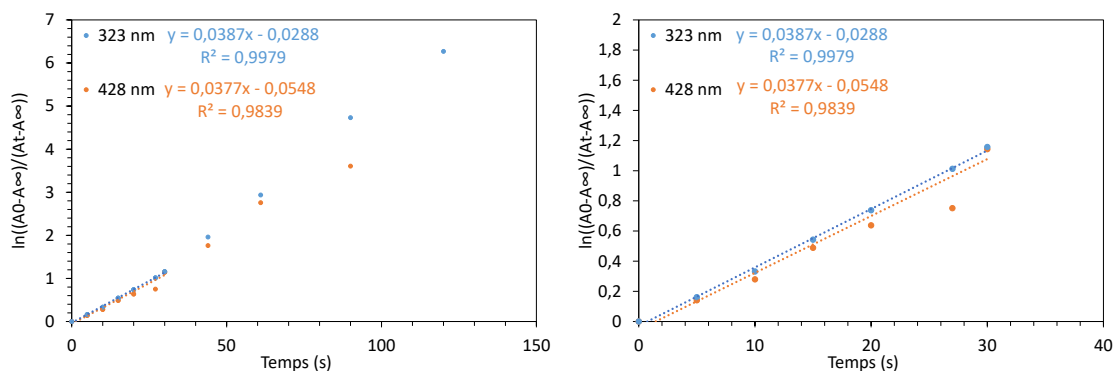


Figure B-40 Cinétique de la transition *cis*→*trans* d'une solution de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (0,015 g.L⁻¹ dans du HCl 0,05 M) au cours d'une exposition aux UV (365 nm) (gauche : vue d'ensemble; droite : zoom aux temps courts).

On observe le même comportement que pour la transition *trans*→*cis* avec une constante de vitesse k de 0.04 s⁻¹, soit une cinétique deux fois plus rapide que précédemment.

5 Références

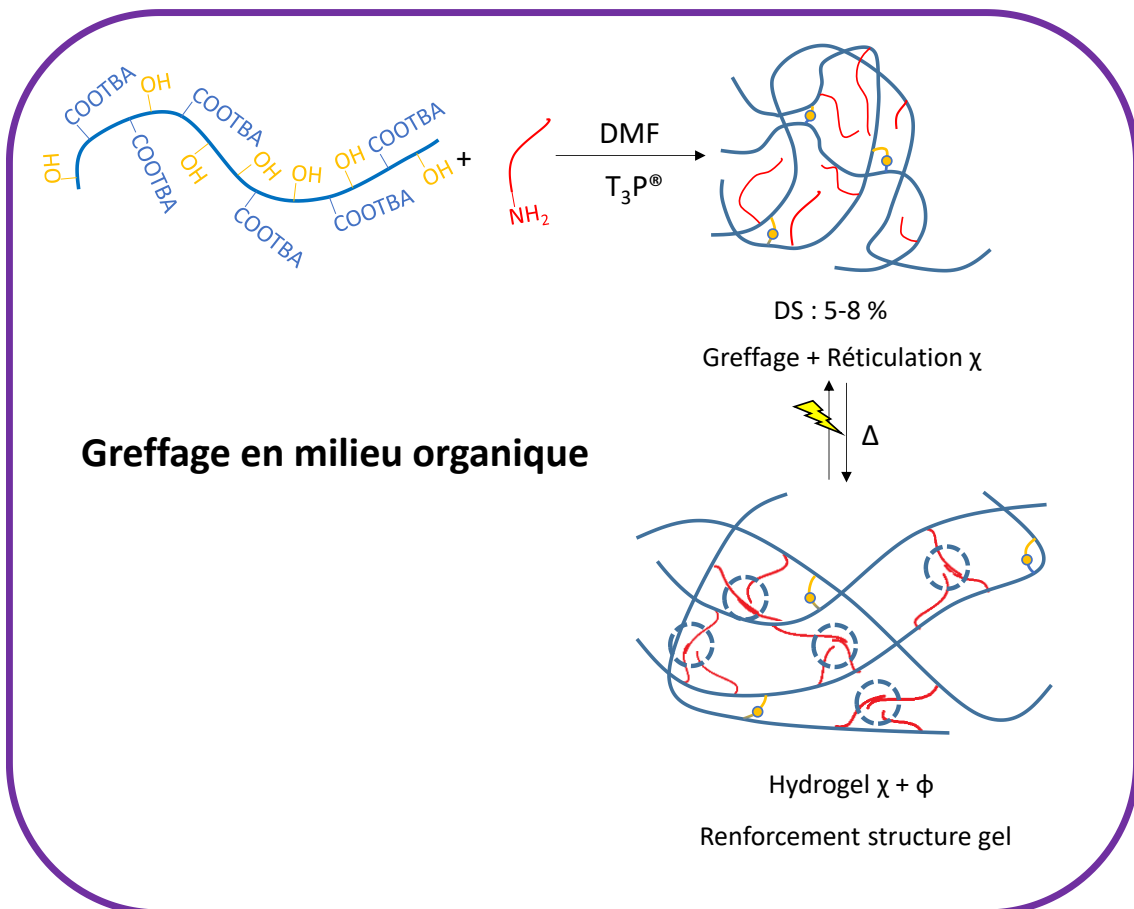
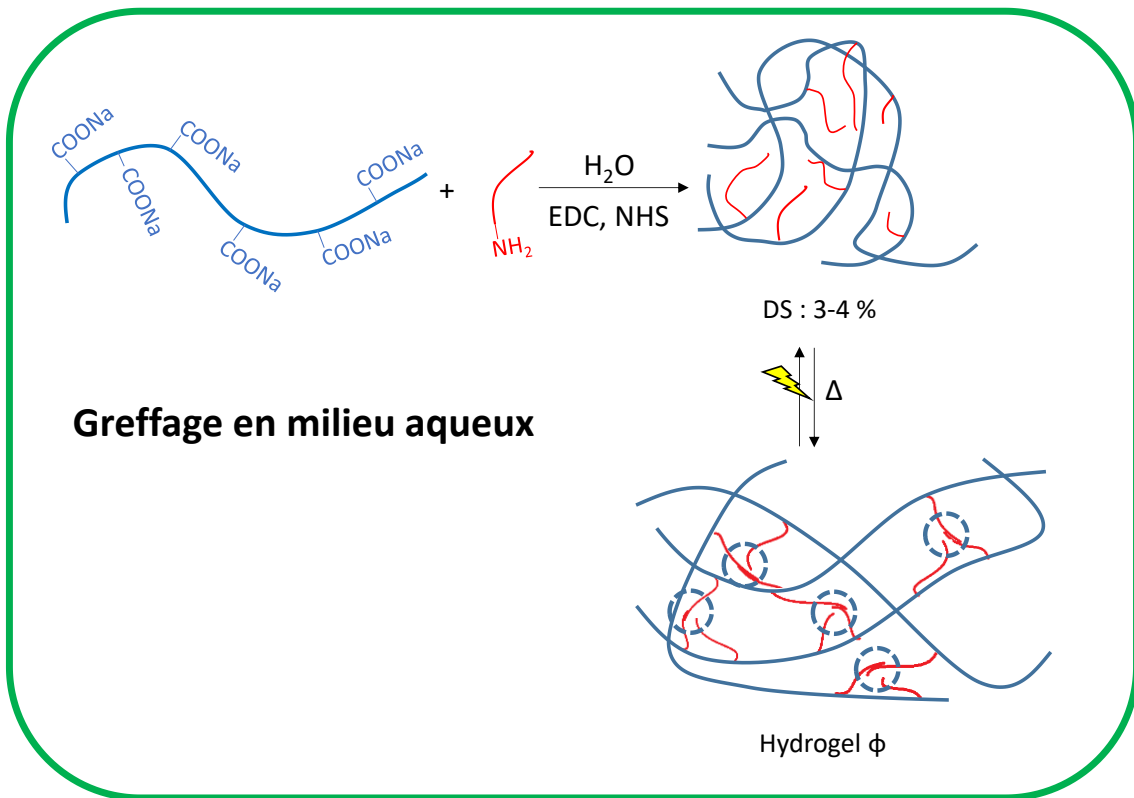
1. D. Canet, J.-C. Boubel, E. Canet-Soulas, *La RMN Concepts, méthodes et applications*, Archive ouverte de l'Université de Lorraine, 2020.
2. G. Dupuis, *Éléments de spectroscopie de RMN*. <https://www.faidherbe.org/site/cours/dupuis/rmn.htm>, 2021 (accessed 11 October 2021).
3. J.T. Arnold, S.S. Dharmatti, M.E. Packard, Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds, *J. Chem. Phys.* 18 (1951) 507-507.
4. E. Buisine, TP de Résonance Magnétique Nucléaire 1D/2D, Travaux pratiques de chimie industrielle Méthodes d'analyse et sécurité, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, 2009-2010.
5. F. Fardus-Reid, J. Warren, A. Le Gresley, Validating heteronuclear 2D quantitative NMR, *Anal. Methods* 8 (2016) 2013-2019.
6. D. Ret, G. Steiner, S. Gentilini, S. Knaus, Exact determination of the degree of substitution of high molar mass hyaluronan by controlling the conformation in solution, *Carbohydr. Polym.* 204 (2019) 124–130.
7. T. Gostan, D. Tramesel, E. Brun, Y. Prigent, M.-A. Desluc, L'expérience DOSY, une puissante méthode RMN pour l'analyse de mélanges complexes et la détection de traces, *Spectra Anal.* 240 (2004) 25–31.
8. C. Secades, B. O'Connor, C. Brown, M. Walpole, Earth Observation for Biodiversity Monitoring: A review of current approaches and future opportunities for tracking progress towards the Aichi Biodiversity Targets., Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montréal, Canada, Technical Series 72 (2014).
9. C.R. Baiz, B. Blasiak, J. Bredenbeck, M. Cho, J.-H. Choi, S.A. Corcelli, A.G. Dijkstra, C.-J. Feng, S. Garrett-Roe, N.-H. Ge, M.W.D. Hanson-Heine, J.D. Hirst, T.L.C. Jansen, K. Kwac, K.J. Kubarych, C.H. Londergan, H. Maekawa, M. Reppert, S. Saito, S. Roy, J.L. Skinner, G. Stock, J.E. Straub, M.C. Thielges, K. Tominaga, A. Tokmakoff, H. Torii, L. Wang, L.J. Webb, M.T. Zanni, Vibrational Spectroscopic Map, *Vibrational Spectroscopy, and Intermolecular Interaction*, *Chem. Rev.* 120 (2020) 7152-7218.
10. L. Servant, G. Le Bourdon, T. Buffeteau, Comprendre la spectroscopie infrarouge : principes et mise en œuvre, *Photoniques* 53 (2011) 68-73.
11. J.F. Nicoud, *Principes de Spectroscopie UV-Visible*, Licence MPC L3 S5 « Chimie

- Organique Avancée, Université de Strasbourg.
12. Agilent, UV-vis Spectroscopy & Spectrophotometer FAQs, <https://www.agilent.com/en/support/molecular-spectroscopy/uv-vis-uv-vis-nir-spectroscopy/uv-vis-spectroscopy-spectrophotometer-basics>, 2021 (accessed 11 October 2021).
 13. L. Picton, D. Le Cerf, Chromatographie d'exclusion stérique multi-détection, *Actual. Chim.* 422-423 (2017) 59-64.
 14. A. Gontier, F. Renou, O. Colombani, F. Burel, G. Morandi, Hybridization of Poly(oxazoline) and Poly(ethylene oxide)-Based Amphiphilic Copolymers into Thermosensitive Mixed Micelles of Tunable Cloud Point, *Langmuir* 5 (2021).
 15. P.G. de Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Cornell University Press, London, United Kingdom (1979).
 16. T.G. Mezger, *The Rheology Handbook*, third revised ed., Vincentz Network, Hanover, Germany, 2011.
 17. TA Instruments, *Discovery Hybrid Rheometers Temperature Systems and Accessories* (2021).
 18. Malvern Instruments, *Dynamic Light Scattering: An introduction in 30 Minutes*, DLS technical note MRK656-01 1-8.
 19. A. Durand, D. Hourdet, Thermoassociative graft copolymers based on poly(*N*-isopropylacrylamide): effect of added co-solutes on the rheological behavior, *Polymer* 41 (2000) 545-557.
 20. Y. Zhang, S. Furyk, D.E. Bergbreiter, P.S. Cremer, Specific ion Effects on the Water Solubility of Macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister Series, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 14505-14510.
 21. C. Pottier, *Copolymères triblocs stimuli-sensibles à amphiphilie contrôlée : synthèse et auto-assemblage en solution aqueuse*, Université de Rouen-Normandie (2015).
 22. M. Fettaka, R. Issaadi, N. Moulai-Mostefa, I. Dez, D. Le Cerf, L. Picton, Thermo-sensitive behavior of cellulose derivatives in dilute aqueous solutions: From macroscopic to mesoscopic scale, *J. Colloid Interface Sci.* 357 (2011) 372-378.
 23. S. Huber, R. Jordan, Modulation of the lower critical solution temperature of 2-Alkyl-2-oxazoline copolymers, *Colloid Polym. Sci.* 286 (2008) 395-402.
 24. J.S. Park, K. Kataoka, *Comprehensive and Accurate Control of Thermosensitivity of*

- Poly(2-alkyl-2-oxazoline)s via Well-Defined Gradient or Random Copolymerization, *Macromolecules* 40 (2007) 3599-3609.
25. M. Hruby, S.K. Filippov, J. Panek, M. Novakova, H. Mackova, J. Kucka, D. Vetvicka, K. Ulbrich, Polyoxazoline Thermoresponsive Micelles as Radionuclide Delivery Systems, *Macromol. Biosci.* 10 (2010) 916-924.
 26. G. Gody, P.B. Zetterlund, S. Perrier, S. Harrison, The limits of precision monomer placement in chain growth polymerization, *Nat. Commun.* 7 (2016) 10514.
 27. B. Guillerm, S. Monge, V. Lapinte, J.J. Robin, Novel Investigations on Kinetics and Polymerization Mechanism of Oxazolines Initiated by Iodine, *Macromolecules* 43 (2010) 5964-5970.
 28. A. El Asmar, O. Gimello, G. Morandi, D. Le Cerf, V. Lapinte, F. Burel, Tuning the Thermo-Sensitivity of Micellar Systems through a Blending Approach, *Macromolecules* 42 (2016) 4307-4315.
 29. L. Hespel, G. Morandi, M. Grossel, L. Lecamp, L. Picton, F. Burel, Synthesis of lipid-*b*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) and successive study of pH- and thermo-sensitive mixed micelles by combination with lipid-*b*-poly(acrylic acid), *Polym. Chem.* 5 (2014) 4009-4015.
 30. L. Chen, X. Zhao, Y. Lin, Z. Su, Q. Wang, Dual stimuli-responsive supramolecular hydrogel of bionanoparticles and hyaluronan, *Polym. Chem.* 5 (2014) 6754-6760.
 31. A. Hadrich, Nouveaux hydrogels à base de polysaccharide obtenus par voie biomimétique ou par photoréticulation, Université de Rouen-Normandie (2019).
 32. Z. Hua, R. Keogh, Z. Li, T.R. Wilks, G. Chen, R.K. O'Reilly, Reversibly Manipulating the Surface Chemistry of Polymeric Nanostructures *via* a 'Grafting To' Approach Mediated by Nucleobase Interactions, *Macromolecules* 50 (2017) 3662-3670.
 33. P. Zheng, X. Hu, X. Zhao, L. Li, K.C. Tam, L.H. Gan, Photoregulated Sol-Gel Transition of Novel Azobenzene-Functionalized Hydroxypropyl Methylcellulose and Its α -Cyclodextrin Complexes, *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004) 678-682.
 34. A.M. Rosales, C.B. Rodell, M.H. Chen, M.G. Morrow, K.S. Anseth, J.A. Burdick, Reversible Control of Network Properties in Azobenzene-Containing Hyaluronic Acid-Based Hydrogels, *Bioconjugate Chem.* 29 (2018) 905-913.
 35. V. Dulong, G. Mocanu, D. Le Cerf, A novel amphiphilic pH-sensitive hydrogel based on pullulan, *Colloid Polym. Sci.* 285 (2007) 1085-1091.
 36. T.F. Stefanello, A. Szarpak-Jankowska, F. Appaix, B. Louage, L. Hamard, B.G. De Geest, B.

- van der Sanden, C.V. Nakamura, R. Auzély-Velty, Thermoresponsive hyaluronic acid nanogels as hydrophobic drug carrier to macrophages, *Acta Biomater.* 10 (2014) 4750-4758.
37. W.-S. Lee, A. Ueno, Photocontrol of the Catalytic Activity of a β -Cyclodextrin Bearing Azobenzene and Histidine Moieties as a Pendant Group, *Macromol. Rapid Commun.* 22 (2001) 448-450.
38. A. Miniewicz, H. Orlikowska, A. Sobolewska, S. Bartkiewicz, Kinetics of thermal cis-trans isomerization in a phototropic azobenzene-based single-component liquid crystal in its nematic and isotropic phases, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20 (2018) 2904-2913.
39. K. Matczyszyn, J. Sworakowski, Phase Change in Azobenzene Derivative-Doped Liquid Crystal Controlled by the Photochromic Reaction of the Dye, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 6039-6045.

Chapitre C : Elaboration d'hydrogels thermosensibles à base de HA-g-M2005



Sommaire

1	Introduction.....	165
2	Article.....	166
3	Causes de la dégradation du HA_{1200k} en milieu aqueux.....	187
4	Conclusion	188
5	Références.....	189

1 Introduction

Nous avons vu dans le chapitre A que la Jeffamine® M2005 a déjà été greffée sur des polysaccharides comme le carboxyméthylpullulane¹, mais également sur l'acide hyaluronique^{2,3}. Si son greffage sur le carboxyméthylpullulane a bien permis l'obtention d'hydrogels physiques par élévation de la température, dans le cas du HA, le bilan est plus contrasté. En effet, la publication de D'Este *et coll.* a conclu que le greffage de Jeffamine® M2005 ou M600 ne permettait pas d'obtenir une augmentation satisfaisante des modules de conservation G' et de perte G'' par élévation de la température. L'étude de Trojer *et coll.* a requis l'utilisation d'un large excès d'EDC de 15 fois la quantité d'amine à greffer. Or, cet agent de couplage est connu pour induire des réactions secondaires, l'intermédiaire activé de type O-acylurée pouvant se réarranger en N-acylurée non réactive⁴. Dulong *et coll.* ont mis au point une méthode pour éliminer l'EDC restant par traitement avec des solutions basiques et acides.

Il convient de noter que la plupart des méthodes de greffage de la Jeffamine® ont été réalisées avec l'EDC en phase aqueuse. Il existe cependant davantage d'agents de couplage en milieu organique. Schlee *et coll.* ont par exemple utilisé l'anhydride propylphosphonique T3P® afin de fonctionnaliser l'alginate avec des amines aliphatiques, avec des taux de greffage proches de 100 %⁵. Ce polysaccharide a une structure proche du HA, il est en effet constitué d'unités acide mannuronique, issues de l'oxydation du mannose, un épimère du glucose, ainsi que d'acide guluronique, un épimère de l'acide mannuronique. Il comprend donc des groupements acides carboxyliques. Il n'est pas soluble en milieu organique et doit donc d'abord être converti sous forme de sel de tétrabutylammonium, un agent de transfert de phase, afin de pouvoir être dissout en milieu aprotique polaire.

Au cours de ce chapitre, nous étudierons deux voies de fonctionnalisation de la Jeffamine® M2005, l'une en milieu aqueux en adaptant le protocole développé par Dulong *et coll.* et l'autre en milieu organique aprotique polaire. L'impact des deux méthodes sur les taux de greffage ainsi que sur les propriétés des hydrogels obtenus seront comparées. Ce chapitre est réalisé à partir d'un article publié sur les résultats obtenus. Les HA utilisés sont le HA_{1200k} de chez Sigma-Aldrich (utilisé pour les premiers essais) ainsi que les HA_{38k} et HA_{140k} offerts par GIVAUDAN (le HA_{990k} qu'ils nous ont également fourni a des propriétés très similaires au HA_{1200k} comme nous avons pu le voir chapitre B).

Hyaluronic Acid Functionalization with Jeffamine® M2005: A Comparison of the Thermo-responsiveness Properties of the Hydrogel Obtained through Two Different Synthesis Routes

Mathieu Madau, Didier Le Cerf*, Virginie Dulong and Luc Picton

Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces (PBS), Normandie University, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, 76000 Rouen, France; mathieu.madau@univ-rouen.fr (M.M.); virginie.dulong@univ-rouen.fr (V.D.); luc.picton@univ-rouen.fr (L.P.)

* Correspondence: didier.lecerf@univ-rouen.fr; Tel.: +33 (0)2-35146543

Abstract: Hyaluronic acid (HA) of different molar masses (respectively 38,000, 140,000 and 1,200,000 g.mol⁻¹) have been functionalized with a commercial poly(etheramine), Jeffamine® M2005, in order to devise physical thermo-responsive hydrogels. Two routes have been studied, involving the use of either water for the first one or of *N,N'*-Dimethylformamide (DMF), a polar aprotic solvent, for the second one. In the case of the water route, the reaction was performed using a mixture of *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) as coupling reagents. The reaction was optimized while making sure no free M2005 remained in the final material, leading to M2005 grafting degrees of about 4%, which enabled the formation of hydrogels by increasing the temperature. In the case of the organic solvent route, propylphosphonic anhydride T3P® was used as a coupling reagent in DMF, resulting in a M2005 grafting degree of around 8% with better thermo-responsive properties of HA-g-M2005 compared to those obtained when the reaction was performed in water. However, the reaction systematically led to covalent cross-linking in the case of the HA, with the highest starting molar masses resulting in a very different rheological behaviour and with higher gel strength retaining thermo-responsive behaviour but being only poorly soluble in water.

Keywords: hyaluronic acid; hydrogel; thermo-responsive; Jeffamine® M2005

Citation: Madau, M.; Le Cerf, D.; Dulong, V.; Picton, L. Hyaluronic Acid Functionalization with Jeffamine® M2005: A Comparison of the Thermo-responsiveness Properties of the Hydrogel Obtained through Two Different Synthesis Routes. *Gels* 2021, 7, 88. <https://doi.org/10.3390/gels7030088>

Academic Editor(s): Georgios Bokias

Received: 18 June 2021

Accepted: 2 July 2021

Published: 9 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Hydrogels are soft materials made of a three-dimensional hydrophilic polymeric network able to swell in water [1,2]. They are increasingly studied in order to design complex materials for applications in the biomedical field, with applications in wound dressing, drug delivery, scaffolds for tissue engineering or magnetic hydrogels [3–5]. Hydrogels are divided into two categories: physical and chemical hydrogels. Physical hydrogels have their cross-links made of dynamic non-covalent bonds, such as hydrogen bonds [4], ionic cross-linking [6] or Van der Waals interaction [7]. These cross-links are reversible, and their association or dissociation dynamics are dependent on the physical and chemical environment of the material, such as the temperature [8], the pH [7], the saline environment [6], etc. Oppositely, chemical hydrogels are made through the formation of covalent cross-linking. Such cross-linking leads to stronger structures compared to physical hydrogels; however, they are not reversible and are therefore not as versatile as physical hydrogels. Devising hydrogels for biomedical applications requires of course to use biocompatible raw materials, with biotic materials being the preferred option [9].

Hyaluronic acid is a glycosaminoglycan found within tissues of vertebrates and some bacteria as a major component of the extracellular matrix and of connective tissues such as the synovial fluid, where it helps lubricating articulations or umbilical cord [10,11]. It is a linear polysaccharide made of glucuronic acid units alternating with *N*-

acetylglucosamine units [12]. Among glycosaminoglycans, it is the only non-sulfated one and is not bound to a protein [13].

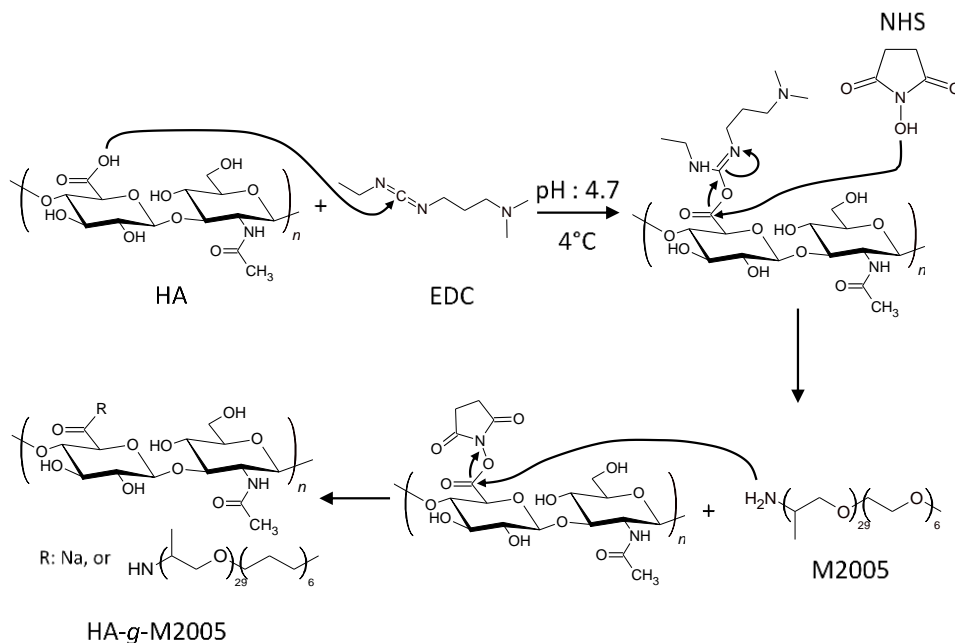
HA is very hydrophilic [10] and though it is already used for its viscoelastic properties in the cosmetic industry [13,14], it needs to be functionalized to acquire hydrogel properties. In particular, grafting a thermo-responsive moiety displaying a lower critical solution temperature (LCST) will result in a material able to undergo a sol-gel transition by raising the temperature. Some polymers do indeed display a LCST, which is the minimum temperature above which they will go from a soluble state in a given solvent (mostly water in the studied cases) to an insoluble state. It has to be stressed that the transition temperature will change according to the polymer concentration in the solvent, the LCST being the minimum temperature above which the polymer will undertake a transition. In general, the transition temperature is referred to as a cloud point [15]. There are many polymers displaying a LCST, most of them synthetic, like poly(*N*-isopropylacrylamide) PNIPAM, the one that is most studied, which is due to its LCST being around 32 °C in water, which is perfect for biomedical application [16]. Moreover, its transition temperature is not very dependent on the polymer concentration compared to other systems [16]. Other examples of thermo-responsive polymers are poly(*N*-vinylcaprolactam) [16], polyoxamers made of poly(ethylene oxide)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene oxide) block copolymers [8], and hydroxypropyl cellulose (obtained through the functionalization of a natural material) [17].

HA has already been functionalized with polymers displaying a LCST. For instance, PNIPAM has been grafted either on HA using either "grafting from" [18] or "grafting to" approaches [19,20]. Another polymer, Jeffamine® M2005, a poly(etheramine), with a LCST of 14°C in water, is being increasingly used as a functional group. It has a block copolymer structure consisting of 6 units of ethylene oxide EO and 29 units of propylene oxide PO ended with an amine at the PPO block end, a functionality that makes this polymer quite suitable for grafting on other polymeric structures, especially the ones displaying carboxylic acid moieties through the formation of an amide bond. Therefore, Jeffamine® M2005 has first been grafted on carboxymethylpullulan by Dulong et al. [8] before the reaction was adapted to HA by Eglin et al. [20] and more recently by Trojer et al. (who also did the reaction on carboxymethylcellulose) [21]. Eglin et al. functionalized HA with both Jeffamine® M2005 and M600 (with a different composition than M2005, the chain being notably much shorter), using the method they developed to graft amino terminated PNIPAM to HA in DMSO with carbonyl diimidazole as a coupling reagent. However, their HA-g-M2005 did not display any thermo-responsive properties and their HA-g-M600 gave only very limited increase of storage modulus G' upon heating, contrary to their HA-g-PNIPAM, for which they had far more interesting results that were subsequently used by this group for their following studies [22,23]. In the case of Trojer et al., they did the coupling reaction using the well documented procedure involving *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC) in conjunction with *N*-hydroxysuccinimide (NHS) as the coupling reagent in water. Their resulting materials were responsive to temperature; however, their rheological studies did not include oscillation measurements, which would have helped to definitely confirm the presence of a gelation point by comparing the evolution of the storage modulus G' and the loss modulus G'' during a temperature ramp.

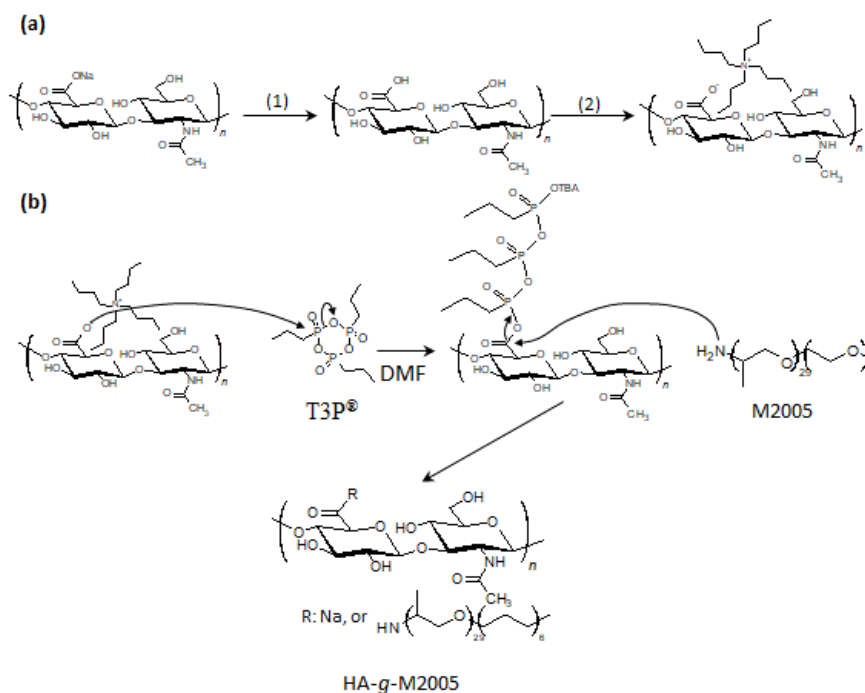
Here, we are going to adapt to HA the methodology from Dulong et al., developed for grafting Jeffamine® M2005 to carboxymethylpullulan in water using EDC/NHS as the coupling reagent (Scheme 1).

This protocol, in particular, puts a strong emphasis on sample purification, with short dialysis steps in acidic and alkaline media to efficiently remove the EDC (which would otherwise be attached to HA as a *N*-acylurea as described by Kuo et al. [24]) as well as longer dialysis steps in a mixture of ethanol and water and washing of the final material in acetone to remove unreacted M2005, which was found out to be difficult to remove using only dialysis. As the obtained degrees of substitution (DS) were low, with values

below 5%, we have adapted a protocol developed by Schlee et al. who grafted simple aliphatic amines to alginate, another polysaccharide with carboxylic acid moieties, using the coupling reagent propylphosphonic anhydride T3P® in *N,N*-Dimethylformamide (DMF), for which they reported DS of around 100% [25] (Scheme 2). The structure of the modified HAs has been determined through FTIR, NMR and SEC/MALS, while its thermo-gelling properties have been assessed through rheology.



Scheme 1. Mechanism of the grafting of M2005 to HA (water route).



Scheme 2. Proposed mechanism of the grafting on M2005 to HA (organic solvent route). (a) Conversion of Na-HA to its TBA salt through two steps: (1) acidification with a DOWEX cationic

ion exchange resin overnight (the resin is then filtered off the solution) and (2) neutralization of the resulting hyaluronic acid with TBAOH. (b) Activation of TBA-HA with T3P® followed with nucleophilic substitution with M2005, resulting in HA-g-M2005.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis of HA-g^(EDC)-M2005 in Water

M2005 was grafted to HA₁₂₀₀, HA₁₄₀ and HA₃₈ using EDC/NHS as a coupling reagent for 24 h at 4 °C, the mechanism is detailed in scheme 1. The reaction was done under mild acidic conditions and at 4 °C in order to have M2005 in the sol state [8]. The reaction of the HA carboxylic acid moiety led to the formation of an activated *O*-Acylurea intermediate (Scheme 1), which can rearrange itself into an unreactive *N*-Acylurea. It has been reported the use of NHS in catalytic quantities helps to prevent this by inducing the formation of a second activated intermediate which is more stable. Both intermediates will eventually lead to the formation of an amide bond with M2005. In order to fully remove EDC and unreacted M2005, extensive purification steps had to be undertaken, using first dialysis against various solutions of NaOH, HCl or water (see section 4.2.1 for details). These steps are needed to make sure no EDC remains in the final material. In order to fully remove unreacted M2005, dialysis against a mixture of ethanol and water (ratios 33/67 *v/v*) was performed, followed by dialysis against water, and the resulting material received after freeze-drying was then washed several times in acetone until no more M2005 grafting degree variation was observed through NMR (Figure S1). The resulting functionalized HAs using this route were coded as follow: HA_{Mn(kg.mol⁻¹)}-g^(EDC)-M2005-DS%.

The successful grafting could be qualitatively assessed through FTIR, with bands corresponding to M2005 appearing at 2875 cm⁻¹ and 2970 cm⁻¹ (corresponding to the stretching of, respectively, C-H₂ and C-H₃ from the etheroxide backbone) and at 1375 cm⁻¹ (corresponding to the bending of C-H₂ from the etheroxide backbone). Moreover, a slight increase of the band at 1565 cm⁻¹ (corresponding to N-H bend from amide) can be observed, suggesting the formation of additional amide bonds (Figure 1) on the structure of HA.

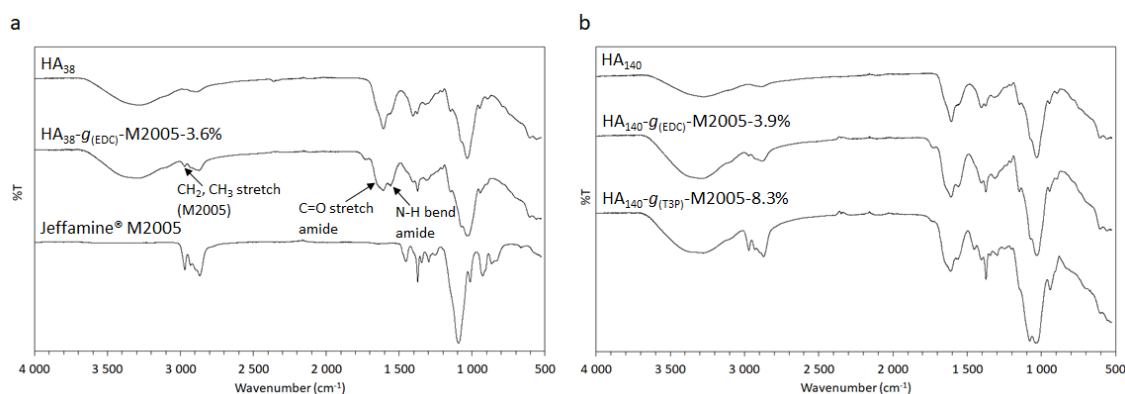


Figure 1. (a) FTIR spectrum of HA₃₈ (top), HA₃₈-g^(EDC)-M2005-3.6% (middle), and M2005 (bottom) and (b) HA₁₄₀ (top), HA₁₄₀-g^(EDC)-M2005-3.9% (middle), and HA₁₄₀-g^(T3P)-M2005-8.3% (bottom).

The grafting reaction efficiency was low in all the cases, none of the samples having a degree of substitution of more than 5 % (Figure 2).

Nonetheless, some differences between the different HA materials can be spotted (Table 1): the grafting reaction was indeed slightly less efficient for HA, which had the highest starting molar mass with a DS of 2.7 %, while the other two batches had a grafting degree between 3.5 % and 4 %. Moreover, the reaction led to some polymer degradation for HA₁₂₀₀, with the molar mass values becoming around half the starting values, while HA₃₈ and HA₁₄₀ were almost unaffected by the reaction (Figure S2). This

could be due to the dialysis step, which was partly performed against 0.1 M NaOH to remove EDC from the material (which will induce HA degradation as it is well known that this polysaccharide is prone to β -elimination when exposed to alkaline solution) [26]. The grafting degree could be improved for HA₁₂₀₀ by using an excess of M2005 compared to HA. When going for a ratio of M2005 chains compared to HA units of 5:1 instead of 1:1, the resulting DS was found to be 4.5%.

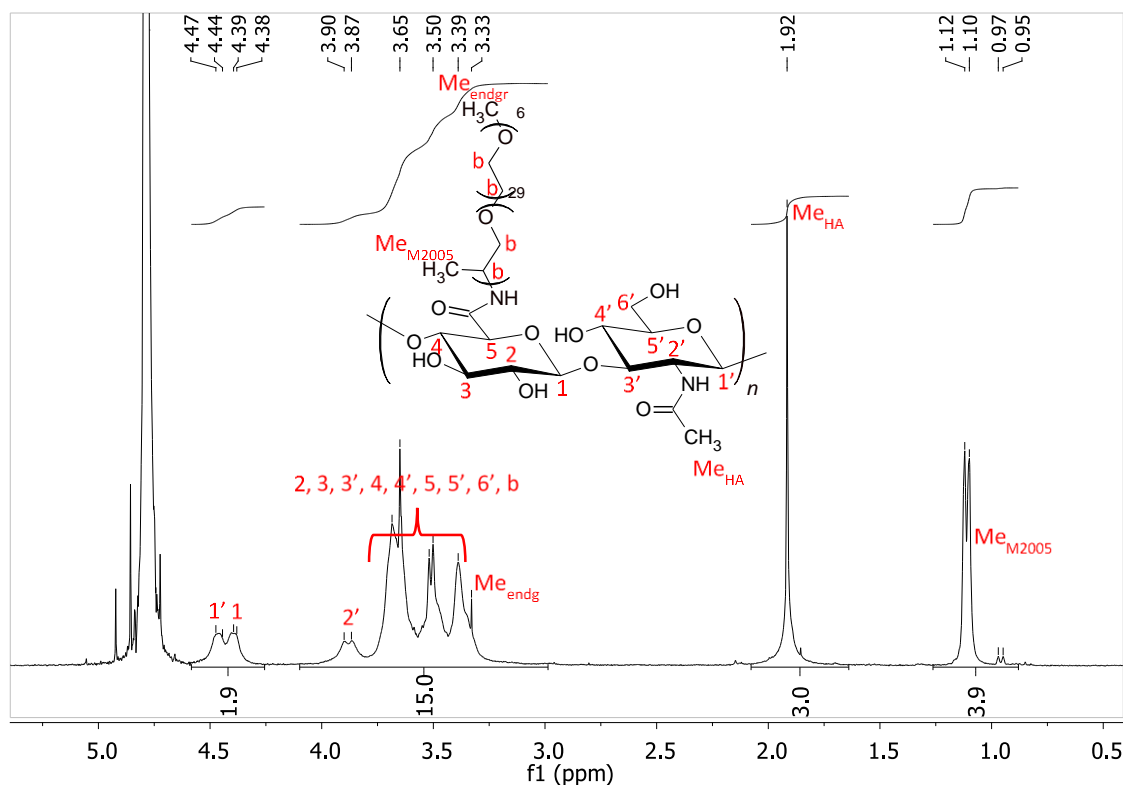


Figure 2. ¹H NMR spectrum of HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5% in D₂O.

Table 1. Reaction conditions and resulting grafting degrees and molar mass of the different HA-g-M2005. EDC/NHS were used with a ratio of 1/0.04 compared to Na-HA units.

Sample	nM2005/nHA	nT3P/n TBA-HA	nTEA/nTBA-HA	DS
HA ₃₈ -g(EDC)-M2005-3.6%	1	-	-	3.6 % ^a
HA ₃₈ -g(T3P)-M2005-8.3%	2	2	1	8.3 % ^b
HA ₁₄₀ -g(EDC)-M2005-3.9%	1	-	-	3.9 % ^a
HA ₁₄₀ -g(T3P)-M2005-5.5%	2	0.3	0.3	5.5 % ^b
HA ₁₄₀ -g(T3P)-M2005-8.3%	2	2	1	8.3 % ^b
HA ₁₂₀₀ -g(EDC)-M2005-2.7%	1	-	-	2.7 % ^a
HA ₁₂₀₀ -g(T3P)-M2005-3.7%	2	0.3	0.3	3.7 % ^b
HA ₁₂₀₀ -g(EDC)-M2005-4.5%	5	-	-	4.5 % ^a

^a DS is calculated according to Eq. 1a; ^b DS is calculated according to Eq 1b.

2.2. Synthesis of HA-g(T3P)-M2005 in polar aprotic solvent

The reaction was performed in DMF with T3P[®] as the coupling reagent at room temperature. Grafting degrees of 8.3% were reached after functionalization of HA₃₈ and HA₁₄₀ (Figure 3). The resulting functionalized HAs using this route were coded as follows: HA_{Mn}(kg.mol⁻¹)-g(T3P)-M2005-DS%. The higher degree of substitution could be qualitatively assessed through FTIR, as the bands corresponding to M2005 were more pronounced (Figure 1). However, it should be noted HA₁₄₀-g(T3P)-M2005-8.3% prepared in this way displayed hydrogel behaviour at a 60 g.L⁻¹ solution in water, even at low temperature,

and was looked like a colloidal suspension at 30 g.L⁻¹, which implies the formation of cross-links. Trying to reduce the amount of coupling reagent for functionalizing HA₁₄₀ and HA₁₂₀₀ (resulting in samples HA₁₄₀-g(T3P)-M2005-5.5% and HA₁₂₀₀-g(T3P)-M2005-3.7%) also led to hydrogel behaviour in water in the case of HA₁₄₀ and to a colloidal suspension in the case of HA₁₂₀₀.

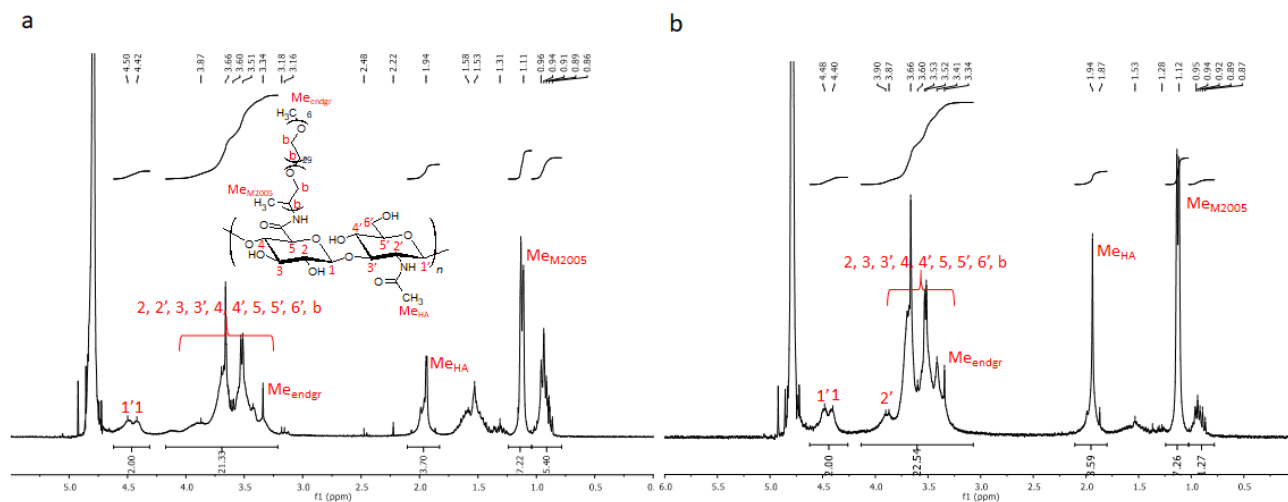


Figure 3. ¹H NMR spectrum of (a) HA₃₈-g(T3P)-M2005-8.3% and (b) HA₁₄₀-g(T3P)-M2005-8.3% in D₂O.

The synthesis in DMF using T3P[®] as the coupling reagent proved therefore to be more efficient than the one performed in water, with DS above 5% being reachable. However, it is linked to unexpected behaviour in the case of both HAs with the highest starting molar masses, HA₁₄₀ and HA₁₂₀₀, which is probably linked to cross-linking formation. The impact on the material behaviour will be investigated in the next section.

2.3. Physicochemical properties of HA-g-M2005

2.3.1. Conformational Properties extracted from SEC/MALS

Reaction with EDC/NHS in Water

The physicochemical parameters of the various HA-g-M2005 were determined through SEC/MALS and rheology. As shown in table 2, at first glance, the reaction performed in water with EDC/NHS as a coupling reagent did not impact the molar mass of the material obtained from HA₃₈ and HA₁₄₀, as the grafting degree is rather low (between 3.5% and 4%). In fact, when the results are looked at closely, a slight material degradation can be evidenced: the degree of polymerisation (DP_n) of the chain has been determined according to Eq. (S2), and it can be seen that the DP_n of functionalised HA_{38k} and HA_{140k} is equal to 84 % of its initial value. Moreover, the intrinsic viscosity [η] is found to slightly decrease in both cases, going from 150 mL.g⁻¹ to 120 mL.g⁻¹ in the case of HA₃₈ and from 410 mL.g⁻¹ to 390 mL.g⁻¹ in the case of HA₁₄₀. This can be attributed both to the grafting of M2005 to HA, leading to the disruption of the many intermolecular H-bonds between HA chains and to the slight HA-g-M2005 degradation [10,13,19]. Conversely, the “a” parameter from the Mark Houwink equation does not change much with the grafting reaction, being always around 0.7, suggesting that the resulting materials all display a random coil conformation in good solvent (they were not determined in the case of HA₁₂₀₀ due to the challenging analysis). In the case of HA₁₂₀₀, as described earlier, the reaction leads to material degradation, with resulting molar masses being half the initial values. This degradation is further indicated by a drop of both the hydrodynamic radius, R_h, and the gyration radius, R_g (Table 2). However, it can be seen HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-2.7% and HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5% have very similar molar masses, with M_n values of respectively 430,000 g.mol⁻¹ and 540,000 g.mol⁻¹, thus making the comparison of their properties with

the different grafting degree possible. It can indeed be seen that despite having the highest molar mass, HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5% has a lower $[\eta]$ and R_g compared to HA₁₂₀₀-g-M2005-2.7%, which can be expected due to the higher grafting degree leading to higher intermolecular interaction disruption. This result is in agreement with a previous study on the grafting of M2005 on carboxymethylpullulan [8].

Table 2. Molar mass analysis and macromolecular data (intrinsic viscosity $[\eta]$, hydrodynamic radius (Rh), gyration radius (Rg), and Mark-Houwink parameters (a and K)) of the obtained samples through SEC/MALS (at 25°C, in LiNO₃ 0.1M).

Sample	M _n (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	Đ	DP _n	Mass Recovery	$[\eta]_w$ (mL.g ⁻¹)	Rh _w (nm)	Rg _w (nm)	a (Mark Houwink)
HA ₃₈	38,000	64,000	1.68	95	68 %	150	11	- ^a	0.76
HA ₃₈ -g(EDC)-M2005-3.6%	38,000	63,000	1.64	80	61 %	120	10	- ^a	0.72
HA ₃₈ -g(T3P)-M2005-8.3%	60,000	250,000	4.18	106	35 %	140	14	37	0.79
HA ₁₄₀	140,000	210,000	1.50	349	63 %	410	23	44	0.71
HA ₁₄₀ (T3P) ^b	190,000	550,000	2.89	473	41 %	450	30	68	0.72
HA ₁₄₀ -g(EDC)-M2005-3.9%	140,000	190,000	1.39	294	77 %	390	22	39	0.62
HA ₁₄₀ -g(T3P)-M2005-5.5%	180,000	430,000	2.39	354	47 %	320	25	46	0.76
HA ₁₄₀ -g(T3P)-M2005-8.3%	200,000	540,000	2.76	355	21 %	290	26	48	0.77
HA ₁₂₀₀	1,200,000	1,500,000	1.25	2990	65 %	1700	73	147	-
HA ₁₂₀₀ -g(EDC)-M2005-2.7%	430,000	500,000	1.15	947	78 %	1300	46	102	-
HA ₁₂₀₀ -g(T3P)-M2005-3.7%	-	-	-	-	0 %	-	-	-	-
HA ₁₂₀₀ -g(EDC)-M2005-4.5%	540,000	710,000	1.32	1105	49 %	840	44	84	-

MHS coefficient (a) has been determined by integrating the most linear part of bilogarithmic representation of intrinsic viscosity vs molar mass; SEC/MALS/VD/DRI data accuracy: M_n ± 9%; M_w ± 6%; Đ ± 10%; $[\eta]_w$ ± 0.5%; Rh_w ± 2%; Rg_w ± 6%; ^a Out of the range of the MALS detector (isotropic diffusion for lower masses fractions); ^b Sample reacted with T3P[®] only.

Reaction with T3P[®] in DMF

The chromatograms obtained for HA-g(T3P)-M2005 revealed a different behaviour than for HA-g(EDC)-M2005. First of all, while mass recovery after filtration as detected from DRI was high (>60 %) for almost all samples modified in Milli-Q water with EDC/NHS, it was below 50% for all samples modified with T3P[®] in DMF, with HA₁₂₀₀-g(T3P)-3.7% being fully retained by the filter. Moreover, the molar masses were higher than the corresponding HA (e.g. HA₃₈-g(T3P)-M2005-8.3% displayed respectively a M_n of 60,000 g.mol⁻¹ (38,000 g.mol⁻¹ for starting HA₃₈) and a M_w of 250,000 g.mol⁻¹ (64,000 g.mol⁻¹ for starting HA₃₈) and the dispersities (Đ) were increased (4.18 for HA₃₈-g(T3P)-M2005-8.3% versus 1.68 for HA₃₈). In all cases, the LS signal main peak is shifting to the higher values (Figure 4a), indicating the formation of aggregates.

In order to investigate the impact of the coupling reagent T3P[®], the coupling reaction was performed on HA₁₄₀ as stated in the material section without adding Jeffamine[®] M2005. The resulting material, not fully soluble in Milli-Q, displays the same molar mass values compared to functionalized HA₁₄₀-g(T3P)-M2005, similar chromatograms (see Figure 4b) and also significant mass loss upon filtration with a mass recovery of only 41 %, all of which are hinting toward cross-linking of the sample. It is known coupling reagent that can trigger cross-linking of polysaccharide chains: 2-chloro-1-methylpyridinium iodide (CMPI) has already been used to cross-link HA of high molar masses [27] for instance. Trisodium trimetaphosphate, which has a chemical structure akin to T3P[®], is also a well-known cross-linker of HA in water [28]. This side-reaction was still unexpected, as no

cross-linking induced by T3P[®] was observed on alginate of low molar mass (30,000 g.mol⁻¹) by Schlee et al., as evidenced by their SEC-MALS data [25]. Moreover, the cross-linking occurred in spite of the reaction conditions, where the starting concentration of HA was reduced with increasing initial molar mass (see section 4.2.2). Furthermore, it is interesting to notice HA₁₄₀ which was cross-linked with T3P[®] without adding any Jeffamine[®] M2005 displayed higher $[\eta]_w$, Rh_w or Rg_w than HA₁₄₀-g(T3P)-M2005 in 0.1 M LiNO₃ solution, indicating the polymer functionalized with the polyetheramine is less swollen than the corresponding material which was only cross-linked with the coupling reagent.

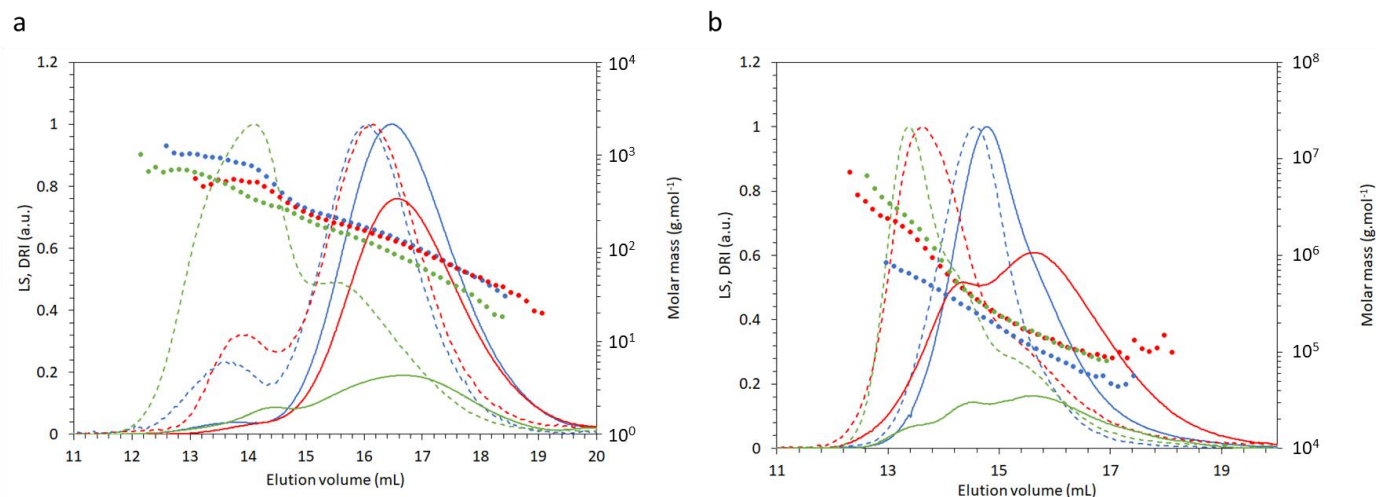


Figure 4. (a) Molar mass distribution of HA₃₈ (blue), HA₃₈-g(EDC)-M2005-3.6% (red), and HA₃₈-g(T3P)-M2005-8.3% (green) (b) Molar mass distribution of HA₁₄₀ (blue), HA₁₄₀ after reticulation with T3P[®] (red), and HA₁₄₀-g(T3P)-M2005-8.3% (green); full lines: DRI; dotted lines: LS; full circles: molar mass distribution.

Rheological properties and temperature induced hydrogel formation

The thermal transition of the samples was assessed through rheological measurements in water. It was determined as the crossing between the storage modulus G' , corresponding to the fluid elastic behaviour, and the loss modulus G'' , corresponding to the fluid viscous behaviour [8,29]. As the temperature rises, M2005-M2005 interactions are favoured over M2005-water ones, thus creating non-covalent cross-linking between HA-g-M2005 chains through the grafted moieties. The material will therefore go from an initial state at the lower temperature where G'' is over G' , indicating the viscous behaviour of the sample is predominant to a state where G' is over G'' and a gel-like behaviour, the structure being able to recover its initial shape after a slight deformation. However, the transition will only be observed if the cross-linking is made through an intermolecular process, which requires the sample solution to be above its C^* (Figure S3). The solutions were therefore prepared at a concentration 12.5 times above the C^* of starting HA, and the results are displayed in Figure 5 and Table 3.

Rheological properties of HA-g(EDC)-M2005

The temperature ramps were applied from 25 °C to 60 °C. The rheological response of HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5%, prepared as a solution in Milli-Q water at 1 wt%, was taken as an example in Figure 5a. In a first step, at between 25°C and 29°C, the complex viscosity η^* is slightly decreasing, as it would be the case with non-thermo-sensitive material, even though the temperature is higher than the LCST of M2005. Although M2005 intermolecular associations will be promoted, as they are grafted to a very hydrophilic HA backbone, their temperature-induced hydrophobicity is not yet strong enough for triggering network formation. However, when the temperature reaches 28–29 °C, as cross-

links are starting to unfold, G' , G'' , and η^* start to increase as the temperature rises. The crossing of G' and G'' was reached at 41.5 °C, and all parameters were still rising as the temperature of 60 °C was reached, indicating the cross-linking formation was still strengthening. However, the measurement was stopped at this temperature, as water would start to evaporate above, even when using a solvent trap.

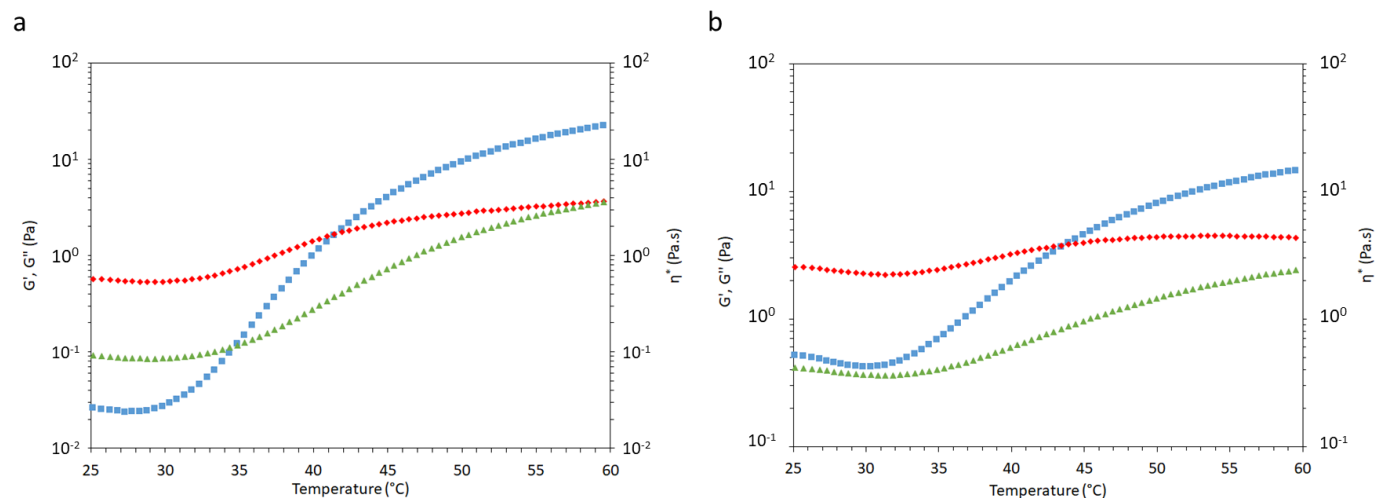


Figure 5. Rheological profile of (a) HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5% at 1 wt% in water and (b) HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-2.7% at 1 wt% in water. Heating ramp: G' (blue square), G'' (red rhombus), η^* (green triangle) vs temperature; measurement in oscillation mode (parameters: shear stress: 0.1 Pa; frequency: 1 Hz; rate: 0.5°C.min⁻¹).

Table 3. Rheological properties of the different HA-g-M2005 samples.

Sample	C (wt%)	T _{trans} (°C)	G' (Pa) (25°C)	G' (Pa) (60°C)	$\frac{G'_{60^\circ\text{C}}}{G'_{25^\circ\text{C}}}$
HA ₃₈ -g(EDC)-M2005-3.6%	11	>60 °C	0.1 Pa	78.4 Pa	784
HA ₃₈ -g(T3P)-M2005-8.3%	11	<25 °C	25 Pa	230 Pa	9.2
HA ₃₈ -g(T3P)-M2005-8.3%	3	33.7 °C	0.2 Pa	12.6 Pa	63
HA ₁₄₀ -g(EDC)-M2005-3.9%	6	51.6 °C	1 Pa	296 Pa	296
HA ₁₄₀ -g(T3P)-M2005-5.5%	6	-	176 Pa	810 Pa	4.6
HA ₁₄₀ -g(T3P)-M2005-8.3%	6	-	435 Pa	3200 Pa	7.4
HA ₁₂₀₀ -g(EDC)-M2005-2.7%	1	43.7 °C	0.5 Pa	14.8 Pa	30
HA ₁₂₀₀ -g(EDC)-M2005-4.5%	1	41.5 °C	0.026 Pa	23 Pa	885

Temperature ramp measurements were performed with an oscillation frequency of 1 Hz.

As can be seen from Table 3 and Figure 5 (a and b), the grafting degrees did not impact the transition temperature for HA-g(EDC)-M2005 much, as observed when comparing HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-2.7% and HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5%, their transition temperature being respectively found at 43.7 °C and 41.5 °C. This is most probably because the achievable DS are still too close to each other. All the HA-g(EDC)-M2005 obtained have therefore sufficiently close DS to be compared according to the starting HA batch. It is clear from table 5 that the transition temperature increases with decreasing starting HA molar mass, with HA₃₈-g(EDC)-M2005-3.6% displaying the highest value, just above 60 °C, despite the chains being in an entangled state.

We also compared the G' value at 60 °C, which gives an indication of the gel strength, as according to the Hooke's law, the higher it is, the higher the required strength to strain the material to a set value will be. Among all HA-g(EDC)-M2005 samples, the material with the highest G' at 60 °C is HA₁₄₀-g(EDC)-M2005-3.9% with 296 Pa. The behaviour is actually difficult to predict, as it is the consequence of several parameters, such as the material conformation in solution, the entanglement and the viscosity. However, it should be noted that a high variation of G' during the thermal transition, corresponding to a component

going from a very fluid state to a highly rigid one, is useful when devising materials for injection applications. The transition reversibility was also studied by applying a cooling ramp right after the heating ramp with the same general parameters, and all materials were giving a similar response as during the heating ramp, with only slight shifts of the temperature transition ($<3\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Figure S4).

Rheological properties of HA-g(T3P)-M2005

In the case of HA-g(T3P)-M2005, only HA₃₈-g(T3P)-M2005-8.3% was soluble in water, with HA₁₄₀ derivatives behaving like a gel and HA₁₂₀₀ derivatives behaving like a colloidal suspension. Focusing first on HA₃₈-g(T3P)-M2005-8.3%, the material was already displaying a G' value above the G'' when working under the same conditions as HA₃₈-g(EDC)-M2005-3.6% (11wt% solution in Milli-Q water) (Figure 6a), with all moduli values increasing over the whole temperature range. In order to see a transition, another solution was prepared with a concentration of only 3 wt% (Figure 6b). The transition was seen at 33.7 °C only, the lowest observed during this study, with G' values at 25 °C and 60 °C similar to the ones of HA₁₂₀₀-g-M2005-2.7% at 1 wt%. In the case of the HA₁₄₀-g(T3P)-M2005 samples, both of them were displaying a hydrogel behaviour at a concentration of 60 g.L⁻¹ ($G' > G''$ over the whole range) (Figure 6c,d) and a colloidal suspension behaviour at 20 g.L⁻¹ (Figure S5). Nonetheless, the materials were still displaying thermo-responsive behaviour, with G' and G'' values both increasing during the heating ramp (Table 3). The magnitude of G' increase between 25 °C and 60 °C was between 4.6 and 9.2 (Table 3), which is far below the values found for materials starting with a predominant viscous behaviour ($G'' > G'$), with $G'_{60^{\circ}\text{C}}$ being at least 60 times higher than $G'_{25^{\circ}\text{C}}$. However, the strongest gels were obtained in this way, with $G'_{60^{\circ}\text{C}}$ values being all above 230 Pa. The functionalization with T3P® is therefore more suited to obtain chemical hydrogels which are strengthening their network through the rise of temperature, which induces the establishment of additional reversible physical cross-links. In case a material displaying a thermo-responsive hydrogel transition behaviour is needed, it is better to work with low molecular weight HA as HA₃₈-g(T3P)-M2005-8.3% displayed an interesting G'/G'' crossing at 33.7 °C.

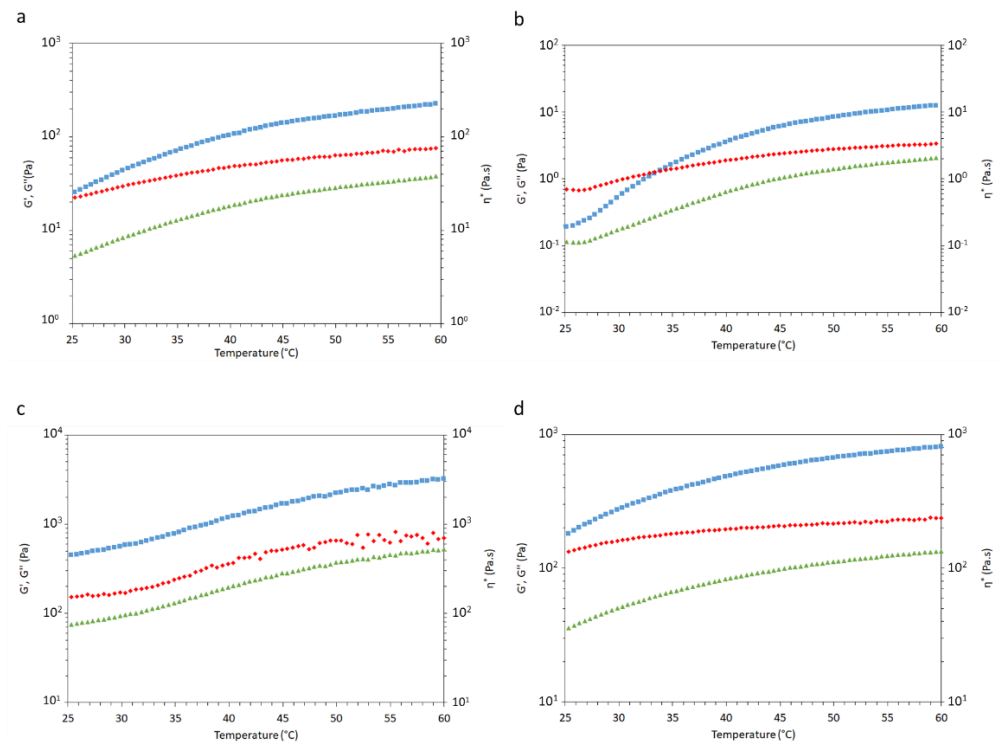


Figure 6. Rheological profile of (a) HA₃₈-g(T3P)-M2005-8.3% at 11 wt% in water (b) HA₃₈-g(T3P)-M2005-8.3% at 3 wt% in water (c) HA₁₄₀-g(T3P)-M2005-8.3% at 60 g.L⁻¹ in water and (d) HA₁₄₀-

$g_{(T3P)}\text{-M2005-5.5\%}$ at 6 wt% in water. Heating ramp: G' (square), G'' (rhombus), η^* (triangle) vs temperature; measurement in oscillation mode (parameters shear stress: 0.02 Pa (a and b), 0.1 Pa (c) or 0.5 Pa (d); frequency: 1 Hz; heating rate: $0.5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

3. Conclusion

Jeffamine[®] M2005 was grafted to hyaluronic acids of various molar mass using two different synthesis approaches with varying grafting degrees. The route using water as the solvent and a combination of EDC and NHS as coupling reagents did not allow to reach a degree of substitution of more than 5%. However, it was sufficient to induce a transition to a gel-like structure around $40\text{ }^\circ\text{C}$, with functionalized HA₁₂₀₀ at only 1 wt% concentration. On the other hand, with this range of grafting degree, HA_{38-g(EDC)}-M2005 and HA_{140-g(EDC)}-M2005 did not reach a gel-like structure with a reasonable concentration of the material in water, the transition happening at more than $50\text{ }^\circ\text{C}$ for already high concentrations of respectively 11 wt% and 6 wt%. In general, the protocol in water is straightforward to use and compatible with green chemistry principles, with the only drawback arising from the need to carefully purify the resulting material with several washings in acetone, as dialysis was not efficient to fully remove unreacted M2005. Moreover, although HA₃₈ and HA₁₄₀ remained intact from the reaction, HA₁₂₀₀ was slightly degraded, avoiding degradation would most probably lead to material with even better sol-gel transition properties.

In the approach that used DMF as the solvent and T3P[®] as the coupling reagent, higher grafting degrees of around 8% were achieved compared to the protocol in water. However, poorly soluble materials were obtained for HA₁₄₀ and HA₁₂₀₀ due to cross-linking formation, even when reducing the amount of coupling reagent. Still, the materials were also displaying thermo-responsive behaviour because of the formation of additional physical cross-links upon a chemical hydrogel network. Only HA₃₈ led to soluble samples, which displayed improved properties compared to the approach with water, with a high tendency to aggregate and a transition to a gel-like behaviour at only $33.7\text{ }^\circ\text{C}$ with a concentration of only 3 wt% in water. This material would be promising for devising injectable hydrogels for biomedical applications [30].

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi* (M_n : 1,200,000 g.mol⁻¹, abbreviated as HA₁₂₀₀) was purchased from Sigma-Aldrich (France), and two sodium hyaluronate batches with lower molar masses were kindly provided by Givaudan France SAS (Pomacle, France): BASHYAL with M_n : 140,000 g.mol⁻¹ (HA₁₄₀) and RENOVHYAL with M_n : 38 000 g.mol⁻¹ (HA₃₈) (absolute molar masses were determined through SEC/MALS measurements as detailed in section 4.3.3.). Jeffamine[®] was kindly provided by Huntsman. EDC, NHS, sodium phosphate monobasic monohydrate (NaH₂PO₄·H₂O), and tetrabutylammonium hydroxide 54–56 wt% (TBAOH) were purchased from Sigma-Aldrich (France). Propylphosphonic anhydride (T3P[®]) solution 50 wt% in DMF was purchased from Acros Organics (Germany). Anhydrous DMF, sodium chloride, sodium hydroxide, hydrochloric acid, sodium hydrogenophosphate (Na₂HPO₄), and amberlite ion exchange resin (IRN77, cationic type, H⁺) were purchased from VWR (France). Triethylamine (TEA) was purchased from Fluka (United Kingdom) and sodium phosphate dibasic dihydrate (Na₂HPO₄·2H₂O) was purchased from Merck (NJ,USA). Water was purified with the Milli-Q water reagent system (Millipore,MA,USA).

4.2. Synthesis of HA-g-M2005

4.2.1. Synthesis in water with EDC/NHS

The reaction was adapted from Dulong et al. [8] and typically done following the procedure described with eventual adjustments (see Scheme 1 for the mechanism). HA

(500 mg, 1.25 mmol) was dissolved overnight in 87.5 mL Milli-Q water. At the same time, M2005 (2.47 g, 1.25 mmol) was dissolved overnight in 9 mL Milli-Q water at 4 °C, as its LCST is 14 °C. The day after, the HA solution was placed at 4 °C while the pH of the M2005 solution was adjusted to 4.7 using both 1 M and 0.1 M HCl and NaOH solutions. As the pH adjustment of the M2005 solution was performed at room temperature, the solution sometimes precipitated due to the increasing temperature; it was therefore placed back at 4 °C for a while to dissolve again, this step being more straightforward due to the presence of positively charged ammonium induced by the pH decrease. The M2005 solution was then added to the HA solution (5 mL Milli-Q water were used for rinsing), and the pH was once more adjusted to 4.7 M using HCl and NaOH, as previously described, with the resulting mixture placed back at 4 °C immediately afterwards. An EDC/NHS solution was then prepared with 238.8mg EDC (1.25 mmol) and 5.7 mg (0.05 mmol) NHS dissolved in 2.5 mL water (the NHS should remain in catalytic quantities in order for the reaction not to lose its efficiency as stated by Dulong et al) [8]. It was then added to the HA/M2005 solution to start the reaction, which was left to proceed for one day at 4 °C. The day after, the reaction mixture was placed in a dialysis membrane (cut off: 12–14 kDa for HA₁₄₀ and HA₁₂₀₀; 3.5kDa for HA₃₈) and several cycles of dialysis were performed: one hour against 0.1 M NaOH, followed by neutralization against water for two days (changing water several times within each day); one hour against 0.1 M HCl, followed by neutralization against water for two days (changing water several times within each day); one hour against 0.1 M NaOH, to convert back the carboxylic acid moieties to sodium carboxylate, followed by neutralization against water for two days, then two days against a mixture of EtOH/H₂O (ratios: 33/67, *v/v*), and finally, against water until conductivity was as close to Milli-Q water as possible. In order to completely remove the unreacted Jeffamine® M2005, the material was washed several times in acetone until no variation of the ¹H NMR peaks corresponding to M2005 was observed (Figure S2).

4.2.2. Synthesis of HA-g-M2005 in Organic Solvent

- Conversion of sodium hyaluronate to tetrabutylammonium hyaluronate: 5 g of HA were dissolved overnight in 830 mL at room temperature. Then the cation exchange resin (H⁺) (45 g) was introduced in the solution, which was left to stir overnight. The resin was subsequently filtered off the solution through a sintered glass filter, whose porosity was adjusted depending on the viscosity of the HA solution. The obtained filtered hyaluronic acid solution was then neutralized with TBAOH for getting tetrabutylammonium hyaluronate TBA-HA as follows: Tetrabutylammonium hydroxide (TBAOH) 54–56 wt% in water was diluted fivefold with water prior to the reaction. It was subsequently added drop-wise to the previously prepared hyaluronic acid solution until the pH reached 8. The solution was then freeze-dried and the resulting solid kept in a freezer until further use.
- M2005 grafting on TBA-HA in DMF with T3P®: The grafting on reaction was adapted from Schleeh et al. [25], with an example given as follows: 2.5 g TBA-HA (4.03 mmol, from batch HA₃₈) were dissolved in 30 mL anhydrous DMF at room temperature in a three-neck flask which was thereafter put under nitrogen. Then, 4.7 mL of T3P® (50 wt% in DMF) were added to the mixture, which was left to stir for one hour at room temperature. Meanwhile, 15.96 g M2005 were dissolved in 15 mL anhydrous DMF. After TBA-HA was activated by T3P® for one hour, 568 µL of TEA were added to the solution, immediately followed with the M2005 solution (the flask was rinsed with 2.5 mL DMF). The final TBA-HA concentration was 50 g.L⁻¹, which was respectively adjusted to 10 g.L⁻¹ for HA₁₄₀ and to 6 g.L⁻¹ for HA₁₂₀₀ by increasing the amount of DMF used to dissolve TBA-HA. The reaction was left overnight at room temperature. The day after, 25 mL of a 2.5 M solution of NaCl were added drop-wise to the reaction vessel, which was subsequently left to stir for 30min before being poured in 250 mL acetone to precipitate the modified hyaluronic acid. The material was then recovered

through filtration, dissolved in 350 mL 0.1 M phosphate buffer (pH: 7.5) and then dialyzed against water until the resulting conductivity of water was found to be as close as Milli-Q as possible, indicating removal of the impurities; this was followed eventually by freeze-drying of the material. In order to completely remove the unreacted M2005, the material was washed several times in acetone until no more variation of the ^1H NMR peaks corresponding to M2005 was observed.

4.3. Characterisation Methods

4.3.1. Infrared Spectroscopy

Infrared spectra were acquired on a spectrometer Nicolet IS50 FT-IR (Thermo Scientific, MA, USA). The samples were analysed with the OMNIC 8.0 software by transmission from 500 to 4000 cm^{-1} (32 scans with resolution 2.).

4.3.2. ^1H NMR Spectroscopy

^1H NMR spectra were acquired on a Bruker Avance 300MHz spectrometer (MA, USA). The PMeOx homopolymer samples were prepared in deuterated chloroform CDCl_3 , while HA derivatives were prepared in deuterium oxide D_2O containing 0.125 M sodium deuterioxide NaOD [11].

The M2005 grafting degree (DS) on HA was evaluated by ^1H NMR using either Eq. 1a for HA-g(EDC)-M2005 (using HA methyl protons as a reference) or Eq. 1b for HA-g(T3P)-M2005 (using HA anomeric protons as a reference in case there were peaks overlapping with HA methyl protons).

$$DS = \frac{I_{MeM2005}}{(3 \times 29)} \times \frac{3}{I_{MeHA}} \quad \text{Eq. 1a} \quad (1)$$

Where $I_{MeM2005}$ corresponds to the integration of the duet of the methyl group from the propylene oxide units of the M2005 moieties found at about 1.10 ppm (the small duet at 0.95 ppm was also included in the integration, as it corresponds to the propylene oxide unit in α of the terminal nitrogen of M2005). I_{MeHA} corresponds to the integration of the methyl group from the *N*-acetylglucosamine unit (Figure 4).

$$DS = \frac{I_{MeM2005}}{(3 \times 29)} \times \frac{2}{I_{Hanom}} \quad \text{Eq. 1b} \quad (2)$$

Where I_{Hanom} corresponds to the integration number of the HA two anomeric protons were found at 4.47–3.38 ppm. The results of the various experiments have been combined in table 1.

4.3.3. SEC/MALS/DRI/Viscometer

The absolute average molar mass and molar mass distribution of the polymers were determined at 25°C on a system coupling on-line a size-exclusion chromatograph (SEC), a multi-angle light scattering system (MALS), a viscometer and a differential refractive index detector (DRI). The carrier was a 0.1 M LiNO_3 solution which was filtered through a 0.1 μm filter unit (Millipore, MA, USA), degassed on-line (DGU-20A3, Shimadzu, Japan), and eluted at a 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ flow-rate (LC10Ai Shimadzu, Japan). The solutions to analyse were prepared in 0.1M LiNO_3 at a concentration of respectively 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (HA_{1200} based materials) and 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (HA_{140} and HA_{38} based materials) and were passed through a 0.45 μm filter prior to injection which was performed on 100 μL of the solution with an automatic injector (SIL-20A Shimadzu, Japan). The SEC line consisted of an OHPAK SB-G guard column for protection and two OHPAK SB 806 and 804 HQ columns (Shodex Showa Denko K.K., Japan.) in series. The column packing was a polyhydroxymethylmethacrylate gel. The MALS detector was a DAWN Heleos-II (Wyatt Technology Inc., CA, USA) fitted with a 50 μL K5 cell and 18 photodiodes (normalized relative to the 90° detector using bovine serum albumin). The viscometer was a ViscoStar II (Wyatt Technology Inc., CA, USA). The collected data were analysed using the Astra

6.1.7.16 software package (Wyatt Technology Ins, CA, USA). Molar masses were obtained with the Zimm order 1 method. The concentration of each eluted fraction was determined with DRI (RID 10A Shimadzu, Japan) according to the known values of dn/dc (0.150 mL.g⁻¹ for HA and derivatives).

4.3.4. Rheology

Rheological measurements were performed on a Discovery Hybrid Rheometer HR-2 from TA Instruments (United Kingdom). Samples were prepared in Milli-Q water as a solvent at a concentration 12.5 times higher than starting HA overlapping concentration C*. Geometries used for measurements were either double concentric cylinders (aluminium—gap: 500 µm) or cone-plate (aluminium—gap: 50 µm). Oscillation measurement were mostly performed with a set frequency of 1 Hz (for measurement other than frequency sweep) and a set stress of 0.1 Pa (for measurement other than stress sweep). Temperature ramps were performed from 25 °C to 60 °C (and vice-versa) with a heating/cooling rate of 0.5 °C/min. A solvent trap was used to prevent the evaporation of water at the highest used temperatures. The data were processed using the Trios software v4.1.1.33073 from TA Instruments (United Kingdom).

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Summary of the properties of the different HA batches, Figure S1: HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5% DS evolution with the number of washes in Acetone,, Figure S2: Molar mass distribution of a) HA₁₂₀₀, HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5% and b) HA₁₄₀ and HA₁₄₀-g(EDC)-M2005-3.9%, Figure S3: Dilute and semi-dilute domains of HA₁₂₀₀ in Milli-Q water as determined through low shear viscosity measurements, Figure S4: Rheological profile of HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5% at 1 wt% in water (with cooling ramp), and Figure S5: Rheological profile of HA₁₄₀-g(T3P)-M2005-8.3% at 2 wt% in water (with cooling ramp).

Author Contributions: Supervision was conducted by L.-P., D.-L.C. and V.-D.; writing—original draft preparation was done by M.-M.; writing—review and editing were done by L.-P., D.-L.C. and V.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Région Normandie and the European Union.

Acknowledgments: The authors would like to thank Givaudan and Huntsman for having graciously offered HA and Jeffamine®, respectively. We are grateful to Dr. Christophe Rihouey for the SEC/MALS/DRI/Visco analyses

Conflict of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Lack, S.; Dulong, V.; Le Cerf, D.; Picton, L.; Argillier, J.F.; Muller, G. Hydrogels Based on Pullulan Crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): Rheological study. *Polym. Bull.* **2004**, *52*, 429–436.
- Matsumoto, K.; Sakikawa, N.; Miyata, T. Thermo-responsive gels that absorb moisture and ooze water. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2315–2321.
- Hennink, W.E.; Van Nostrum, C.F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 223–236.
- Peppas, N.A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 27–46.
- Li, Y.; Huang, G.; Zhang, X.; Li, B.; Chen, Y.; Lu, T.; Lu, T.J.; Xu, F. Magnetic Hydrogels and Their Potential Biomedical Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 660–672.
- Kierstan, M.; Bucke, C. The Immobilization of Microbial Cells, Subcellular Organelles, and Enzyme in Calcium Alginate Gels. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *19*, 387–397.
- Rosenblatt, J.; Devereux, B.; Wallace, D.G. Injectable collagen as a pH-sensitive hydrogel. *Biomaterials* **1994**, *15*, 985–995.
- Dulong, V.; Mocanu, G.; Picton, L.; Le Cerf, D. Amphiphilic and thermosensitive copolymers based on pullulan and Jeffamine®: Synthesis, characterization and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 1522–1531.
- Graham, S.; Marina, P.F.; Blencowe, A. Thermoresponsive polysaccharides and their thermoreversible physical hydrogel networks. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *207*, 143–159.
- Fraser, J.R.E.; Laurent, T.C.; Laurent, U.G.B. Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **1997**, *242*, 27–33.

11. Ret, D.; Steiner, G.; Gentilini, S.; Knaus, S. Exact determination of the degree of substitution of high molar mass hyaluronan by controlling the conformation in solution. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *204*, 124–130.
12. Charlot, A.; Heyraud, A.; Guenot, P.; Rinaudo, M.; Auzély-Velty, R. Controlled Synthesis and Inclusion Ability of a Hyaluronic Acid Derivative Bearing β -Cyclodextrin Molecules. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 907–913.
13. Kovensky, J.; Grand, E.; Uhrig, M.L. Applications of Glycosaminoglycans in the Medical, Veterinary, Pharmaceutical, and Cosmetic Fields. In *Industrial Applications of Renewable Biomass Products*, Goyanes, S.N., D'Accorso, N.B., Eds.; Springer International Publishing AG: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017; pp. 135–164.
14. Maudens, P.; Meyer, S.; Seemayer, C.A.; Jordan, O.; Alléman, E. Self-assembled thermoresponsive nanostructures of hyaluronic acid conjugates for osteoarthritis therapy. *Nanoscale* **2018**, *10*, 1845–1854.
15. Saraiva, A.; Persson, O.; Fredenslund, A. An experimental investigation of cloud-point curves for the poly(ethylene glycol)/water system at varying molecular weight distributions. *Fluid Phase Equilib.* **1993**, *91*, 291–311.
16. Ramos, J.; Imaz, A.; Forcada, J. Temperature-sensitive nanogels: Poly(*N*-vinylcaprolactam) versus poly(*N*-isopropylacrylamide). *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 852–856.
17. Guido, S. Phase Behavior of Aqueous Solutions of Hydroxypropylcellulose. *Macromolecules* **1995**, *28*, 4530–4539.
18. Ohya, S.; Nakayama, Y.; Matsuda, T. Thermoresponsive Artificial Extracellular Matrix for Tissue Engineering: Hyaluronic Acid Bioconjugated with Poly(*N*-isopropylacrylamide) Grafts. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 856–863.
19. Bulpitt, P.; Aeschlimann, D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *47*, 152–169.
20. D'Este, M.; Alini, M.; Eglin, D. Single step synthesis and characterization of thermoresponsive hyaluronan hydrogels. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90*, 1378–1385.
21. Trojer, M.A.; Anderson, M.; Bergenholtz, J.; Gatenholm, P. Quantitative Grafting for Structure-Function Establishment: Thermoresponsive Poly(alkylene oxide) Graft Copolymers Based on Hyaluronic Acid and Carboxymethylcellulose. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 1271–1280.
22. Seelbach, R.J.; D'Este, M.; Alini, M.; Mata, A.; Eglin, D. Copper catalyst efficiency for the CuAAC synthesis of a poly(*N*-isopropylacrylamide) conjugated hyaluronan. *Clin. Hemorheol. Microcir.* **2015**, *60*, 25–37.
23. Ter Boo, G.-J.A.; Arens, D.; Metsemakers, W.-J.; Zeiter, S.; Richards, R.G.; Grijpma, D.W.; Eglin, D.; Moriarty, T.F. Injectable gentamicin-loaded thermo-responsive hyaluronic acid derivative prevents infection in a rabbit model. *Acta Biomater.* **2016**, *43*, 185–194.
24. Kuo, J.W.; Swann, D.A.; Prestwich, G.D. Chemical Modification of Hyaluronic Acid by Carbodiimides. *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 232–241.
25. Schlee, T.; Madau, M.; Roessner, D. Two competing reactions of tetrabutylammonium alginate in organic solvents: Amidation versus γ -lactone synthesis. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *138*, 244–251.
26. Stern, R.; Kogan, G.; Jedrzejewski, M.J.; Šoltés, L. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 537–557.
27. Gamini, A.; Paoletti, S.; Toffanin, R.; Micali, F.; Michielin, L.; Bevilacqua, C. Structural investigations of cross-linked hyaluronan. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1161–1167.
28. Dulong, V.; Lack, S.; Le Cerf, D.; Picton, L.; Vannier, J.P.; Muller, G. Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *57*, 1–6.
29. Hadrich, A.; Dulong, V.; Rihouey, C.; Labat, B.; Picton, L.; Le Cerf, D. Biomimetic hydrogel by enzymatic crosslinking of pullulan grafted with ferulic acid. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *250*, 116967.
30. Dreiss, C.A. Hydrogel design strategies for drug delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2020**, *48*, 1–17.

Supplementary Materials

HA functionalization with Jeffamine® M2005: a comparison of the thermo-responsiveness properties of the hydrogel obtained through two different synthesis routes.

Mathieu MADAU ^a, Didier LE CERF ^a, Virginie DULONG ^a, Luc PICTON ^a

a) Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, PBS, F-76000 Rouen,
France

mathieu.madau@univ-rouen.fr; didier.lecerf@univ-rouen.fr;

virginie.dulong@univ-rouen.fr; luc.picton@univ-rouen.fr

* Correspondence: didier.lecerf@univ-rouen.fr; Tel.: (+33 (0)2 35 14 65 43)

1. Characterisation of the starting HA batches

HA₃₈, HA₁₄₀ and HA₁₂₀₀ dilute and semi-dilute domains were determined through low shear viscometry measurements using a Low Shear 400 Rheometer from Lamy Rheology (France). Samples were prepared in Milli-Q water. Measurements were performed in the Newtonian domain at low shear rate ($\leq 5 \text{ s}^{-1}$, after having screened the starting solution at different shear rates) with a LS11 geometry. The HA solution was gradually diluted from the starting solution (whose concentration depended on the probed HA batch), so the dilution domains and the critical overlapping concentration C^* could subsequently be determined by plotting the evolution of the specific viscosity η_{spe} as a function of the HA mass concentration using a logarithmic scale. η_{spe} was determined using formulae. S1:

$$\eta_{spe} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad \text{Eq. S1}$$

with η the measured viscosity of the solution and η_0 the viscosity of the solvent. The results of both SEC/MALS and C^* measurements are summed up in table 1.

Table S1 Summary of the properties of the different HA batches

Samples	M_n (g/mol) (SEC/MALS)	M_w (g/mol) (SEC/MALS)	C^* (g/L, MQ) (Lowshear)
HA ₃₈	38 000	64 000	8.5
HA ₁₄₀	140 000	210 000	4.8
HA ₁₂₀₀	1 200 000	1 500 000	0.8

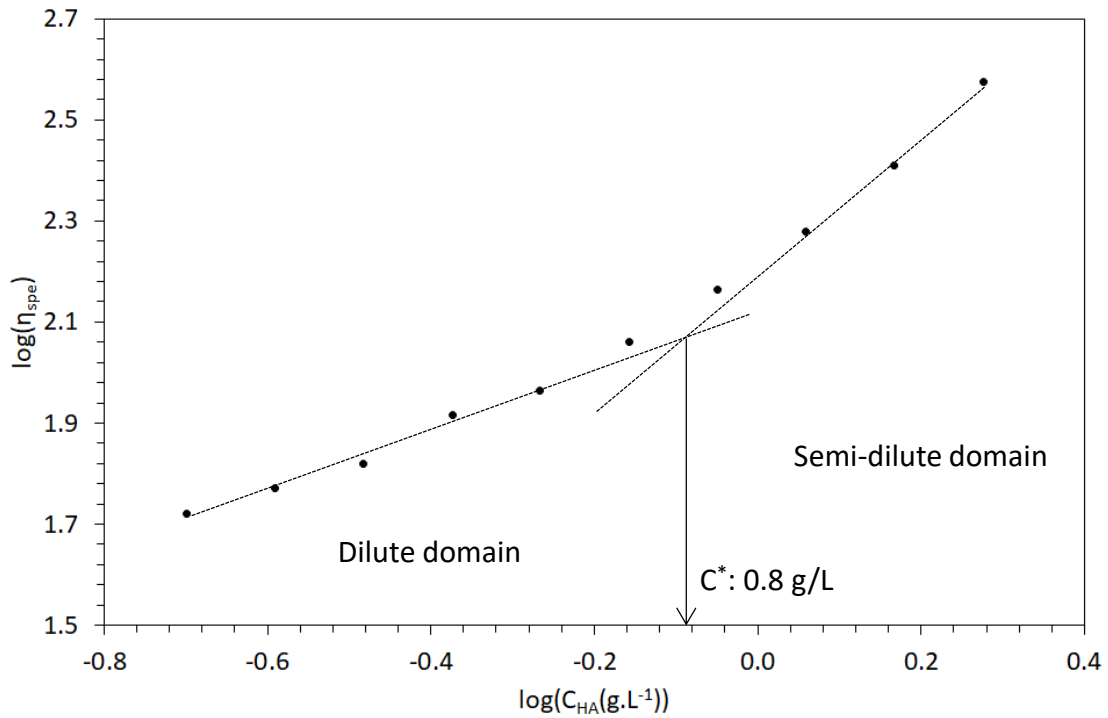


Figure S1. Dilute and semi-dilute domains of HA₁₂₀₀ in Milli-Q water as determined through low shear viscosity measurements. The crossing of the two linear domains is giving the C^* .

2. Synthesis of HA-g(EDC)-M2005 in water.

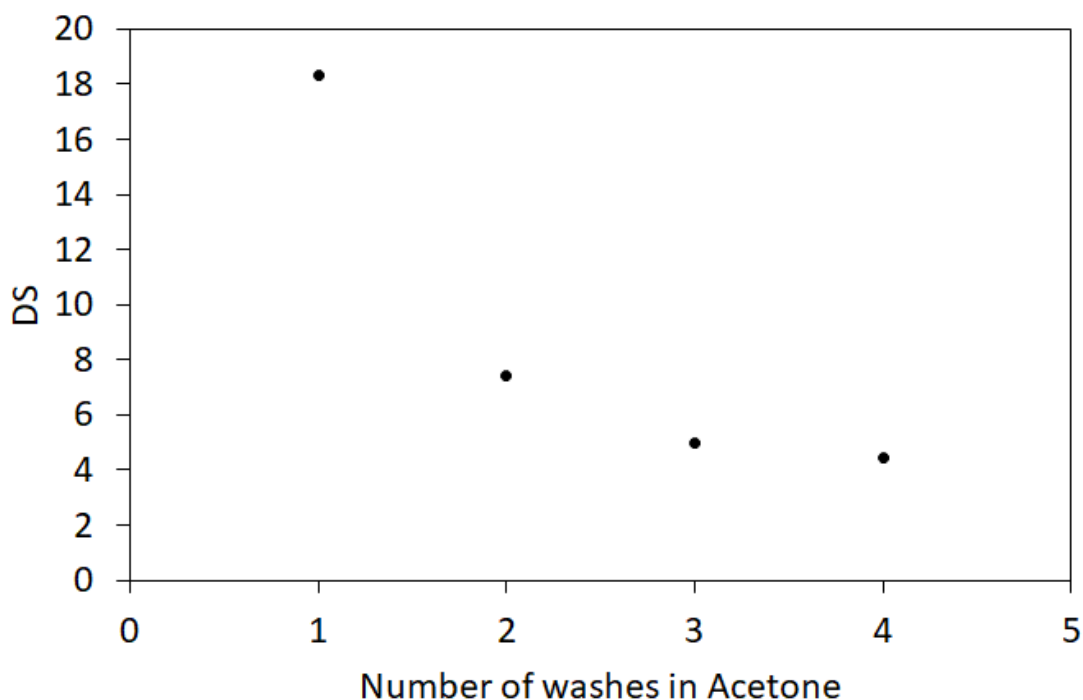


Figure S2. HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5% DS evolution with the number of washes in Acetone (DS was determined through ¹H NMR measurements).

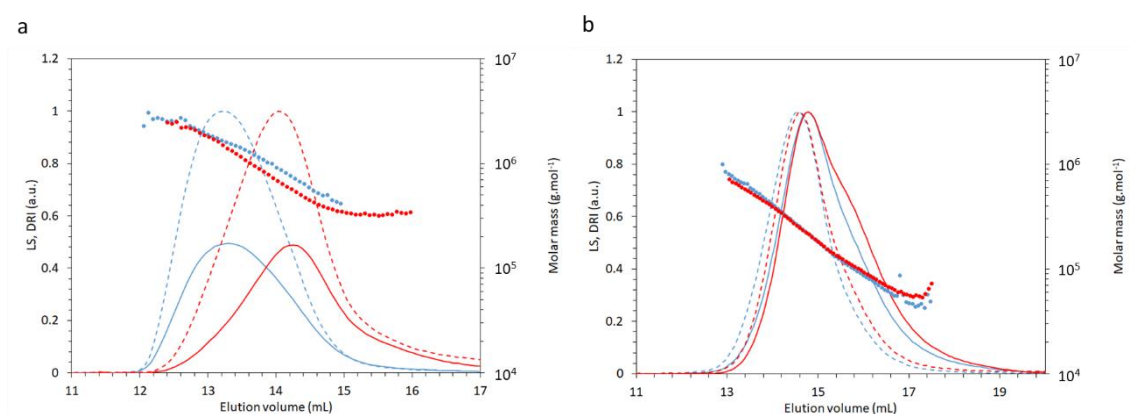


Figure S3. Molar mass distribution of a) HA₁₂₀₀ (blue), HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5% (red) and b) HA₁₄₀ (blue), HA₁₄₀-g(EDC)-M2005-3.9% (red); full lines: DRI; dotted lines: LS; full circles: molar mass distribution.

The DP_n values of HA-g-M2005 samples reported in Table 2 were calculated using Eq. (S2)

$$DPn = \frac{Mn}{DS \times (M_{M2005} + M_{uHA} - M_H) + (1-DS) \times M_{uNaHA}} \quad (S2)$$

Where M_n is the corresponding HA-g-M2005 average molar mass in number determined through SEC/MALS/VD/DRI measurements. M_{M2005} is the Jeffamine® M2005 molar mass, DS the grafting degree of M2005 on HA obtained from Eq. (1a) (HA-g_(EDC)-M2005) or Eq. (1b) (HA-g_(T3P)-M2005) with ¹H NMR spectroscopy (Fig. 3), M_{uHA} the molar mass of the acid form of HA disaccharide unit, M_H the molar mass of hydrogen and M_{uNaHA} the molar mass of the sodium form of HA disaccharide unit. Concerning M_{uNaHA} , for the sake of simplification, HA was assumed to be in its sodium salt form for this calculation. It is actually in equilibrium with the lithium salt form, also SEC/MALS/VD/DRI is only taking into account the fraction of condensed counter-ions [1]. Considering sodium or lithium salt will barely affect the calculated values, and more importantly, the observed tendencies will remain unaffected.

3. Conversion of Na-HA to TBA-HA

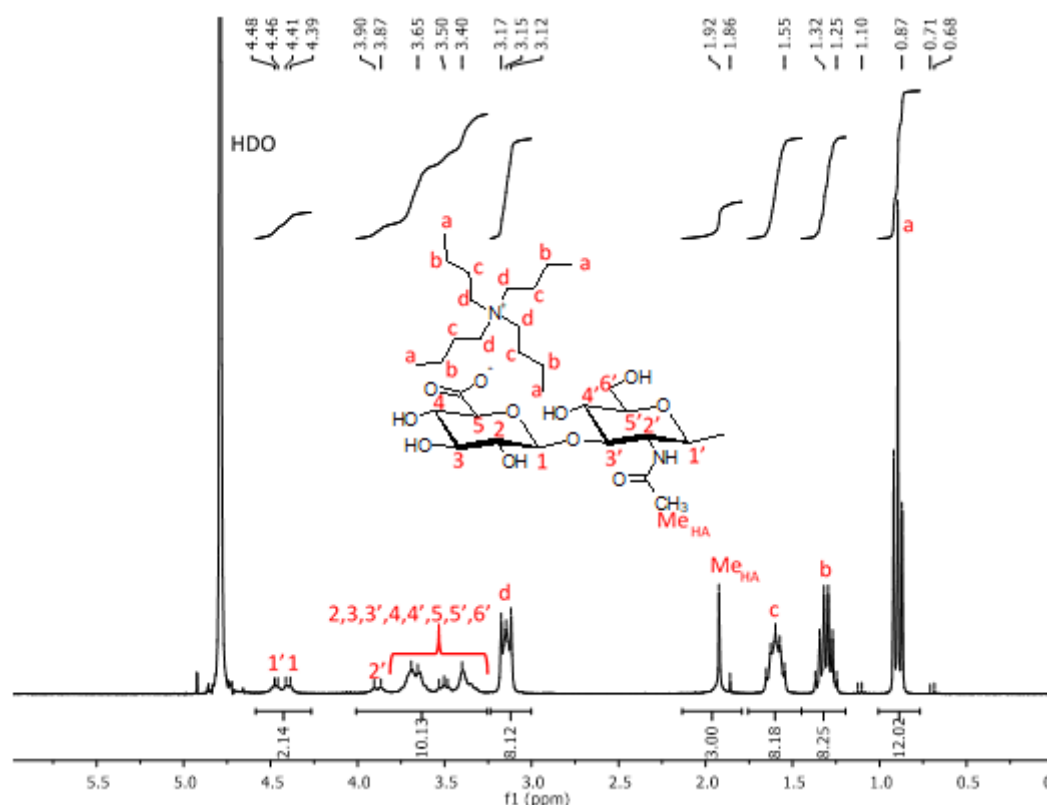


Figure S4. ¹H NMR spectrum of TBA-HA₃₈ in D₂O.

HA (sodium salt) had to be converted to a TBA salt in order to become soluble in DMF. The conversion was done in two steps: Na-HA was first acidified using a cationic exchange resin before being neutralized with tetrabutylammonium hydroxide (scheme 2a). The full conversion of sodium ions to tetrabutylammonium ones could then be assessed through ^1H NMR (Figure S4).

4. Rheological properties of HA-g-M2005

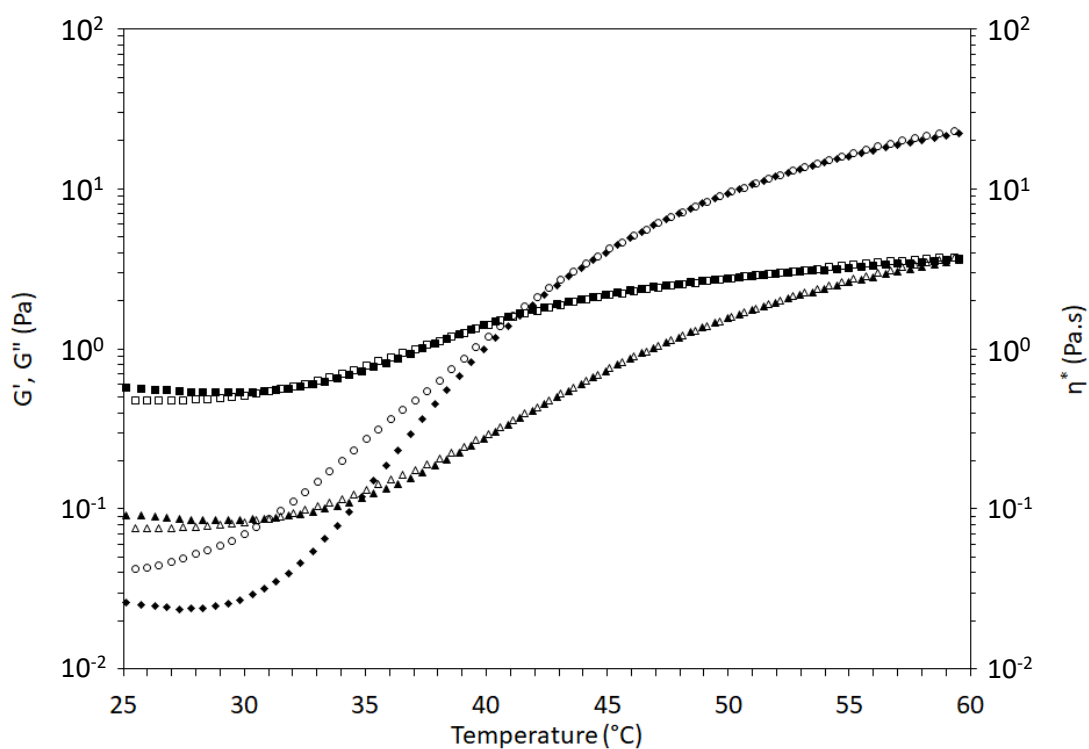


Figure S5. Rheological profile of HA₁₂₀₀-g(EDC)-M2005-4.5% at 1 wt% in water (with cooling ramp). Heating ramp: G' (full square), G'' (full rhombus), η^* (full triangle) vs temperature; cooling ramp: G' (empty square), G'' (empty rhombus), η^* (empty triangle) measurement in oscillation mode (parameters: shear stress: 0.1 Pa; frequency: 1 Hz; rate: 0.5 °C.min⁻¹).

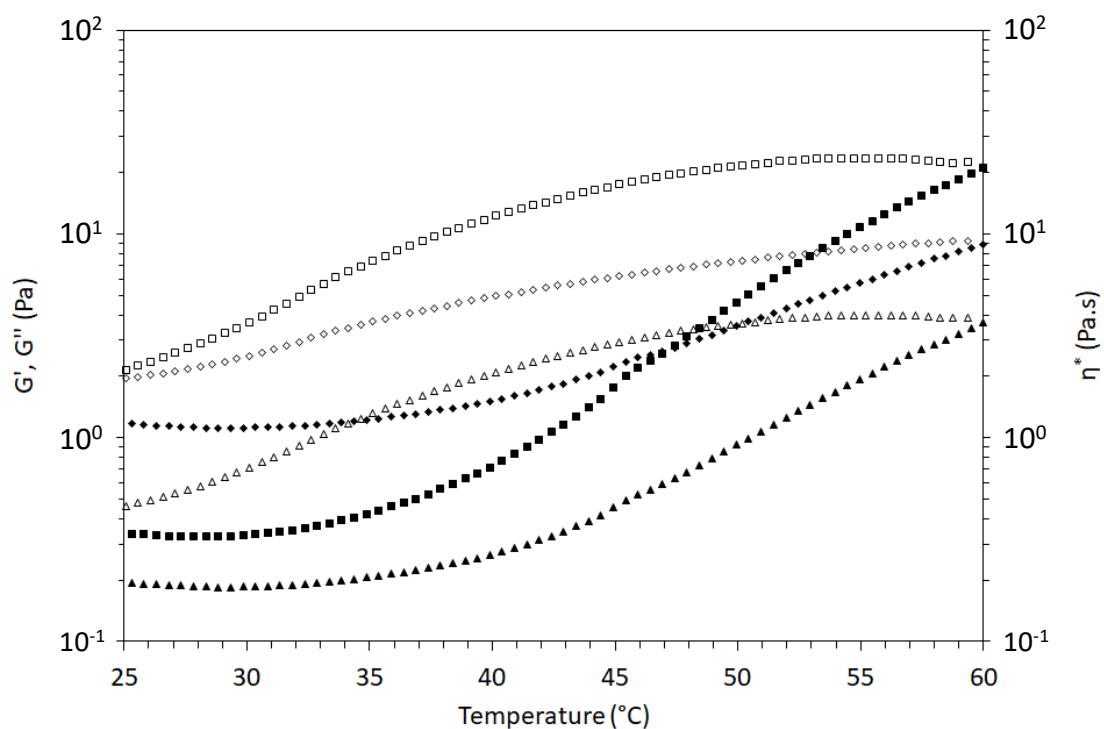


Figure S6. Rheological profile of HA₁₄₀-g(T_{3P})-M2005-8.3% at 2 wt% in water (with cooling ramp). Heating ramp: G' (full square), G'' (full rhombus), η^* (full triangle) vs temperature; cooling ramp: G' (empty square), G'' (empty rhombus), η^* (empty triangle) measurement in oscillation mode (parameters: shear stress: 0.1 Pa; frequency: 1 Hz; rate: 0.5 °C.min⁻¹).

References

1. Gonzalez, P.; Leclercq, L.; Cottet, H. What is the Contribution of Counter-Ions to the Absolute Molar Mass of Polyelectrolytes Determined by SEC-MALLS? *Macromol. Chem. Phys.* **2016**, *217*, 2654-2659.

3 Causes de la dégradation du HA_{1200k} en milieu aqueux

En milieu aqueux, la réaction conduit à une dégradation des chaînes de HA_{1200k}, qui ont perdu environ la moitié de leur longueur, tandis que les dérivés de HA_{140k} sont à peine dégradés et ceux du HA_{38k} ne le sont pas du tout. Cette dégradation est due à la fois à la réaction et à l'étape de dialyse en milieu basique. Un essai de dialyse directe du HA_{1200k} dans les conditions employées (blanc) lors du protocole de greffage a montré une dégradation plus limitée de l'échantillon par rapport aux HA_{1200k-g-M2005} (Figure C-1 et Tableau C-1). Par contre, l'utilisation de solutions tamponnées à la place de la soude et de l'acide chlorhydrique a également montré que des conditions pH plus douces permettaient également de limiter la dégradation de l'échantillon. On peut en effet constater Figure C-1 et Tableau C-1 que l'échantillon en solution au sein de tampons de pH respectifs de 8 (phosphate) et 6 (phosphate) est le moins dégradé, suivi de l'échantillon en solution dans des tampons de pH respectifs de 9 (carbonate) et 5 (MES).

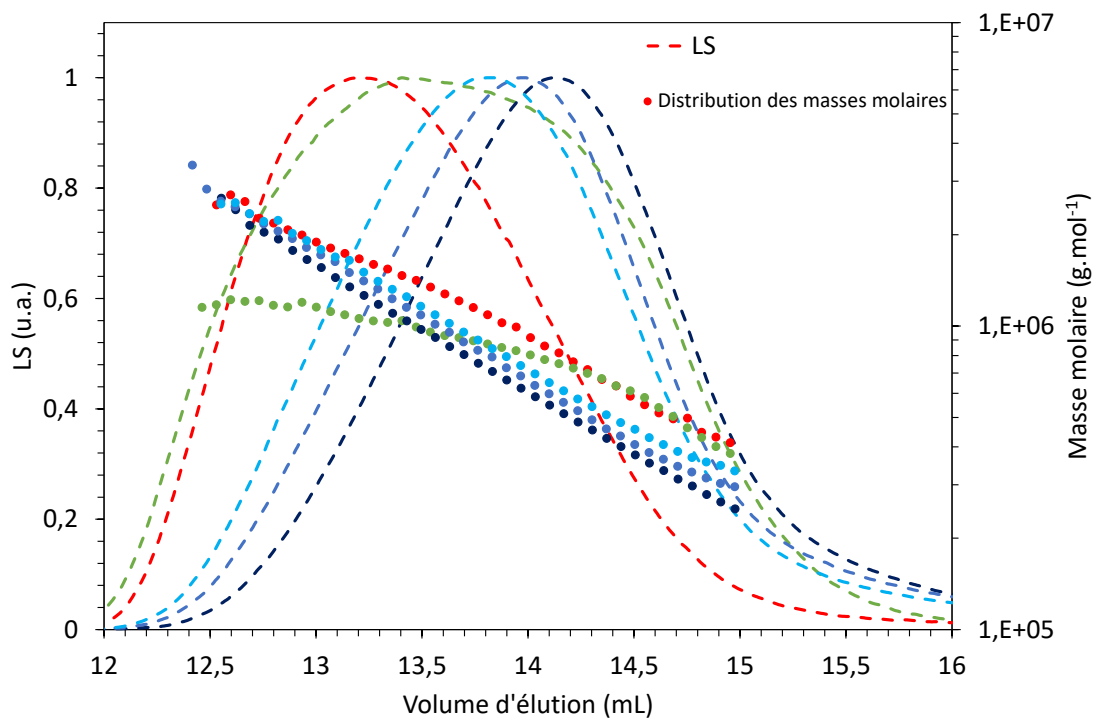


Figure C-1. Chromatogrammes du HA_{1200k} avant (courbes rouges) et après dialyse dans des solutions de soude et d'acide 0,1 M (courbes vertes) ainsi que de HA_{1200k-g-M2005} après dialyse dans des solutions de soude et d'acide 0,1 M (courbes bleues foncé), dans des tampons carbonate (pH 9) et MES (pH 5) (courbes bleues) et dans des tampons phosphate (pH 8 et 6) (courbes bleues clair) (éluant : LiNO₃ 0,1 M).

Tableau C-1. Impact du protocole de purification sur les masses molaires.

Echantillon	Méthode de purification	M _n (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	Đ
HA _{1200k}		1 200 000	1 500 000	1,25
HA _{1200k}	Dialyse dans NaOH et HCl 0,1 M	700 000	820 000	1,19
HA _{1200k-g} -M2005 ^a	Dialyse dans NaOH et HCl 0,1 M	360 000	440 000	1,44
HA _{1200k-g} -M2005 ^a	Dialyse dans carbonate et MES	500 000	560 000	1,40
HA _{1200k-g} -M2005 ^a	Dialyse dans phosphate	600 000	710 000	1,41

^a issus de la même réaction, séparée en plusieurs fractions pour la purification.

4 Conclusion

Nous avons étudié au cours de ce chapitre la fonctionnalisation de HA de diverses masses molaires avec la Jeffamine® M2005 en milieu aqueux et en milieu organique.

Le taux de greffage obtenu en milieu aqueux n'a pas dépassé les 5 %, mais restait suffisant malgré tout pour permettre la formation d'hydrogels physiques par élévation de la température. Il faut cependant employer du HA de forte masse molaire, le HA_{1200k}, qui bien que dégradé après réaction, est celui dont les dérivés permettent d'atteindre les T_{trans} les plus basses, avec des valeurs légèrement supérieures à 40 °C. Ce protocole en milieu aqueux est plus compatible avec les principes de la chimie verte, mais nécessite toutefois une étape de purification prolongée avec l'utilisation de plusieurs milieux de dialyse et la nécessité d'exécuter plusieurs lavages à l'acétone afin d'éliminer la Jeffamine® M2005 n'ayant pas réagi.

Le greffage en milieu organique permet d'améliorer les DS obtenus et d'atteindre les 8 %. Nous avons ainsi pu obtenir par exemple un HA_{38k-g}-M2005-8,3% avec une T_{trans} de 33,7 °C à une concentration de seulement 30 g.L⁻¹. Cependant, il faut noter que les composés obtenus ont tous également été réticulés chimiquement par l'action du T3P® par formation de liaisons esters, ce qui n'avait pas été constaté au cours de l'étude sur l'alginate utilisée comme référence (Schleeh). De ce fait, les HA_{140k-g}-M2005 et HA_{1200k-g}-M2005 ne sont que faiblement solubles dans l'eau. Toutefois, les hydrogels chimiques obtenus conservent des propriétés thermosensibles, avec une augmentation de leur G' pouvant se rapprocher d'une décade lorsque l'on passe de 25 °C à 60 °C observée pour certains échantillons de DS de 8,3 %.

Au final, nous pouvons conclure que ce système de HA-g-M2005 manque de flexibilité : le taux de greffage est difficile à augmenter, les T_{trans} difficiles à contrôler et la méthode en milieu

organique s'accompagne de la formation de gels chimiques qui nous éloigne de notre objectif initial.

La Jeffamine® M2005 est un copolymère de polyéthylène glycol et de polypropylène glycol : la modification de sa composition monomérique permettrait d'ajuster ses propriétés thermiques. Cependant, les dérivés commerciaux de Jeffamine® ne sont pas assez variés sur ce point. De plus, la biocompatibilité des polyéthers de glycol est de plus en plus remise en question du fait de leur tendance à s'accumuler dans les organes.

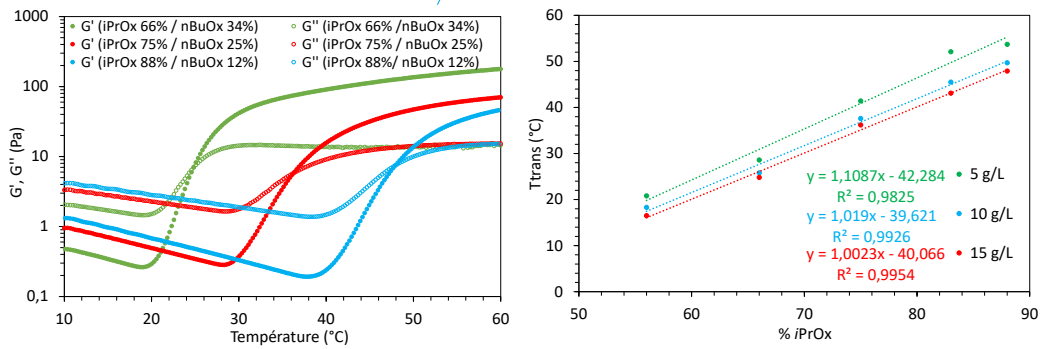
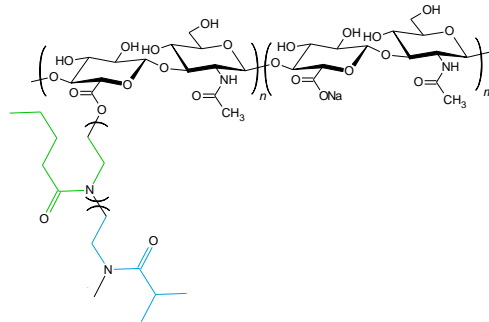
L'idéal serait donc de pouvoir synthétiser nous même au laboratoire des copolymères dont nous pourrions varier la réponse thermosensible par ajustement de leur composition. Les polyétheramines ayant déjà été bien étudiés, notre choix s'est porté sur un autre type de polymère thermosensible, les poly(2-alkyl-2-oxazoline)s.

5 Références

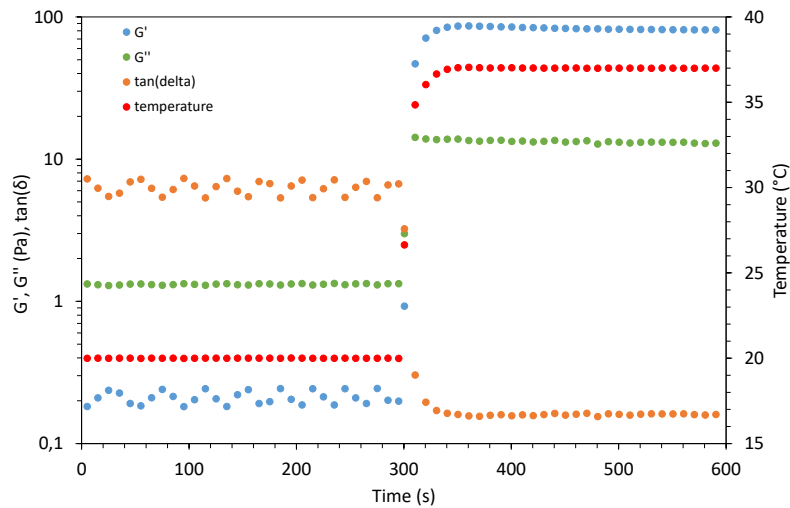
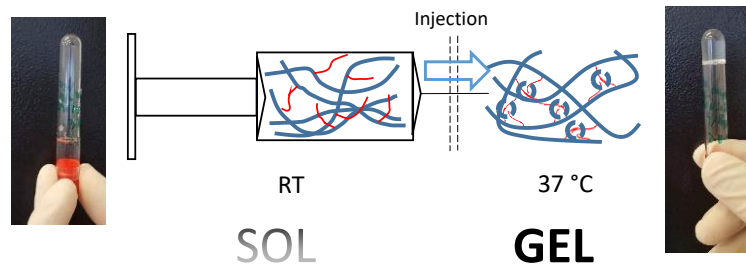
1. V. Dulong, G. Mocanu, L. Picton, D. Le Cerf, Amphiphilic and thermosensitive copolymers based on pullulan and Jeffamine®: Synthesis, characterization and physicochemical properties, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1522-1531.
2. M. D'Este, M. Alini, D. Eglin, Single step synthesis and characterization of thermoresponsive hyaluronan hydrogels, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1378–1385.
3. M.A. Trojer, M. Andersson, J. Bergenholtz, P. Gatenholm, Quantitative Grafting for Structure-Function Establishment: Thermoresponsive Poly(alkylene oxide) Graft Copolymers Based on Hyaluronic Acid and Carboxymethylcellulose, *Biomacromolecules* 20 (2019) 1271–1280.
4. J.W. Kuo, D.A. Swarm, G.D. Prestwich, Chemical Modification of Hyaluronic Acid by Carbodiimides, *Bioconjug. Chem.* 2 (1991) 232–241.
5. T. Schlee, M. Madau, D. Roessner, Two competing reactions of tetrabutylammonium alginate in organic solvents: Amidation versus γ -lactone synthesis, *Carbohydr. Polym.* 138 (2016) 244–251.

Chapitre D : Elaboration d'hydrogels thermosensibles à base de HA-g-(PiPrOx- co-PnBuOx)

Ajustement T_{trans} du HA-g-(PiPrOx-PnBuOx) avec ratio *iPrOx/nBuOx* du greffon



Injectabilité échantillon



Sommaire

1	Introduction.....	195
2	Synthèse du HA-g-PMeOx	195
2.1	Sélection de la stratégie de synthèse	195
2.2	Synthèse du PMeOx par voie thermique.....	198
2.3	Greffage du PMeOx sur le HA	201
2.3.1	Protocole de la réaction	201
2.3.2	Caractérisation moléculaire	203
2.3.3	Optimisation de la purification.....	205
2.3.4	Efficacité du greffage et analyse des propriétés des échantillons	210
3	Synthèse du HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx)	215
3.1	Protocole de la réaction.....	215
3.2	Caractérisation moléculaire.....	217
3.3	Caractérisation physico-chimique	222
3.3.1	Grandeurs physico-chimiques obtenues par SEC/MALLS/VD/DRI.....	222
3.3.2	Analyse de la T_{cp} par spectroscopie UV-vis.	225
3.4	Caractérisation rhéologique de la formation des hydrogels par élévation de la température.....	229
3.4.1	Mesure de la transition hydrogel par rampe thermique	229
3.4.1.1	Influence du ratio $iPrOx/nBuOx$ sur T_{trans}	234
3.4.1.2	Influence du DS sur T_{trans}	238
3.4.1.3	Influence du DP_{POX}	238
3.4.1.4	Influence de la masse molaire du HA sur T_{trans}	240
3.4.2	Impact du protocole de synthèse sur les propriétés des échantillons obtenus	241
3.4.3	Etude de la relaxation des gels.....	242
3.4.4	Etude de l'injectabilité du gel	244
4	Conclusion	246
5	Références.....	248

1 Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il était effectivement possible d'obtenir des hydrogels thermosensibles à base d'acide hyaluronique en lui greffant un polymère thermosensible commercial, la Jeffamine® M2005. Cependant, nous avons également pu remarquer qu'il était difficile de contrôler les propriétés thermiques du composé obtenu. Il y a donc un intérêt à synthétiser nos propres chaînes thermosensibles dont nous pourrions ajuster les propriétés. Nous avons vu au chapitre B que nous pouvions synthétiser des copolymères de PiPrOx-co-PnBuOx de point trouble variable selon la composition monomérique de la chaîne macromoléculaire, une augmentation de la teneur en nBuOx, plus hydrophobe que l'iPrOx, entraînant la baisse du T_{cp} . Il faudrait donc maintenant pouvoir le greffer sur le HA.

Etant donné que les deux monomères sont relativement chers (271 € les 5 g pour l'iPrOx et 144 € les 5 g de nBuOx chez sigma-aldrich), il a été décidé d'utiliser dans un premier temps le monomère de 2-alkyl-2-oxazoline le plus simple, à savoir le 2-méthyl-2-oxazoline MeOx, qui présente la chaîne alcane fonctionnelle la plus courte. Il est en effet nettement moins cher (76,7 € les 100 g chez sigma-aldrich) et son hydrophilie facilitera les analyses en SEC/MALLS, car le composé ne peut être retenu par les colonnes.

Dans ce chapitre, nous traiterons donc dans un premier temps du greffage du PMeOx sur le HA en expliquant la stratégie de synthèse et les conditions de réaction choisies. Les HA-g-PMeOx seront ensuite caractérisés. Puis, la réaction sera étendue aux copolymères de PiPrOx-co-PnBuOx et les propriétés thermiques des HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) obtenus seront étudiées.

2 Synthèse du HA-g-PMeOx

2.1 Sélection de la stratégie de synthèse

Il a tout d'abord fallu établir une stratégie de synthèse en consultant la littérature. Pour rappel, nous visons à effectuer le greffage par une voie '*grafting to*', où la chaîne serait d'abord polymérisée avant d'être incorporée sur le HA, ce qui résulterait en la formation d'une structure de type copolymère en peigne. Cette méthode a été privilégiée à la voie '*grafting from*', où le monomère serait polymérisé à partir de la chaîne où il doit être greffé. La première idée était de fonctionnaliser le HA avec le PMeOx par l'établissement de liaisons amide comme cela avait été le cas avec la Jeffamine® M2005. Pour cela, il faut que la chaîne PMeOx ait une fonctionnalité

amine terminale, en α ou en ω . L'obtention d'une amine en α implique d'utiliser un amorceur qui en serait pourvu, ce qui serait compliqué, car l'amine est un nucléophile et peut donc terminer la CROP du PMeOx. Il faudrait donc utiliser des groupes protecteurs des amines, comme les *tert*-Butoxycarbonyl (BOC), ce qui implique des étapes de synthèse supplémentaires dont une déprotection post-polymérisation, ce qui ôte tout intérêt d'utiliser cette voie par rapport à la fonctionnalisation en ω , dont le principal inconvénient est de nécessiter d'effectuer des réactions après obtention de la chaîne PMeOx. Cette approche est plus avantageuse car elle permet de travailler avec des composés peu onéreux que l'on trouve chez les fournisseurs usuels. Parmi ces méthodes, on peut citer la synthèse de Gabriel qui permet d'obtenir des amines primaires^{1,2}. Elle se déroule en deux étapes, la première consiste en une addition nucléophile d'un phthalimide, qui se fera dans ce cas sur l'oxazolium terminal du polyoxazoline. Le phthalimide est ensuite converti en amide en ajoutant de l'hydrazine au milieu de réaction porté à reflux (Figure D-1-1). La deuxième méthode est l'utilisation de la réaction de Staudinger. Dans un premier temps, la chaîne polyoxazoline est terminée avec un azoture, puis ce dernier est converti en amine en le faisant réagir avec de la triphénylphosphine (Figure D-1-2)³. Ces deux méthodes aboutissent à la formation d'une amine terminale. Il en existe deux autres qui reposent sur l'utilisation de diamines. Dans le cadre de la première, on utilise une pipéridine, une amine secondaire cyclique, pour effectuer la terminaison, ce groupe étant couramment utilisé pour terminer les chaînes polyoxazolines⁴. La pipéridine employée est la 4-(*N*-BOC-amino)pipéridine⁵. Elle comporte une fonction amine avec un groupe protecteur BOC, qui sera retiré en ajoutant de l'acide trifluoroacétique au milieu de réaction porté à reflux (Figure D-1-3). La dernière voie consiste à effectuer la terminaison directement avec de l'éthylène diamine en excès⁶ (Figure D-1-4). La plupart de ces méthodes nécessitent plusieurs étapes. Il faut en outre à chaque fois caractériser l'extrémité de chaîne du polymère, ce qui n'est pas aisé, des méthodes indirectes devant être utilisées comme de la HPLC par échange d'ion³. Il est en effet souvent délicat d'utiliser la RMN pour repérer ces groupes. Une autre possibilité est de doser les fonctions amines terminales par l'acide 4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS)⁷, cependant cette méthode nécessite un étalonnage. De plus, il faut ensuite purifier le polymère obtenu, or, nous avons constaté au chapitre B qu'il était délicat d'obtenir un bon rendement par dialyse avec les DP relativement courts (de 15 à 50) que nous visions. Nous avons donc recherché une voie alternative.

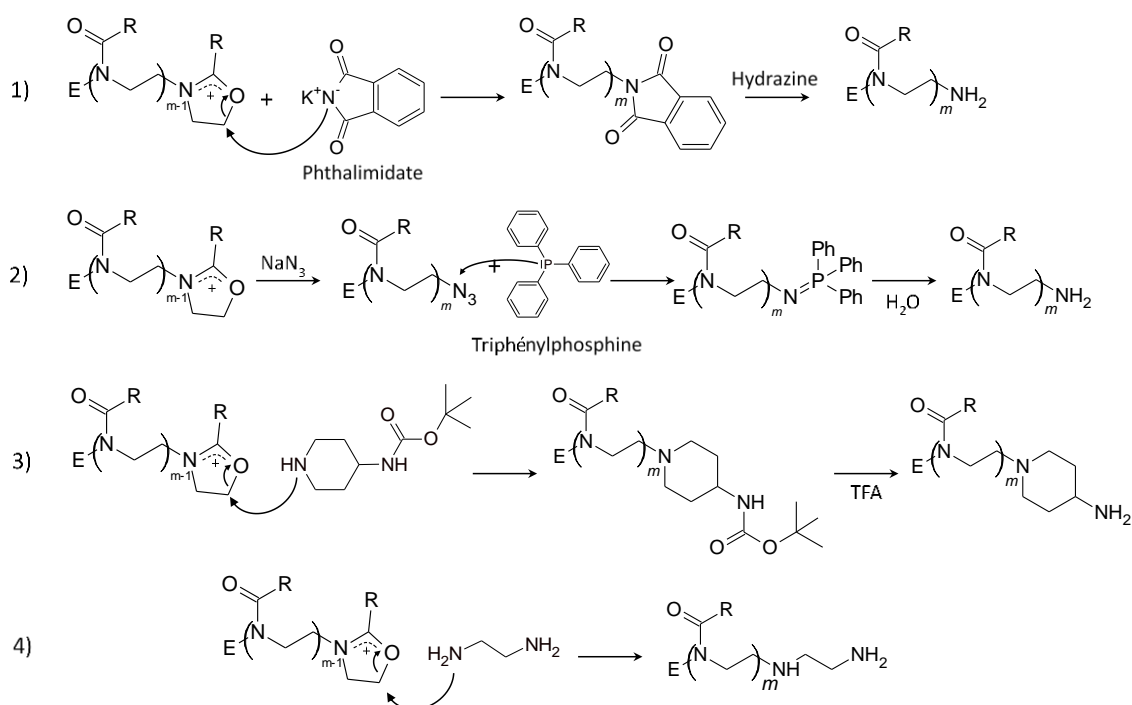


Figure D-1 Diverses stratégies de terminaisons d'une chaîne polyoxazoline avec une fonction amine en position ω .

Nous avons vu chapitre A que certains groupes de recherche utilisaient directement des polysaccharides pour effectuer la terminaison d'une chaîne polyoxazoline. Une équipe a par exemple utilisé la fonction amine du chitosane^{8,9}. En ce qui nous concerne, Il est possible de générer une fonction amine au sein du HA par désacétylation, cependant, nous avons vu que cela comportait deux inconvénients, à savoir la nécessité de réacétyler les amines qui n'auraient pas terminé de chaîne POx et que la réaction s'effectue dans des conditions qui risquent de dégrader la chaîne polysaccharide¹⁰. Un autre groupe a activé les fonctions alcools de polysaccharides constitués de glucose comme le glycogène avec de l'hydruire de sodium dans le DMSO pour effectuer la terminaison¹¹. Cependant, cette méthode comporte aussi des inconvénients dans notre cas, à savoir que l'hydruire de sodium est une base forte et elle risque donc de dégrader le HA par β -élimination.

Nous avons donc focalisé notre attention sur les fonctions acide carboxylique du HA. Ce groupe fonctionnel a en effet déjà été utilisé pour terminer des chaînes de polyoxazolines, à partir de molécules^{12,13}, mais également, de façon plus rare, à partir de polymères comme le PMMA par exemple¹⁴.

Dans cette partie, nous allons donc traiter de la terminaison directe du PMeOx en milieu organique par le HA sous forme de sel de tétrabutylammonium, afin d'obtenir des copolymères en peignes de HA-g-PMeOx. Nous avons varié le ratio de HA/PMeOx afin de voir l'impact sur le degré de substitution DS, ainsi que le DP des chaînes PMeOx (DP_{PMeOx}). Les HA-g-PMeOx obtenus ont été caractérisés par spectroscopies RMN et FTIR. Afin de vérifier que le PMeOx était bien greffé sur le HA, des mesures de SEC/MALLS et de RMN DOSY ont été effectuées. Le schéma de la réaction est décrit Figure D-2.

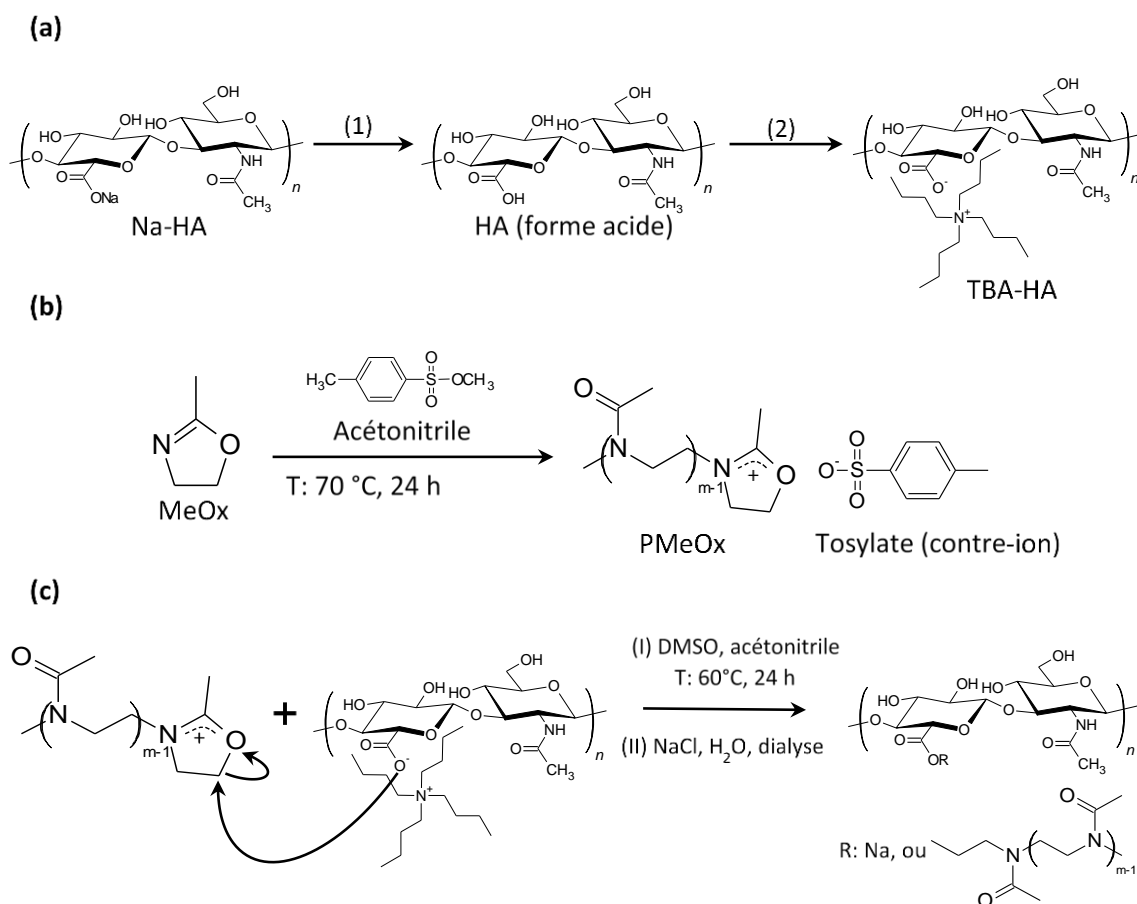


Figure D-2 Schéma global de la fonctionnalisation du HA avec le PMeOx : a) conversion du HA sous forme de sel de tétrabutylammonium, b) CROP du MeOx et c) terminaison de la chaîne PMeOx avec le TBA-HA.

2.2 Synthèse du PMeOx par voie thermique

Pour obtenir le PMeOx en quantité raisonnable, nous avons opté pour la polymérisation du MeOx par voie thermique (permettant de synthétiser de plus grandes quantités). Nous avons

tout d'abord réalisé des tests avec terminaison de la chaîne avec du KOH dans le méthanol afin de vérifier que la chaîne se forme bien.

Protocole de polymérisation du PMeOx par voie thermique :

Le protocole est similaire à celui utilisé pour le PiPrOx-co-PnBuOx (chapitre B, section 4.3, page 140) jusque l'étape de purification, qui a été modifiée. Afin d'éviter de réaliser des dialyses prolongées et d'améliorer le rendement de la réaction, 3 cycles de précipitation dans l'éther diéthylique suivi de redissolution dans le dichlorométhane ont été réalisés dans des tubes Falcon® de 50 mL, afin de pouvoir centrifuger le contenu lors des précipitations pour extraire facilement le solvant (il n'était pas non plus possible de laver le composé dans l'eau distillée vu qu'il n'est pas thermosensible). Le PMeOx est ensuite précipité une dernière fois dans l'éther diéthylique, puis dialysé contre l'eau Milli-Q (seuil de rétention des membranes : 500-1000 Da) pendant deux nuits et un jour en ne changeant l'eau que le matin et le soir. Nous avons obtenu des chaînes de PMeOx de DP respectifs de 14 (PMeOx₁₄), 28 (PMeOx₂₈) et de 44 (PMeOx₄₄), le DP étant déterminé par RMN avec l'équation B20 (page 135) sur un prélèvement du milieu réactionnel juste avant l'étape de terminaison. Cette formule fonctionne également avec le PMeOx, vu qu'elle repose sur l'utilisation des protons des groupes méthylènes du squelette polymère et sur les protons du tosylate issu de l'amorceur (voir Figure D-4 pour un exemple de spectre RMN avant terminaison). Le rendement de la réaction était d'environ 45 % pour le PMeOx₂₈ et le PMeOx₄₄, ce qui constitue un progrès par rapport aux tests avec les copolymères PiPrOx-co-PnBuOx pour lesquels le rendement était de 25-30 %. Par contre, il n'était que de 11 % avec le PMeOx₁₄ malgré l'utilisation de membranes de seuil de rétention de 100-500 Da pour cet échantillon particulier.

Les échantillons ont ensuite pu être analysés par SEC/MALLS en utilisant le jeu de colonnes 804-802,5 (Figure D-3). On peut voir que les volumes d'élution suivent l'ordre attendu, avec le PMeOx₄₄ qui sort le premier de la colonne, suivi du PMeOx₂₈ et enfin du PMeOx₁₄ (les composés ont bien sûr été injectés séparément). On peut également observer que les valeurs de \bar{D} sont inférieures à 1,1, ce qui signifie que l'on a des échantillons quasi monodisperses. Les valeurs de M_n obtenues permettent de remonter à un degré de polymérisation DP_{SEC} selon l'équation suivante :

$$DP_{SEC} = \frac{M_n - (M_{CH_3} + M_{OH})}{M_{MeOx}} \quad (D1)$$

Où M_{CH_3} est la masse molaire du groupe méthyle à l'extrémité α de la chaîne PMeOx (15 g.mol⁻¹), M_{OH} celle de la fonction hydroxyle à l'extrémité ω de ce même polymère (17 g.mol⁻¹), et M_{MeOx} la masse molaire du monomère MeOx (85,1 g.mol⁻¹).

Ces dernières sont nettement plus élevées que les valeurs obtenues par RMN. Si l'on corrèle ces valeurs élevées de DP, les dispersités extrêmement faibles obtenues et les rendements massiques faibles observés après l'étape de dialyse, on peut déduire que seules les fractions de plus fortes masses molaires du PMeOx ont été retenues par la membrane. Ceci peut expliquer en partie les différences observées car nous ne disposons pas des distributions de masses molaires avant la terminaison. Par la suite de ce manuscrit, nous continuerons donc d'utiliser les valeurs de DP obtenues par RMN avant la terminaison (équation B20, page 135), qui permettent de comparer les deux échantillons et sont les plus proches de la valeur théorique devant être obtenue.

Tableau D-1 Masses molaires des PMeOx polymérisés par voie thermique (dn/dc : 0,158).

Echantillon	M_n (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	\bar{D}	DP _{SEC}
PMeOx ₄₄	6400	6800	1,059	75
PMeOx ₂₉	3700	4000	1,090	43
PMeOx ₁₄	2000	2100	1,055	23

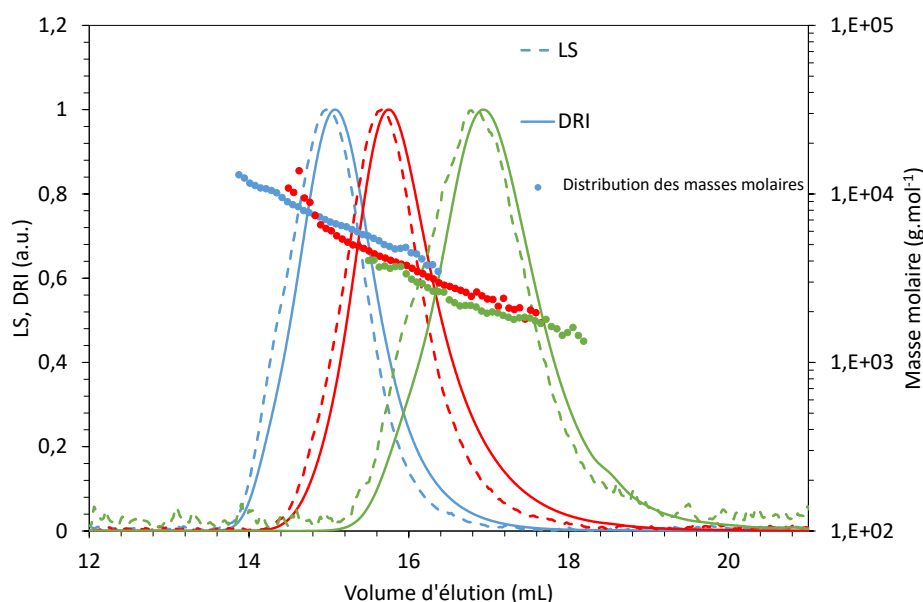


Figure D-3 Chromatogrammes respectifs du PMeOx₄₄ (bleu), du PMeOx₂₉ (rouge) et du PMeOx₁₄ (vert).

2.3 Greffage du PMeOx sur le HA

2.3.1 Protocole de la réaction

Nous pouvons donc dorénavant tenter de greffer le PMeOx sur le HA. Les acides hyaluroniques utilisés pour cette étude sont le HA_{38k}, le HA_{140k} et le HA_{990k}. Ils sont d'abord convertis sous forme de sels de tétrabutylammonium comme expliqué au chapitre B (section 4.1.2.2 page 125) (Figure D-2). Le PMeOx a été polymérisé par voie thermique avec le même protocole que pour la polymérisation du PiPrOx-co-PnBuOx (chapitre B, section 4.3, page 140) a été utilisé sauf l'étape de terminaison où la solution de KOH dans le méthanol a été remplacée par une solution de TBA-HA dans le DMSO afin de réaliser un greffage 'one-pot', s'affranchissant des pertes en polyoxazoline au cours de la purification.

Greffage du PMeOx sur le HA :

Le protocole est présenté pour un PMeOx de DP cible de 30 et pour un ratio molaire théorique de PMeOx/TBA-HA de 1 ou 0,5. La verrerie est séchée à l'étuve la veille de la réaction (170 °C). Le *p*-toluènesulfonate de méthyle (150 mg, 0,805 mmol) est dissout dans 4 mL d'acétonitrile anhydre et est introduit dans un ballon placé sous agitation à température ambiante. Le MeOx (2,056 g, 24,16 mmol) est ensuite introduit dans le ballon (2 mL d'acétonitrile sont utilisés pour le rinçage des flacons de façon à aboutir à une concentration en monomère dans le ballon de 4 mol.L⁻¹). De l'azote est bullé pendant environ 15 min dans le milieu réactionnel, à la suite de quoi le ballon est introduit dans un bain d'huile préchauffé à 70 °C (l'azote est maintenu dans le ballon avec un ballon de baudruche réservoir piqué dans le bouchon septum fermant le ballon). La réaction est laissée 24 h. Avant la terminaison, un échantillon est prélevé pour effectuer une analyse RMN (Figure D-4) afin de déterminer les caractéristiques du PMeOx (DP). L'allure est conforme à celle obtenue dans d'autres études^{15,16}.

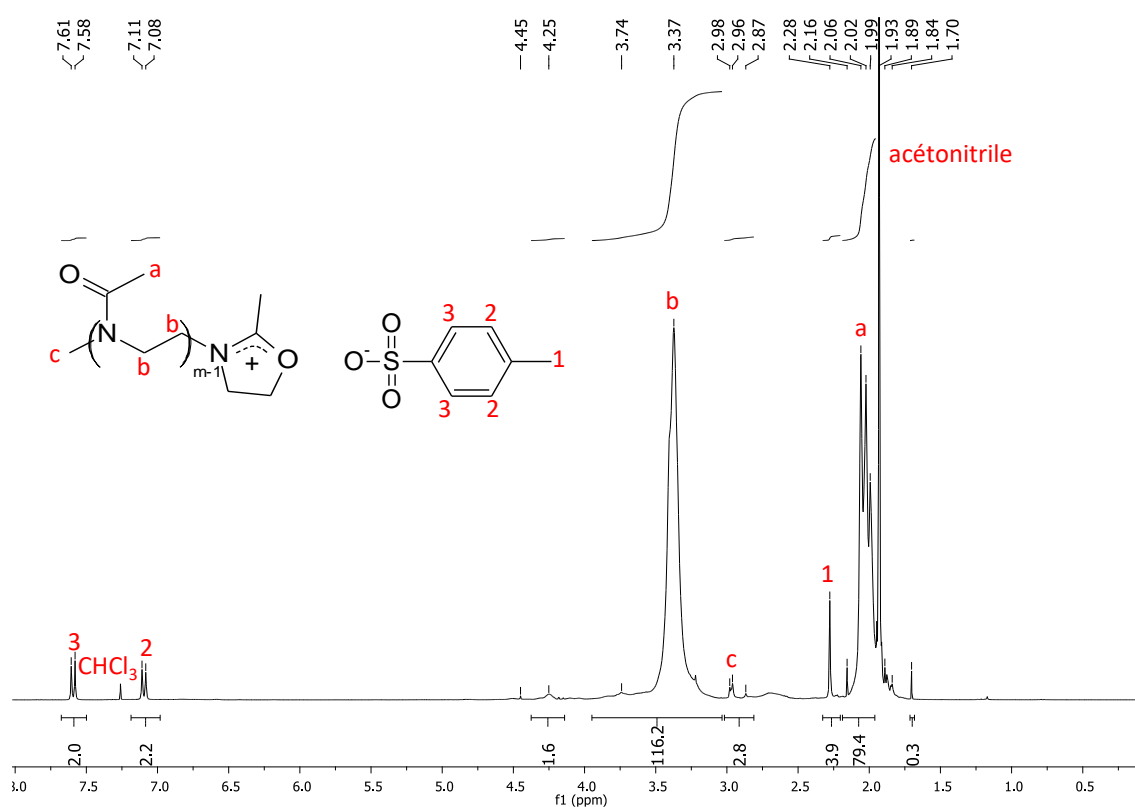


Figure D-4 Spectre RMN du PMeOx₂₉ dans le CDCl₃ (avant la terminaison).

Le principe de l'étape de terminaison est représenté Figure D-2-c. Afin d'ajuster la quantité d'unité TBA-HA par rapport à celle de chaîne PMeOx, on considère que cette dernière est équivalente à la quantité d'amorceur employée. Le TBA-HA (500 mg, 0,805 mmol pour un ratio molaire PMeOx/TBA-HA de 1 ou 1 g, 1,6109 mmol, pour un ratio molaire PMeOx/TBA-HA de 0,5) est dissout dans du DMSO anhydre au sein d'un tricol. Pendant la dissolution, le tricol est placé sous azote en faisant buller le gaz environ 15 min, et maintenu sous ce gaz par le biais d'un ballon de baudruche rempli d'azote piqué dans un bouchon septum. La quantité de solvant a été ajustée en fonction du polysaccharide employé afin d'obtenir une concentration de 50 g.L⁻¹ pour le TBA-HA_{38k}, de 20 g.L⁻¹ pour le TBA-HA_{140k} et de 12,5 g.L⁻¹ pour le TBA-HA_{990k}. La dissolution était relativement rapide pour le TBA-HA_{38k} et le TBA-HA_{140k}. Par contre, elle a nécessité une nuit à 60 °C pour le TBA-HA_{990k}. Dans tous les cas, la solution de PMeOx dans l'acétonitrile est prélevée avec une seringue puis introduite au sein du tricol contenant la solution de TBA-HA dans le DMSO, cette dernière étant placée à température ambiante sous forte agitation. Le tricol est ensuite transféré dans un bain d'huile préchauffé à 60 °C. La réaction de terminaison est laissée 24 h à 60 °C. Le récipient est ensuite laissé à refroidir à température ambiante. Puis on introduit goutte-à-goutte une solution de NaCl 2,5 M à hauteur de 10 mL par

gramme de TBA-HA employé. Cette solution sert à substituer les cations tétrabutylammonium du HA par du sodium. Le polysaccharide fonctionnalisé est ensuite précipité dans de l'acétone (le volume correspondait à 5x celui de DMSO employé). Il est ensuite filtré et placé dans une solution de NaCl 0,2 mol.L⁻¹ sous agitation pendant une nuit (100 mL par gramme de TBA-HA employé au début de la réaction), afin de substituer les éventuels tétrabutylammoniums restant sur la chaîne. La solution est ensuite dialysée contre l'eau Milli-Q avec des membranes de seuils de rétention respectifs de 6-8 kDa pour le TBA-HA_{38k} et de 12-14 kDa pour le TBA-HA_{140k} et le TBA-HA_{990k}. La solution contenant le HA modifiée est ensuite congelée à -20 °C, puis lyophilisée. Le matériau obtenu, d'aspect cotonneux, est ensuite dispersé dans l'éthanol pendant une journée puis récupéré par filtration (rinçage à l'éthanol 3x 100 mL), cette opération étant répétée trois fois afin d'éliminer les chaînes de PMeOx libres restantes. Au cours de la dernière filtration, le HA est rincé avec de l'éthanol puis avec de l'acétone afin d'accélérer l'étape de séchage qui va suivre, cette dernière s'effectuant à l'étuve sous vide à température ambiante jusque l'obtention d'une masse constante.

Par la suite, les échantillons obtenus seront codés de la façon suivante : HA_{M_n}-g-PMeOx_{DP}-DS, où M_n est la masse molaire en nombre du HA de départ (ex : 140k pour 140 000 g.mol⁻¹), DP le degré de polymérisation du PMeOx et DS le degré de fonctionnalisation de la chaîne HA avec du PMeOx.

2.3.2 Caractérisation moléculaire

Les échantillons ont d'abord été caractérisés par FTIR et RMN afin de vérifier si la réaction a bien fonctionné. Les courbes obtenues par analyse infrarouge sont résumées Figure D-5.

Le spectre infrarouge du HA-g-PMeOx révèle des bandes caractéristiques du HA de départ à 3610-2970 cm⁻¹ (élongation O-H), 2888 cm⁻¹ (étirement C-H), 1606 cm⁻¹ (étirement asymétrique du C=O du carboxylate), 1318 cm⁻¹ (étirement du C-O d'un carboxylate) et à 1033 cm⁻¹ (élongation C-OH), ainsi que les bandes caractéristiques du PMeOx à 1620 cm⁻¹ (élongation du C=O d'un amide tertiaire), 1420 cm⁻¹ (élongation du C-N d'un amide) et à 1240 cm⁻¹ (élongation du C-N du squelette)¹⁷. Une bande additionnelle à 1739 cm⁻¹ est également observée qui peut correspondre à la présence d'une liaison ester entre le HA et le PMeOx. Le greffage semble donc avoir eu lieu. De plus, nous nous attendions à ce qu'il soit effectué sur la fonction carboxylate du HA et non sur les fonctions alcool (Figure D-2-c), vu que ces dernières sont moins réactives

et n'ont pas été activées contrairement à ce qui a été effectué dans d'autres études¹¹. Nous pensons donc que le mécanisme est similaire à une réaction d'estérification sur un polysaccharide comportant des fonctions carboxylates, comme cela a déjà pu être réalisé sur l'alginate ou le HA avec des halogénures d'alcanes¹⁸ ou de benzyle¹⁹.

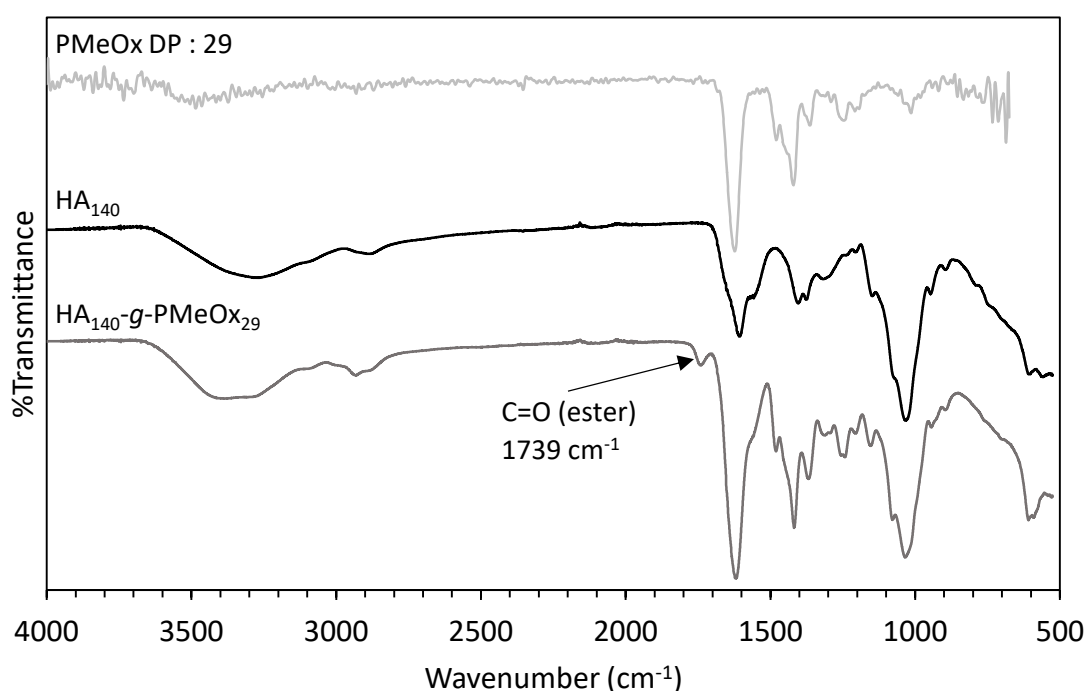


Figure D-5 Spectres FTIR du PMeOx₂₉ (haut, courbe gris clair), du HA_{140k} (milieu, courbe noire) et du HA_{140k}-g-PMeOx₂₉-0,13 (bas, courbe gris foncé).

Un spectre RMN typique est représenté Figure D-6. On retrouve les pics associés au HA avec les protons anomériques (1 et 1') à 4,40-4,50 ppm, le proton en position α de l'amide (2') vers 3,9 ppm, les autres protons du cycle saccharide entre 3,44 et 3,71 ppm et le groupement méthyle de la *N*-acétylglucosamine à 1,94 ppm, ainsi que les pics associés au PMeOx, avec les protons des méthylènes à 3,44 ppm, le méthyle en bout de chaîne α à 3,04-3,08 ppm et le groupe méthyle à 2,1 ppm. A partir de ce spectre, il est possible de déterminer le DS en utilisant la formule suivante :

$$DS = \frac{2 \times (I_{Methyl-3})}{3 \times DP_{PMeOx} \times I_{Hanom}} \quad (D2)$$

Où I_{Methyl} est la valeur de l'intégration des pics superposés entre 1,8 et 2,1 ppm associés à la fois aux méthyles respectifs du HA et du PMeOx. DP_{PMeOx} correspond au degré de polymérisation de

la chaîne PMeOx (équation B20 page 135). I_{Hanom} correspond aux protons anomériques (portés par C₁ et C_{1'}) de l'unité disaccharide qui se situent vers 4,5 ppm. Ces derniers ont été utilisés comme pics de référence du spectre car ils ne se superposaient pas à d'autres distributions.

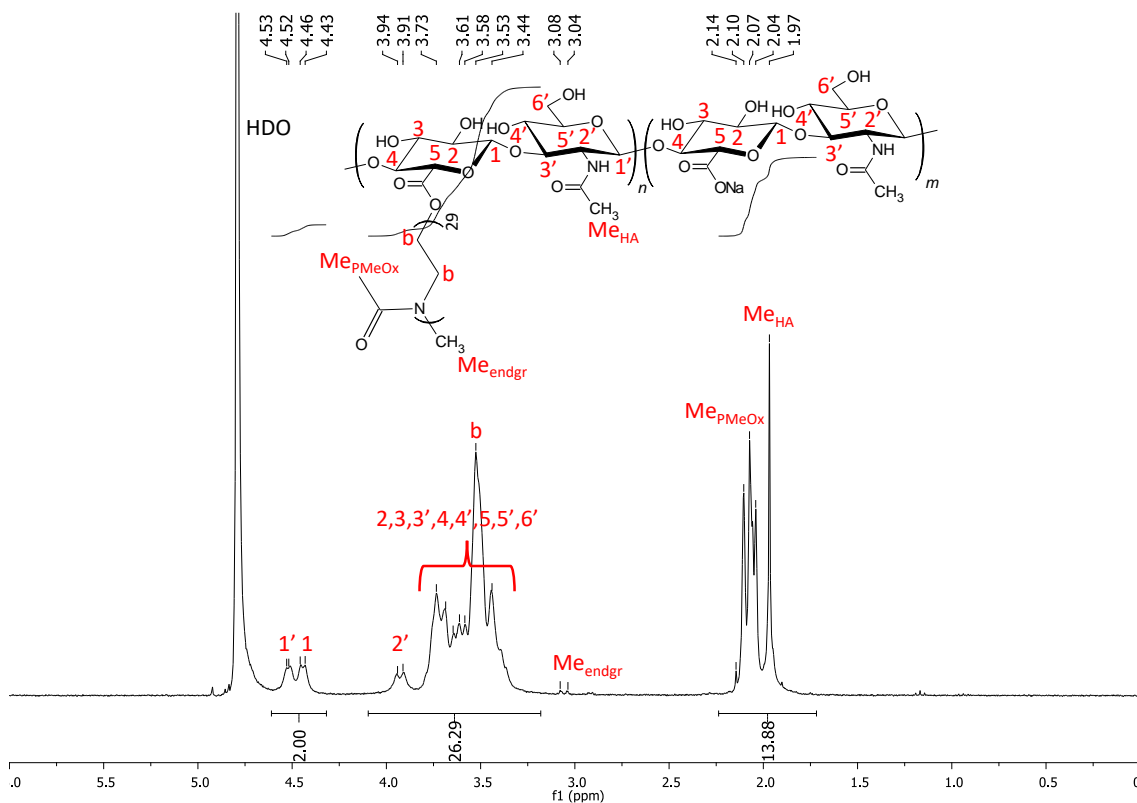


Figure D-6 Spectre RMN du HA_{140k}-g-PMeOx₂₉-0,13 dans le D₂O (contenant du NaOD à 0,125 mol.L⁻¹).

2.3.3 Optimisation de la purification

Avant d'analyser plus en détail les résultats de la réaction, il convient de faire un aparté sur la purification du HA-g-PMeOx. En effet, il n'y avait initialement pas eu d'optimisation de la purification par une étape supplémentaire de dispersion de l'échantillon dans l'éthanol après la dialyse/lyophilisation, car l'échantillon était considéré comme pur. Cependant, les chromatogrammes obtenus par SEC/MALLS montraient alors l'existence d'une deuxième distribution très intense en plus de celle associée au HA greffé, qui sortait avec un volume d'élution d'environ 20 mL (Figure D-7). Ce pic a clairement été identifié comme étant du PMeOx, en comparant notamment le volume d'élution avec celui d'un PMeOx seul de même DP. Ce résultat était surprenant pour deux raisons : seul le HA greffé était censé précipiter lorsque le milieu de réaction a été versé dans l'acétone, étape qui devait éliminer le PMeOx libre. De plus,

l'étape de dialyse a été effectuée dans des membranes de dialyse de seuil de rétention nettement plus élevé (au moins 6-8 kDa) que lors de la polymérisation du PMeOx (500-1000 Da), or nous avons vu lors de la polymérisation du PMeOx avec une terminaison au KOH dans le méthanol que l'étape de dialyse entraînait une forte perte de masse en polymère (chapitre B, section 4.3, page 133). Du fait de l'étape de dialyse prolongée dans le cas du HA-g-PMeOx, durant généralement une semaine afin de réduire la conductivité de l'eau de la cuve au niveau de celle de l'eau Milli-Q, on aurait pu s'attendre à ce que le PMeOx libre soit éliminé, ce qui n'est manifestement pas le cas. Pour ce qui est de l'étape de précipitation, il se trouve que l'acétone n'est pas un bon solvant pour le PMeOx, au contraire du PiPrOx-co-PnBuOx étudié préalablement, ce qui a été constaté de façon fortuite. L'acétone semble ne pas être assez polaire pour ce polymère, ce qui est surprenant car ce dernier est soluble dans le $CDCl_3$. Quant à l'étape de dialyse, il se peut que le PMeOx libre soit retenu par affinité avec le PMeOx greffé sur le HA, qui lui est retenu par la membrane. Le PMeOx étant soluble dans l'éthanol, plus polaire que l'acétone, nous avons donc décidé de purifier les produits obtenus en les dispersant dans ce solvant. L'opération a été répétée à plusieurs reprises.

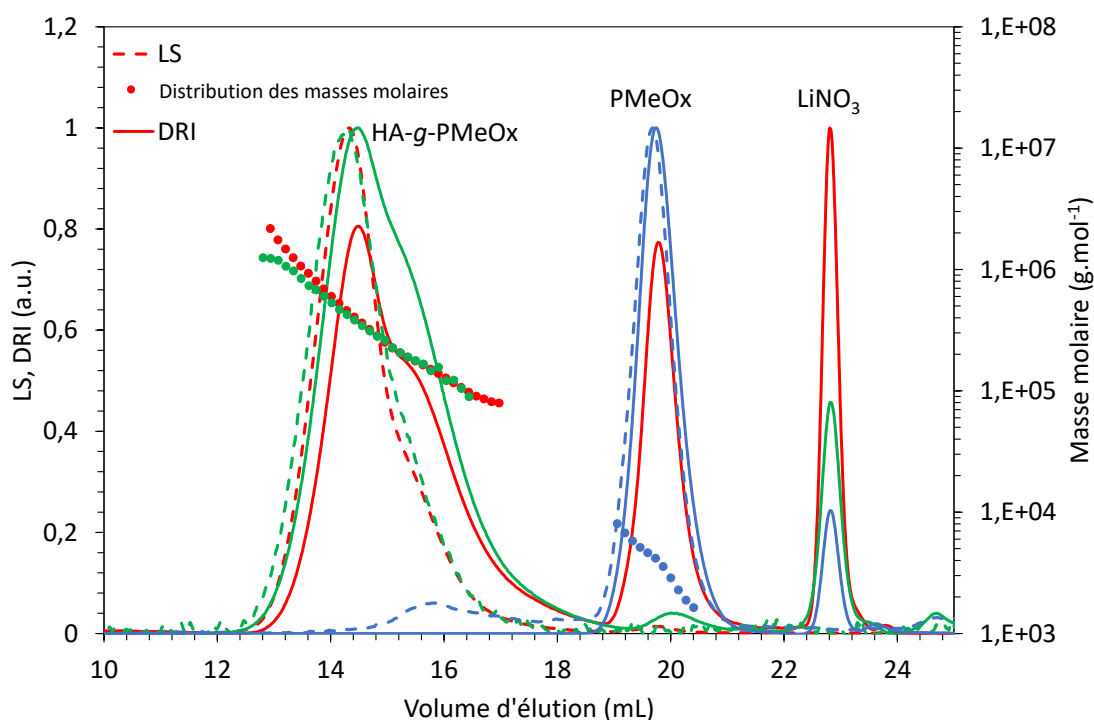


Figure D-7 Chromatogrammes obtenus par SEC/MALLS du PMeOx₂₉ (courbes bleues) et du HA_{140k}-g-PMeOx₂₉-0,13 avant purification (courbes rouges) et après purification par lavages à l'éthanol (courbes verte).

Un détail intéressant est que l'intensité de la détection DRI lors des analyses SEC/MALLS est proportionnelle à la concentration massique du composé dans la fraction éluée. Il est donc possible de déterminer la quantité de PMeOx libre contenue dans un échantillon et également de déduire de ces analyses le degré de substitution de PMeOx greffé sur le HA (Tableau D-2) en utilisant l'équation D3 (voir le détail des calculs en Annexe 1).

$$DS_{réel\ est} = \frac{m\%_{PMeOx\ réel} \times M_{uNaHA}}{m\%_{PMeOx\ réel} (M_{uNaHA} - Mn_{PMeOx} - M_{uHA} + M_H) + 100 \times Mn_{PMeOx}} \quad (D3)$$

Où $DS_{réel\ est}$ est le DS réel estimé du HA-g-PMeOx analysé, $m\%_{PMeOx\ réel}$ est la fraction massique de PMeOx greffé au sein du HA-g-PMeOx, M_{uHA} la masse molaire de l'unité disaccharide du HA sous forme acide ($379,3 \text{ g.mol}^{-1}$), M_H celle de l'hydrogène (1 g.mol^{-1}), M_{uNaHA} celle de l'unité disaccharide du HA sous forme de sel de sodium ($401,3 \text{ g.mol}^{-1}$) et Mn_{PMeOx} la masse molaire moyenne en nombre du PMeOx.

Des exemples sont regroupés Tableau D-2.

Tableau D-2 Estimation du DS de l'échantillon pur à partir des données RMN et SEC/MALLS/DRI.

Echantillons	n_{PMeOx} (chaîne)/ $n_{HA(\text{unité})}^a$	DP_{PMeOx}	DS_{exp}^b	$m\%_{PMeOx\ libre}$	$m\%_{PMeOx\ réel}$	$DS_{réel\ est}$	$DS_{réel}^c$
HA _{140k} -g-PMeOx ₂₉ - 0,25	1,0	29	0,25	25,6	47,9	0,15	0,13
HA _{990k} -g-PMeOx ₂₉ - 0,16	0,5	29	0,16	14	42,1	0,12	0,12
HA _{990k} -g-PMeOx ₂₉ - 0,24	1,0	29	0,24	31,2	42,7	0,12	0,11

^a ratio molaire

^b obtenu par RMN ¹H avant purification dans l'éthanol (formule D2)

^c obtenu par RMN ¹H après purification dans l'éthanol (formule D2)

On peut observer que la surestimation initiale du DS était forte, avec des résultats deux fois plus élevés que les valeurs réelles pour les échantillons préparés avec un ratio molaire de chaînes PMeOx par rapport au nombre d'unités HA de 1. On constate surtout une bonne corrélation entre l'estimation du $DS_{réel}$ et sa valeur obtenue après purification des échantillons. On peut voir sur la Figure D-7 que l'étape de purification dans l'éthanol conduit bien à une quasi-

disparition du pic à 20 mL associé au PMeOx, qui n'est plus présent que sous forme de trace (< 2% de la masse totale de l'échantillon).

Il est également possible de vérifier le greffage du PMeOx sur le HA ainsi que la pureté de l'échantillon en utilisant la spectroscopie RMN de diffusion DOSY (Figure D-8), qui est une méthode de RMN 2D permettant d'attribuer des coefficients de diffusions aux divers pics d'un spectre proton. Les coefficients de diffusions sont liés au rayon hydrodynamique de la molécule par la relation de Stokes-Einstein²⁰ :

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D_t} \quad (D4)$$

Où R_h est le rayon hydrodynamique, k la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité du milieu solvant et D_t le coefficient de diffusion. Le principe de séparation de cette méthode est donc le même que la SEC. Nous devrions donc normalement obtenir des résultats similaires.

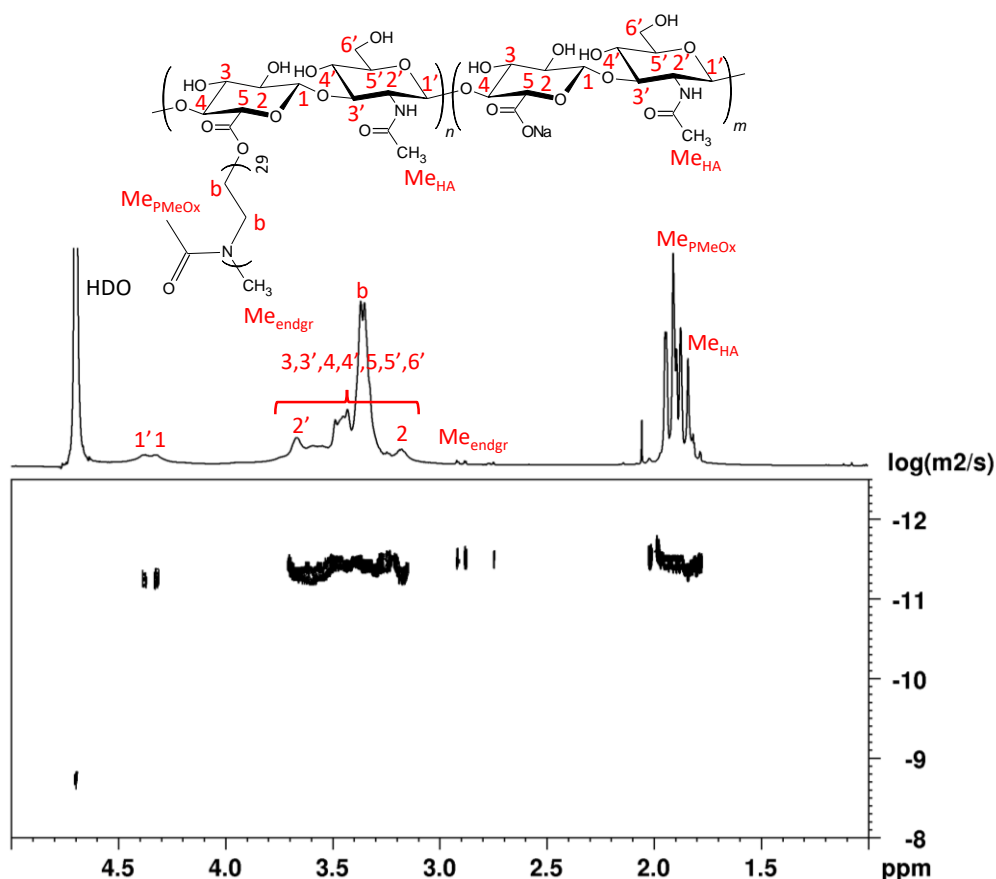


Figure D-8 Spectre RMN 1H 2D DOSY du $HA_{140k}\text{-}g\text{-}PMeOx_{29-0,13}$ dans le D_2O à 290 K (600 MHz).

L'échantillon a été préparé uniquement dans le D₂O, sans ajout de NaOD, afin d'éviter d'hydrolyser les liaisons entre le HA et le PMeOx. De plus le spectromètre utilisé était un Bruker Avance III 600 MHz, qui présente un champ magnétique plus puissant que le spectromètre de 300 MHz utilisé pour les spectres ¹H, ce qui a permis entre autre de compenser la perte de résolution induite par l'absence d'électrolyte au sein de la solution (Figure D-8). Les pics du HA sont tout de même un peu plus élargis que lorsque du NaOD est incorporé à l'échantillon (comparer avec la Figure D-6). Les pics du PMeOx sont donc comparativement plus prononcés, et l'on peut constater que leur allure générale est un peu différente du spectre obtenu dans le CDCl₃. Elle correspond à ce qui peut être observé dans le D₂O au sein d'autres études^{17,21}. Il est important de considérer des pics associés à chacun des deux polymères (HA et PMeOx) qui ne se superposent pas, sans quoi l'analyse n'est pas correcte. Les distributions majeures (cycle saccharide, squelette du PMeOx et groupes méthyle) se superposent malheureusement les unes aux autres. Cependant, les pics des protons anomériques de l'unité disaccharide du HA (portés par C₁ et C_{1'}) situés entre 4,38 ppm et 4,32 ppm sortent dans une zone dégagée. L'acquisition a été effectuée à 290 K, au lieu de 295 K, afin de les espacer par rapport au pic du solvant (ce qui explique le décalage de leur déplacement chimique par rapport aux autres spectres). De plus, les protons du méthyle en bout de chaîne α sortent aussi de façon isolée entre 2,92 et 2,75 ppm. On peut clairement voir que ces deux ensembles de pics ont le même coefficient de diffusion (Figure D-8), ce qui confirme les résultats de SEC/MALLS. A l'inverse, un mélange physique de HA et de PMeOx (terminé avec une solution de KOH à 1 M dans le méthanol) donne clairement deux distributions de coefficients de diffusion différentes, dont l'une correspond aux pics du HA et l'autre à ceux du PMeOx (Figure D-9-d). On voit également que le HA_{140k} diffuse plus lentement que le PMeOx₂₉, ce qui est le comportement attendu, le HA ayant une masse molaire moyenne nettement supérieure (140 kDa contre 3 kDa). Les spectres DOSY du HA_{140k}, du PMeOx₂₉ et du HA_{140k}-g-PMeOx₂₉ sont également représentés Figure D-9 pour comparaison.

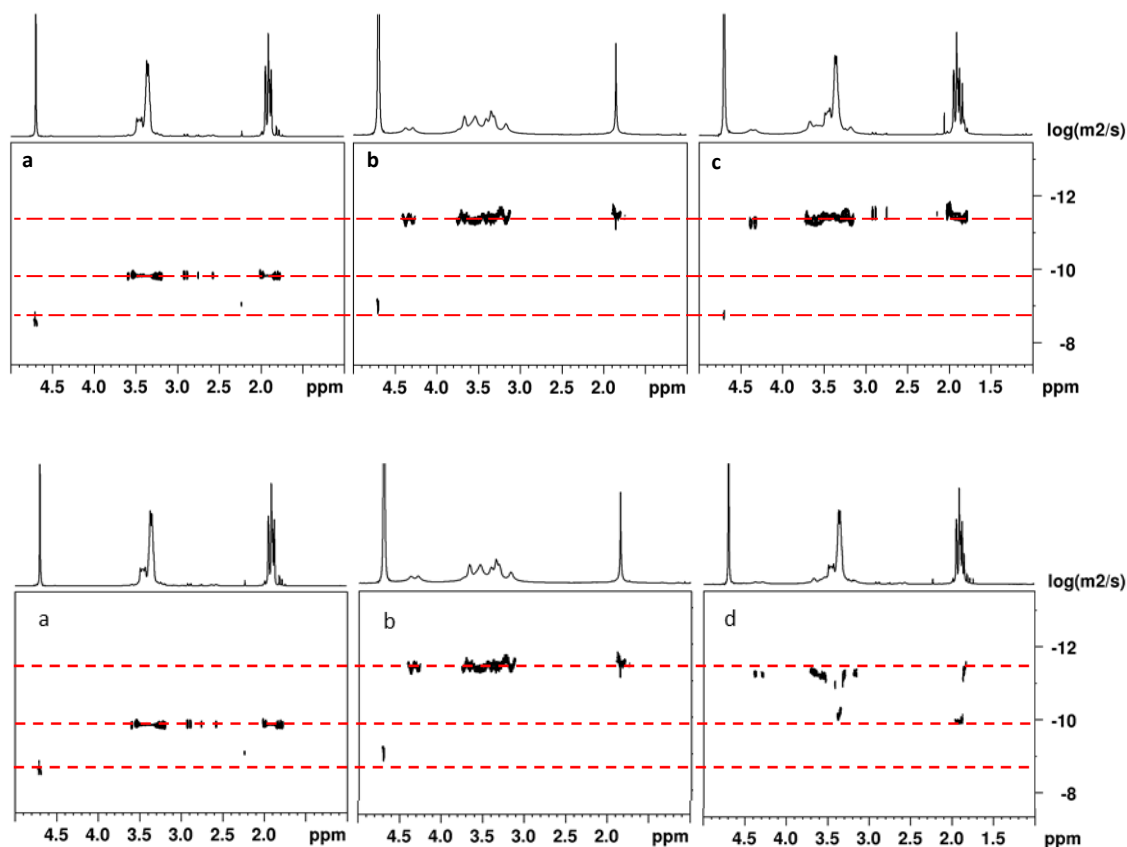


Figure D-9 Spectres RMN ^1H 2D DOSY (600 MHz, D_2O , 290 K) du PMeOx_{29} (a); du $\text{HA}_{140\text{k}}$ (b); du $\text{HA}_{140\text{k}}\text{-g-PMeOx}_{29}\text{-}0,13$ (c) et d'un mélange physique de $\text{HA}_{140\text{k}}$ et de PMeOx_{29} (d).

2.3.4 Efficacité du greffage et analyse des propriétés des échantillons

Les résultats de la réaction après purification complète sont regroupés dans le Tableau D-3.

L'efficacité de greffage est comprise, à une exception près, entre 8 et 16 %. On peut observer notamment que d'une part l'augmentation du ratio de chaîne PMeOx par rapport à l'unité disaccharide HA et d'autre part l'augmentation du DP_{PMeOx} ont conduit tous les deux à une diminution de l'efficacité de greffage. Dans le premier cas, ce phénomène est fréquemment observé lors de réaction de fonctionnalisation des polymères^{22,23}. Dans le second, cela peut s'expliquer par l'augmentation de l'encombrement stérique des chaînes à greffer. Le DS augmente généralement avec le ratio $n_{\text{PMeOx}}(\text{chaîne})/n_{\text{HA}}(\text{unité})$, avec l'exception notable du $\text{HA}_{990\text{k}}\text{-g-PMeOx}_{29}\text{-}0,12$, qui présente un DS quasi identique celui du $\text{HA}_{990\text{k}}\text{-g-PMeOx}_{29}\text{-}0,11$, alors qu'il

a été synthétisé avec deux fois moins de chaîne PMeOx par rapport à l'unité HA. L'efficacité de la réaction est de ce fait très supérieure aux autres échantillons (24 %). Si l'on revient au Tableau D-2, on peut observer que cet échantillon présentait une fraction massique de PMeOx libre étonnamment plus faible que les autres échantillons. Nous ne connaissons pas la raison de ce phénomène. Par ailleurs, la longueur de la chaîne HA ne semble pas avoir une forte influence sur les degrés de substitution obtenus. Il semble que l'on soit limité à des DS en PMeOx₂₉ de l'ordre de 11-13 %, ce qui correspond à un pourcentage massique en PMeOx au sein de l'échantillon de l'ordre de 40-45 % (voir calcul en Annexe 1, formule A₁₁), ce qui est déjà considérable. Il n'est en effet pas intéressant d'avoir un échantillon avec une trop forte proportion de polyoxazoline, auquel cas les propriétés du HA ne seraient pas exprimées au sein du copolymère. Le rendement massique de la réaction est compris entre 40 et 72 %, ce qui est satisfaisant compte-tenu de la purification complète.

Tableau D-3 Conditions expérimentales des réactions effectuées et résultats obtenus (HA-g-PMeOx).

Echantillons	$n_{\text{PMeOx (chaîne)}} / n_{\text{HA(unité)}}^{\text{a}}$	DP_{PMeOx}	DS^{b}	Efficacité de greffage (%) ^c	Rendement massique (%)
HA _{38k} -g-PMeOx ₄₇ -0,05	0,5	47	0,05	10	50
HA _{38k} -g-PMeOx ₂₉ -0,09	1,0	29	0,09	9	62
HA _{140k} -g-PMeOx ₄₇ -0,04	0,5	47	0,04	8	62
HA _{140k} -g-PMeOx ₂₉ -0,08	0,5	29	0,08	16	n.d.
HA _{140k} -g-PMeOx ₂₉ -0,13	1,0	29	0,13	13	40
HA _{990k} -g-PMeOx ₄₇ -0,05	0,5	47	0,05	10	82
HA _{990k} -g-PMeOx ₂₉ -0,12	0,5	29	0,12	24	72
HA _{990k} -g-PMeOx ₂₉ -0,11	1,0	29	0,11	11	58

^a ratio molaire

^b déterminé par RMN ¹H d'après l'équation D2

^c défini comme $\frac{DS}{n_{\text{PMeOx(chain)}}/n_{\text{HA(unit)}}}$

n.d. non déterminé

Les masses molaires et propriétés physico-chimiques des échantillons ont été déterminées par mesures SEC/MALLS (Tableau D-4).

Tableau D-4 Grandeurs macromoléculaires des échantillons déterminés par SEC/MALLS/VD/DRI (25 °C, LiNO₃, 0,1 mol.L⁻¹)^a.

Echantillon	M _n (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	DP _n	Đ	[η] _w (mL.g ⁻¹)	Rh _w (nm)	Rg _w (nm)	a (MHS)
HA _{38k}	38 000	64 000	95	1,7	145	11	^b	0,76
HA _{38k} -g-PMeOx ₄₇ -0,05	46 000	78 000	77	1,7	130	11	^b	0,78
HA _{38k} -g-PMeOx ₂₉ -0,09	60 000	103 000	96	1,7	130	12	^b	0,72
HA _{140k}	140 000	210 000	350	1,5	410	23	44	0,71 ^c
HA _{140k} -g-PMeOx ₄₇ -0,04	150 000	210 000	270	1,4	350	22	38	0,66 ^c
HA _{140k} -g-PMeOx ₂₉ -0,08	180 000	260 000	300	1,5	340	23	38	0,67 ^c
HA _{140k} -g-PMeOx ₂₉ -0,13	240 000	350 000	330	1,5	350	26	45	0,69 ^c
HA _{990k}	990 000	1 300 000	2 475	1,4	1 600	68	147	- ^d
HA _{990k} -g-PMeOx ₄₇ -0,05	640 000	940 000	1065	1,5	890	49	94	- ^d
HA _{990k} -g-PMeOx ₂₉ -0,12	470 000	650 000	675	1,4	570	38	66	- ^d
HA _{990k} -g-PMeOx ₂₉ -0,11	650 000	910 000	967	1,4	750	46	80	- ^d

Le coefficient 'a' de l'expression de MHS a été déterminé en intégrant la partie la plus linéaire de la représentation bilogarithmique de la viscosité intrinsèque en fonction de la masse molaire. Précision des données SEC/MALLS/VD/DRI : M_n ± 9%; M_w ± 6%; Đ ± 10%; [η]_w ± 0.5%; Rh_w ± 2%; Rg_w ± 6%

^a taux de récupération massique compris entre 72 et 84 %.

^b en dehors de la zone de détection du MALLS (la diffusion devient isotrope pour les faibles masses).

^c Voir Figure D-10 pour les courbes MHS

^d Valeurs non déterminées du fait de la difficulté de l'analyse dans cette zone de masses molaires

Pour le HA_{38k} et le HA_{140k}, on peut voir que les masses molaires augmentent avec le DS. Dans le cas du HA_{38k}-g-PMeOx₂₉-0,09, par exemple, la M_n et la M_w sont passées respectivement de 38 kg.mol⁻¹ et 64 kg.mol⁻¹ (HA_{38k} de départ) à 60 kg.mol⁻¹ et 103 kg.mol⁻¹. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la masse molaire de l'unité de répétition devient beaucoup plus élevée lorsqu'on lui greffe un polymère, ce qui va impacter la masse molaire de la chaîne globale²⁴. Du fait que la masse molaire moyenne du polymère greffé peut être déterminée par RMN, on peut dès lors calculer le degré de polymérisation du HA-g-PMeOx, nommé DP_n, avec la formule suivante :

$$DPn = \frac{Mn}{DS \times (Mn_{PMeOx} + Mu_{HA} - M_H) + (1 - DS) \times Mu_{NaHA}} \quad (D5)$$

Où M_n est la masse molaire moyenne en nombre de l'échantillon de HA-g-PMeOx déterminée par mesures SEC/MALLS/VD/DRI, M_{nPMeOx} celle de la chaîne PMeOx, déterminée à partir des mesures RMN 1H (voir Annexe 1), DS le taux de greffage du PMeOx sur le HA, déterminé avec l'équation D2, M_{uHA} la masse molaire de l'unité disaccharide du HA sous forme acide ($379,3 \text{ g.mol}^{-1}$), M_H celle de l'hydrogène (1 g.mol^{-1}) et M_{uNaHA} celle de l'unité disaccharide du HA sous forme de sel de sodium ($401,3 \text{ g.mol}^{-1}$). Pour ce qui est du M_{uNaHA} , dans un souci de simplification, le HA a été considéré comme étant sous forme de sel de sodium. Cette dernière est en fait en équilibre avec la forme de sel de lithium provenant des échanges avec le solvant $LiNO_3$ 0,1M. De plus, la SEC/MALLS ne tient compte que de la fraction condensée des contre-ions²⁵. Les valeurs obtenues ne seront que marginalement affectées par la prise en compte de la forme de sel de sodium ou de lithium et, plus important, les tendances obtenues seront les mêmes. On peut alors observer que le DP_n n'a pas beaucoup varié pour la série de HA_{38k}-g-PMeOx, seule une légère dégradation de la chaîne a été constatée pour le HA_{38k}-g-PMeOx_{47-0.05}, avec un DP_n diminuant de 95 à 77. Pour la série des HA_{140k}-g-PMeOx, de masse intermédiaire, le DP_n a cette fois diminué pour tous les échantillons, passant de 350 pour le HA_{140k} précurseur à respectivement 270, 300 et 330. Les masses molaires obtenues demeurent cependant supérieures au HA_{140k} précurseur du fait de l'impact du greffage de la chaîne PMeOx. Cette tendance à la dégradation est confirmée et même amplifiée pour les échantillons obtenus à partir du HA_{990k}, qui présente la plus forte masse molaire. Ces résultats indiquent une dégradation de la chaîne relativement importante, au point où les masses molaires obtenues pour les HA_{990k} fonctionnalisés sont toutes inférieures au HA_{990k} précurseur. Plus la chaîne HA de départ est longue, plus la chaîne sera dégradée. Ceci peut s'expliquer par le fait que les chaînes plus longues sont plus flexibles, et donc plus faciles à rompre²⁶. De plus, la température de la réaction de 60 °C a pu favoriser cette dégradation. On constate par contre que la dispersité n'a pas été affectée par la réaction quel que soit le HA considéré.

D'autres paramètres physico-chimiques ont pu être déterminés par SEC/MALLS/VD/DRI (Tableau D-4), à savoir le rayon de giration ($R_{g,w}$), la viscosité intrinsèque ($[\eta]_w$), le rayon hydrodynamique ($R_{h,w}$) et le paramètre 'a' de l'expression de Mark-Houwink-Sakurada (équation B14 page 113). On constate que ces paramètres n'évoluent pas ou peu lorsque l'on greffe des chaînes PMeOx sur le HA_{38k} et le HA_{140k}. On peut juste noter une très légère baisse de la viscosité intrinsèque en masse, qui peut s'expliquer par le fait que la présence de chaînes latérales va amoindrir les interactions par liaisons H entre les macromolécules de HA. On notera

que les rayons de giration du HA_{38k} et de ses dérivés n'ont pu être déterminés, car ils deviennent trop faible (< 20 nm) et induisent une diffusion isotrope du faisceau lumineux incident émis par le laser rouge de l'instrument : l'intensité de la diffusion ne variant plus avec l'angle d'observation, il devient impossible de déterminer le R_g à partir de la courbe de Zimm. Dans le cas des HA_{990k} fonctionnalisés, on peut observer une diminution des grandeurs caractéristiques de la taille des macromolécules en solution (R_{g,w}, [η]_w et Rh_w) qui confirment la dégradation de la chaîne. Par exemple, les valeurs du R_{g,w}, du [η]_w et du Rh_w du HA_{990k}-g-PMeOx₂₉-0,11 (respectivement de 80 nm, 750 mL.g⁻¹ et de 46 nm) étaient toutes plus basses que celles du HA_{990k} de départ (147 nm, 1600 mL.g⁻¹, 68 nm), ce qui est en accord avec la baisse du DP_n de 2475 à 967. Pour ce qui est du paramètre 'a' de l'équation de MHS, les résultats montrent que les HA-g-PMeOx présentent globalement la même conformation que les HA précurseurs. Les résultats obtenus indiquent des valeurs de 'a' situées aux alentours de 0,7, ce qui indique une conformation en solution de pelote statistique en bon solvant, similaire à ce qui a été observé dans d'autres équipes²⁶. Des courbes MHS typiques obtenues sont représentées Figure D-10.

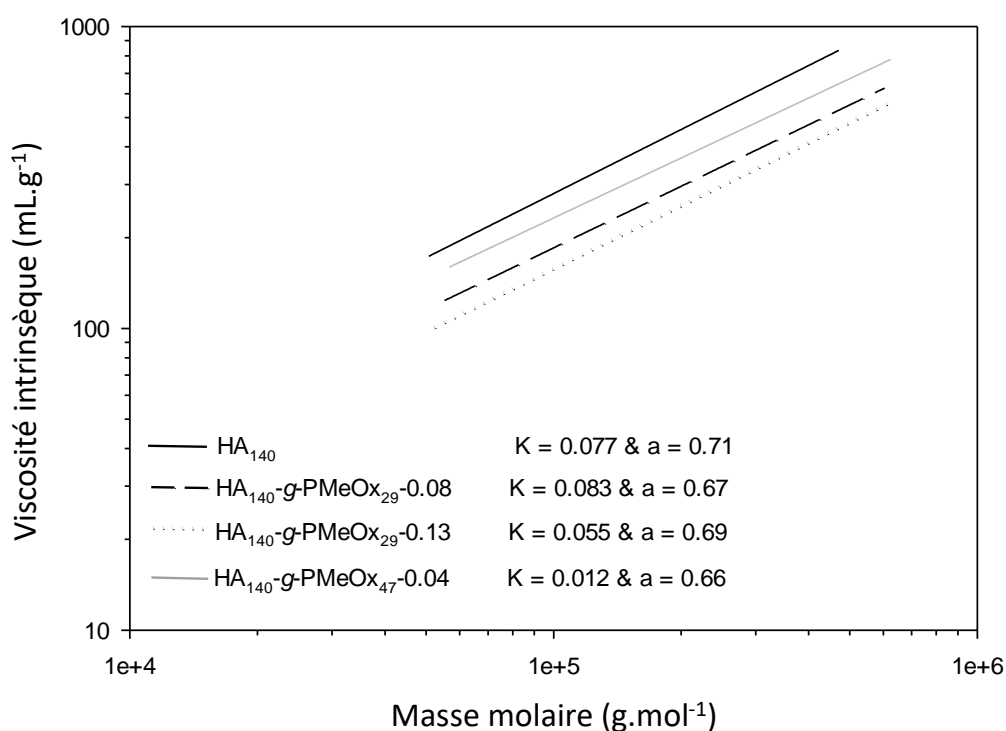


Figure D-10 Courbes de Mark-Houwink-Sakurada du HA_{140k} (ligne noire pleine), HA_{140k}-g-PMeOx₂₉-0,08 (traits noirs), HA_{140k}-g-PMeOx₂₉-0,13 (ligne noire en pointillés) et du HA_{140k}-g-PMeOx₄₇-0,04 (ligne grise pleine) obtenues par mesures SEC/MALLS/VD/DRI.

La réaction de greffage du PMeOx sur le HA fonctionne donc, avec une efficacité d'environ 10 %. Il est possible de cibler des degrés de substitution de l'ordre de 11-13 %, ce qui correspond à un pourcentage massique en PMeOx de l'ordre de 40-45 %. Il semble que le greffage se produise comme attendu sur la fonction carboxylate du HA comme ont semblé l'indiquer les mesures de RMN 2D (voir Annexe 2). La purification a dû être optimisée du fait de la particularité du PMeOx de ne pas être soluble dans l'acétone (contrairement au copolymère thermosensible de PiPrOx-co-PnBuOx qui va être utilisé par la suite). La pureté de l'échantillon a pu être confirmée par SEC/MALLS et également par RMN DOSY. Si la chaîne de HA est pratiquement inchangée dans le cas des échantillons de plus faible masse molaire de départ, elle est dégradée dans le cas du HA_{990k}. Il est donc maintenant possible de transposer la réaction aux copolymères thermosensibles afin d'obtenir des acides hyaluroniques fonctionnalisés pouvant acquérir des propriétés d'hydrogels physiques par élévation de la température.

3 Synthèse du HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx)

3.1 Protocole de la réaction

La réaction est effectuée de façon similaire à celle avec le PMeOx avec de petites différences.

Greffage du PiPrOx-co-PnBuOx sur le HA :

Le protocole est décrit pour un copolymère PiPrOx-co-PnBuOx de DP cible de 30 et de ratio *i*PrOx/*n*BuOx cible de 69/31 ainsi que pour un ratio molaire de chaînes de polyoxazolines par rapport aux unités de HA de 1. On réalise la polymérisation simultanée des deux oxazolines par voie thermique comme décrit lors du chapitre B avec 150 mg de *p*-toluenesulfonate de méthyle (0,805 mmol), 1,89 g d'*i*PrOx (16,7 mmol) et 953 mg de *n*BuOx (7,5 mmol) dans 6 mL d'acétonitrile anhydre (concentration totale en monomères de 4 mol.L⁻¹). La polymérisation est effectuée pendant 24 h sous azote à 70 °C. Cette durée est portée à 48 h dans le cas d'un DP cible de 50, afin d'obtenir une conversion quasi-totale, l'*i*PrOx ayant une cinétique de polymérisation plus lente que le MeOx ou le *n*BuOx. Nous avons observé en effet que le monomère pouvant être présent de façon résiduelle sur le spectre RMN réalisé avant terminaison si le temps de réaction n'est pas suffisant. Avant la terminaison, un échantillon est prélevé pour effectuer une analyse RMN (Figure D-11) afin de déterminer les propriétés du copolymère PiPrOx-co-PnBuOx (Mn, DP, ratio *i*PrOx/*n*BuOx). Pour la terminaison, 500 mg de TBA-HA sont dissouts dans du DMSO anhydre sous azote (avec des concentrations respectives

de 50 g.L⁻¹ pour le TBA-HA_{38k}, de 20 g.L⁻¹ pour le TBA-HA_{140k} et de 12,5 g.L⁻¹ pour le TBA-HA_{990k}). Si la dissolution est relativement rapide dans le cas du TBA-HA_{38k} et du TBA-HA_{140k}, elle est plus délicate pour le TBA-HA_{990k}. Dans ce dernier cas, elle a été préparée la veille de la terminaison en la laissant sous agitation une journée à 60 °C dans un bain d'huile. Le lendemain, la solution est retirée du bain d'huile et placée sous forte agitation à température ambiante. L'addition de la solution de PiPrOx-co-PnBuOx au sein du tricol contenant le TBA-HA a été effectuée à température ambiante en maintenant la solution de TBA-HA sous forte agitation. Le tricol est ensuite placé dans un bain d'huile à 60 °C pendant une journée après homogénéisation complète de la solution, ce dernier point étant important comme il sera discuté par la suite. Le récipient est ensuite extrait du bain d'huile, laissé à refroidir à température ambiante, puis on ajoute goutte-à-goutte une solution de NaCl à 2,5 mol.L⁻¹ (10 mL par gramme de TBA-HA de départ) pour substituer le TBA par du Na sur les chaînes de HA. Le polymère est ensuite précipité dans de l'acétone (5x le volume de DMSO), filtré puis dissout une nuit dans une solution tampon phosphate 0,1 M (sel de sodium, pH : 7,5; 100 mL par gramme de TBA-HA de départ). Cette solution a remplacé celle de NaCl car les échantillons de HA-g-PMeOx étaient légèrement acides en solution, aussi, le tampon avait également pour rôle de neutraliser l'échantillon. Puis la solution est dialysée et lyophilisée de la même manière que pour le HA-g-PMeOx. Afin d'éliminer le PiPrOx-co-PnBuOx résiduel, le HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) obtenu est dispersé trois fois dans l'acétone (50 mL pour 100 mg de HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx)), avec une étape de filtration entre deux lavages, avant d'être séché sous vide.

Par la suite, les échantillons obtenus seront codés de la façon suivante : HA_{M_n}-g-(PiPrOx_{DP(PiPrOx)}}-co-PnBuOx_{DP(PnBuOx)}})-DS, où M_n est la masse molaire moyenne en nombre du HA en kg.mol⁻¹, DP(PiPrOx) le degré de polymérisation du PiPrOx, DP(PnBuOx) celui du PnBuOx et DS le taux de greffage du PiPrOx-co-PnBuOx.

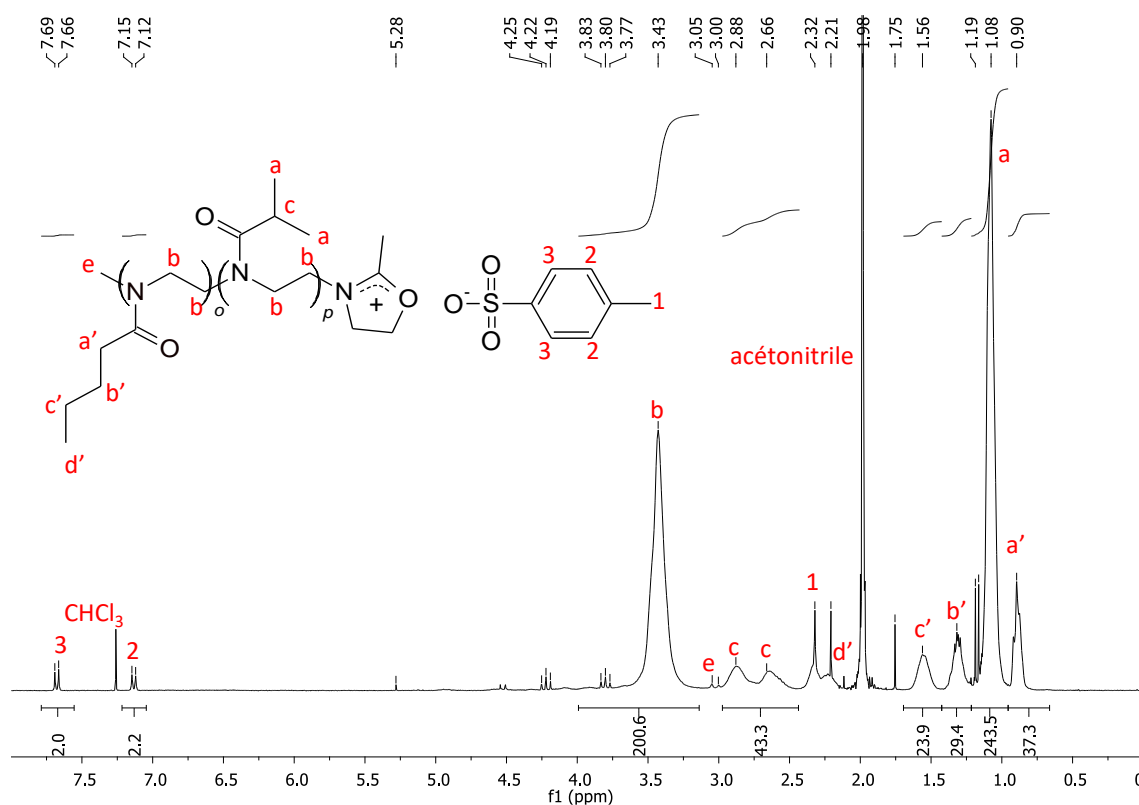


Figure D-11 Spectre RMN ^1H du $\text{PiPrOx}_{38}\text{-co-PnBuOx}_{12}$ dans le CDCl_3 avant terminaison.

3.2 Caractérisation moléculaire

L'échantillon a été analysé par spectroscopie FTIR (Figure D-12) et par RMN (Figure D-13).

En infrarouge, on retrouve à nouveau les bandes caractéristiques du HA de départ à ainsi que les bandes du $(\text{PiPrOx-co-PnBuOx})$ à 2970 cm^{-1} , 2935 cm^{-1} et 2875 cm^{-1} (élongations des C-H_3 , C-H_2 et C-H), 1620 cm^{-1} (élongation du C=O d'un amide tertiaire), 1474 cm^{-1} (déformation C-H_2 , dérivée seconde), 1420 cm^{-1} (élongation du C-N d'un amide), 1380 cm^{-1} (déformation C-H_3), 1200 cm^{-1} (élongation C-N du squelette polymère). On observe également une bande additionnelle à 1745 cm^{-1} , qui peut correspondre à la formation d'une liaison ester entre le HA et le PiPrOx-co-PnBuOx .

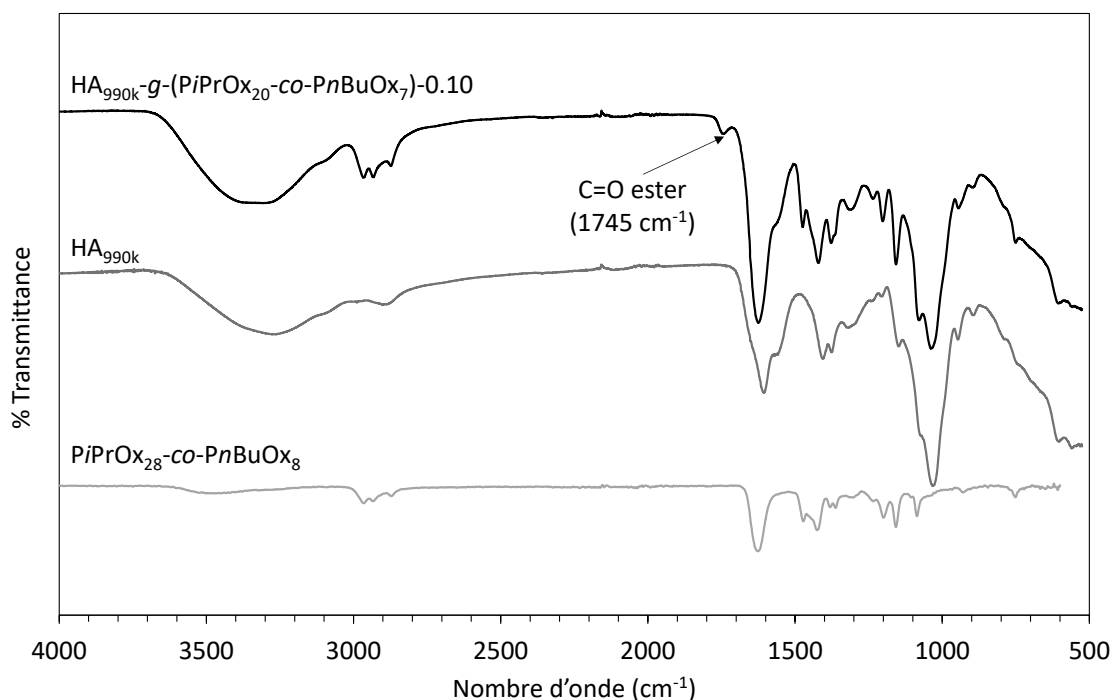


Figure D-12 Spectres infrarouges du HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₀-co-PnBuOx₇)-0,10 (dessus, courbe noire), HA_{990k} (milieu, courbe gris foncé) et du PiPrOx₂₈-co-PnBuOx₈ (bas, courbe gris clair).

On peut également observer sur le spectre RMN les pics associés au HA avec les protons anomériques (1 et 1') à 4,50-4,40 ppm, le proton en α de la fonction amide (2') à 3,9 ppm, les autres protons du cycle saccharide entre 3,65 ppm et 3,30 ppm et les protons du méthyle (Me_{HA}) à 1,97 ppm²⁷, les pics associés PiPrOx avec les méthylènes du squelette polymère à 3,44 ppm, les méthyles et le CH de la fonction isopropyle respectivement à 2,91-2,72 ppm et 1,03 ppm, ainsi que les pics associés au PnBuOx avec les méthylènes du squelette polymère également à 3,44 ppm, les trois méthylènes et le méthyle de la fonctionnalité butyle respectivement à 2,35 ppm, 1,51 ppm, 1,30 ppm et 0,9 ppm²⁸.

L'analyse RMN permet de déterminer le DS en utilisant la formule suivante :

$$DS = \frac{3 \times (I_{\text{squelette}} - 10)}{4 \times DP_{\text{POx}} \times I_{\text{Methyl}}} \quad (\text{D6})$$

Où I_{methyl} correspond à la valeur de l'intégration du singulet à 1,97 ppm associé au méthyle de l'unité HA, utilisé comme pic de référence. DP_{POx} correspond au degré de polymérisation du PiPrOx-co-PnBuOx (déterminé par RMN avant la terminaison avec l'équation B20 page 135). $I_{\text{squelette}}$ correspond à la valeur de l'intégration des protons des méthylènes du squelette du

PiPrOx-co-PnBuOx à 3,44 ppm ainsi qu'aux 10 protons de l'unité HA entre 3,95 et 3,3 ppm (Figure D-13).

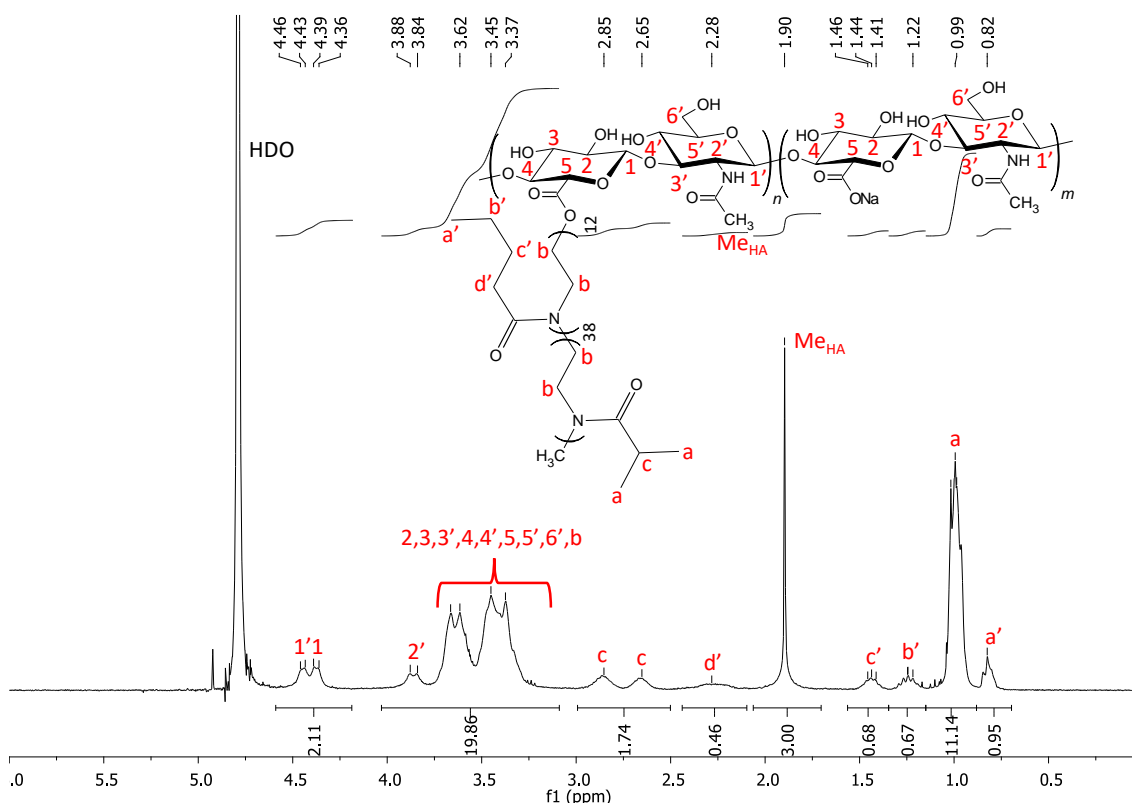


Figure D-13 Spectre RMN ^1H du $\text{HA}_{990\text{k}}\text{-g}(\text{PiPrOx}_{38}\text{-co-PnBuOx}_{12})\text{-0,05}$ dans le D_2O (contenant du NaOD à $0,125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

On peut aussi se servir du spectre RMN pour déterminer à nouveau le ratio $i\text{PrOx}/n\text{BuOx}$ en reprenant les formules B21 et B22 (page 135) qui sont également applicables sur ce spectre. Dans le cas présenté le ratio obtenu est de 85/15, ce qui est supérieur au ratio déterminé avant la terminaison, qui était de 76/24 (ratio théorique : 78/22). Ce résultat est systématique pour tous les échantillons et peut s'expliquer par la différence de solvant employé pour réaliser la RMN : avant la terminaison, la chaîne de PiPrOx-co-PnBuOx est analysée dans le CDCl_3 où elle est soluble, tandis qu'elle est effectuée dans le D_2O après la terminaison vu qu'il s'agit du seul solvant pouvant dissoudre le HA sous forme de sel de sodium. Or, le PnBuOx contenu dans le copolymère est hydrophobe, ces pics RMN seront donc moins visibles dans le D_2O . Ce phénomène a déjà été documenté pour d'autres systèmes copolymères comportant une fraction hydrophobe²⁹. Nous avons donc systématiquement sélectionné les ratios obtenus avant terminaison.

Il est à noter qu'une fois de plus, une étape de purification par dispersion dans un solvant a dû être incluse au protocole afin d'éliminer les traces de PiPrOx-co-PnBuOx libre pouvant demeurer dans l'échantillon après l'étape de précipitation (Figure D-14).

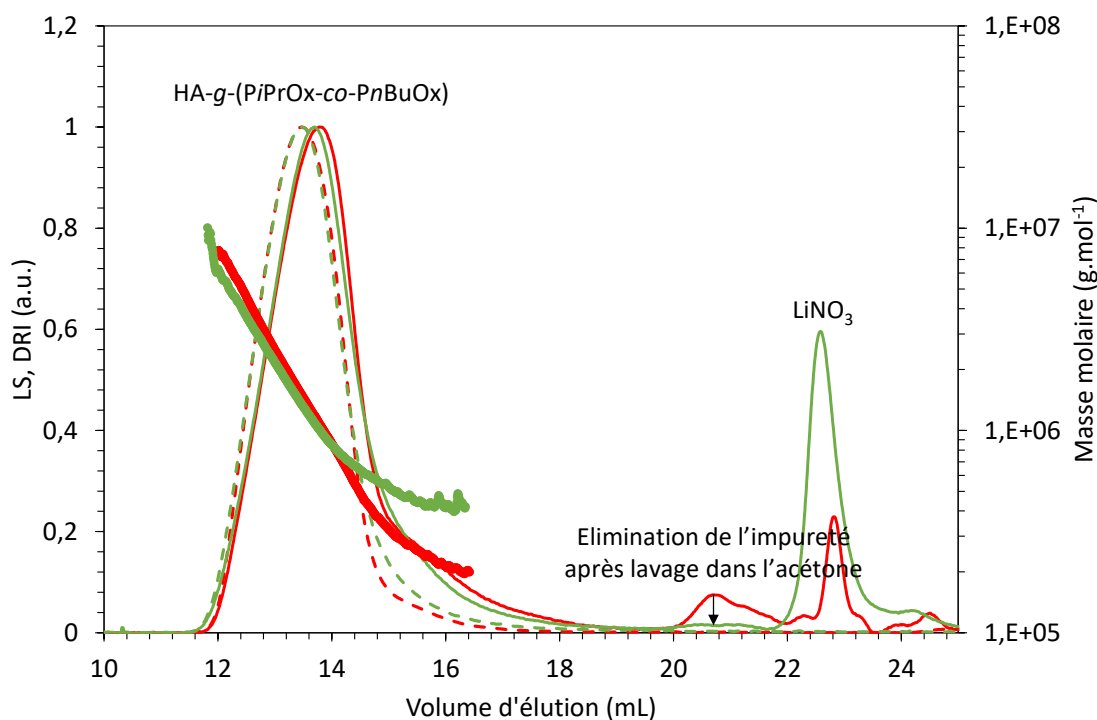


Figure D-14 Chromatogrammes obtenus par SEC/MALLS du HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₄-co-PnBuOx₃)-0,12 avant (courbes rouges) et après (courbes vertes) purification par dispersion dans l'acétone (traits pointillés : LS, traits pleins : DRI, disques : distribution des masses molaires).

L'analyse a été conduite sur un échantillon avec un greffon de PiPrOx₂₄-co-PnBuOx₃ relativement hydrophile (ratio *i*PrOx/*n*BuOx de 88/12), qui aura donc un T_{cp} vers 30 °C (voir figure B-31), ce qui permet donc son analyse au sein de la SEC/MALLS à température ambiante. On constate que si l'on analyse l'échantillon après l'étape de lyophilisation, il reste un peu de PiPrOx₂₄-co-PnBuOx₃ qui élue entre 20 et 22 mL. Le niveau d'impureté est toutefois nettement plus bas que dans le cas des dérivés de HA-g-PMeOx (Figure D-7). Le fait de disperser l'échantillon trois fois dans l'acétone permet de supprimer cette impureté résiduelle (Figure D-14). Par mesure de précaution et afin d'obtenir les matériaux les plus purs possible, cette étape a été incorporée au protocole.

Les différents échantillons synthétisés sont regroupés Tableau D-5. Le HA_{990k} a été utilisé comme base de travail, car sa faible concentration critique de recouvrement/enchevêtrement

(valeur moyenne entre C* et C**) (Tableau B-1 page 122) permet d'obtenir des hydrogels en consommant un minimum de produits. Il sera en outre plus facile d'obtenir des hydrogels à plus basse température avec ce dérivé (voir plus loin dans le manuscrit). Le paramètre le plus étudié est la variation du ratio *i*PrOx/*n*BuOx au sein du copolymère, car nous avons vu qu'il nous permettait d'ajuster aisément la T_{cp} (tableau B-2), ce qui devrait fortement influencer sur les propriétés thermosensibles de notre polymère. Autrement, les longueurs de chaîne du HA et du PiPrOx-co-PnBuOx ont également été variées. Enfin, un homopolymère de PnPrOx a été greffé sur le HA du fait de sa T_{cp} qui est proche de celle des copolymères employés²⁸. Afin d'obtenir des DS aux alentours de 10 %, les chaînes de PiPrOx-co-PnBuOx ont été terminées exclusivement avec une quantité stœchiométrique de HA au cours de cette étude.

Tableau D-5 Caractéristiques des HA-g-PiPrOx-coPnBuOx et résultats de synthèse.

Echantillons	Ratio <i>i</i> PrOx/ <i>n</i> BuOx	DP _{POx}	DS ^a	Efficacité du greffage (%) ^b	Rendement massique (%)
HA _{38k} -g-(PiPrOx ₁₅ -co-PnBuOx ₁₂)-0,10	57/43	27	0,10	10	60
HA _{140k} -g-(PiPrOx ₁₇ -co-PnBuOx ₁₀)-0,06	62/38	27	0,06	6	77
HA _{140k} -g-(PiPrOx ₁₉ -co-PnBuOx ₈)-0,09	72/28	27	0,9	9	63
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₈ -co-PnBuOx ₆)-0,31	58/42	14	0,31	31	92
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₅ -co-PnBuOx ₁₂)-0,12	56/44	27	0,12	12	-
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₇ -co-PnBuOx ₁₀)-0,06	63/37	27	0,06	6	92
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₈ -co-PnBuOx ₉)-0,13	66/34	27	0,13	13	84
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₈ -co-PnBuOx ₉)-0,15	67/33	27	0,15	15	90
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₀ -co-PnBuOx ₇)-0,10	75/25	27	0,10	10	79
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₂ -co-PnBuOx ₅)-0,12	83/17	27	0,12	12	95
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₄ -co-PnBuOx ₃)-0,12	88/12	27	0,12	12	82
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₃₈ -co-PnBuOx ₁₂)-0,05	76/24	50	0,05	5	87
HA _{990k} -g-PnPrOx ₂₇ -0,13	-	27	0,13	13	80

^a déterminé par spectroscopie RMN ¹H en utilisant l'équation D6

^b déterminé comme $\frac{DS}{n_{POx(chain)}/n_{HA(unit)}}$

Dans la plupart des cas, le DS obtenu est compris entre 0,06 et 0,15, avec l'exception notable de l'échantillon de HA_{990k}-g-(PiPrOx₈-co-PnBuOx₆)-0,31 qui présente un DS nettement plus élevé de 0,31, ce qui peut être expliqué dans ce cas par le fait que la chaîne à greffer est plus courte avec un DP de seulement 14 (comparé à 27 et 50), ce qui implique que la chaîne est stériquement moins encombrée. A l'inverse, le HA_{990k}-g-(PiPrOx₃₈-co-PnBuOx₁₂)-0,05 a un DS de seulement 0,05, cette fois-ci du fait de la longueur accrue de la chaîne à greffer. Les rendements massiques sont tous supérieurs à 60 %, ceux étant obtenus avec le HA_{990k} étant généralement les plus élevés, du fait de leur longueur de chaîne plus importante facilitant leur précipitation et leur rétention par les membranes employées au cours de l'étape de dialyse.

Maintenant que nous avons obtenu un panel assez large de copolymères, nous pouvons analyser leurs propriétés physico-chimiques, en commençant par les masses molaires, dimensions et paramètres de conformation que nous pouvons déterminer par SEC/MALLS/VD/DRI.

3.3 Caractérisation physico-chimique

3.3.1 Grandeurs physico-chimiques obtenues par SEC/MALLS/VD/DRI

Les différentes propriétés physico-chimiques des échantillons obtenues par SEC/MALLS/VD/DRI sont représentées Tableau D-6. On retrouve beaucoup de tendances déjà observées avec les dérivés de HA-g-PMeOx, à savoir l'invariance du paramètre 'a' de l'équation de Mark-Houwink-Sakurada pour un HA de départ donné et également l'invariance des rayons hydrodynamiques et de giration pour les dérivés de HA_{38k} et de HA_{140k} (alors qu'ils baissent pour le HA_{990k} du fait de la dégradation de la chaîne induite par la réaction). On observe aussi une légère baisse de la viscosité intrinsèque après greffage et une tendance des masses molaires à augmenter avec le taux de greffage de polyoxazolines, du fait de l'augmentation de la masse molaire moyenne de l'unité saccharide. Enfin, le DP_{n app} (degré de polymérisation apparent) baisse légèrement pour les dérivés de HA_{140k} et de façon plus prononcée pour les dérivés de HA_{990k}, signe de la dégradation de la chaîne polymère. La réaction produit donc les mêmes effets que ceux observés précédemment. Des différences de comportement pouvant être reliées au caractère thermosensible de la chaîne latérale ont toutefois été remarquées. Dans le cas du HA_{38k}, le dérivé HA_{38k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,10 obtenu présente un DP_{n app} de 138 plus élevé que celui du HA de départ (95). Le copolymère greffé est assez hydrophobe (ratio

*i*PrOx/*n*BuOx de 57/43), sa T_{cp} est donc inférieure à la température ambiante, ce qui entraîne probablement un comportement agrégatif des chaînes en solution. On constate aussi que les chaînes de HA_{990k}-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) ont un DP_n plus élevé que leurs homologues de HA_{990k}-g-PMeOx, ce qui entraîne l'observation de masses molaires parfois plus élevées que pour le HA de départ. On constate également que certaines masses récupérées sont faibles (ex : 43 % pour le HA_{140k}-g-(PiPrOx₁₇-co-PnBuOx₁₀)-0,06), voire très faible (6 % pour le HA_{990k}-g-(PiPrOx₈-co-PnBuOx₆)-0,31), et même nulle dans le cas du HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12. Ces échantillons ont généralement des greffons qui deviennent trop hydrophobes à température ambiante, et sont donc agrégés dans les conditions de la mesure : ils ne peuvent dès lors pas facilement traverser le filtre à l'entrée de la colonne et une grande quantité est alors perdue. Dans le cas du HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12, l'échantillon était trop agrégé et n'a donc pu être analysé. On constate que les dérivés de HA_{990k} aux greffons les plus hydrophiles (HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₄-co-PnBuOx₃)-0,12 et HA_{990k}-g-(PiPrOx₃₈-co-PnBuOx₁₂)-0,05) ne présentent généralement pas ce problème avec des taux de récupération très corrects (89 % et 85 %). On peut également remarquer que bien qu'ayant des greffons de composition similaire, le HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12 et le HA_{38k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,10 ont montré des comportements très différents lors de l'analyse, le premier n'ayant pu être analysé, tandis que le second, bien qu'agrégatif et préparé à une concentration supérieure (1 g.L⁻¹ contre 0,5 g.L⁻¹), présente un taux de récupération de 63 %. On peut donc s'attendre à des propriétés thermosensibles très différentes selon le HA de départ utilisé.

Tableau D-6 Grandeurs macromoléculaires des échantillons déterminés par SEC/MALLS/VD/DRI (25 °C, LiNO₃, 0,1 mol.L⁻¹).

Echantillons	M _n (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	DP _{n app}	Đ	[η] _w (mL.g ⁻¹)	Rh _w (nm)	Rg _w (nm)	a (MHS)	Masse récupérée
HA _{38k}	38 000	64 000	95	1,7	145	11	^a	0,76	68 %
HA _{38k} -g-(PiPrOx ₁₅ -co-PnBuOx ₁₂)-0.10	100 000	150 000	138	1,5	110	13	31	0,90	63 %
HA _{140k}	140 000	210 000	350	1,5	410	23	44	0,71	63 %
HA _{140k} -g-(PiPrOx ₁₇ -co-PnBuOx ₁₀)-0.06	190 000	220 000	314	1,2	265	20	47	0,93	43 %
HA _{140k} -g-(PiPrOx ₁₉ -co-PnBuOx ₈)-0.09	200 000	260 000	290	1,3	280	22	36	0,75	75 %
HA _{990k}	990 000	1 300 000	2 475	1,4	1 600	68	147	^{-b}	78 %
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₈ -co-PnBuOx ₆)-0.31	850 000	1 100 000	930	1,3	940	53	93	0,68	6 %
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₅ -co-PnBuOx ₁₂)-0.12	^{-c}	^{-c}	^{-c}	^{-c}	^{-c}	^{-c}	^{-c}	^{-c}	^{-c}
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₇ -co-PnBuOx ₁₀)-0.06	730 000	990 000	1230	1,4	990	52	101	0,60	33 %
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₈ -co-PnBuOx ₉)-0.13	980 000	1 120 000	1178	1,2	740	51	110	^{-b}	20 %
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₈ -co-PnBuOx ₉)-0.15	1 170 000	1 400 000	1262	1,2	770	54	110	^{-b}	20 %
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₀ -co-PnBuOx ₇)-0.10	1 140 000	1 700 000	1590	1,5	840	58	110	^{-b}	76 %
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₂ -co-PnBuOx ₅)-0.12	1 130 000	1 660 000	1437	1,5	1020	62	116	0,69	30 %
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₄ -co-PnBuOx ₃)-0.12	960 000	1 440 000	1240	1,5	760	53	101	^{-b}	89 %
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₃₈ -co-PnBuOx ₁₂)-0.05	990 000	1 100 000	1444	1,1	810	52	104	^{-b}	85 %
HA _{990k} -g-PnPrOx ₂₇ -0.12	2 280 000	2 480 000	2920	1,1	680	63	103	^{-b}	80 %

Coefficient 'a' de l'expression de MHS obtenu en intégrant la partie la plus linéaire de la représentation bilogarithmique de [η] = f(M)

Précision des données SEC/MALLS/VD/DRI : M_n ± 9%; M_w ± 6%; Đ ± 10%; [η]_w ± 0.5%; Rh_w ± 2%; Rg_w ± 6%

^a en dehors de la zone de détection du MALLS (la diffusion devient isotrope pour les faibles masses).

^b Valeurs non déterminées (analyse difficile).

^c n'a pas pu être analysé car est resté bloqué dans le filtre.

3.3.2 Analyse de la T_{cp} par spectroscopie UV-vis.

Avant d'analyser les propriétés thermosensibles de nos hydrogels par rhéologie, nous avons cherché à observer les phénomènes qui pouvaient être visible à l'œil nu en préparant des solutions de HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) en régime semi-dilué enchevêtré dans des tubes. Nous avons pu constater que les différentes solutions deviennent plus ou moins troubles en milieu salin lorsqu'on les chauffe à des températures de 37 °C ou plus afin de visualiser la transition vers un hydrogel (Figure D-15). Il est à noter que le comportement des copolymères dans l'eau Milli-Q est très différent qu'en milieu salin (tampon PBS). En effet, le copolymère de HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12, qui est le plus hydrophobe au point de précipiter lorsque l'on augmente la température en milieu salin (Figure D-15-a), forme visuellement un hydrogel limpide dans l'eau Milli-Q à 10 g.L⁻¹ (régime semi-dilué enchevêtré) (Figure D-15-b) (il faut rappeler que ce copolymère est le seul qui n'avait pu être analysé par SEC/MALLS dans une solution saline dans LiNO₃ 0,1 M, cf. Tableau D-6). A l'inverse, le HA_{990k}-g-(PiPrOx₃₈-co-PnBuOx₁₂)-0,05, ayant un greffon parmi les plus hydrophiles utilisés (ratio *i*PrOx/*n*BuOx de 76/24) a donné un gel limpide dans le PBS (Figure D-15-c). Nous avons donc décidé de quantifier ce phénomène en mesurant d'éventuels points troubles de nos échantillons au spectrophotomètre UV-vis.

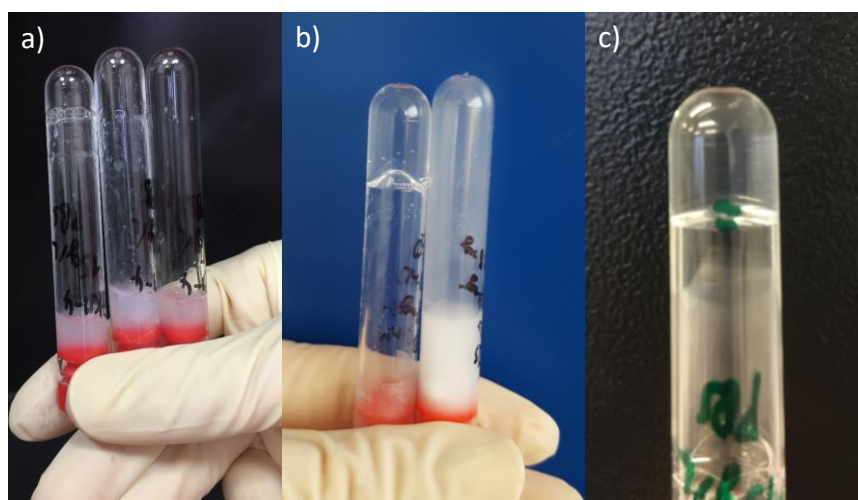


Figure D-15 Photos de diverses solutions de HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) : **a)** HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12 (15 g.L⁻¹ (gauche), 10 g.L⁻¹ (milieu), 5 g.L⁻¹ (droite), 37 °C, PBS); **b)** HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12 (10 g.L⁻¹, Milli-Q, 50 °C) (gauche) et HA_{990k} + PiPrOx₁₆-co-PnBuOx₁₃ (droite) (total : 10 g.L⁻¹, masses ajustées pour obtenir la même composition que la solution de HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12, Milli-Q, 50 °C); **c)** HA_{990k}-g-(PiPrOx₃₈-co-PnBuOx₁₂)-0,05 (15 g.L⁻¹, 50 °C, PBS).

Tableau D-7 Détermination de la T_{cp} des différents copolymères de HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx).

Echantillons	Ratio <i>i</i> PrOx/ <i>n</i> BuOx	T_{cp} (°C) (50 g.L ⁻¹ , PBS 0,15 M)	T_{cp} (°C) (15 g.L ⁻¹ , PBS 0,15 M)	T_{cp} (°C) (10 g.L ⁻¹ , PBS 0,15 M)	T_{cp} (°C) (5 g.L ⁻¹ , PBS 0,15 M)
HA _{38k} -g-(PiPrOx ₁₅ -co-PnBuOx ₁₂)-0,10	57/43	- ^a	-	-	-
HA _{140k} -g-(PiPrOx ₁₇ -co-PnBuOx ₁₀)-0,06	62/38	22	-	-	-
HA _{140k} -g-(PiPrOx ₁₉ -co-PnBuOx ₈)-0,09	72/28	26	-	-	-
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₈ -co-PnBuOx ₆)-0,31	58/42	-	19	21	25
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₅ -co-PnBuOx ₁₂)-0,12	56/44	-	15	17	19
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₇ -co-PnBuOx ₁₀)-0,06	63/37	-	23	-	29
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₈ -co-PnBuOx ₉)-0,13	66/34	-	25	28	33
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₈ -co-PnBuOx ₉)-0,15	67/33	-	24	28	31
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₀ -co-PnBuOx ₇)-0,10	75/25	-	28	-	-
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₂ -co-PnBuOx ₅)-0,12	83/17	-	34	38	41
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₄ -co-PnBuOx ₃)-0,12	88/12	-	42	-	-
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₃₈ -co-PnBuOx ₁₂)-0,05	76/24	-	32	29	31
HA _{990k} -g-PnPrOx ₂₇ -0,12	-	-	29	31	36

^a Aucune transition observée.

Les résultats sont regroupés au sein du Tableau D-7. Les mesures ont été effectuées à des concentrations de 15 g.L⁻¹, 10 g.L⁻¹ et 5 g.L⁻¹ pour les échantillons à base de HA_{990k} et à 50 g.L⁻¹ pour les échantillons à base de HA_{140k} et de HA_{38k}, afin de reproduire les conditions qui seront employées pour les mesures rhéologiques. La plupart des échantillons de HA_{990k}-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) à 15 g.L⁻¹ voient leur absorbance augmenter, de façon pouvant être abrupte (HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12) avec un comportement rappelant celui des copolymères de polyoxazolines libres, ou plus modérée avec des pentes peu prononcées (HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₀-co-PnBuOx₇)-0,10, HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₄-co-PnBuOx₃)-0,12), voire être à peine visible pour certains (HA_{990k}-g-(PiPrOx₃₈-co-PnBuOx₁₂)-0,05). Cette évolution est fonction de l'hydrophilie de la chaîne greffée : logiquement plus cette dernière est hydrophile, moins l'échantillon va se troubler (Figure D-16).

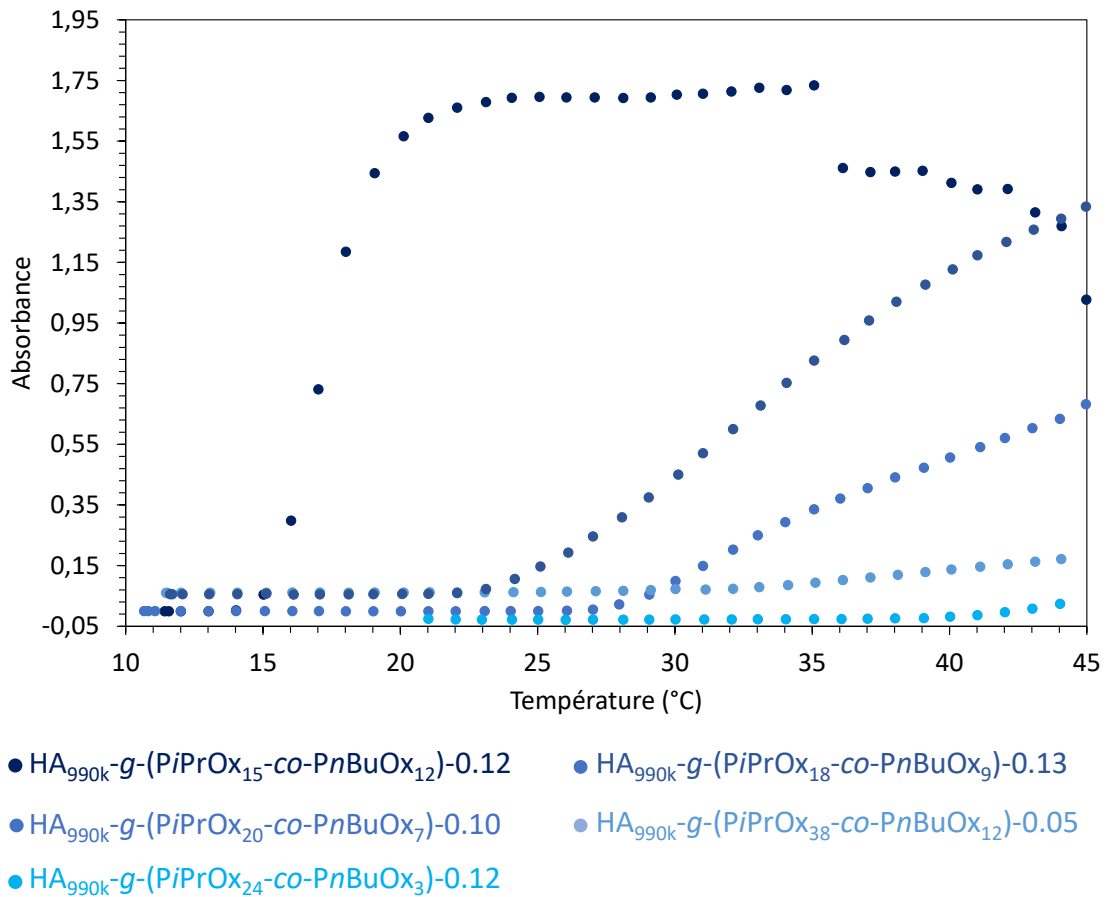


Figure D-16 Evolution de l'absorbance d'échantillons de HA_{990k}-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) par élévation de la température (15 g.L⁻¹, PBS).

L'effet du DS pour un ratio *i*PrOx/*n*BuOx similaire a également pu être étudié (Figure D-17). Si l'on compare les échantillons HA_{990k}-*g*-(PiPrOx₁₇-co-PnBuOx₁₀)-0,06 et HA_{990k}-*g*-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,13, on constate que l'absorbance commence à augmenter à la même température. Par contre, la pente de la courbe est nettement plus faible quand le DS est faible (Figure D-17-a). Nous avons également pu comparer des échantillons comprenant des greffons de composition et de DS similaires mais attachés sur des HA de masses molaires différentes. Ainsi, le HA_{990k}-*g*-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12 et le HA_{38k}-*g*-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,10 ont montré des comportements macroscopiquement radicalement différents, le second ayant une absorbance augmentant à peine lorsque la température augmente alors que le premier précipite, avec un comportement proche des polyoxazolines avant greffage sur du HA (chapitre B, Figure B-30 page 136), et présente même une tendance à sédimenter aux températures élevées comme on peut le voir avec la baisse de l'absorbance au-delà de 35 °C (Figure D-17-b). Il convient également de noter que ce composé présente une absorbance augmentant à peine quand il est dissout dans l'eau Milli-Q (Figure D-18-a), ce qui vient confirmer l'observation visuelle (Figure D-15-b). Ce phénomène est bien connu, les effets de sels sur la balance hydrophile/lipophile ont été déjà reportés depuis une trentaine d'année^{30,31}.

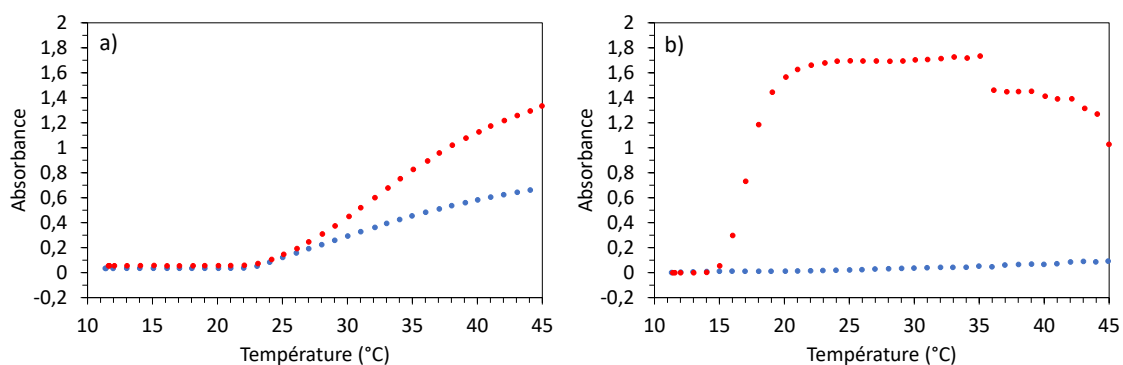


Figure D-17 Evolution de l'absorbance d'échantillons de HA-*g*-(PiPrOx-co-PnBuOx) par élévation de la température **a)** en fonction du DS (rouge : HA_{990k}-*g*-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,13; bleu : HA_{990k}-*g*-(PiPrOx₁₇-co-PnBuOx₁₀)-0,06) (15 g.L⁻¹, PBS) et **b)** en fonction de la masse molaire du HA de départ (rouge : HA_{990k}-*g*-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12 (15 g.L⁻¹, PBS); bleu : HA_{38k}-*g*-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,10 (50 g.L⁻¹, PBS).

On peut également observer que le HA_{990k}-*g*-PnPrOx₂₇-0,12 (T_{cp} : 29,2 °C) (15 g.L⁻¹, PBS) présente une T_{cp} comparable à celle du HA_{990k}-*g*-(PiPrOx₂₀-co-PnBuOx₇)-0,10 (T_{cp} : 28,1 °C) (Figure D-18-b), mais que l'augmentation de son absorbance est plus marquée (son absorbance

à 45 °C est presque deux fois plus élevée). La substitution du copolymère de PiPrOx-co-PnBuOx, qui comporte des unités *n*BuOx hydrophobes, par un homopolymère de PnPrOx, intermédiaire entre l'*i*PrOx et le *n*BuOx en terme de point trouble, ne permet donc pas d'éviter que les HA fonctionnalisés ne deviennent turbides par élévation de la température.

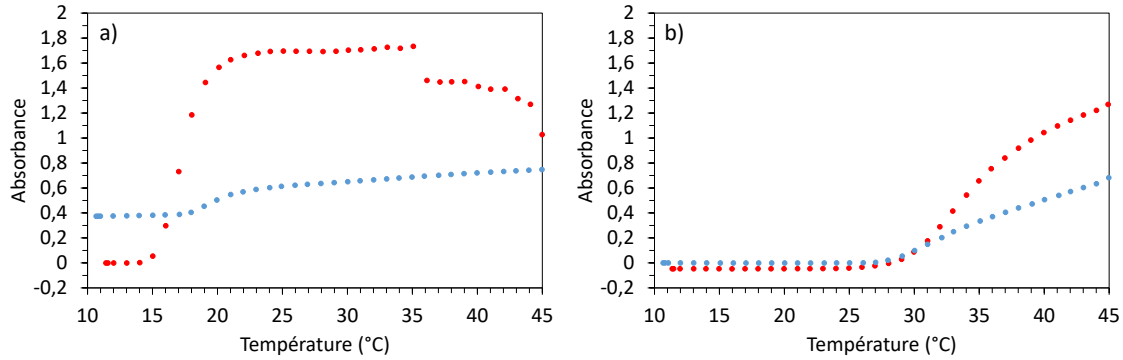


Figure D-18 Evolution de l'absorbance d'échantillons **a)** HA_{990k}-*g*-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12 à 15 g.L⁻¹ dans le PBS (courbe rouge) ou l'eau Milli-Q (courbe bleue) et **b)** HA_{990k}-*g*-PnPrOx₂₇-0,12 (courbe rouge) et HA_{990k}-*g*-(PiPrOx₂₀-co-PnBuOx₇)-0,10 (courbe bleue) (15 g.L⁻¹, PBS).

3.4 Caractérisation rhéologique de la formation des hydrogels par élévation de la température

3.4.1 Mesure de la transition hydrogel par rampe thermique

Nous avons cette fois essentiellement travaillé avec des solutions de HA-*g*-(PiPrOx-co-PnBuOx) dans le PBS afin de reproduire le même environnement salin que dans le corps humain. Dans le cas des échantillons de HA_{990k} fonctionnalisés, la concentration a été variée de 15 g.L⁻¹ (soit 1,5 % en masse), 10 g.L⁻¹ et de 5 g.L⁻¹. Dans le cas des HA_{140k} et HA_{38k}, nous avons dû travailler à une concentration plus élevée de 50 g.L⁻¹ du fait de la C* plus réduite pour ces deux HA. Les rampes de montée et de baisse en température étaient de 0,5 °C.min⁻¹. La géométrie principale employée était le double-entrefer, le cône-plan ayant également été utilisé de façon ponctuelle. Les mesures ont été réalisées en oscillation au sein du domaine de linéarité viscoélastique de l'échantillon. Cette zone de linéarité peut être déterminée par des balayages en amplitude de contrainte à une fréquence donnée lors de mesures oscillantes effectuées à différentes températures (Figure D-19). On peut observer sur les différentes courbes que les modules de conservation élastique G' et de perte G'' sont constants pour les faibles amplitudes de contrainte

oscillante. Puis, les deux valeurs vont finir par diminuer une fois une certaine amplitude atteinte, à commencer par le G' (qui diminue toujours un peu avant le G'').

On peut voir que l'augmentation de la température finit par entraîner une hausse du G' et du G'' , avec G' qui devient éventuellement supérieur à G'' (Figure D-19). On observe alors que le domaine de visco-élasticité linéaire devient plus large au fur et à mesure de l'augmentation de la température. On peut déjà observer un effet très net de la température, avec le passage d'une solution avec un comportement visqueux prédominant à une solution avec un comportement élastique prédominant par élévation de la température. De surcroît, le G'' a atteint une limite, là où le G' continue d'augmenter, ce dernier étant passé d'une valeur inférieure à 1 Pa (10-20 °C) à une valeur supérieure à 100 Pa (50 °C). Par la suite, dans la majeure partie des cas, la contrainte a été fixée à 0,1 Pa. La fréquence, quant à elle, a été fixée à 1 Hz.

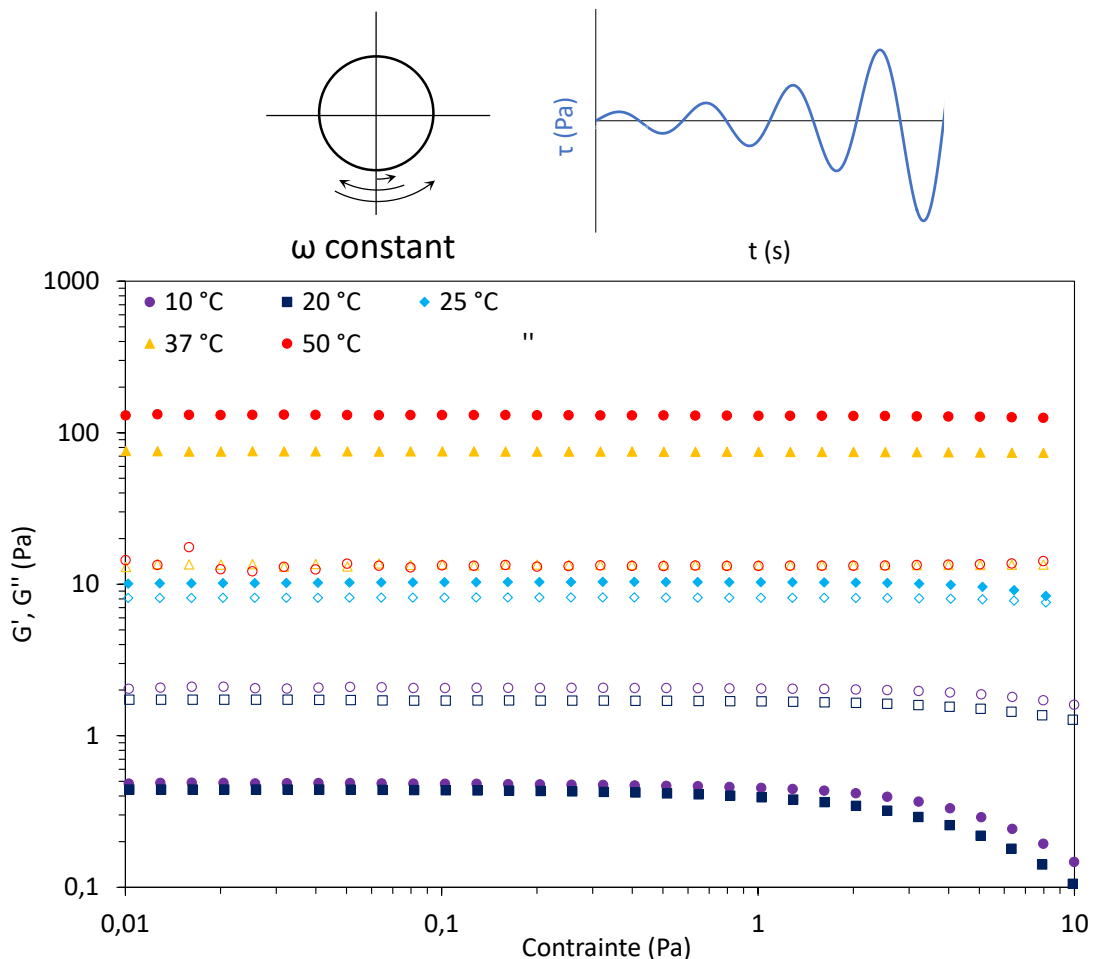


Figure D-19 Balayage en contrainte sur une solution de HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,13 (15 g.L⁻¹, PBS) à diverses températures (symboles pleins : G' ; symboles vides : G'') (violet : 10 °C; bleu foncé : 20 °C; bleu clair : 25 °C; orange : 37 °C; rouge : 50 °C) (f : 1 Hz).

Au cours de la rampe thermique, les valeurs des modules de conservation G' et de perte G'' sont représentées en fonction de la température. Une rampe de température typique est représentée Figure D-20. On peut voir à nouveau que G'' est supérieur à G' aux basses températures. De même, l'augmentation de la température se traduit d'abord par une baisse de la valeur des deux modules, ce qui est le comportement attendu pour un polymère non thermosensible, du fait de la baisse de la viscosité induite par l'agitation thermique de la montée en température. Il n'y a à ce moment pas d'association entre les chaînes polyoxazolines, comme on peut le constater en superposant l'analyse UV à la courbe rhéologique (Figure D-20). A partir d'une certaine température, qui coïncide plutôt bien avec celle où l'absorbance de la solution commence à augmenter, les valeurs de G' et de G'' commencent à s'accroître du fait de l'établissement d'associations entre chaînes latérales polyoxazolines. Puis les deux modules finissent par se croiser à une température, qui sera appelée par la suite température de transition T_{trans} . Cette température correspond à un point remarquable qui permet la comparaison entre nos systèmes. Notons toutefois que celle-ci ne correspond pas au point de percolation de notre hydrogel, ce qui sera discuté par la suite. Passé cette température, G' est supérieur à G'' , la solution commence donc à présenter un comportement élastique prédominant typique des hydrogels. La transition est réversible dans tous les cas (Figure D-20) même si parfois une hystérésis a pu être observée.

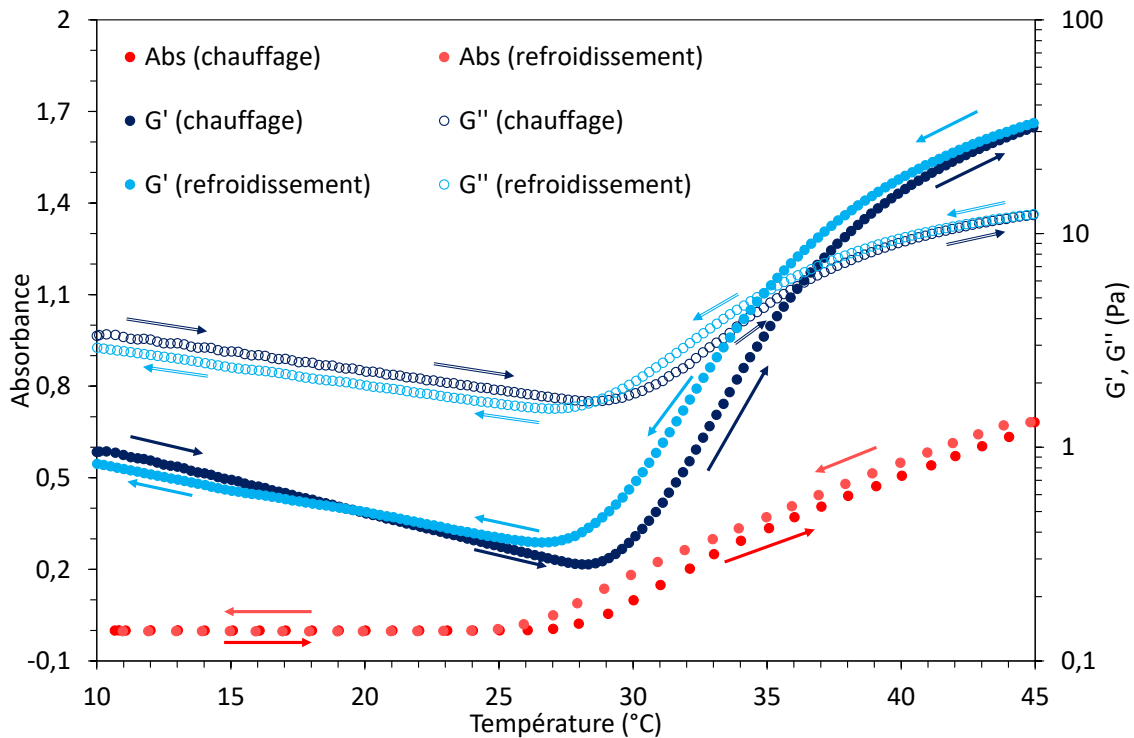


Figure D-20 Profil rhéologique et évolution de l'absorbance du HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₀-co-PnBuOx₇)-0,10 (G' : symboles bleus pleins; G'' : symboles bleus vides; absorbance : symboles rouges) en solution dans le PBS à 15 g.L⁻¹ au cours d'une rampe en température (0,5 °C.min⁻¹; contrainte : 0,1 Pa; fréquence : 1 Hz).

Les propriétés rhéologiques de chaque échantillon sont résumées dans le Tableau D-8. Parmi les paramètres étudiés, la concentration n'affecte que très peu la T_{trans} . Une diminution de 15 g.L⁻¹ à 5 g.L⁻¹ a entraîné une augmentation de la T_{trans} de seulement 4-8 °C, à l'unique exception du HA_{990k}-g-(PiPrOx₈-co-PnBuOx₆)-0,31, qui constitue un cas particulier du fait de la chaîne greffée plus courte qu'à l'accoutumé. Dans ce cas, une très forte variation de la T_{trans} a été observée (de 29,8 °C pour une concentration de 15 g.L⁻¹ à 51,4 °C pour une concentration de 5 g.L⁻¹), qui résulte du fait d'associations plus faibles entre les chaînes latérales en raison de leurs tailles plus courtes et ce, malgré leur nombre plus élevé (DS : 31 %). Autrement, l'amplitude faible du décalage vers les hautes températures induit par la baisse de concentration est identique à celui déjà observé avec la spectrophotométrie UV-vis (Tableau D-7). On peut en conclure que tant que les chaînes de polymère sont enchevêtrées, les greffons vont s'associer vers la même température.

Tableau D-8 Propriétés rhéologiques expérimentales des échantillons de HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) en tampon PBS.

Echantillons	Ratio <i>iPrOx/nBuOx</i>	T_{trans} (°C)				$G'_{10\text{ °C}}$ (Pa)	$G'_{37\text{ °C}}$ (Pa)	$G'_{60\text{ °C}}$ (Pa)	$\eta_{10\text{ °C}}$ (Pa.s)	$\tan(\delta)_{60\text{ °C}}$
		50 g.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹	10 g.L ⁻¹	5 g.L ⁻¹					
HA _{38k}	-	aucun	aucun	aucun	aucun	-	-	-	-	-
HA _{38k} -g-(PiPrOx ₁₅ -co-PnBuOx ₁₂)-0,10	57/43	42,4	-	-	-	0,01 ^a	21 ^a	198 ^a	0,05 ^a	0,54 ^a
HA _{140k}	-	aucun	aucun	aucun	aucun	-	-	-	-	-
HA _{140k} -g-(PiPrOx ₁₇ -co-PnBuOx ₁₀)-0,06	62/38	36,6	-	-	-	0,14 ^a	113 ^a	800 ^a	0,75 ^a	0,31 ^a
HA _{140k} -g-(PiPrOx ₁₉ -co-PnBuOx ₈)-0,09	72/28	43,2	-	-	-	0,08 ^a	18,8 ^a	592 ^a	-	0,43 ^a
HA _{990k}	-	aucun	aucun	aucun	aucun	-	-	-	-	-
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₈ -co-PnBuOx ₆)-0,31	58/42	-	29,8	45,9	51,4	0,41 ^b	4,3 ^b	6,3 ^b	0,27 ^b	0,22 ^b
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₅ -co-PnBuOx ₁₂)-0,12	56/44	-	16,5	18,3	20,8	0,014 ^b	9,2 ^b	10 ^b	0,056 ^b	0,12 ^b
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₇ -co-PnBuOx ₁₀)-0,06	63/37	-	29,3	29,1	35,0	1,3 ^b	29 ^b	86 ^b	0,60 ^b	0,27 ^b
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₈ -co-PnBuOx ₉)-0,13	66/34	-	24,8	25,8	28,6	0,48 ^b	77,9 ^b	178 ^b	0,30 ^b	0,08 ^b
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₁₈ -co-PnBuOx ₉)-0,15	67/33	-	24,7	26,0	29,7	0,51 ^b	68,9 ^b	159 ^b	0,23 ^b	0,08 ^b
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₀ -co-PnBuOx ₇)-0,10	75/25	-	36,2	37,6	41,4	0,95 ^b	7,4 ^b	70 ^b	0,70 ^b	0,29 ^b
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₂ -co-PnBuOx ₅)-0,12	83/17	-	43,1	45,5	52,1	0,99 ^b	0,38 ^b	37 ^b	-	0,28 ^b
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₂₄ -co-PnBuOx ₃)-0,12	88/12	-	47,9	49,7	53,7	1,3 ^b	0,20 ^b	47 ^b	0,89 ^b	0,33 ^b
HA _{990k} -g-(PiPrOx ₃₈ -co-PnBuOx ₁₂)-0,05	76/24	-	33,0	34,6	38,1	1,3 ^b	28,9 ^b	179 ^b	0,68 ^b	0,12 ^b
HA _{990k} -g-PnPrOx ₂₇ -0,13	-	-	39,4	41,6	47,6	1,6 ^b	3,21 ^b	31 ^b	0,68 ^b	0,27 ^b

^a valeur obtenue pour une concentration de 50 g.L⁻¹

^b valeur obtenue pour une concentration de 15 g.L⁻¹

3.4.1.1 Influence du ratio $iPrOx/nBuOx$ sur T_{trans}

Le paramètre principal de cette étude est le ratio $iPrOx/nBuOx$ au sein du copolymère greffé, car nous nous attendions à ce qu'il permette de contrôler facilement la température de transition de nos hydrogels. Les rampes en température des échantillons HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,13, HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₀-co-PnBuOx₇)-0,10 et HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₄-co-PnBuOx₃)-0,12 sont regroupées Figure D-21. Comme pour la figure précédente, elles ont toutes trois une allure similaire. Les deux modules, G' et G'' , diminuent dans un premier temps ($G'' > G'$) avant d'augmenter du fait de l'établissement d'associations entre les chaînes latérales, puis G' et G'' finissent par se croiser et G' devient le module prépondérant. G'' finit par atteindre un plateau, similaire pour tous les échantillons, tandis que G' continue d'augmenter à 60 °C, température maximale atteinte, mais de façon nettement plus modérée qu'aux alentours de T_{trans} , un point d'inflexion dans la courbe étant généralement observé peu avant le croisement G'/G'' (Figure D-21). Les principales différences observées entre les courbes sont donc la température à partir de laquelle les chaînes latérales deviennent associatives. Comme attendu, la T_{trans} est la plus faibles pour le HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,13, qui a la chaîne greffée la plus hydrophobe, et la plus élevée pour le HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₄-co-PnBuOx₃)-0,12, qui inversement présente la chaîne greffée la plus hydrophile.

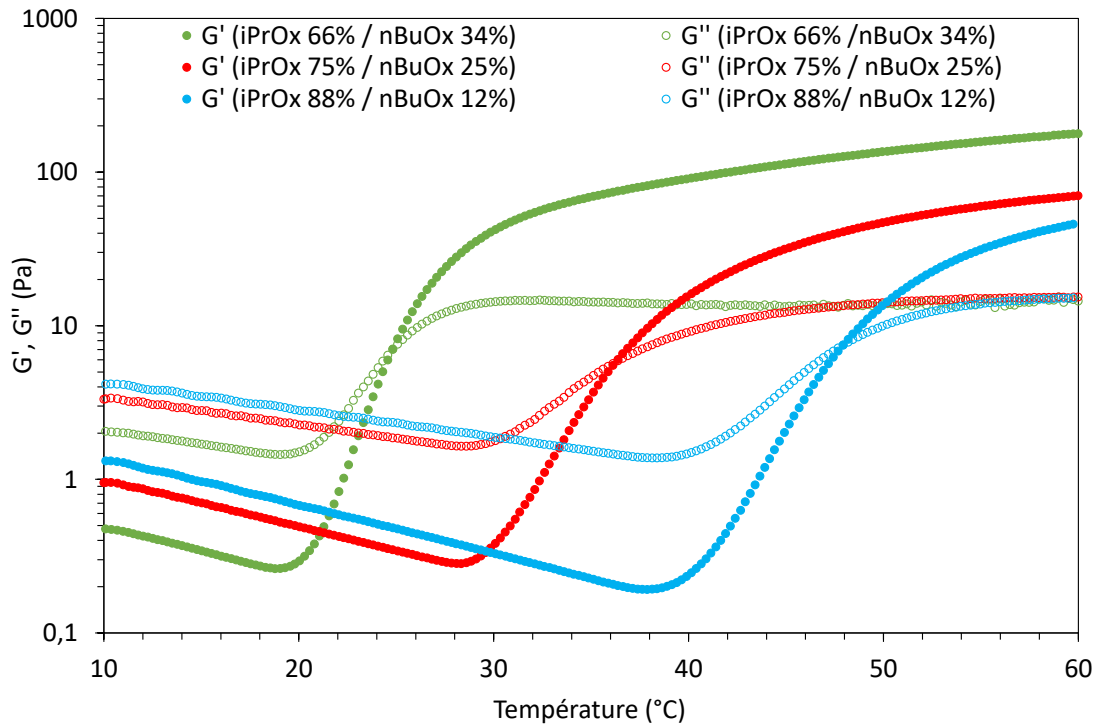


Figure D-21 Profils rhéologiques du HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,13 (courbe verte), du HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₀-co-PnBuOx₇)-0,10 (courbe rouge) et du HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₄-co-PnBuOx₃)-0,12 (courbe bleue) (G' : symboles pleins; G'' : symboles vides) en solution dans le PBS à 15 g.L⁻¹ au cours d'une rampe en température (0,5 °C.min⁻¹; contrainte : 0,1 Pa; fréquence : 1 Hz).

Il y a une exception à ce comportement qui provient de l'échantillon HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12 (Figure D-22). Aux basses températures, cet échantillon présente un comportement similaire aux autres jusqu'au croisement de G' et G'' , cependant, une fois ce point franchi, on peut constater une forte inflexion des deux courbes G' et G'' qui finissent par décroître, avec G' atteignant finalement un plateau autour de 10 Pa. On constate que ce changement de comportement survient de façon concomitante avec la forte montée de l'absorbance de l'échantillon. Cette dernière finit d'ailleurs elle aussi par décroître de façon irréversible à des températures supérieures à 35 °C, ce qui indique probablement un collapse des chaînes dû à une trop forte association des groupes thermosensibles et une sédimentation de l'échantillon. Ces phénomènes avaient d'ailleurs déjà été constatés visuellement (Figure D-15-a). On remarque d'ailleurs sur la courbe de refroidissement qu'après une étape de décroissance, les deux modules G' et G'' finissent par augmenter de nouveau vers 20 °C au moment où l'absorbance décroît brutalement, signe que l'échantillon repasse en solution. On

retrouve ensuite à nouveau le comportement normal, avec G' et G'' qui se remettent à diminuer avant de se croiser.

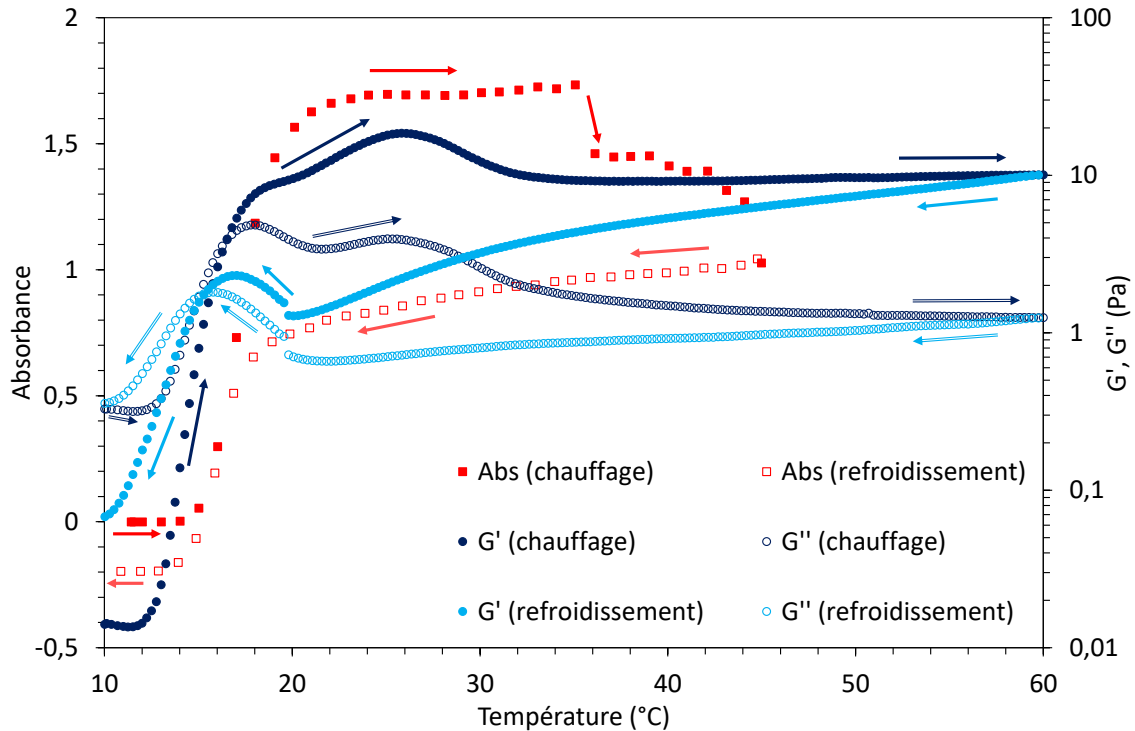


Figure D-22 Profils rhéologiques et évolution de l'absorbance du HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂-0,12 (G' : symboles bleus pleins, G'' : symboles bleus vides, absorbance : symboles rouges) en solution dans le PBS à 15 g.L⁻¹ au cours d'une rampe en température (0,5 °C.min⁻¹; contrainte : 0,1 Pa; fréquence : 1 Hz).

Si on compare des solutions de HA_{990k}-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) avec des chaînes greffées présentant le même DP et avec des DS similaires, on constate que leur T_{trans} varie de façon linéaire avec le pourcentage d'unités *i*PrOx au sein du polymère greffé. Cette évolution a été retrouvée quelle que soit la concentration étudiée (Figure D-23). On constate en outre que le coefficient directeur est égal ou proche de l'unité. Les points issus de l'échantillon HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12 s'intègrent bien à la courbe malgré le comportement irrégulier de ce dernier : sa T_{trans} se situe en effet dans une zone où l'échantillon n'a pas encore précipité (Figure D-22). Le contrôle de la T_{trans} est donc facilement réalisable par ce biais. Ces observations constituent un résultat majeur de notre étude et justifient notre stratégie.

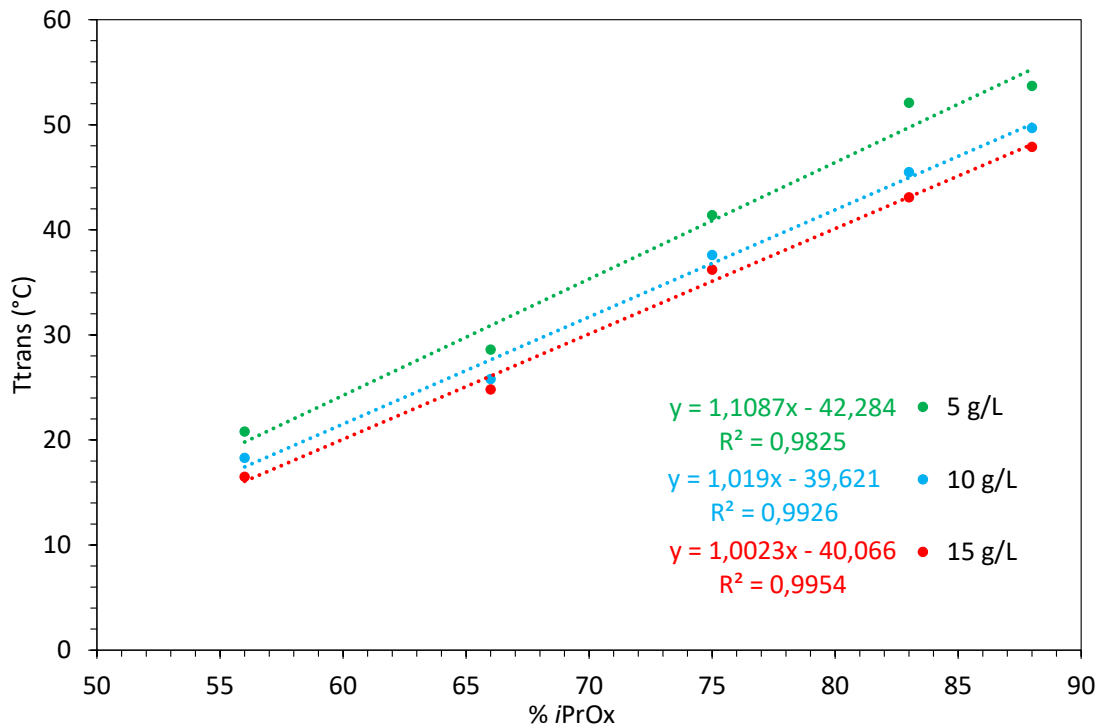


Figure D-23 Evolution de la T_{trans} de divers échantillons de $HA_{990k}-g-(PiPrOx_m-co-PnBuOx_n)$ ($m + n = 27$; $DS \sim 0,12$) en fonction du pourcentage d'unités $iPrOx$ au sein du copolymère greffé.

A ce stade, nous pouvons noter que les modules présentés par les solutions de $HA_{990k}-g-(PiPrOx-co-PnBuOx)$ à basse température sont largement inférieurs à ceux affichés par le HA_{990k} à des concentrations massiques similaires (Figure D-24). Cependant, ce résultat s'explique par deux facteurs : les $HA_{990k}-g-(PiPrOx-co-PnBuOx)$ présentent tous une dégradation de la chaîne HA (comme l'ont montré les $DP_{n\ app}$) et il faut rappeler que 40-45 % de la masse de l'échantillon sont en fait constitués de chaînes polyoxazolines (formule A_{11} en annexe 1 en substituant la M_n du PMeOx avec celle du copolymère $PiPrOx-co-PnBuOx$), qui n'auront pas la même contribution à la viscosité que le HA seul.

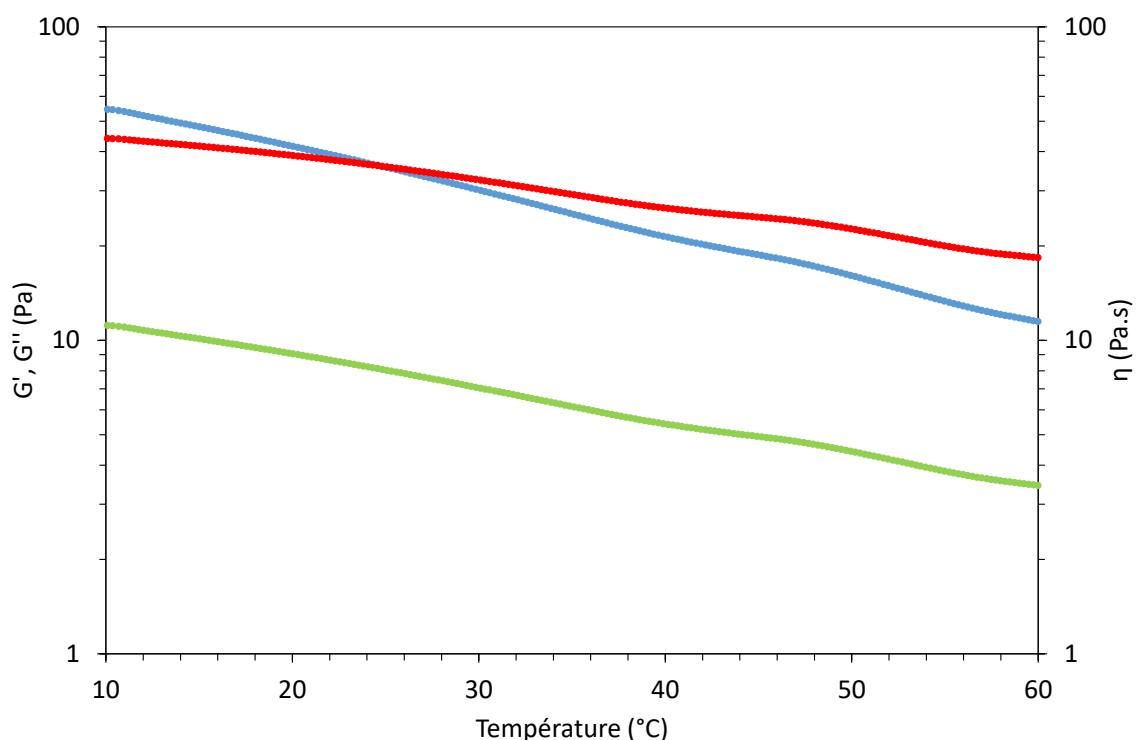


Figure D-24 Profil rhéologique du HA_{990k} (G' : symboles rouges; G'' : symboles bleus; η : symboles verts) en solution à 15 g.L⁻¹ dans le PBS au cours d'une rampe en température (0,5 °C.min⁻¹; contrainte : 0,1 Pa; fréquence : 1 Hz).

3.4.1.2 Influence du DS sur T_{trans}

Parmi les autres paramètres influençant la T_{trans} , nous pouvons également noter le DS de l'échantillon. Lorsque l'on compare les échantillons HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₇-co-PnBuOx₁₀)-0,06 (T_{trans} : 29,3 °C à 15 g.L⁻¹) et HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,13 (T_{trans} : 24,8 °C à 15 g.L⁻¹), de chaîne greffée de composition similaire, on constate que la T_{trans} du composé avec le DS le plus faible est la plus élevée, ce qui peut s'expliquer par la plus faible quantité de polyoxazoline greffé sur le HA entraînant moins de possibilité d'associations inter-chaînes.

3.4.1.3 Influence du DP_{POx}

Un autre paramètre étudié est le DP_{POx}. Le diminuer de 27 à 15 pour des échantillons avec un greffon hydrophobe (contenant plus de 40 % de nBuOx) a permis d'éviter le collapse du copolymère observé avec le HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12 (Figure D-22) comme on peut le constater avec le HA_{990k}-g-(PiPrOx₈-co-PnBuOx₆)-0,31 (Figure D-25-a). Cependant, des chaînes latérales plus courtes résultent en des interactions réduites, ce qui s'oppose à la formation du gel (Figure D-25-b). A l'inverse, l'augmentation du DP de 27 à 50 (pour un même ratio

*i*PrOx/*n*BuOx) entraîne une diminution de la T_{trans} du fait d'associations renforcées, comme on peut le constater en comparant le HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₀-co-PnBuOx₇)-0.10 avec le HA_{990k}-g-(PiPrOx₃₈-co-PnBuOx₁₂)-0.05, ce dernier présentant la T_{trans} la plus faible (33 °C à 15 g.L⁻¹ contre 36.2 °C à 15 g.L⁻¹) bien qu'ayant un DS plus bas (Figure D-26).

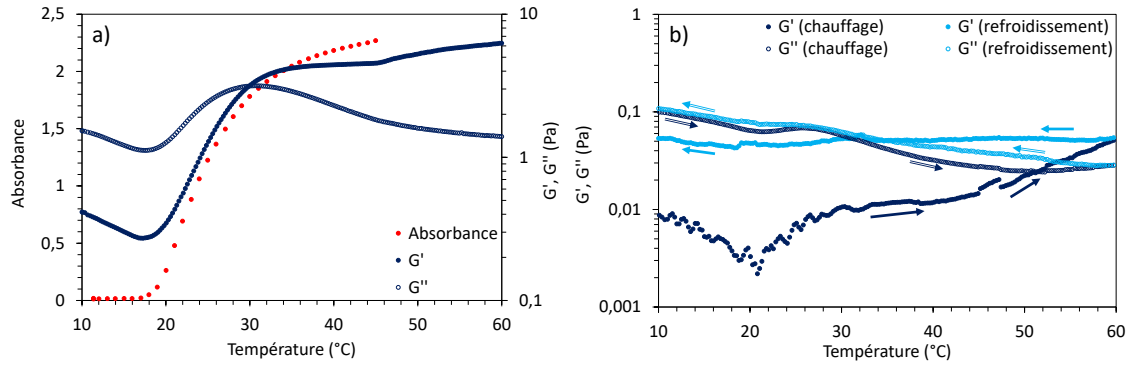


Figure D-25 Profil rhéologique et évolution de l'absorbance d'une solution de HA_{990k}-g-(PiPrOx₈-co-PnBuOx₆)-0,31 en solution dans le PBS à **a)** 15 g.L⁻¹ et **b)** 5 g.L⁻¹ (G' : symboles bleus pleins; G'' : symboles bleus vides; Absorbance : symboles rouges).

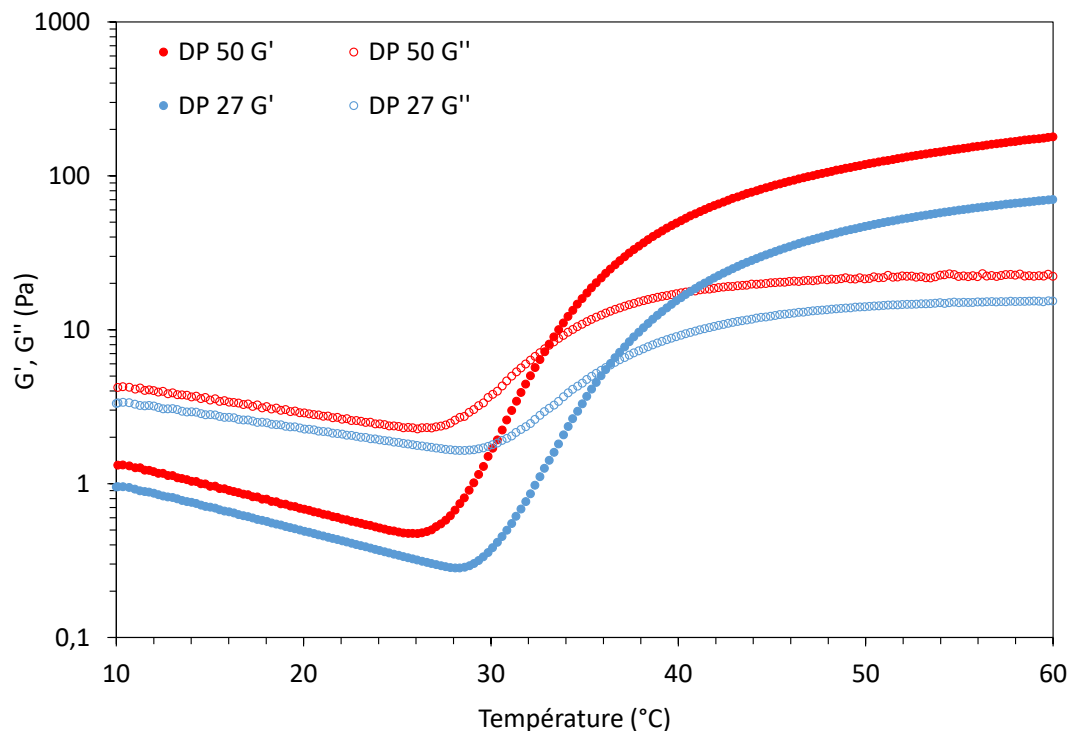


Figure D-26 Profils rhéologiques de solutions de HA_{990k}-g-(PiPrOx₃₈-co-PnBuOx₁₂)-0,05 (courbes rouges) et de HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₀-co-PnBuOx₇)-0,10 (courbes bleues) à 15 g.L⁻¹ dans le PBS (G' : symboles pleins; G'' : symboles vides) (contrainte : 0,1 Pa; fréquence : 1 Hz).

3.4.1.4 Influence de la masse molaire du HA sur T_{trans}

La masse molaire du HA a eu quant à elle un impact notable sur les propriétés de l'hydrogel. En effet, dans le cas du HA_{140k} et du HA_{38k}, il a fallu employer des concentrations plus élevées de 50 g.L⁻¹ par rapport au HA_{990k}, de C^* moindre. On a notamment pu observer que le greffage de chaînes polyoxazolines de même composition monomérique a entraîné des T_{trans} plus élevées sur ces deux HA comparé au HA_{990k} et ce, malgré les concentrations plus élevées employées (à ce sujet, on peut comparer les échantillons HA_{38k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,10 (T_{trans} : 42,4 °C) et HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₅-co-PnBuOx₁₂)-0,12 (T_{trans} : 16,5 °C) dans le Tableau D-8, ou encore HA_{140k}-g-(PiPrOx₁₇-co-PnBuOx₁₀)-0,06 (T_{trans} : 36,6 °C) et HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₇-co-PnBuOx₁₀)-0,06 (T_{trans} : 29,3 °C)). Ils ont également tendance à devenir moins troubles quand ils sont exposés à des températures élevées en solution dans le PBS, encore une fois malgré les concentrations plus élevées employées (Figure D-17-b). Par contre, on peut noter que l'amplitude de l'augmentation des deux modules, et surtout du G' , est plus marquée dans les dérivés de HA_{38k} et plus encore de HA_{140k} par rapport à ceux de HA_{990k} (on passe notamment de 0,14 Pa à 20 °C à 800 Pa à 60 °C pour le HA_{140k}-g-(PiPrOx₁₇-co-PnBuOx₁₀)-0,06 à 50 g.L⁻¹ dans le PBS, ce qui constitue la transition de plus grande ampleur constatée au cours de cette étude). Ce résultat est notamment intéressant pour des applications dans des systèmes injectables, qui nécessitent de voir leurs propriétés varier fortement d'une solution peu visqueuse à température ambiante à un gel structuré une fois introduit dans le corps humain. Cependant, le module de perte G'' augmente également de façon marquée et, au final, nous nous retrouvons avec des valeurs de $\tan(\delta)$ plus élevées par rapport aux dérivés de HA_{990k}, ce qui signifie que ces derniers ont un comportement élastique plus prédominant (la quasi-totalité des dérivés de HA_{990k}, excepté celui avec le greffon le plus hydrophile, ont une valeur de $\tan(\delta)$ inférieure à 0,3 à 60 °C, contrairement à ceux de HA_{140k} et HA_{38k}).

Enfin, les G' à 37 °C allaient de 0,20 Pa (HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₄-co-PnBuOx₃)-0,12 à 15 g.L⁻¹ dans le PBS), à 113 Pa (HA_{140k}-g-(PiPrOx₁₇-co-PnBuOx₁₀)-0,06 à 50 g.L⁻¹ dans le PBS). Dans notre cas, il serait intéressant d'avoir des systèmes présentant un G' à 37 °C supérieur à 50 Pa. Il s'agit en effet du seuil de contrainte empirique au-delà duquel on passe d'un gel faible à un gel viscoélastique³². Ce seuil a été atteint pour les échantillons HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,13 (77,9 Pa, 15 g.L⁻¹ dans le PBS), HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,15 (68,9 Pa, 15 g.L⁻¹ dans le PBS) et HA_{140k}-g-(PiPrOx₁₇-co-PnBuOx₁₀)-0,06 (113 Pa, 50 g.L⁻¹ dans le PBS). Ce dernier présente donc la valeur la plus élevée de G' à 37 °C, quand bien même sa T_{trans} est très proche (36,6 °C). Par

contre, dans le cas des dérivés de HA_{990k}, il est nécessaire d'employer des systèmes de T_{trans} nettement inférieure afin d'atteindre ce seuil (elle était d'environ 25 °C pour les deux dérivés présentés ci-dessus, qui ont une composition et donc des propriétés très similaires), (une autre possibilité serait de travailler à concentration plus élevée.

3.4.2 Impact du protocole de synthèse sur les propriétés des échantillons obtenus

Il a été stipulé lors de la description du protocole de greffage des PiPrOx-co-PnBuOx sur le HA section 3.1 qu'il était particulièrement important de bien homogénéiser le milieu réactionnel sous forte agitation à température ambiante après addition de la solution de PiPrOx-co-PnBuOx (acétonitrile) au sein de celle de TBA-HA dans le DMSO. Le non-respect de cette étape peut entraîner des déviations dans le comportement thermique du matériau en solution comme on peut le voir Figure D-27. Un échantillon de HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,11 a ainsi été synthétisé en ajoutant la solution de PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅ dans l'acétonitrile à celle de TBA-HA_{990k} dans le DMSO, alors que cette dernière était déjà placée dans un bain d'huile à 60 °C avec une agitation modérée (cet échantillon n'a pas été répertorié dans les tableaux de ce chapitre). Autrement, le protocole était identique à celui employé pour l'échantillon HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,12 (propriétés détaillées dans Tableau D-5, Tableau D-6, Tableau D-7 et Tableau D-8) qui lui a par contre été homogénéisé plus vigoureusement à température ambiante avant d'être placé à 60 °C. On peut d'ailleurs constater que les échantillons ont la même composition. De plus, leurs propriétés en solution à température ambiante sont identiques, comme le montre la Figure D-27 (solutions de 15 g.L⁻¹ dans le PBS). Les deux échantillons sont également thermosensibles : les deux solutions voient leur absorbance ainsi que leurs modules G' et G'' augmenter lorsqu'on les expose à des températures plus élevées, cependant les profils des courbes divergent fortement malgré la composition similaire. On voit en effet que l'augmentation du G' se fait selon une pente plus faible dans le cas de l'échantillon HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,11 (mauvaise homogénéisation à 60 °C au début de greffage) et présente une courbe plus irrégulière que pour le HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,12 (bonne homogénéisation à température ambiante au début du greffage). On aboutit donc à des G' plus faibles pour le HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,11 à une même température et à un croisement G'/G'' à une température nettement plus élevée (52,2 °C contre 43,1 °C pour le HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,12). On observe en outre des différences notables sur les profils des absorbances. Celle de la solution de HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,11 augmente plus que

celle du HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,12, avec en outre la présence de deux transitions, la première se situant vers 26 °C, une température où la réponse thermique de l'échantillon n'est pourtant pas encore visible en rhéologie. La seconde se situe à la T_{cp} du HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,12 (34 °C). Vers cette température, les deux solutions voient leurs modules commencer à augmenter. La présence des deux transitions pour le HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,11 vient probablement d'une hétérogénéité dans la structure du copolymère qui n'est pas perceptible par RMN ou SEC/MALLS. Du fait de la mauvaise homogénéisation du milieu réactionnel au cours de l'étape de terminaison, il se peut que les greffons soient répartis de façon hétérogène sur les HA.

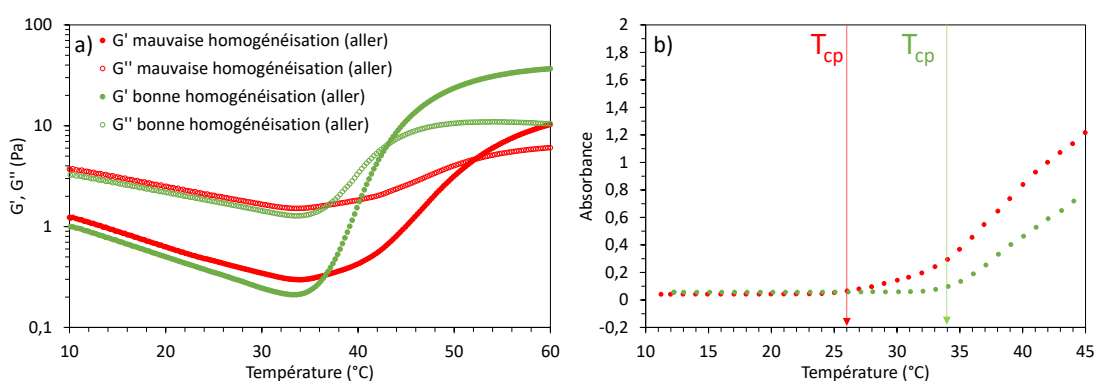


Figure D-27 Comparaison des profils rhéologiques (figure a)) et de l'évolution de l'absorbance (figure b)) de solutions de HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,12 (courbes vertes, « bonne homogénéisation ») et de HA_{990k}-g-(PiPrOx₂₂-co-PnBuOx₅)-0,11 (courbes rouges, « mauvaise homogénéisation ») à 15 g.L⁻¹ dans le PBS au cours d'une rampe thermique (G' : symboles pleins; G'' : symboles vides).

A l'inverse, lorsque le protocole est appliqué correctement, il est reproductible comme on a pu le voir avec les échantillons HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,13 et HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,15.

3.4.3 Etude de la relaxation des gels

Afin d'étudier plus en détail l'aspect dynamique du comportement de nos systèmes, des mesures de balayages en fréquence de 0,01 à 10 Hz ont été effectuées à diverses températures, à savoir inférieures à la T_{trans}, aux alentours de la T_{trans} et au-dessus de la T_{trans}. Les résultats obtenus avec les échantillons HA_{990k}-g-(PiPrOx₃₈-co-PnBuOx₁₂)-0,05 (T_{trans} = 33,0°C à 15 g.L⁻¹) et HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,15 (T_{trans} = 24,7°C à 15 g.L⁻¹), deux échantillons aux propriétés

thermosensibles intéressantes, sont présentés Figure D-28. On peut voir que dans les deux cas, en-dessous de la T_{trans} , G'' est supérieur à G' sur toute la gamme étudiée, ce qui indique un comportement visqueux du système avec un temps de relaxation (défini comme l'inverse de la fréquence de croisement de G'/G'') non accessible sur le rhéogramme et donc très rapide. Quand la température est proche de la T_{trans} , le matériau présente un comportement visqueux à viscoélastique pour des fréquences supérieures à 1 Hz (la fréquence utilisée au cours de la rampe en température). Cependant, en-dessous de cette fréquence, G'' est supérieur à G' , ce qui signifie que le temps de relaxation de l'échantillon est en fait encore assez rapide avec des valeurs aux alentours de 3 s dans les deux cas comme on peut le voir Figure D-28. Le réseau est donc encore extrêmement faible à cette température, le système n'est donc très probablement pas percolé et ne présente que des propriétés viscoélastiques sur le domaine de fréquence étudié. Cependant, si l'on se place 5 °C au-dessus de la T_{trans} , on peut observer dans les deux cas que le temps de relaxation est supérieur à 100 s (limite basse en fréquence utilisée pour la mesure). Le système est donc bien mieux structuré. Enfin, si on se place 12 °C au-dessus de la T_{trans} , on constate que les courbes de G' et G'' sont quasiment parallèles, ce qui caractérise un comportement de gel.

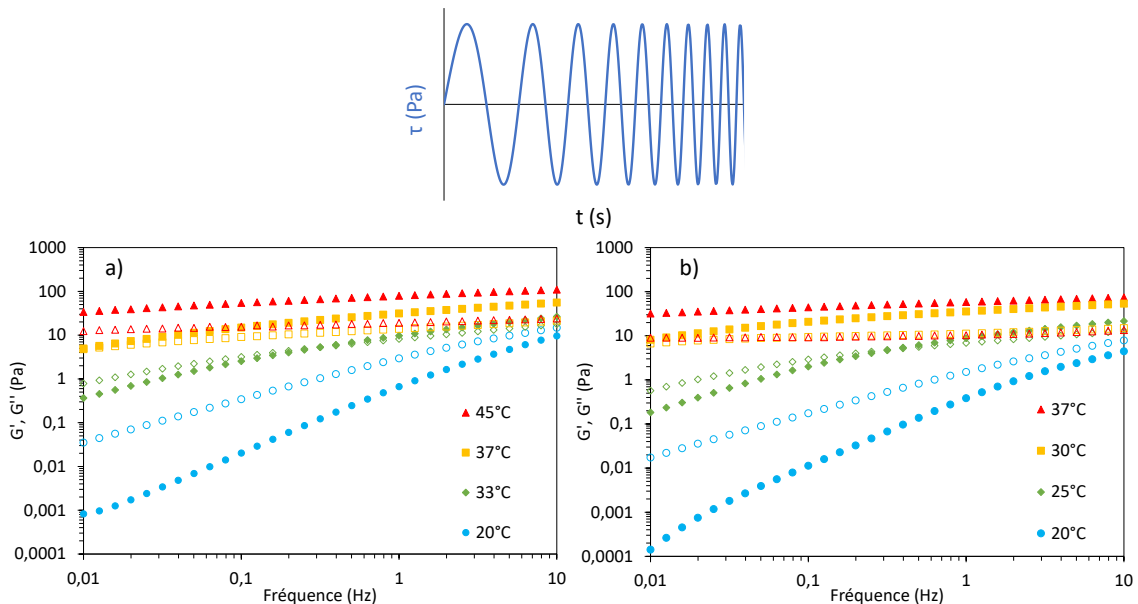


Figure D-28 Balayage en fréquence à diverses températures de solution à 15 g.L^{-1} dans le PBS de **a)** $\text{HA}_{990\text{k}}\text{-g-(PiPrOx}_{38}\text{-co-PnBuOx}_{12})\text{-0,05}$ (symboles pleins : G' ; symboles vides : G'') et de **b)** $\text{HA}_{990\text{k}}\text{-g-(PiPrOx}_{18}\text{-co-PnBuOx}_9)\text{-0,15}$ (symboles pleins : G' ; symboles vides : G'').

Une fois de plus, on peut constater qu'il est nécessaire de choisir des composés avec des T_{trans} inférieures à la température ciblée pour l'application, afin que le matériau ait un comportement de gel structuré. Notre système permet de moduler la T_{trans} . En particulier, les composés HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,13 et HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,15 ont la particularité de se comporter comme des solutions visqueuses à 20 °C et comme des hydrogels à 37 °C à des concentrations de 15 g.L⁻¹ ou de 10 g.L⁻¹ (Annexe 3), ce qui en fait des candidats potentiels pour des applications en tant que systèmes injectables.

3.4.4 Etude de l'injectabilité du gel

Des mesures rhéologiques complémentaires ont été réalisées sur une solution de HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,15 à 15 g.L⁻¹ dans le PBS afin d'évaluer l'injectabilité du système. Des mesures en oscillation ont été effectuées à contrainte et fréquence constantes (0,1 Pa et 1 Hz), au cours desquelles la température a été fixée à 20 °C pendant 5 min, avant d'être brusquement placée à 37 °C pour observer la vitesse à laquelle le système se structure. La géométrie employée était un système cône-plan, qui a été privilégié au double-entrefer car elle permet d'atteindre très rapidement la température consigne contrairement à cette dernière. Les résultats sont représentés Figure D-29.

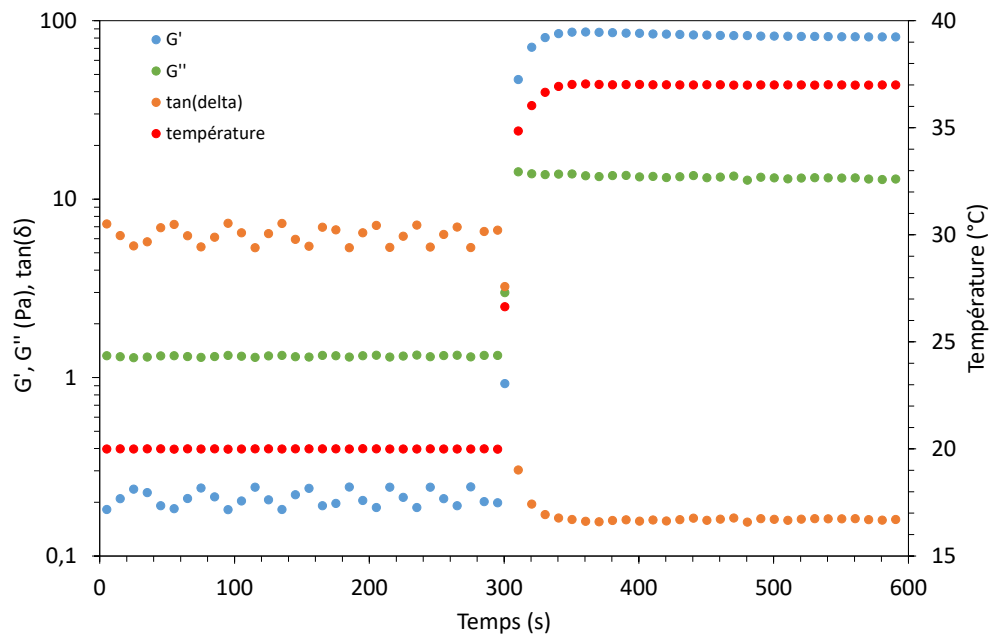


Figure D-29 Réponse d'une solution de HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,15 à 15 g.L⁻¹ dans le PBS à un brusque changement de température au cours de mesures oscillatoires (contrainte : 0,1 Pa; fréquence : 1 Hz).

A 20°C, le module visqueux est largement supérieur au module élastique traduisant le caractère visqueux d'une solution facilement injectable. Il apparait clairement sur cette figure que la transition sol/gel du système lors d'un brusque écart de température (de 20°C à 37°C) est quasi-instantanée : on voit en effet que l'allure de la courbe du G' est très proche de celle de la courbe de l'évolution de la température.

Nous avons également mesuré la viscosité apparente à 37 °C de l'hydrogel formé. La géométrie employée était un système plan-plan strié afin d'avoir une bonne prise sur l'échantillon. Les résultats sont représentés Figure D-30.

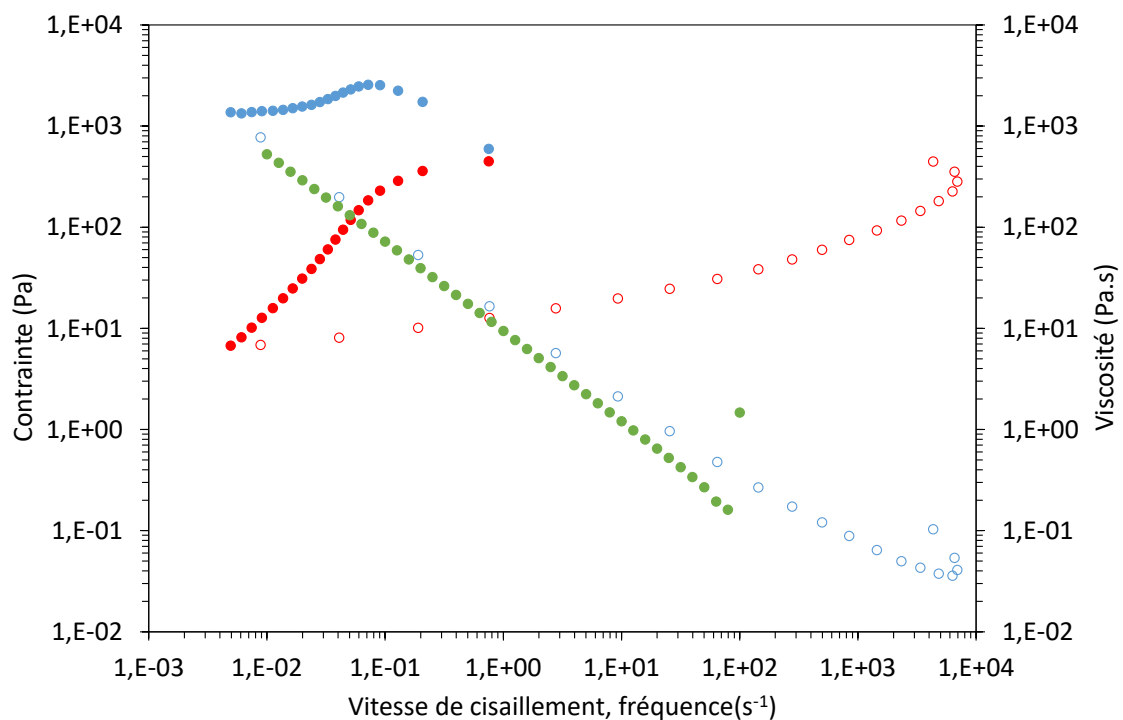


Figure D-30 Mesure de la viscosité apparente η_{app} (contrainte contrôlée) d'une solution de HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,15 à 15 g.L⁻¹ dans le PBS (37 °C) à laquelle a été superposée la courbe de viscosité complexe η^* correspondante obtenue par balayage en fréquence (symboles pleins : montée du cisaillement; symboles vides : retour du cisaillement).

La mesure a été effectuée en contrainte contrôlée aller et retour, afin d'évaluer la thixotropie du système à 37 °C. En observant la courbe obtenue, on pourrait avoir l'impression dans un premier temps que le système est newtonien, avec une viscosité ne dépendant pas de la vitesse de cisaillement (le léger phénomène de rhéo-épaississement observé étant probablement un artefact de mesure), alors que l'on devrait plutôt observer un comportement

rhéo-fluidifiant. Cependant, au-delà d'une contrainte de 360 Pa, la viscosité apparente mesurée commence à diminuer et la structure du gel est même totalement brisée au-delà de 450 Pa : l'instrument est alors contraint de travailler à sa limite en terme de vitesse de cisaillement afin de pouvoir exercer sa contrainte consigne. La courbe retour de la viscosité apparente traduit bien un comportement rhéo-fluidifiant. On constate de plus que cette dernière se superpose presque à la courbe de la variation de la viscosité complexe obtenue sur le même échantillon lors d'un balayage en fréquence (avec une géométrie double-entrefer), ce qui vérifie la loi empirique de Cox-Merz. Il est donc probable que les valeurs de viscosité obtenues initialement lors de la montée en contrainte soient trompeuses : il a d'abord fallu que l'instrument surmonte une contrainte seuil d'environ 450 Pa. Les valeurs obtenues sur la courbe retour sont probablement les plus réalistes. Au final, bien que la structure du gel ait été rompue, le système récupère bien sa viscosité initiale à la fin de la mesure, ce qui montre qu'il peut se restructurer.

4 Conclusion

Nous avons abordé dans ce chapitre les différentes stratégies de greffage des polyoxazolines sur le HA qui s'offraient à nous d'après la littérature : nous avons adopté une approche '*grafting to*', où le polyoxazoline est polymérisé avant d'être greffée sur le HA. De plus, afin de limiter le nombre d'étape de synthèse et de maximiser les rendements de réaction, nous avons opté pour effectuer la terminaison de la chaîne POx directement par la fonction acide carboxylique du HA.

Cette stratégie a dans un premier temps été appliquée sur le polyoxazoline le plus simple, à savoir la poly-(2-méthyl-2-oxazoline), hydrophile et non-thermosensible. Le 2-méthyl-2-oxazoline est polymérisé dans de l'acétonitrile par polymérisation par ouverture de cycle cationique en utilisant le méthyl-*p*-toluène sulfonate comme amorceur. Après 24 h de réaction, la solution est introduite dans un ballon contenant du HA sous forme de sel de tétrabutylammonium dissout dans du DMSO à température ambiante sous forte agitation afin d'effectuer la terminaison. Cette dernière est ensuite réalisée en plaçant le milieu réactionnel pendant 24 h à 60 °C. Le HA est ensuite reconverti sous forme de sel de sodium, précipité dans l'acétone et purifié par dialyse et plusieurs lavages dans l'éthanol, la PMeOx étant également insoluble dans l'acétone et n'étant pas efficacement éliminée au cours de la dialyse. Ce protocole nous a permis d'obtenir des HA-g-PMeOx dont la pureté a pu être constatée par SEC-MALLS et RMN DOSY. Des chaînes PMeOx de DP 29 et 47 ont pu être greffées sur des HA de

masses molaires diverses, à savoir le HA_{38k}, le HA_{140k} et le HA_{990k}. Les degrés de substitutions peuvent atteindre 13 % (pour un DP_{PMeOx} de 27), ce qui correspond à une teneur massique en PMeOx au sein de l'échantillon d'environ 45 %, ce qui constitue déjà une valeur élevée. Le HA et le PMeOx étant tous les deux hydrophiles, le greffage n'a pas eu un impact déterminant sur les propriétés physico-chimique du HA-g-PMeOx par rapport au HA de départ.

La réaction a ensuite pu être étendue aux copolymères PiPrOx-co-PnBuOx dont les propriétés thermosensibles ont été étudiées au chapitre B. Ce composé étant soluble dans l'acétone, les lavages ont été effectués dans ce solvant plutôt que dans l'éthanol. La réaction a été appliquée avec des chaînes polyoxazolines de DP 14, 27 et 50 sur les mêmes HA. Elle a donné des résultats similaires en terme de DS à ceux obtenus avec le PMeOx. On a pu observer que le DS dépend de la longueur de la chaîne polyoxazoline : plus cette dernière est longue, plus il sera faible. Dans le cas d'une chaîne de DP 27, le DS est compris entre 10 % et 13 % dans la grande majorité des cas. Les propriétés thermosensibles des HA-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) obtenus ont ensuite été étudiées par spectroscopie UV-visible ainsi que par rhéologie. La spectroscopie UV-visible a permis de mettre en évidence une tendance des échantillons à donner des solutions devenant turbides par élévation de la température quand ils sont dissouts en solution aqueuse saline. Plus le greffon est hydrophobe (pour des taux de nBuOx élevés au sein du copolymère), plus le composé devient trouble pour des températures faibles, au point de précipiter à l'ambiante pour des ratios de iPrOx/nBuOx de 60/40 ou moins. Par contre, l'augmentation de la turbidité est très limitée si le composé est dissout dans l'eau distillée, ce qui a été expliqué par le fait que les chaînes de HA, de nature polyélectrolyte, sont étendues dans ce solvant le caractère trouble des solutions étant probablement induit par la formation de domaines hydrophobes issus de la déshydratation des chaînes de copolymère à la température critique. La rhéologie a permis de montrer l'évolution des propriétés viscoélastiques des échantillons lors de l'application d'une rampe de température. Tous ont présenté le passage d'une zone de comportement visqueux prédominant, caractérisée par un G'' supérieur au G', à une zone de comportement élastique prédominant, où G' devient le module prépondérant. L'augmentation des deux modules coïncide bien avec celle de la turbidité de la solution. La température de croisement de G' et G'', T_{trans} varie selon les échantillons. Ainsi, des paramètres comme la longueur des chaînes HA et POx, la concentration massique employée ainsi que le DS peuvent affecter cette T_{trans} et les valeurs des modules obtenus. Toutefois, c'est la composition monomérique du greffon qui permet le contrôle le plus précis des propriétés de

l'échantillon. Par exemple, dans le cas d'échantillons de HA_{990k}-g-(PiPrOx-co-PnBuOx) (DP_{POx} : 27), l'augmentation de la teneur en *i*PrOx de 1 % entraîne une variation de la T_{trans} de 1 °C (à concentration fixe) sur un domaine étudié allant de 16,5 °C à 47,9 °C.

La relaxation des systèmes obtenus a également été étudiée. Nous avons notamment pu observer qu'à la T_{trans}, le système est encore viscoélastique avec des temps de relaxation très courts (2-3 s). Cependant, si l'on expose les systèmes à des températures supérieures de 12 °C à la T_{trans}, les courbes des modules G' et G'' sont presque parallèles et il n'est plus possible de mesurer de temps de relaxation, nous sommes alors en présence de gels structurés.

L'injectabilité des hydrogels a également été étudiée en observant la vitesse de l'évolution des propriétés rhéologiques du système lors d'un changement brusque de la température. Nous avons pu voir que l'échantillon, visqueux à l'ambiante (donc injectable) subissait la transition sol/gel de façon quasi-instantanée, ce qui est intéressant pour des applications en injection.

Le HA_{990k} semble être le précurseur le plus prometteur sur lequel travailler car il permet d'obtenir des gels à des concentrations très basses (solution à 1,5 % voire 1 % en masse), qui peuvent au besoin être ajustées à la hausse, et présente un G' particulièrement prépondérant sur le G'' à haute température ($\tan(\delta) < 0.20$). Pour obtenir des T_{trans} intéressantes, il faut utiliser des ratios *i*PrOx/*n*BuOx de 70/30 ou moins. Enfin, les échantillons avec des greffons de DP 50 semblent plus prometteurs que ceux de DP 27 : en effet, quand bien même ils correspondent à des DS moindres de l'ordre de 6 % (plutôt que 12 %), ils mènent comparativement à des T_{trans} plus faibles pour un même ratio *i*PrOx/*n*BuOx, leurs associations inter-chaînes sont plus importantes et ils entraînent une hausse plus modérée de la turbidité en solution saline. Pour compléter cette étude, la biocompatibilité des matériaux et l'impact des fluides biologiques sur leurs propriétés devraient maintenant être étudiés.

5 Références

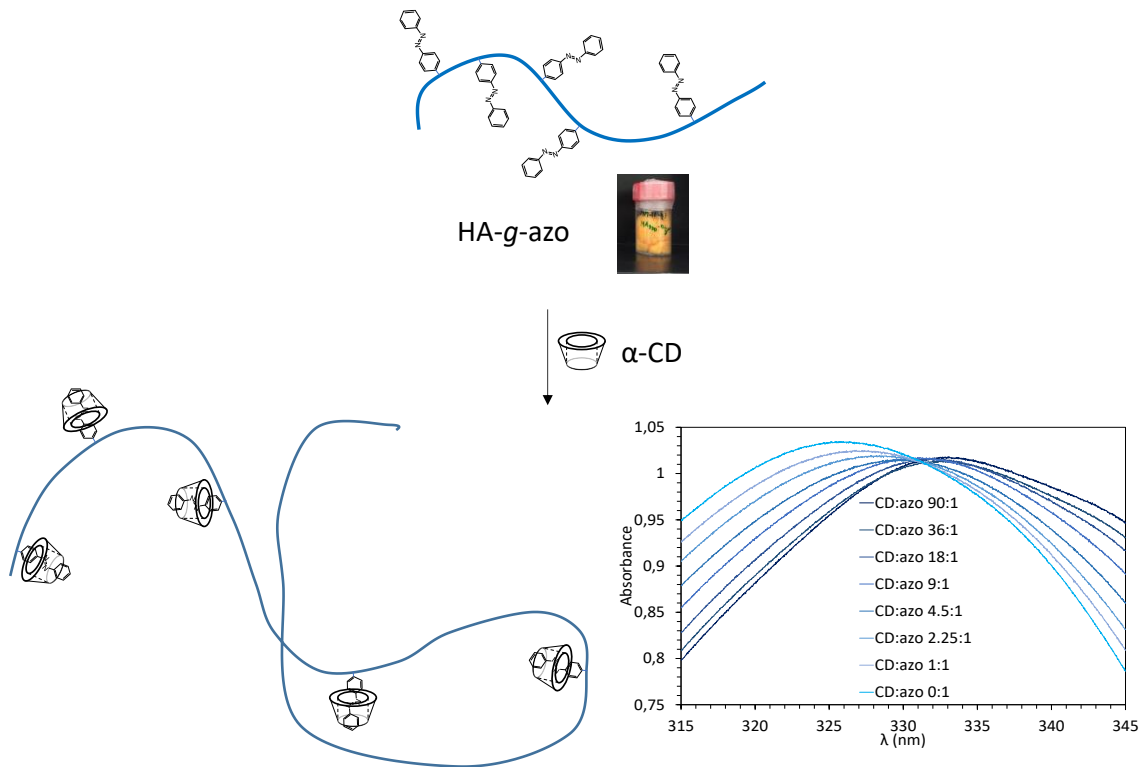
1. J.S. Park, Y. Akiyama, F.M. Winnik, K. Kataoka, Versatile Synthesis of End-Functionalized Thermosensitive Poly(2-isopropyl-2-oxazolines), *Macromolecules* 37 (2004) 6786-6792.
2. L. Tauhardt, M. Frant, D. Pretzel, M. Hartlieb, C. Bücher, Gerhard Hildebrand, B. Schröter, C. Weber, K. Kempe, M. Gottschaldt, K. Liefeth, U.S. Schubert, Amine end-functionalized poly(2-ethyl-2-oxazoline) as promising coating material for antifouling applications, J.

- Mater. Chem. B 2 (2014) 4883-4893.
3. S. Osawa, T. Ishii, H. Takemoto, K. Osada, K. Kataoka, A facile amino-functionalization of poly(2-oxazoline)s' distal end through sequential azido end-capping and Staudinger reactions, Eur. Polym. J. 88 (2017) 553-561.
 4. S. Huber, N. Hutter, R. Jordan, Effect of end group polarity upon the lower critical solution temperature of poly(2-isopropyl-2-oxazoline), Colloid Polym. Sci. 286 (2008) 1653-1661.
 5. M. Meyer, H. Schlaad, Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-Poly(L-glutamate) Block Copolymers through Ammonium-Mediated NCA Polymerization, Macromolecules 39 (2006) 3967-3970.
 6. C.P. Fik, C. Krumm, C. Muennig, T.I. Baur, U. Salz, T. Bock, J.C. Tiller, Impact of Functional Satellite Groups on the Antimicrobial Activity and Hemocompatibility of Telechelic Poly(2-methyloxazoline)s, Biomacromolecules 13 (2012) 165-172.
 7. C. Pottier, Copolymères triblocs stimuli-sensibles à amphiphilie contrôlée : synthèse et auto-assemblage en solution aqueuse, Université de Rouen-Normandie (2015).
 8. K. Aoi, A. Takasu, M. Okada, Synthesis of novel chitin derivatives having poly(2-alkyl-2-oxazoline) side chains, Macromol. Chem. Phys. 195 (1994) 3835-3844.
 9. K. Aoi, A. Takasu, M. Okada, T. Imae, Synthesis and assembly of novel chitin derivatives having amphiphilic polyoxazoline block copolymer as a side chain, Macromol. Chem. Phys. 200 (1999) 1112-1120.
 10. L.B. Dahl, T.C. Laurent, B. Smedsrød, Preparation of Biologically Intact Radiolabeled Hyaluronan of High Specific Radioactivity: Coupling of ¹²⁵I-Tyramine-Cellobiose to Amino Groups after Partial N-Deacetylation, Anal. Biochem. 175 (1988) 397-407.
 11. A. Pospisilova, S. K. Filippov, A. Bogomolova, S. Tumer, O. Sedlacek, N. Matsushkin, Z. Cernochova, P. Štěpánek, M. Hruby, Glycogen-graft-poly(2-alkyl-2-oxazolines) – the new versatile biopolymer-based thermoresponsive macromolecular toolbox, RSC Adv. 4 (2014) 61580-61588.
 12. B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.J. Robin, How to modulate the chemical structure of polyoxazolines by appropriate functionalization, Macromol. Rapid Commun. 33 (2012) 1600–1612.
 13. S. Kobayashi, E. Masuda, S. ichiro Shoda, Y. Shimano, Synthesis of Acryl- and Methacryl-Type Macromonomers and Telechelics by Utilizing Living Polymerization of 2-Oxazolines, Macromolecules. 22 (1989) 2878–2884.

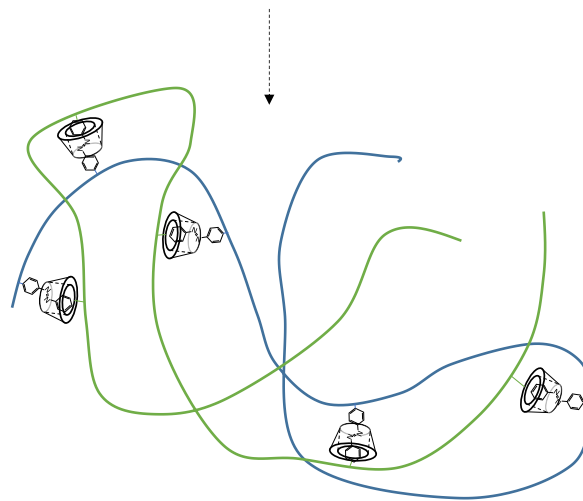
14. C. Weber, C. Remzi Becer, W. Guenther, R. Hoogenboom, U.S. Schubert, Dual responsive methacrylic acid and oligo(2-ethyl-2-oxazoline) containing graft copolymers, *Macromolecules* 43 (2010) 160–167.
15. M. Schmidt, S. Harmuth, E.R. Barth, E. Wurm, R. Fobbe, A. Sickmann, C. Krumm, J.C. Tiller, Conjugation of Ciprofloxacin with Poly(2-oxazoline)s and Polyethylene Glycol via End groups, *Bioconjugate Chem.* 26 (2015) 1950–1962.
16. B. Guillermin, Synthèse et étude Physico-chimique de Copolymères Amphiphiles à base de Poly(2-méthyl-2-oxazoline), Université de Montpellier II (2011).
17. G. Volet, T.X. Lav, J. Babinot, C. Amiel, Click-chemistry: An alternative way to functionalize poly(2-methyl-2-oxazoline), *Macromol. Chem. Phys.* 212 (2011) 118–124.
18. S. Pelletier, P. Hubert, F. Lapique, E. Payan, E. Dellacherie, Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate: synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions, *Carbohydr. Polym.* 43 (2000) 343–349.
19. S.N. Pawar, K.J. Edgar, Alginate esters via chemoselective carboxyl group modification, *Carbohydr. Polym.* 98 (2013) 1288-1296.
20. L. Picton, D. Le Cerf, Chromatographie d'exclusion stérique multi-détection, *Actual. Chim.* 422-423 (2017) 59-64.
21. R. Konradi, B. Pidhatika, A. Mühlebach, M. Textor, Poly-2-methyl-2-oxazoline: A Peptide-like Polymer for Protein-Repellent Surfaces, *Langmuir* 24 (2008) 613-616.
22. F. Vallée, C. Müller, A. Durand, S. Schimchowitsch, E. Dellacherie, C. Kelche, J.C. Cassel, M. Leonard, Synthesis and rheological properties of hydrogels based on amphiphilic alginate-amide derivatives, *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 223-228.
23. V. Dulong, M.C. Kouassi, L. Picton, Functionalized polysaccharides with aminoguanic acid: a competition between associative behavior and antibacterial and antioxidant activities, *Pure Appl. Chem., De Gruyter*, 92 (2019) 223-228.
24. V. Dulong, G. Mocanu, L. Picton, D. Le Cerf, Amphiphilic and thermosensitive copolymers based on pullulan and Jeffamine®: Synthesis, characterization and physicochemical properties, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1522-1531.
25. P. Gonzalez, L. Leclercq, H. Cottet, What is the Contribution of Counter-Ions to the Absolute Molar Mass of Polyelectrolytes Determined by SEC-MALLS?, *Macromol. Chem. Phys.* 217 (2016) 2654–2659.
26. A. La Gatta, M. De Rosa, I. Marzaioli, T. Busico, C. Schiraldi, A complete hyaluronan

- hydrodynamic characterization using a size exclusion chromatography-triple detector array system during in vitro enzymatic degradation, *Anal. Biochem.* 404 (2010) 21–29.
27. D. Ret, G. Steiner, S. Gentilini, S. Knaus, Exact determination of the degree of substitution of high molar mass hyaluronan by controlling the conformation in solution, *Carbohydr. Polym.* 204 (2019) 124–130.
 28. J.S. Park, K. Kataoka, Comprehensive and Accurate Control of Thermosensitivity of Poly(2-alkyl-2-oxazoline)s via Well-Defined Gradient or Random Copolymerization, *Macromolecules* 40 (2007) 3599-3609.
 29. Y. Ma, Y. Tang, N.C. Billingham, S.P. Armes, Synthesis of Biocompatible, Stimuli-Responsive, Physical Gels Based on ABA Triblock Copolymers, *Biomacromolecules* 4 (2003) 864-868.
 30. A. Durand, D. Hourdet, Thermoassociative graft copolymers based on poly(N-isopropylacrylamide): effect of added co-solutes on the rheological behaviour, *Polymer* 41 (2000) 545-557.
 31. Y. Zhang, S. Fruyk, D.E. Bergbreiter, P.S. Cremer, Specific Ion Effects on the Water Solubility of Macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister Series, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 14505-14510.
 32. T.G. Mezger, *The Rheology Handbook*, third revised ed., Vincentz Network, Hanover, Germany, 2011.

Chapitre E : Fonctionnalisation du HA avec des composés photosensibles



Inclusion azo (*trans*) dans CD (observable par spectro UV-vis)



Tentative obtention hydrogel HA-g-azo + HA-g-CD

Sommaire

1	Introduction.....	257
2	Fonctionnalisation du HA avec un dérivé azobenzène.....	258
3	Propriétés physico-chimiques des HA-g-azo.	267
3.1	Analyses SEC/MALLS/UV/VD/DRI	267
3.2	Etude de la transition <i>trans</i> → <i>cis</i>	268
4	Formation de complexes d'inclusion avec des cyclodextrines	273
4.1	Complexes avec des cyclodextrines libres.....	273
4.2	Fonctionnalisation du HA avec l'α-cyclodextrine	278
5	Conclusion	287
6	Références.....	288

1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est la fonctionnalisation du HA avec des dérivés photosensibles, dont les propriétés comme la polarité pourront être modifiées par irradiation lumineuse. Cette étude est prospective, car il est difficile de prévoir *a priori* l'impact qu'aura un greffon de polarité variable sur le HA. Nous voulons greffer un chromophore dont l'évolution des propriétés est réversible, il faut ainsi éviter d'employer des groupes partant comme les *o*-nitrobenzoyles¹. Il existe actuellement cinq catégories principales de chromophores pouvant changer de conformation de façon réversible par action de la lumière, ce qui affecte notamment leur polarité : les azobenzènes, les spiropyranes, les spiroxazines, les diaryléthènes et les fulgides². Parmi ces dérivés, l'azobenzène est celui qui a la structure la plus simple et la moins encombrée : il a donc été retenu pour cette étude. Sous l'action de lumière UV à 360 nm, il peut passer de conformation *trans* apolaire (la plus stable) à une conformation *cis* plus polaire. Le retour à la forme *trans* peut s'effectuer par l'action de la chaleur ou par irradiation à 440 nm ou 254 nm^{3,4}. La molécule d'azobenzène ne peut être facilement greffée directement sur le HA (Figure A-34 page 66), il vaut donc mieux la doter au préalable d'un groupe fonctionnel plus facile à lier au glycosaminoglycane. Au cours du chapitre B, nous avons abordé la fonctionnalisation d'un dérivé commercial d'azobenzène avec une fonction amine ne se situant pas directement en position α des cycles aromatiques, afin qu'elle puisse conserver sa nucléophilicité. Le produit obtenu, la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide, était notamment soluble dans l'eau en milieu acide. Afin de le greffer sur le HA, la méthode retenue a donc été celle du couplage au carbodiimide déjà étudiée avec la Jeffamine[®] M2005. La réaction s'effectue en effet en milieu aqueux à pH 4,7, ce qui est idéal pour la dissolution de l'azobenzène. Le schéma de la réaction est présenté Figure E-1.

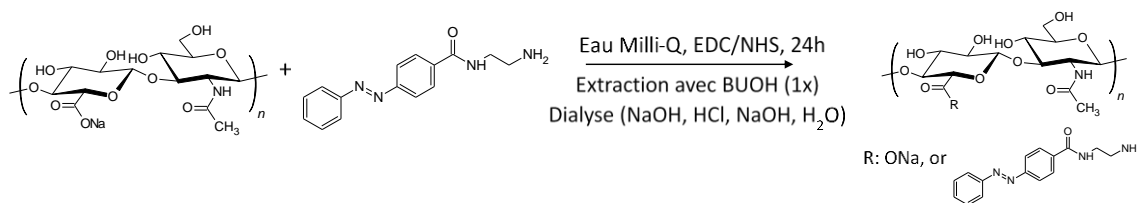


Figure E-1 Réaction de fonctionnalisation du HA avec la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide.

Il est bien connu que les cyclodextrines peuvent former des complexes d'inclusion avec les azobenzènes : en particulier, l' α -cyclodextrine est sélective vis-à-vis de la conformation *trans*, la *cis* étant exclue. Ce fait pourrait nous permettre de concevoir des hydrogels physiques basés sur la formation de complexe d'inclusion, pouvant se former et se défaire par irradiation à une

longueur d'onde précise⁵. En dernière partie de ce chapitre, nous étudierons cette possibilité en tentant de greffer de l' α -cyclodextrine sur le HA.

2 Fonctionnalisation du HA avec un dérivé azobenzène.

La réaction a été entreprise sur le HA_{38k}, le HA_{140k} et le HA_{990k} avec divers ratios d'azobenzène par rapport aux unités HA.

Protocole de greffage de la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide sur le HA :

Le protocole sera décrit pour un ratio molaire azobenzène/unité HA de 0,6. 500 mg de HA (1,25 mmol) sont dissouts dans 88 mL d'eau Milli-Q pendant une nuit dans un ballon monocol. Le pH est ajusté à 4,7, puis 200,6 mg de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (0,75 mmol) sont ajoutés au milieu de réaction. La présence d'amine fait remonter le pH vers environ 9. Il faut donc à nouveau l'ajuster à 4,7. Cette étape doit être répétée à plusieurs reprises, car la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide ne se dissout que progressivement, ce qui entraîne une remontée progressive du pH. Une fois que ce dernier s'est stabilisé, il est possible de commencer la réaction (il se peut qu'il reste une fraction d'azobenzène non dissoute, ce produit demeurant délicat à entièrement solubiliser en milieu aqueux). 238,85 mg de 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (1,25 mmol) et 10 mg de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) sont dissouts respectivement dans 2 mL et 870 μ L d'eau Milli-Q. 500 μ L de la solution de NHS (0,05 mmol) sont ensuite versés dans celle d'EDC, qui est ensuite introduite dans le milieu réactionnel (1 mL d'eau Milli-Q est utilisé pour le rinçage du récipient ayant contenu la solution d'EDC/NHS). La réaction est laissée pendant une journée. Pour la purification, il y a deux possibilités : le milieu réactionnel peut être introduit dans une ampoule à décanter et être extrait une fois avec du *n*-butanol. Ceci permet d'éliminer une bonne partie des impuretés provenant de l'azobenzène en phase organique et facilite l'étape de dialyse appliquée à la phase aqueuse. Cependant, la séparation des deux phases peut prendre un certain temps, notamment quand le HA_{990k} (de plus forte masse molaire) est employé, ainsi que lorsque l'on augmente la quantité de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide employée (ratio molaire azobenzène/unité HA de 1). Dans ce cas, il vaut mieux passer directement à l'étape de dialyse. Cette dernière est effectuée à 4 °C avec des membranes de seuil de rétention ajusté selon le HA de départ employé : 12-14 kDa pour le HA_{990k}, 6-8 kDa pour le HA_{140k} et 3,5 kDa pour le HA_{38k}. La dialyse est dans un premier temps réalisée contre une solution de soude NaOH à 0,1 M pendant 1 h avant d'être remplacé

par de l'eau Milli-Q, l'eau étant changée 5 fois au cours d'une première journée, puis 3 fois au cours d'une seconde afin de neutraliser au mieux le contenu des membranes (la dialyse est effectuée à 4 °C afin de minimiser la dégradation du HA par β -élimination lorsqu'il est exposé à la soude). Au cas où l'étape d'extraction n'aurait pas été effectuée, la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (azo) libre peut précipiter à cette étape. On répète ensuite le procédé une première fois en remplaçant la solution de soude par de l'acide chlorhydrique à 0,1 M (1 h d'exposition, puis lavages à l'eau multiples, la présence d'acide entraîne cette fois la précipitation du HA-*g*-azo obtenu, voir Figure E-2), puis une seconde fois en réemployant la solution de soude. Ces étapes sont identiques à celles employées au cours du chapitre C avec le HA-*g*-M2005 et servent à supprimer la présence d'EDC au sein de l'échantillon⁶. Ensuite, on change régulièrement l'eau Milli-Q jusqu'à atteindre la conductivité la plus proche possible de celle de l'eau Milli-Q. Le composé est ensuite lyophilisé, pesé, puis conservée à -20 °C. Les rendements vont d'environ 70 % (HA_{38k}-*g*-azo et HA_{140k}-*g*-azo) à 80 % (HA_{990k}-*g*-azo). Les échantillons seront par la suite nommés HA_{M_n}-*g*-azo-DS, où M_n est la masse molaire moyenne en nombre du HA en kg.mol⁻¹ et DS le degré de substitution.

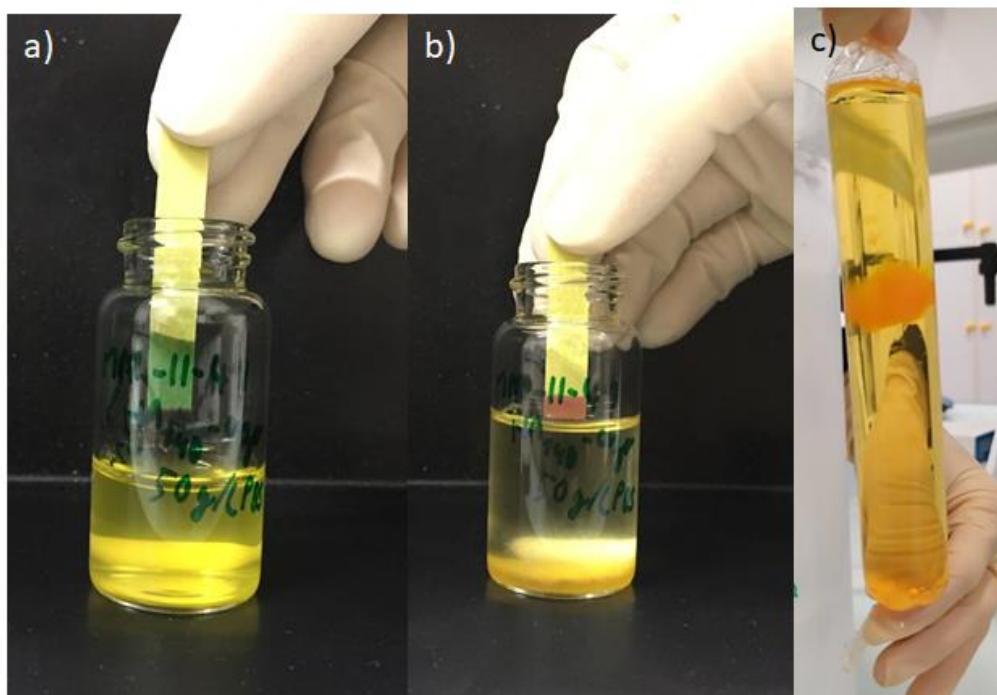


Figure E-2 Photos de **a)** HA HA_{140k}-*g*-azo-0,28 en milieu neutre (composé en solution); **b)** HA_{140k}-*g*-azo-0,28 en milieu acide (précipité au fond du récipient) et **c)** HA_{38k}-*g*-azo-0,23 pendant la dialyse après acidification du milieu. (Merci à Huu Van LE et Koceila BOUNDAOUI pour leurs photos)

Dans un premier temps, les composés obtenus ont été analysés par RMN du proton (solvant : D₂O + NaOD 0,125 M) (Figure E-3). On retrouve bien les pics associés au HA, à savoir le méthyle présent dans l'unité *N*-acétylglucosamine à 1,92 ppm, les protons anomériques à 4,46 et 4,39 ppm, le proton en position 2 de l'unité *N*-acétylglucosamine à 3,90 ppm et tous les autres entre 3,87 et 3,39 ppm. On voit de plus apparaître des pics associés à des protons aromatiques entre 7,93 et 7,6 ppm, qui montrent qu'il y a bien présence d'azobenzène au sein de la molécule. De plus, la valeur de l'intégration de la zone comprise entre 3,90 ppm et 3,39 ppm est légèrement supérieure à 10, la valeur qu'elle devrait avoir s'il n'y avait que les 10 protons issus du HA dans cette zone. Cela peut s'expliquer par la présence des protons provenant des méthylènes de l'éthylène diamine ayant été greffée sur l'azobenzène. Malheureusement, les pics des protons aromatiques sont très élargis par rapport au spectre de la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (Figure B-36) et de ce fait difficiles à attribuer, et l'incertitude sur leur valeur d'intégration sera élevée. Dans le cas présent, la RMN n'est donc pas la meilleure méthode pour déterminer le DS de la réaction.

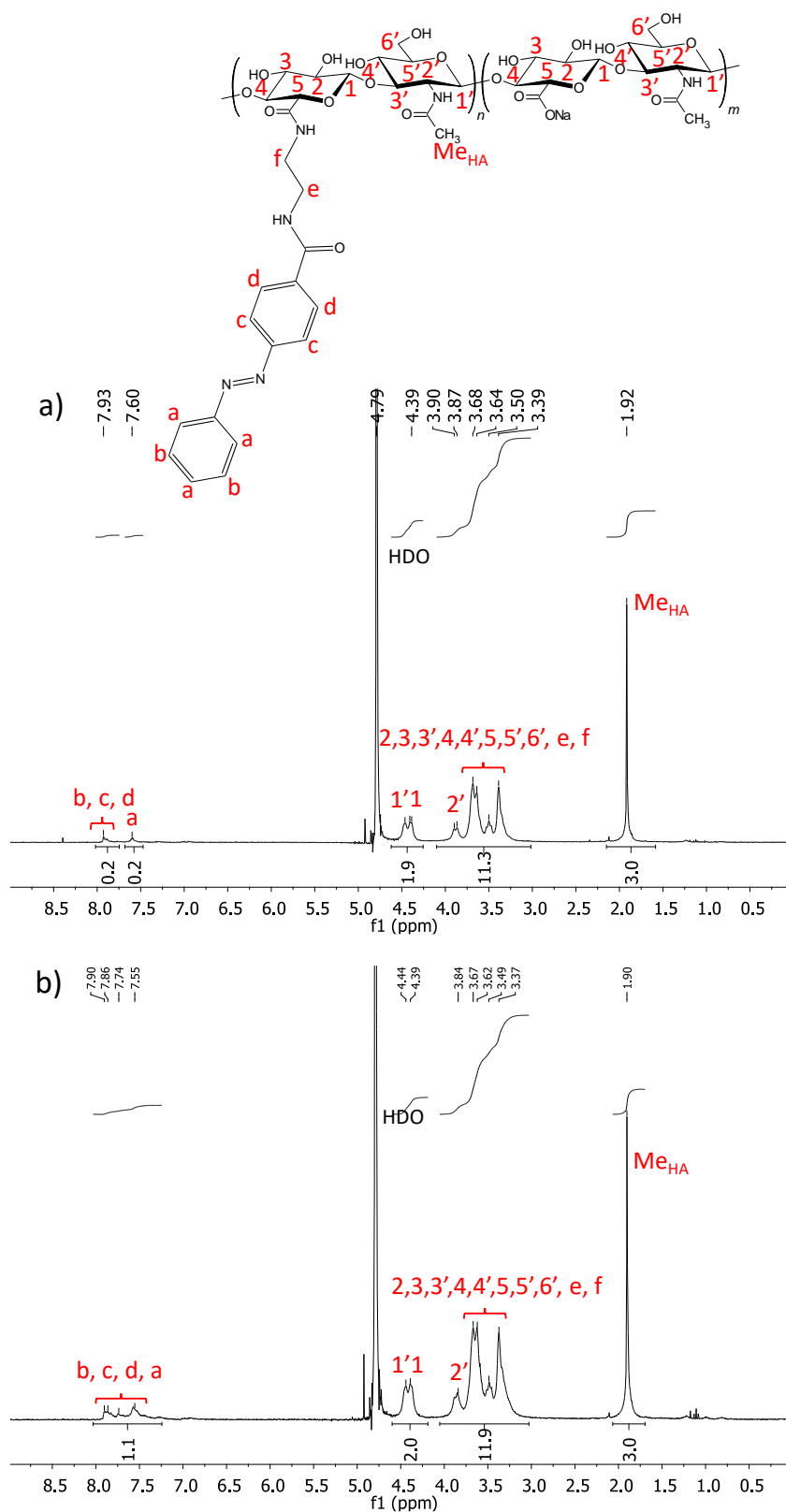


Figure E-3 Spectre RMN ^1H du a) $\text{HA}_{990\text{k}}\text{-g-azo-0,06}$ et du b) $\text{HA}_{140\text{k}}\text{-g-azo-0,28}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ 0,125 mol.L $^{-1}$).

En infrarouge (Figure E-4), on retrouve les bandes caractéristiques du HA de départ à $3640\text{-}3020\text{ cm}^{-1}$ (élongation O-H), 2888 cm^{-1} (élongation C-H), 1606 cm^{-1} (élongation asymétrique du C=O du carboxylate), 1558 cm^{-1} (déformation N-H), 1404 cm^{-1} (élongation symétrique du C=O du carboxylate), 1318 cm^{-1} (élongation du carboxylate C-O) et 1033 cm^{-1} (élongation C-OH). On constate toutefois que la bande à 1558 cm^{-1} (déformation N-H de l'amide) est plus prononcée au sein du HA_{140k-g-azo-0,11} que dans le HA_{140k} de même que l'épaulement vers 1640 cm^{-1} (élongation asymétrique du C=O de l'amide), ce qui indique qu'il y a plus de fonctions amide au sein de la molécule. Ceci est cohérent avec ce qui est attendu, car le greffage de la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide sur le HA se fera par l'établissement d'une liaison amide. Autrement, il est difficile d'extraire plus d'informations de ce spectre qui n'est en définitive pas aussi concluant que ceux réalisés pour les HA thermosensibles.

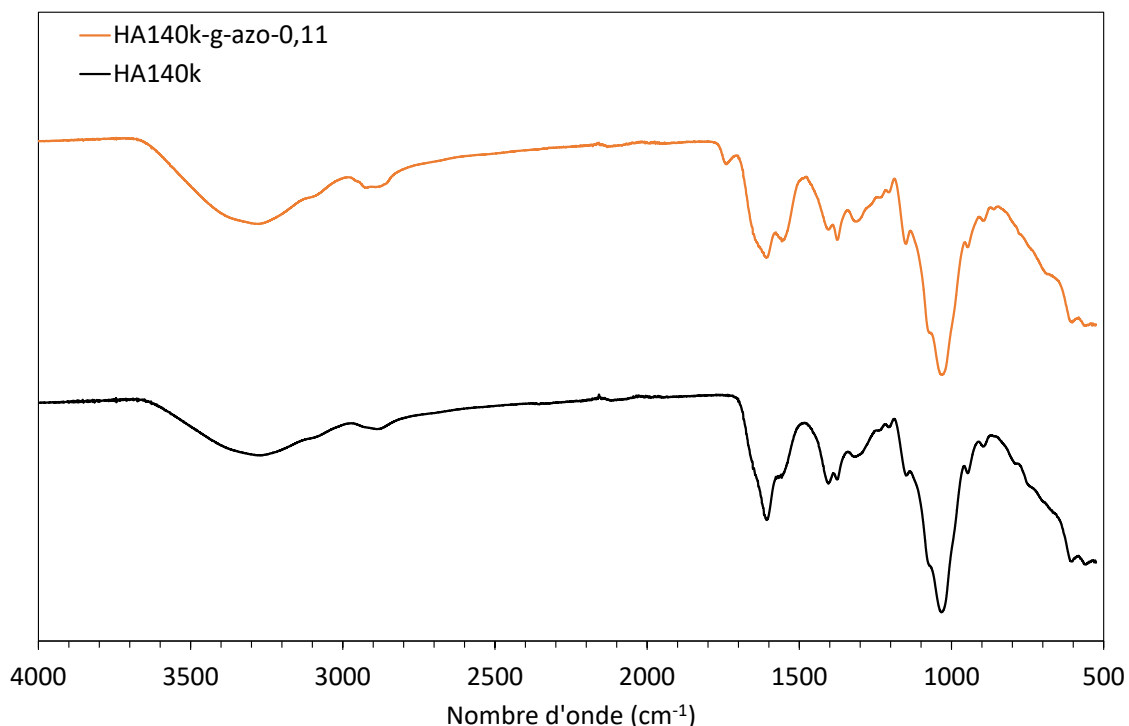


Figure E-4 Spectres infrarouges du HA_{140k-g-azo-0,11} et du HA_{140k}.

Une alternative est de réaliser un dosage colorimétrique par spectrophotométrie UV-vis, en réalisant des courbes d'étalonnage à partir du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (Figure E-5). Les scans ont été réalisés en mesurant l'absorbance de solutions de *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide de diverses concentrations massiques (0,25; 0,1; 0,05; 0,015; 0,01; 0,005 et 0,0025 g.L⁻¹) en milieu acide (HCl 0,05 M) sans traitement UV préalable (ratio *trans/cis* à l'équilibre) entre 800

nm et 200 nm (600 nm.min⁻¹, 1 point tous les nm). Les courbes d'étalonnage ont été réalisées à partir des données obtenues à deux longueurs d'ondes (323 nm et 428 nm) correspondant aux maxima d'absorption.

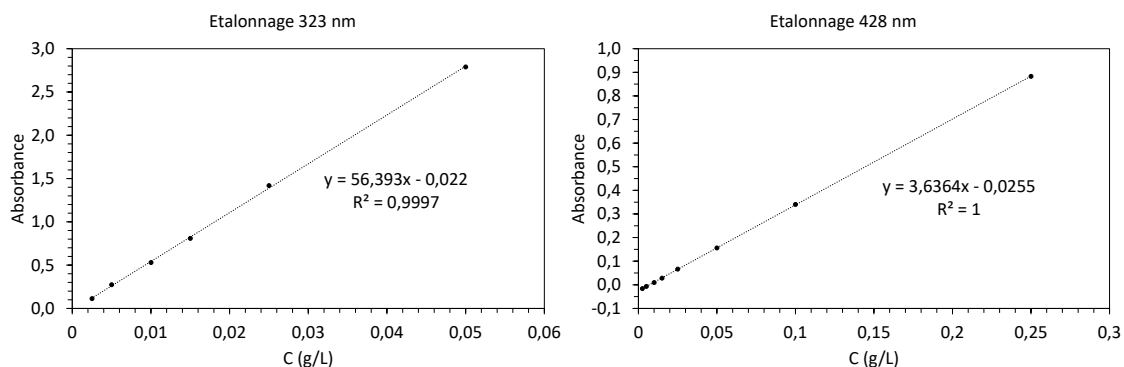


Figure E-5 Courbes d'étalonnage de la concentration massique en solution aqueuse acide (HCl 0,05 M) du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide à 323 nm et 428 nm.

On peut ensuite effectuer un scan de l'absorbance de solutions de HA-*g*-azo (Figure E-6) et retrouver la concentration massique en azobenzène de l'échantillon et, par extension, le DS. Tout d'abord, on voit sur la Figure E-6 que l'allure des courbes de scan du HA est identique à celle du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide précurseur avec les mêmes maxima d'absorption (230 nm, 323 nm et 428 nm). Le dosage est donc possible.

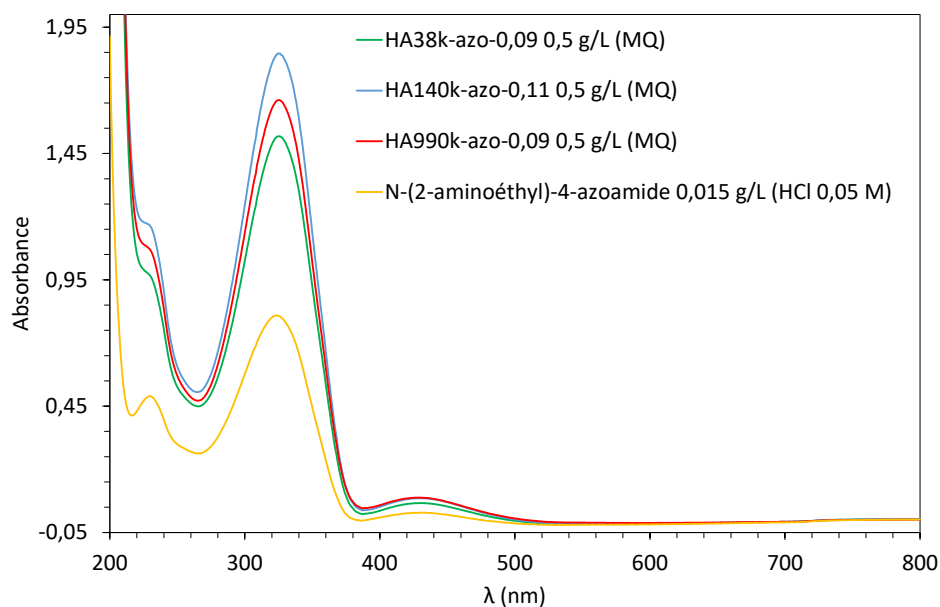


Figure E-6 Courbes d'absorbance de diverses solutions de HA-*g*-azo (0,5 g.L⁻¹, Milli-Q) et du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (0,015 g.L⁻¹, HCl 0,05 M).

Tout d'abord, la concentration massique en azobenzène est déterminée par la formule suivante :

$$C_{azo} = \frac{A_{323nm} + 0,022}{56,393} \text{ (E1a)} \text{ ou } C_{azo} = \frac{A_{428nm} + 0,0255}{3,6364} \text{ (E1b)}$$

Où C_{azo} est la concentration massique en azobenzène (g.L^{-1}), A_{323nm} l'absorbance de l'échantillon à 323 nm et A_{428nm} celle de l'échantillon à 428 nm. Les valeurs numériques employées sont issues des courbes d'étalonnage (Figure E-5).

Il est ensuite possible de déterminer le DS en utilisant la formule suivante :

$$DS = \frac{C_{azo} \times M_{uNaHA}}{C_{HA-g-azo} \times M_{azo} - C_{azo} \times (M_{uHA-g-azo} - M_{uNaHA})} \text{ (E2)}$$

Où C_{azo} est la concentration massique en azobenzène déterminée avec la formule E1a ou E1b, $C_{HA-g-azo}$ la concentration massique du HA-azo dans la solution utilisée pour le dosage, M_{uNaHA} est la masse molaire de l'unité HA sous forme de sel de sodium ($401,3 \text{ g.mol}^{-1}$), M_{azo} est la masse molaire de la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide ($268,3 \text{ g.mol}^{-1}$) et $M_{uHA-g-azo}$ la masse molaire de l'unité HA sur laquelle a été greffée la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide ($629,6 \text{ g.mol}^{-1}$).

Démonstration de la formule E2 :

$$\text{On a par définition } DS = \frac{n_{azo}}{n_{HA-g-azo}} = \frac{C_{azo} \times M_{umoy}}{C_{HA-g-azo} \times M_{azo}}$$

Où n_{azo} est la quantité de matière en azobenzène, $n_{HA-g-azo}$ celle du HA-*g*-azo et M_{umoy} la masse molaire moyenne de l'unité du polymère HA-*g*-azo, telle que :

$$M_{umoy} = DS \times M_{uHA-g-azo} + (1 - DS) \times M_{uNaHA}$$

En développant l'expression de M_{umoy} au sein de l'équation ci-dessus, on obtient :

$$DS = \frac{C_{azo} \times (DS \times M_{HA-azo} + (1 - DS) \times M_{uNaHA})}{C_{HA-azo} \times M_{azo}}$$

En plaçant le DS d'un seul côté de cette expression, on retrouve l'équation E2.

Les concentrations en HA-azo ont été adaptées pour le dosage afin que les valeurs d'absorbance à 323 nm ne soient pas trop élevées. Les résultats des différentes synthèses sont regroupés dans le Tableau E-1:

Tableau E-1 Résultats de synthèse des différents HA-g-azo.

Echantillons	$n_{\text{azo}}/n_{\text{unité HA}}$	$n_{\text{EDC}}/n_{\text{unité HA}}^a$	$DS_{323\text{nm}}$	$DS_{428\text{nm}}$
HA _{38k} -g-azo-0,09	0,2	0,6	0,09	0,08
HA _{38k} -g-azo-0,23	0,6	1	0,23	0,19
HA _{140k} -g-azo-0,11	0,2	0,6	0,11	0,10
HA _{140k} -g-azo-0,22	0,6	1	0,22	0,22
HA _{140k} -g-azo-0,28	1	1	0,28	0,43
HA _{990k} -g-azo-0,09	0,2	0,6	0,09	0,10
HA _{990k} -g-azo-0,17	0,6	1	0,17	0,19
HA _{990k} -g-azo-0,26	1	1	0,26	0,38

^a Dans tous les cas, le ratio molaire NHS/EDC était de 0,04.

Dans les cas où le ratio molaire azobenzène/unité HA est inférieur à 1, on peut constater que les degrés de substitution obtenus à 323 nm ($DS_{323\text{nm}}$) et à 428 nm ($DS_{428\text{nm}}$) pour un même échantillon sont très proches. Ceci est une indication que le HA-g-azo est dans le même état conformationnel d'équilibre que le *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide utilisé pour l'étalonnage. En effet, l'absorbance à 323 nm augmente tandis que celle à 428 nm diminue lorsque le composé passe en conformation *trans*, et inversement lorsqu'il passe en conformation *cis*. Si la répartition *trans/cis* du HA-azo était différente de celle du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide, les $DS_{323\text{nm}}$ et $DS_{428\text{nm}}$ auraient été très différents.

Par contre, on peut voir que, pour une raison difficile à expliquer, les deux échantillons obtenus à partir d'un ratio molaire azobenzène/unité HA de 1 présentent tous deux des $DS_{323\text{nm}}$ et $DS_{428\text{nm}}$ différents, le $DS_{428\text{nm}}$ étant dans les deux cas largement plus élevé. Il est en effet peu probable que l'état conformationnel des deux échantillons soit différent des autres. Les solutions obtenues étaient légèrement troubles dans ces deux cas (Figure E-2-a) et il se peut que ça ait affecté la mesure. Le trouble des solutions est probablement dû au fait que le HA ainsi fonctionnalisé devient moins soluble du fait de la modification de sa balance HLB vers un caractère plus lipophile. Par la suite, étant donné que les valeurs de l'absorbance à 428 nm étaient faibles aux concentrations étudiées ($A < 0,25$), nous avons conservé la valeur de $DS_{323\text{nm}}$, dont l'incertitude était moins élevée ($0,83 < A < 1,9$ aux concentrations utilisées).

On peut constater qu'avoir réalisé la réaction au sein de solutions avec des concentrations massiques en polymère similaires quelle que soit leur masse molaire ($\leq 5,5 \text{ g.L}^{-1}$ en tenant compte du volume de HCl employé pour stabiliser le pH avant l'ajout des activateurs) a conduit à des taux de greffages similaires. Ceci implique que le régime de concentration du HA (dilué pour le HA_{38k}, aux abords du C* pour le HA_{140k} et en régime semi-dilué enchevêtré pour le HA_{990k}) n'affecte que très modérément le résultat de la réaction. Les DS que nous avons obtenus sont élevés par rapport à la littérature concernant le greffage d'azobenzène sur le HA⁷ ou l'acide polyacrylique^{5,8} par l'établissement d'une fonction amide où ils étaient plutôt de l'ordre de 3-4 %. Nous avons atteint les mêmes ordres de grandeur que Rosales *et coll.* qui avaient greffé une fonctionnalité azobenzène sur le HA par la formation de liaisons esters⁹. Ces dernières sont cependant plus facilement hydrolysables que des liaisons amide, ce qui peut poser problème au vu de la dangerosité potentielle des azobenzènes.

Afin d'illustrer les différences visuelles dues aux différents DS des échantillons, les dérivés HA_{990k}-azo présentés dans le Tableau E-1 ont été regroupés Figure E-7. On constate que la coloration jaune-orangée s'intensifie si le DS augmente.

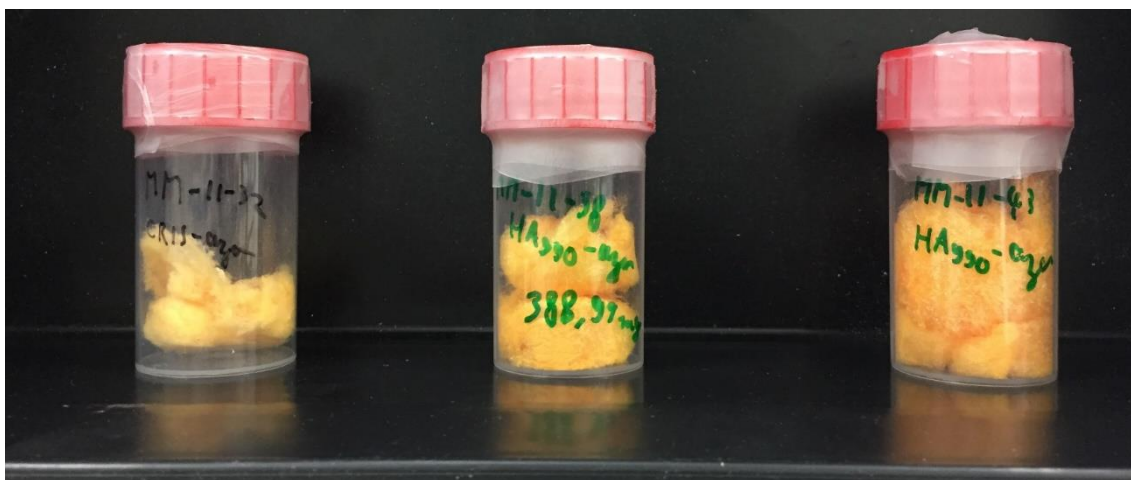


Figure E-7 Photo des échantillons HA_{990k}-g-azo-0,09 (gauche), HA_{990k}-g-azo-0,17 (milieu) et HA_{990k}-g-azo-0,26 (droite).

3 Propriétés physico-chimiques des HA-g-azo.

3.1 Analyses SEC/MALLS/UV/VD/DRI

Les divers HA-g-azo ont été analysés par SEC-MALLS. Dans ce cas, le détecteur UV, réglé sur 320 nm (maximum d'absorption de l'azobenzène) s'est révélé utile afin de vérifier la présence d'azobenzène sur la chaîne HA (Figure E-8). On peut notamment constater que la courbe UV suit parfaitement celle de DRI dans la zone où sort l'échantillon (de 12 à 20 mL), ce qui confirme que l'azobenzène est bien greffé sur le HA et que les greffons sont bien répartis sur toutes les chaînes.

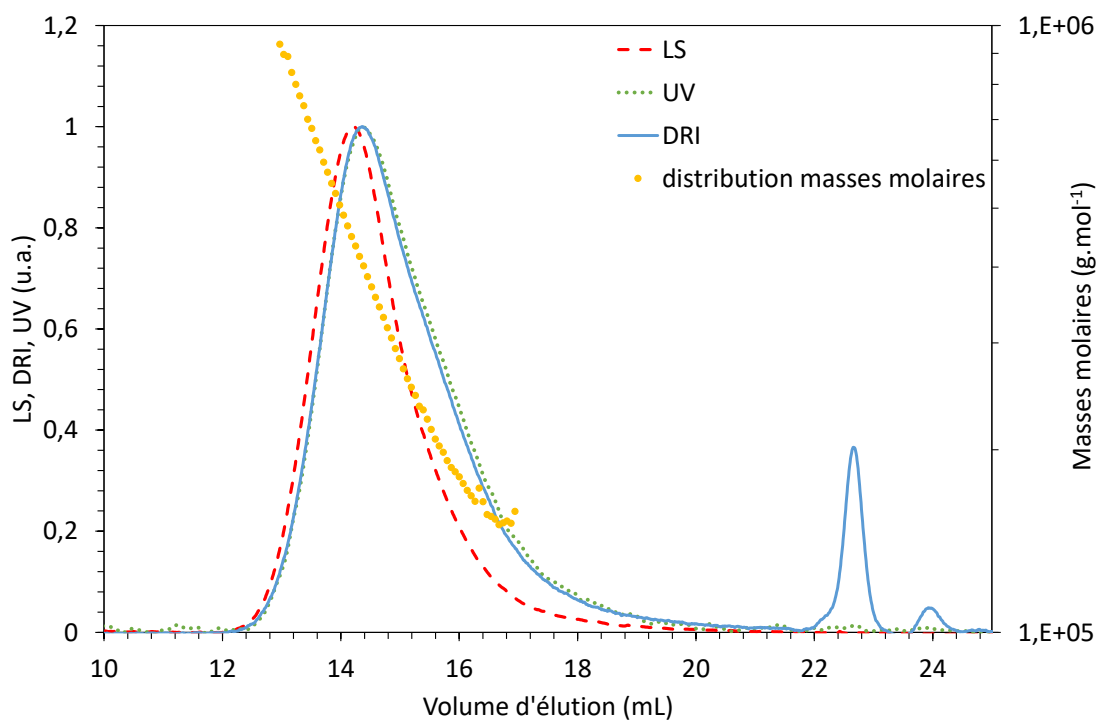


Figure E-8 Chrommatogramme du HA_{990k}-g-azo-0,17 (éluant : LiNO₃ à 0,1 mol.L⁻¹).

Les résultats des analyses SEC-MALLS sont regroupés dans le Tableau E-2 (aucun traitement UV n'a été réalisé sur les échantillons à ce stade) :

Tableau E-2 Propriétés physico-chimiques des différents HA-*g*-azo^a.

Echantillon	M _n (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	Đ	[η] _w (mL.g ⁻¹)	Rh _w (nm)	Rg _w (nm)	DP _n
HA _{38k}	38 000	64 000	1,68	145	11	^b	95
HA _{38k} - <i>g</i> -azo-0,09	39 000	66 000	1,71	145	11	^b	93
HA _{38k} - <i>g</i> -azo-0,23	38 000	44 000	1,18	-	-	-	84
HA _{140k}	140 000	210 000	1,50	410	23	44	349
HA _{140k} - <i>g</i> -azo-0,11	150 000	210 000	1,42	410	23	42	353
HA _{140k} - <i>g</i> -azo-0,22	140 000	150 000	1,10	255	18	^c	310
HA _{140k} - <i>g</i> -azo-0,28	130 000	150 000	1,15	290	18	^c	279
HA _{990k}	990 000	1 300 000	1,36	1 600	68	147	2467
HA _{990k} - <i>g</i> -azo-0,09	330 000	500 000	1,49	840	40	75	781
HA _{990k} - <i>g</i> -azo-0,17	290 000	370 000	1,27	615	32	58	659
HA _{990k} - <i>g</i> -azo-0,26	380 000	450 000	1,18	710	36	77	825

^a Masses récupérées comprises entre 54 % et 100 %.

^b en dehors de la zone de détection du MALLS (la diffusion devient isotrope pour les faibles masses).

^c Diffusion isotrope mais mauvaise distribution des Rg lors de l'analyse.

Précision des données SEC/MALLS/VD/DRI : M_n ± 9 %; M_w ± 6 %; Đ ± 10 %; [η]_w ± 0.5 %; Rh_w ± 2 %; Rg_w ± 6 %

On peut observer une fois encore que les chaînes de HA_{38k}-*g*-azo et de HA_{140k}-*g*-azo sont légèrement dégradées par rapport aux HA_{38k} et HA_{140k} précurseurs. Leurs paramètres physico-chimiques des chaînes (Rh, Rg, [η]) sont globalement peu affectés par la réaction. On peut toutefois noter une légère baisse du Rh et du [η] pour les HA_{140k}-*g*-azo de DS supérieurs à 20 %, tandis que leurs Rg deviennent difficilement mesurables. Ceci peut indiquer une légère tendance des chaînes à devenir plus compactes du fait de la présence de greffons hydrophobes. Par contre, la dégradation est à nouveau plus prononcée pour les HA_{990k}-*g*-azo, ce qui rend la comparaison de leurs grandeurs physico-chimiques plus difficile.

3.2 Etude de la transition *trans*→*cis*

La cinétique de transition *trans*→*cis* des dérivés HA-*g*-azo a été étudiée par spectrophotométrie UV-vis en suivant un protocole similaire à celui employé pour la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (voir chapitre B section 2.2.2.3). Les HA-*g*-azo ont été dissouts dans de

l'eau Milli-Q (au lieu de la solution de HCl employée pour la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide). La concentration été ajustée de façon à obtenir une absorbance d'environ 0,9 à 323 nm en conformation 100 % *trans* pour chaque échantillon, afin de travailler à la même concentration en azobenzène ($0,015 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,001 \text{ g.L}^{-1}$), indépendamment de la concentration en HA. Les résultats sont représentés Figure E-9.

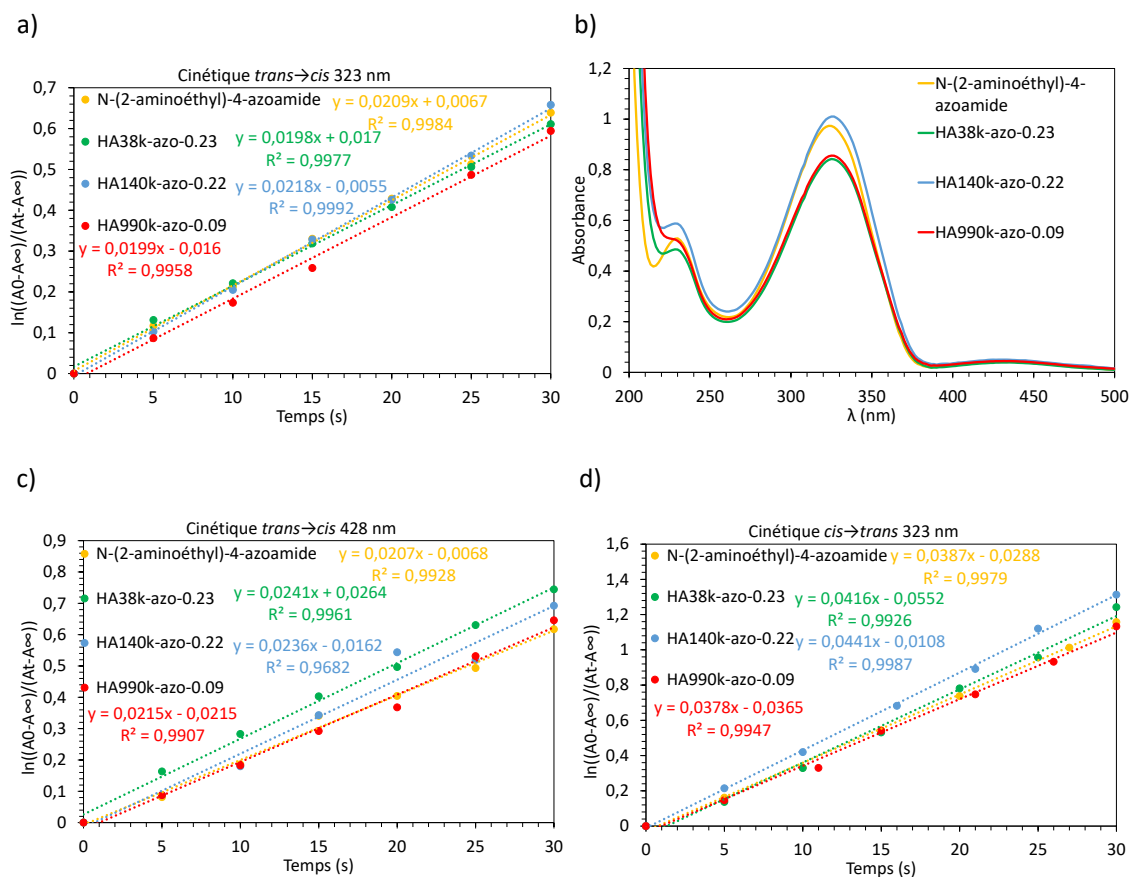


Figure E-9 a) Courbes de cinétiques (ordre 1) de transition *trans*→*cis* (323 nm) obtenues pour divers échantillons de HA-g-azo et la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide ($C_{\text{azo}} : 0,015 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,001 \text{ g.L}^{-1}$); **b)** courbes d'absorbance correspondantes des mêmes échantillons en conformation *trans* à 100%; **c)** courbes de cinétiques *trans*→*cis* (428 nm) et **d)** courbes de cinétique *cis*→*trans* (323 nm) obtenues pour les mêmes échantillons.

On peut observer que les courbes d'absorbances ont la même allure, avec les mêmes maxima d'absorption (Figure E-9-b). Les transitions *trans*→*cis* et *cis*→*trans* suivent une cinétique d'ordre 1 comme la molécule *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (voir chapitre B, section 2.2.2.3 page 150). On constate que pour des concentrations proches en azobenzène, les mêmes valeurs de constantes de vitesses (pente des droites) sont obtenues quel que soit le HA utilisé (Figure E-

9-b). La concentration en HA n'a pas non plus eu d'impact notable : elle allait de 0,106 g.L⁻¹ pour le HA_{38k}-g-azo-0,23 à 0,25 g.L⁻¹ pour le HA_{38k}-azo-0,08 (les HA_{140k}-g-azo-0,28 et HA_{990k}-g-azo-0,26 n'ayant pas fait l'objet de mesures cinétiques), ce qui signifie que nous avons travaillé en régime dilué dans tous les cas. Le taux de greffage n'a donc pas d'impact sur les transitions *trans*→*cis* et *cis*→*trans*. Pour la cinétique de la transition *trans*→*cis* (réalisée en utilisant une lampe de 365 nm, 100 W, ~5,0 mW/cm²), nous avons obtenus des valeurs de constante de vitesse d'environ 0,02 s⁻¹ (identique au *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide). Cette valeur ne dépend pas de la longueur d'onde utilisée, ce qui est normal (on peut constater par contre, que les courbes obtenues à 428 nm sont moins précises que celles à 323 nm, avec des coefficients de corrélation moins élevés, du fait de la faible valeur des absorbances). Les valeurs de constantes de vitesse obtenues pour la transition *cis*→*trans* étaient de l'ordre de 0,04 s⁻¹ (identique au *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide) (lampe de 254 nm, 4W, ~0,2 mW/cm²).

Les effets de ce changement d'une conformation *trans* apolaire vers une conformation *cis* plus polaire sur les propriétés du HA ont été étudiés dans un premier temps par chromatographie SEC-MALLS. Les échantillons ont été préconditionnés 10 min sous lampe UV : 254 nm, 4W, ~0,2 mW/cm² pour la conformation *trans* et 365 nm, 100 W, ~5,0 mW/cm² pour la conformation *cis*, puis les piluliers les contenant ont été enrobés d'aluminium afin de minimiser le retour à l'équilibre avant l'injection dans l'appareil. Sur l'encadré de la Figure E-10, on voit que l'intensité de la détection UV est plus forte pour l'échantillon en conformation *trans* par rapport à celui en conformation *cis*, ce qui était attendu, le détecteur ayant été réglé sur 320 nm. Cela permet de confirmer que les échantillons n'étaient pas dans le même état conformationnel au moment du passage au niveau des détecteurs. On constate que les échantillons à l'équilibre (~80 % en conformation *trans*) et en conformation *trans* sont plus retenus par les colonnes comparativement à l'échantillon en conformation *cis*. Les masses molaires moyennes étant similaires (Tableau E-3), cela se traduit par un décalage au niveau des courbes de distribution des masses molaires (Figure E-10). Il convient toutefois de noter que le phénomène demeure modéré et ce pour tous les échantillons étudiés. Nous n'avons notamment pas observé de forte tendance à l'agrégation des composés en conformation *trans*.

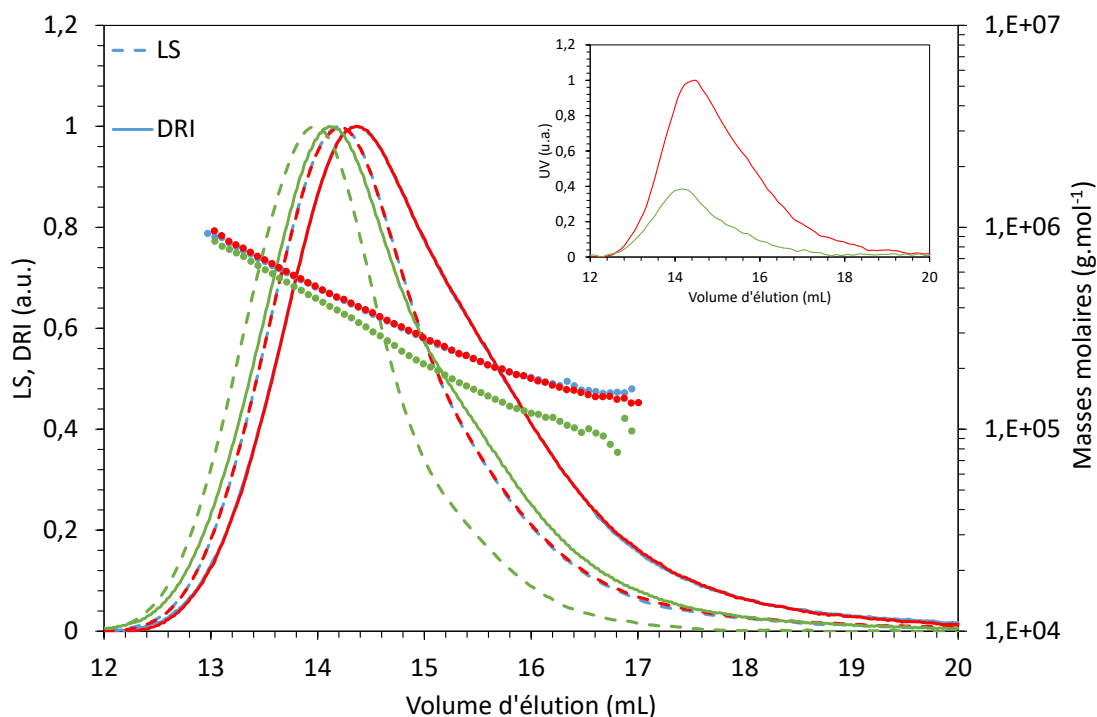


Figure E-10 Chromatogrammes du HA_{990k}-g-azo-0,17 en conformation *trans* (courbes rouges), à l'équilibre (courbes bleues) et en conformation *cis* (courbes vertes) (éluant : LiNO₃ 0,1 mol.L⁻¹) (encadré : traces UV en conformation *trans* (rouge) et en conformation *cis* (vert)).

Tableau E-3 Impact du changement de conformation de certains échantillons sur les grandeurs macromoléculaires.

Echantillon	M _n (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	Đ	[η] _w (mL.g ⁻¹)	Rh _w (nm)	Rg _w (nm)
HA _{140k} -azo-0,29 <i>eq</i>	130 000	150 000	1,15	290	18	^a
HA _{140k} -azo-0,29 <i>trans</i>	150 000	170 000	1,12	290	20	^a
HA _{140k} -azo-0,29 <i>cis</i>	140 000	160 000	1,15	305	19	^a
HA _{990k} -azo-0,17 <i>eq</i>	290 000	370 000	1,27	615	32	58
HA _{990k} -azo-0,17 <i>trans</i>	280 000	370 000	1,29	620	32	55
HA _{990k} -azo-0,17 <i>cis</i>	260 000	370 000	1,44	640	32	58
HA _{990k} -azo-0,26 <i>eq</i>	380 000	450 000	1,18	710	36	77
HA _{990k} -azo-0,26 <i>trans</i>	390 000	460 000	1,18	720	37	76
HA _{990k} -azo-0,26 <i>cis</i>	410 000	520 000	1,27	740	38	85

^a Diffusion isotrope mais mauvaise distribution des Rg lors de l'analyse.

Précision des données SEC/MALLS/VD/DRI : $M_n \pm 9\%$; $M_w \pm 6\%$; $D \pm 10\%$; $[\eta]_w \pm 0.5\%$; $Rh_w \pm 2\%$; $Rg_w \pm 6\%$.

Les propriétés rhéologiques de solutions concentrées de HA-*g*-azo ont été analysées. L'exemple présenté ici est celui du HA_{140k}-*g*-azo-0,28, en solution à 50 g.L⁻¹ dans le tampon PBS. Afin de limiter la quantité de matériau à utiliser pour ce test, une géométrie cône-plan a été utilisée pour réaliser les mesures plutôt que du double-entrefer. L'échantillon a été preconditionné afin d'être en conformation *trans* ou *cis* avant la mesure. Les résultats sont présentés figure E-11. Nous pouvons observer que la viscosité au cours d'une mesure en écoulement n'a pas varié. On peut voir par contre qu'elle est légèrement inférieure à celle d'une solution de HA_{140k} équivalente, ce qui rejoint les observations réalisées en SEC-MALLS, où une viscosité intrinsèque inférieure du HA_{140k}-*g*-azo-0,28 ainsi qu'une légère dégradation de la chaîne avaient été constatées par rapport au HA_{140k} de départ (Tableau E-2).

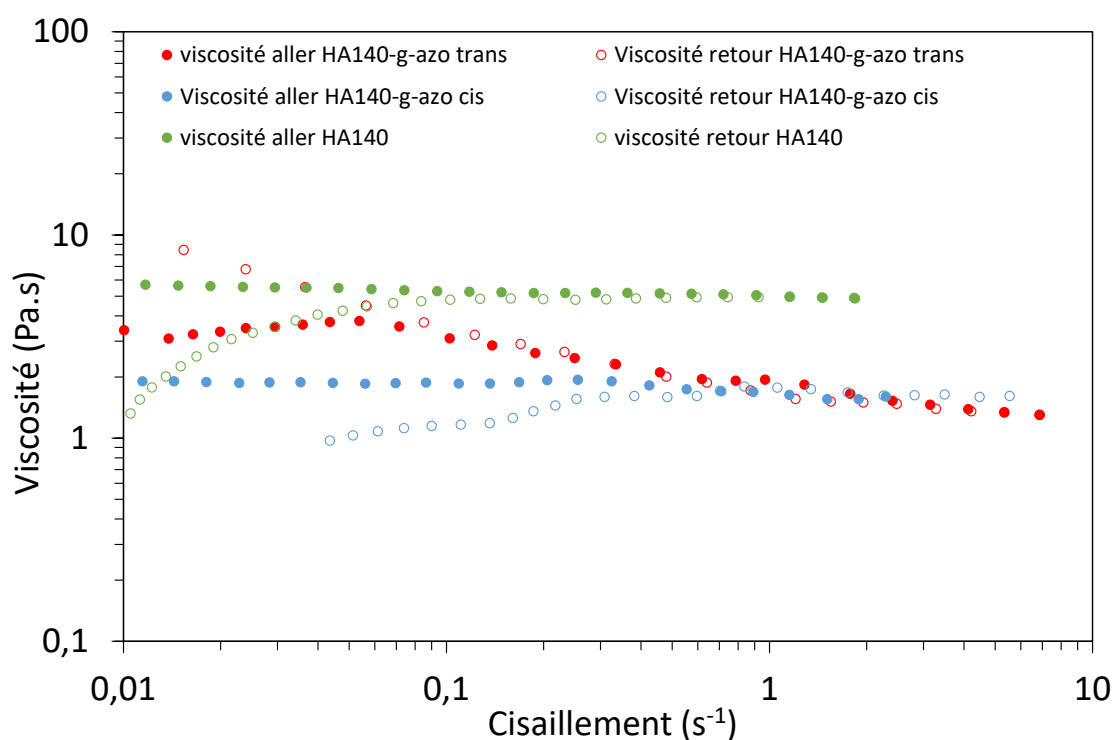


Figure E-11 Viscosité du HA_{140k}, du HA_{140k}-*g*-azo-0,22 en conformation *trans* et *cis* (50 g.L⁻¹, tampon PBS, géométrie CP).

Les fonctions azobenzène ne sont pas assez associatives pour former des hydrogels et la transition *trans*→*cis* n'a pas entraîné d'évolution marquée des propriétés des HA-*g*-azo. Toutefois, leur capacité à former des complexes d'inclusion au sein d' α -cyclodextrine en conformation *trans* uniquement est connue et a déjà été étudiée^{5,9}. Si on parvenait à greffer des

α -cyclodextrines sur le HA, il serait alors possible de former des hydrogels physiques par le biais de complexes d'inclusion.

4 Formation de complexes d'inclusion avec des cyclodextrines

4.1 Complexes avec des cyclodextrines libres

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composés d' α -glucose. Il existe trois catégories principales, qui sont définies par le nombre d'unités glucose au sein du cycle : les α -cyclodextrines (α -CD) (6 unités), les β -cyclodextrines (β -CD) (7 unités), et les γ -cyclodextrines (γ -CD) (8 unités) (Figure E-12). Chacune comporte une cavité hydrophobe, les fonctions alcools étant orientées vers l'extérieur. Ces cavités peuvent inclure des dérivés apolaires. Selon la taille de la cavité par rapport à la molécule à inclure, la stœchiométrie des complexes peut varier. Un exemple bien connu de complexe de stœchiométrie 1:1 se fait entre la β -cyclodextrine et l'antracène¹⁰. Les azobenzènes en conformation *trans* forment généralement des complexes 1:1 avec les α -CD et les β -CD et 2:1 avec la γ -CD¹¹. Comme nous l'avons déjà mentionné au chapitre A, les azobenzènes en conformation *cis* n'ont aucune affinité avec les α -CD, mais peuvent interagir avec la surface des β -CD¹¹⁻¹³.

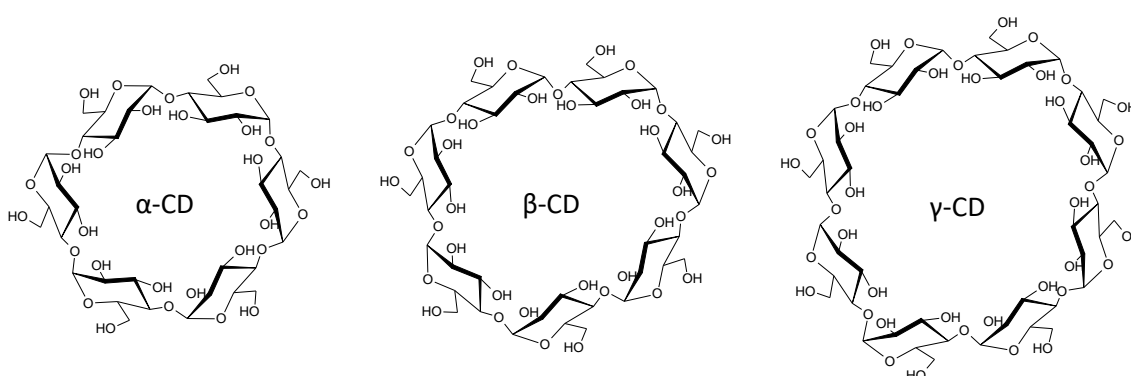


Figure E-12 Représentation des structures de l' α -CD, la β -CD et la γ -CD.

Diverses études mentionnées dans la partie bibliographie de ce manuscrit ont ainsi utilisé les interactions entre les azobenzènes et les cyclodextrines afin de former des complexes d'inclusion photosensibles permettant d'obtenir des systèmes dont la viscosité peut être modifiée par irradiation lumineuse, voire conduire à une transition solution/hydrogel^{5,8,14}. Une étude a notamment réalisé des hydrogels à partir de chaînes HA fonctionnalisées avec des

groupements azobenzènes (par le biais d'une liaison ester) et d'autres chaînes HA sur lesquelles ont été greffées des β -CD⁹. Ce dernier choix est surprenant, car la même étude a également établi que la constante d'affinité des azobenzènes pour les α -CD est plus élevée que pour les β -CD, ce en quoi elle est soutenue par d'autres études¹¹. Cela vient sans doute du fait que le greffage de la β -CD est le mieux maîtrisé des trois grandes catégories de cyclodextrines. Par ailleurs il y a bien plus de dérivés commerciaux de β -CD par rapport à l' α -CD et à la γ -CD, ce qui vient sans doute de la solubilité plus élevée de la β -CD dans la plupart des solvants organiques ainsi que de sa faible solubilité dans l'eau qui est utile lors de la réaction visant à la fonctionnaliser avec des groupements tosyles, préalable à de nombreuses réactions^{15,16}.

Dans un premier temps, nous avons donc cherché à déterminer les constantes d'affinité K_a de nos HA-azo en conformation *trans* vis-à-vis des CD par spectrophotométrie UV-vis^{9,11,17}. Cette méthode repose sur l'utilisation de modèles (Benesi-Hildebrand, Scott et Scatchard) qui permettent de relier K_a à l'évolution de la valeur de l'absorbance de solutions d'azobenzène induite par la présence de cyclodextrine (Tableau E-4). Pour ce faire, nous avons réalisé des scans d'absorbance de solutions contenant à la fois du HA_{140k}-g-azo-0,22 (concentration fixe) et de la cyclodextrine (α ou β) à concentration croissante.

Tableau E-4 Equation des différents modèles de détermination du K_a ^{17,18}

Modèle	Equation
Benesi-Hildebrand	$\frac{1}{\Delta_{Abs}} = \frac{1}{K_a \times \Delta_{Absmax} \times [CD]} + \frac{1}{\Delta_{Absmax}} \quad (E3)$
Scott	$\frac{[CD] \times \Delta_{Absmax}}{\Delta_{Abs}} = \frac{1}{K_a} + [CD] \quad (E4)$
Scatchard	$\frac{\Delta_{Abs}}{[CD]} = -K_a \times \Delta_{Abs} + K_a \times \Delta_{Absmax} \quad (E5)$

Où Δ_{Abs} est la variation de la valeur de l'absorbance à une longueur d'onde donnée entre l'échantillon analysé et la solution ne contenant que le HA_{140k}-g-azo-0,22 (à la même concentration) et Δ_{Absmax} est la valeur maximale de Δ_{Abs} pouvant être atteinte (toutes les molécules invitées sont incluses dans la molécule hôte).

Il convient de noter que cette méthode ne vaut pas le dosage calorimétrique isotherme en terme de précision, mais elle était la plus facile à mettre en œuvre avec l'instrumentation à disposition et a permis une estimation rapide des constantes d'affinité.

Protocole de détermination de la constante d'affinité K_a par spectrophotométrie UV-vis :

Le HA_{140k}-g-azo-0,22 est dissout dans l'eau Milli-Q à une concentration de 0,5 g.L⁻¹. La solution est placée sous lampe UV pendant 10 min, de façon à ce que les fonctions azobenzènes soient toutes en conformation *trans*. 500 µL de cette solution sont ensuite mélangés avec 1500 µL d'une solution de cyclodextrine de concentration variable, le mélange étant placé dans une cuve de quartz pour la mesure. L'acquisition est effectuée de 345 nm à 315 nm (zone proche du maximum d'absorption à 326 nm du dérivé HA_{140k}-g-azo-0,22) avec un point acquis tous les 0,02 nm (vitesse : 12 nm.min⁻¹). Afin de minimiser les incertitudes de mesure, la cuve n'a pas été retirée de son portoir lors du remplacement de la solution entre deux mesures. La cellule de référence contenait de l'eau Milli-Q. Des mesures ont ensuite été effectuées sur les solutions de cyclodextrine seules afin de réaliser les blancs.

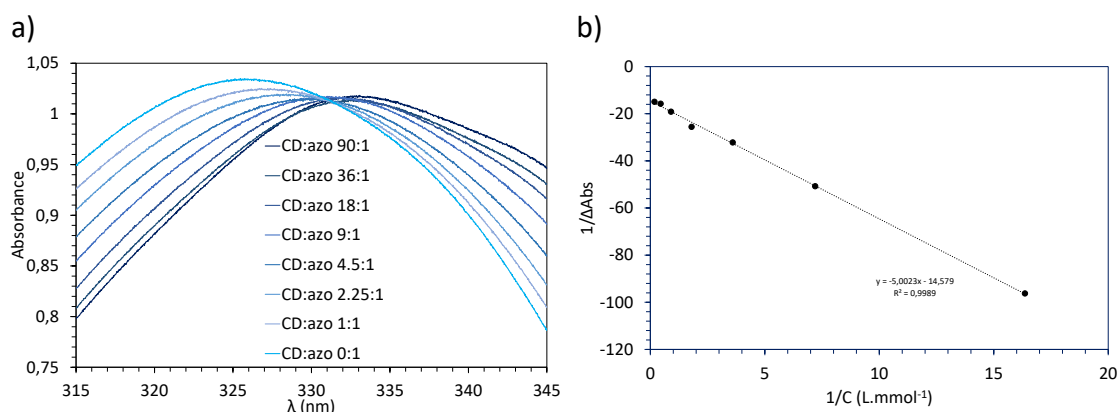


Figure E-13 a) Courbes d'absorbance de solutions de HA_{140k}-g-azo-0,22 (concentration fixe) contenant diverses concentrations d' α -CD (les ratios molaires entre la CD et les fonctions azobenzène sont indiqués sur la figure) et **b)** Courbe de Benesi-Hildebrand obtenue en utilisant les valeurs d'absorbance de la figure a) à 326 nm (pente : $1/(K_a \cdot \Delta_{Absmax})$; ordonnée : $1/\Delta_{Absmax}$)¹⁷.

Sur les courbes d'absorbance, on observe un décalage du maximum d'absorption de plus en plus marqué au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité de cyclodextrine présente dans la solution (Figure E-13-a). Dans le cas de la série obtenue par mélange du HA_{140k}-g-azo-0,22 avec l' α -CD, il est passé de 326 nm en l'absence de cyclodextrine à 333 nm (ratio CD:azobenzène de 90:1). On devine aussi la présence d'un point isobestique vers 331 nm, qui n'est cependant pas aussi net que ceux observés sur les courbes de cinétique de transition *trans*

→ *cis* ou *cis* → *trans* de la molécule d'azobenzène non greffée (Figure B-37 et Figure B-38). Pour les longueurs d'ondes inférieures à celle de ce point, on peut voir que l'absorbance diminue lorsque l'on augmente la quantité d' α -CD. La situation est inversée au-delà de ce point (Figure E-13-a).

Les données obtenues sont ensuite traitées en utilisant plusieurs modèles afin de déterminer la constante d'affinité. On trouve par exemple la méthode de Benesi-Hildebrand (Figure E-13-b), celle de Scott et celle de Scatchard (Figure E-14) (Tableau E-4).

Les différentes méthodes ont donné des valeurs similaires de K_a d'environ $2800 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, ce qui est un résultat relativement élevé¹⁷ (Tableau E-5). On peut également constater que changer de longueur d'onde d'étude en appliquant la méthode de Benesi-Hildebrand à 320 nm au lieu de 326 nm afin de vérifier la reproductibilité de la méthode n'a pas fait varier le résultat obtenu de façon significative.

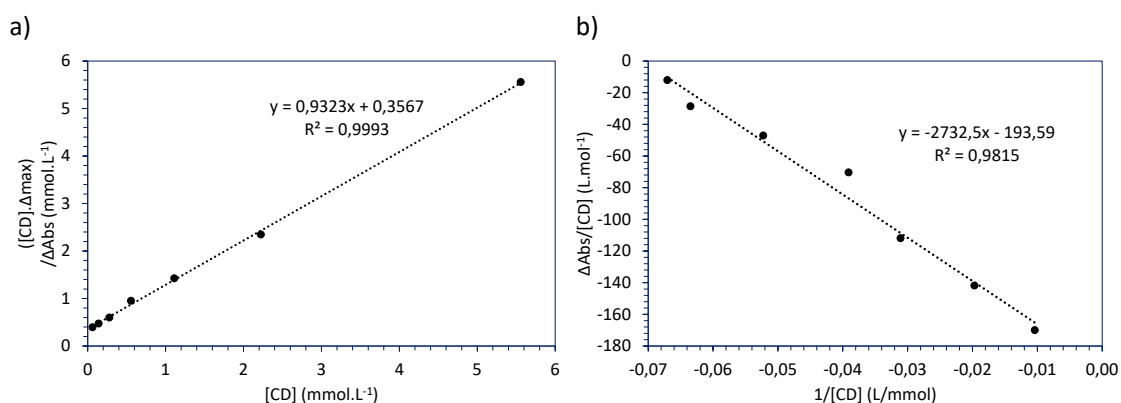


Figure E-14 a) Courbe de Scott et **b)** Courbe de Scatchard du $\text{HA}_{140k}\text{-}g\text{-azo-0,22}$ avec l' α -CD obtenues en utilisant les valeurs d'absorbances à 326 nm.

Tableau E-5 Constantes d'affinités obtenues en utilisant différents modèles (avec le $\text{HA}_{140k}\text{-}g\text{-azo-0,22}$).

Cyclodextrine	Modèle	λ (nm)	K_a ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$)
α -CD	Benesi-Hildebrand	326	3000
	Benesi-Hildebrand	320	2700
	Scott	326	2800
	Scatchard	326	2700 (coef. dir.); 2900 (ordonnée origine)
β -CD	Benesi-Hildebrand	315	620
	Scott		610

La même étude a été réalisée avec le β -CD. On peut constater que le β -CD a un impact moindre sur l'évolution de l'allure de la courbe d'absorbance (Figure E-15-a) : le maximum d'absorption n'y est décalé que de 326 nm à 327 nm. Les valeurs d'absorbance à une même longueur d'onde varient moins, ce qui signifie que l'on se rapproche des limites en sensibilité de l'instrument, les valeurs mesurées sont donc moins précises, et par conséquent la détermination du K_a en utilisant les modèles précités est elle-même moins précise (la valeur obtenue par la méthode de Scatchard n'a par exemple pas été reportée Tableau E-5 du fait de la mauvaise qualité de la courbe). On obtient des valeurs d'environ 600 L.mol⁻¹ avec les modèles de Benesi-Hildebrand et de Scott, ce qui est 4,5 fois inférieur aux valeurs obtenues avec l' α -CD. Cette dernière est donc nettement plus adaptée pour réaliser des complexes d'inclusion.

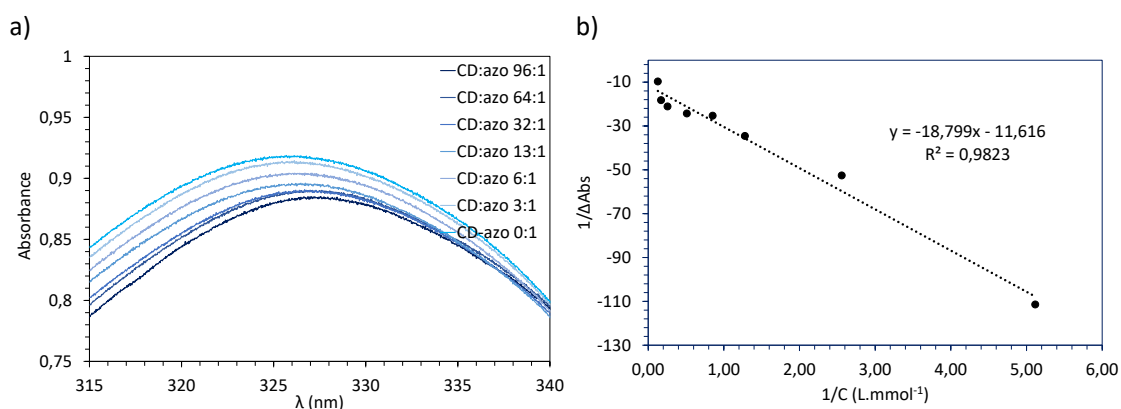


Figure E-15 a) Courbes d'absorbance de solutions de HA_{140k}-g-azo-0,22 (concentration fixe) contenant diverses concentrations de β -CD (les ratios molaires entre la CD et les fonctions azobenzène sont indiqués sur la figure) et **b)** Courbe de Benesi-Hildebrand obtenue en utilisant les valeurs d'absorbances de la figure a) à 315 nm.

Il y a toutefois un détail issu de ces mesures qui mérite d'être noté. Nous avons travaillé avec une concentration massique en HA_{140k}-g-azo-0,22 de 0,125 g.L⁻¹, ce qui correspond à une concentration en azobenzène de $6,1 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ (détails en annexe 4). Si on se place à un ratio molaire d' α -CD:azobenzène de 1:1, en utilisant la valeur obtenue de K_a (2800 L.mol⁻¹), on a une concentration en azobenzène non incluse de $5,3 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, soit 87 % de la valeur initiale, ce qui n'est pas élevé en dépit de ce que pouvait laisser présager la valeur de K_a . Dans ces conditions de mesures, une grande majorité de la molécule d'azobenzène n'a donc pas formé de complexe d'inclusion. Il va donc falloir travailler à des concentrations plus élevées, où

l'enchevêtrement et la gêne stérique limiteront probablement l'efficacité du complexe d'inclusion.

Démonstration :

$$\text{On a par définition } Ka = \frac{[CD:azo]}{[CD]_l \times [azo]_l} \text{ (E6)}$$

Où $[CD:azo]$ est la concentration en azobenzène inclus dans une cyclodextrine, $[CD]_l$ la concentration en cyclodextrine libre (n'ayant pas d'azobenzène au sein de sa cavité) et $[azo]_l$ la concentration en azobenzène libre (non inclus).

Pour un ratio molaire d' α -CD:azobenzène de 1:1, on a $[CD]_l = [azo]_l$, ce qui permet d'écrire la formule E6 sous la forme suivante : $Ka = \frac{[CD:azo]}{[azo]_l^2}$. De plus, on a $[azo]_l + [CD:azo] = [azo]_i$ où $[azo]_i$ est la concentration initiale en azobenzène. Ceci permet d'aboutir au polynôme du second degré suivant :

$Ka[azo]_l^2 + [azo]_l - [azo]_i = 0$ (E7), qui présente un discriminant positif, et donc deux solutions, une positive et une négative. Une valeur de concentration ne pouvant être négative, nous obtenons la valeur de concentration en azobenzène libre suivante :

$$[azo]_l = \frac{-1 + \sqrt{1 + 4Ka[azo]_i}}{2Ka} \text{ (E8)}.$$

En appliquant la formule E8, on peut constater que si on se place à 50 g.L^{-1} avec un HA-g-azo-0,22, il y aura cette fois 11 % d'azobenzène non incluse dans une cavité de cyclodextrine dans le cas où la solution contiendrait une quantité stœchiométrique d' α -CD (sans tenir compte de l'encombrement stérique) (ce taux passe à 24 % pour une concentration de 10 g.L^{-1}). Cela signifie qu'il faudra travailler à des concentrations en HA relativement élevées pour obtenir un taux d'inclusion suffisant. De plus, afin de former des hydrogels, il faut greffer l' α -CD sur le HA. Il vaudrait donc mieux atteindre des taux de greffage élevés, du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec l'azobenzène.

4.2 Fonctionnalisation du HA avec l' α -cyclodextrine

Nous avons envisagé deux stratégies de greffage : la première consiste au greffage direct de 3A-Amino-3A-deoxy-(2AS,3AS)- α -cyclodextrine commerciale sur le HA en milieu aqueux par activation des fonctions acide carboxylique du HA avec le couple EDC/NHS (figure E-16-a). L'avantage de la réaction est qu'elle peut être effectuée en une seule étape. Cependant, étant

donné que la fonction amine est située sur une unité glucose de la cyclodextrine en position 3 à la place d'une fonction alcool, l'encombrement stérique va probablement être conséquent. Une voie alternative a donc consisté en la fonctionnalisation d'une α -CD commerciale tosylée (la Mono-2-O-(*p*-toluenesulfonyl)- α -cyclodextrine) avec de l'éthylène diamine, afin d'ajouter un bras espaceur entre la fonction amine et la cyclodextrine (Figure E-16-b). Cette réaction est bien connue et a surtout été employée avec de la β -CD tosylée¹⁹.

Protocole de greffage de la 3A-Amino-3A-deoxy-(2AS,3AS)- α -cyclodextrine sur le HA :

Un essai a été réalisé sur 400 mg de HA_{990k} (1 mmol d'unité HA), que l'on a fait réagir avec 968,7 mg de 3A-Amino-3A-deoxy-(2AS,3AS)- α -cyclodextrine (M : 971,86 g.mol⁻¹ d'après les spécifications du fournisseur, soit 1 mmol). Un équivalent d'EDC (191,1 mg) et 0,04 équivalents de NHS (4,59 mg) ont été utilisés pour l'activation des fonctions acide carboxylique. Le protocole est similaire à celui décrit pour la Jeffamine® M2005 au sein du chapitre C, section 2. Avant l'addition de la solution d'EDC/NHS dans le milieu réactionnel contenant le HA et l'amino- α -CD, le pH a été ajusté à 4,7. La réaction a duré 24 h avant que le milieu réactionnel ne soit placé dans une membrane de dialyse (seuil de rétention : 12-14 kDa). Une succession de dialyse contre NaOH 0,1 mol.L⁻¹, HCl 0,1 mol.L⁻¹, NaOH 0,1 mol.L⁻¹ et enfin eau Milli-Q a été réalisée. Après dialyse, le produit est lyophilisé puis stocké au congélateur. Le rendement de la réaction a été de 90 %.

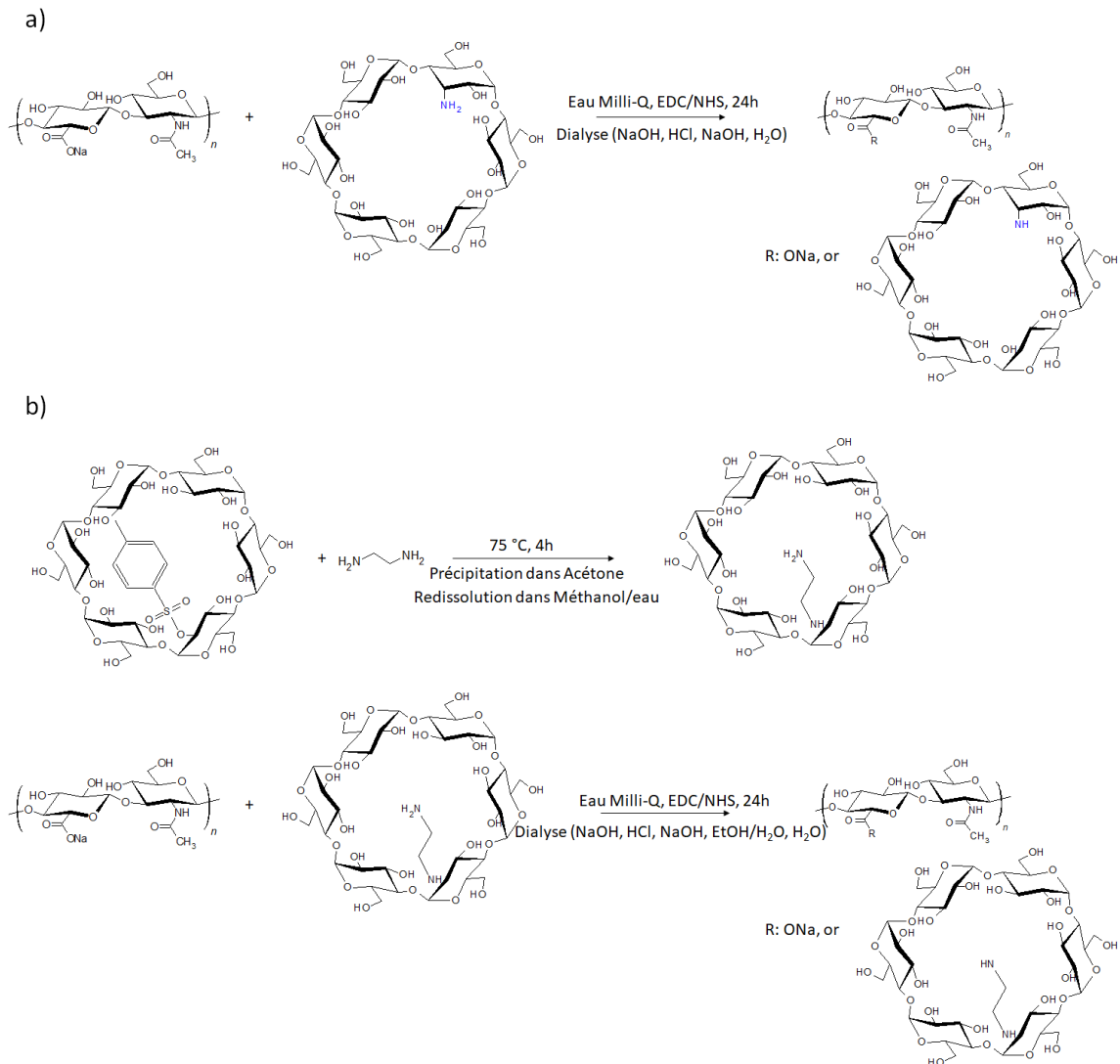


Figure E-16 a) Fonctionnalisation du HA avec la 3A-Amino-3A-deoxy-(2AS,3AS)- α -cyclodextrine et **b)** synthèse de la Mono-2-N-(2-aminoéthyl)- α -cyclodextrine puis fonctionnalisation du HA avec ce dérivé.

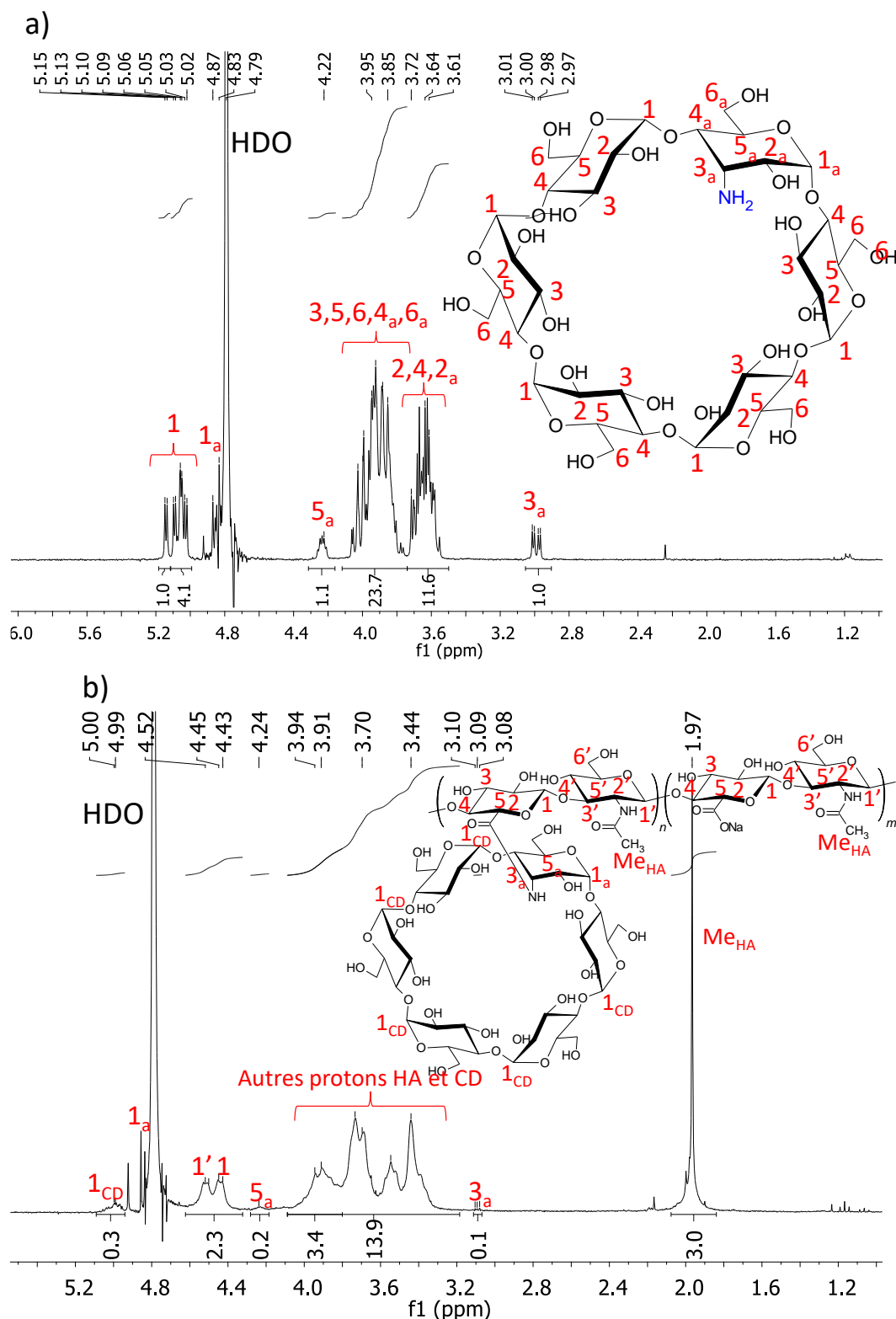


Figure E-17 a) Spectre RMN ^1H (solvant : D_2O) de la 3A-Amino-3A-deoxy-(2AS,3AS)- α -cyclodextrine (pics attribués en se basant sur la référence²⁰ et b) spectre RMN ^1H du HA_{990k}-g- α -CD-0,06 (solvant : D_2O + NaOD 0,125 M).

Le composé obtenu, dénommé HA_{990k}-g-(α-CD), a été analysé par RMN ¹H (Figure E-17-b). On peut y observer les pics usuels du HA, mais également certains pics de l'amino-α-CD, comme les 5 protons anomériques des unités glucose ne comportant pas de fonction amine vers 5 ppm, le proton en position 5 de l'unité glucose comprenant la fonction amine vers 4,22 ppm et le proton en position 3 de cette même unité vers 3,09 ppm (Figure E-17-a et Figure E-17-b, les pics de la 3A-Amino-3A-deoxy-(2AS,3AS)-α-cyclodextrine ont pu être attribués grâce à la référence 20).

Il existe plusieurs manières de déterminer le DS à partir de ce spectre selon le ou les protons venant de la cyclodextrine considérés. On peut utiliser les relations suivantes :

$$DS = \frac{I_{CDanom}}{5} \times \frac{3}{I_{MeHA}} \quad (E9).$$

$$DS = \frac{I_{3-4ppm}^{-1}}{34} \times \frac{3}{I_{MeHA}} \quad (E10).$$

Où I_{CDanom} est la valeur de l'intégration des 5 protons anomériques de l'α-CD sortant vers 5 ppm, I_{MeHA} celle des protons du méthyle du HA sortant vers 1,9 ppm et I_{3-4ppm} celle de l'ensemble des pics sortant entre 3 et 4 ppm. Le DS obtenu avec la formule E9 est de 6 %, tandis qu'il passe à 12 % avec l'équation E10. L'analyse est donc ici très imprécise. Malheureusement, les pourcentages en carbone et en azote des unités de HA fonctionnalisées (respectivement 45 % et 2,1 %) sont trop proches de ceux des unités de Na-HA (respectivement 41,9 % et 3,7 %) pour permettre de déterminer le DS par analyse élémentaire. La valeur de 0,06 a été retenue car elle a été obtenue à partir du pic le plus dégagé.

L'analyse SEC-MALLS a montré que le HA_{990k}-g-(α-CD)-0,06 a donné une M_n de 290 kg.mol⁻¹ et une M_w de 410 kg.mol⁻¹, soit des valeurs dégradées par rapport au HA_{990k} de départ et du même ordre de grandeur que celles obtenues avec les HA_{990k}-g-azo présentés Tableau E-2.

Un mélange stœchiométrique de HA_{990k}-g-(α-CD)-0,06 et de HA_{990k}-g-azo-0,17 a été réalisé avec une concentration totale en HA_{990k} de 15 g.L⁻¹, cependant, aucun signe visible de formation d'hydrogel n'a été constaté.

Afin de pouvoir travailler avec des concentrations plus élevées en azobenzène et en cyclodextrine sans augmenter celle du HA, il faudrait augmenter le DS des HA_{990k}-α-CD. La

présence d'un bras espaceur entre la fonction amine et la cyclodextrine devrait permettre de surmonter ce problème (Figure E-16-b).

Protocole de fonctionnalisation de la Mono-2-O-(p-toluenesulfonyl)- α -cyclodextrine avec l'éthylène diamine :

Le protocole est identique à celui utilisé par Liu *et coll.* sur la β -CD¹⁹. 1 g de Mono-2-O-(p-toluenesulfonyl)- α -cyclodextrine sont dissouts dans 6 mL l'éthylène diamine dans un ballon. Après dissolution totale, le mélange est porté à 75 °C pendant 4 h. Puis, après refroidissement du ballon, le produit de la réaction est précipité dans de l'acétone froid. Afin de purifier le composé obtenu, on réalise une étape de centrifugation permettant de concentrer le composé au culot d'un tube Falcon®, trois à cinq cycles successifs de redissolution dans un mélange méthanol/eau Milli-Q (on verse d'abord le méthanol puis on ajoute l'eau par petits incréments jusque dissolution du produit) et précipitation dans l'acétone. Le composé obtenu est centrifugé, rincé à l'acétone afin d'éliminer l'eau Milli-Q restante, centrifugé une nouvelle fois, laissé à sécher une nuit avant d'être récupéré. Le rendement était de 60 %.

Le composé obtenu a été analysé par RMN ¹H (Figure E-18). On retrouve tous les pics de la Mono-2-O-(p-toluenesulfonyl)- α -cyclodextrine initiale, sans pouvoir observer de distributions entre 2,5 et 3 ppm, où devraient sortir les méthylènes de la diamine. On retrouve les protons anomériques de la cyclodextrine vers 4,80 ppm, et les autres protons du cycle saccharide entre 4 et 3,36 ppm. Les fonctions hydroxyle sont visibles du fait que le solvant employé est le DMSO-d₆ (et non le D₂O). De façon très surprenante, on retrouve les pics aromatiques du groupement tosyle à 7,88 et 7,45 ppm, ainsi que son méthyle à 2,43 ppm. Cela tendrait à montrer que la réaction est un échec, cependant, il faut noter que le tosyle a une affinité pour la cavité de la cyclodextrine et qu'il peut donc être normal qu'il ne soit pas éliminé par la réaction¹⁶. Une étude a montré que l'ajout de résine échangeuse d'ion anionique (Cl⁻ ou OH⁻) permettait de retenir les tosylates (chargés négativement)²¹. Nous avons essayé de traiter le composé par de la résine anionique (Cl⁻) au cours de la redissolution dans le mélange MeOH/Milli-Q du composé pendant l'étape de purification, ce qui a effectivement permis de réduire la présence des pics aromatiques de la cyclodextrine obtenue (Figure E-19). Cependant, le rendement s'en est fortement ressenti, il n'était en effet plus que de 19 %. Cette méthode a donc été abandonnée car nous pensons pouvoir éliminer le tosylate par dialyse après le greffage de la cyclodextrine sur le HA.

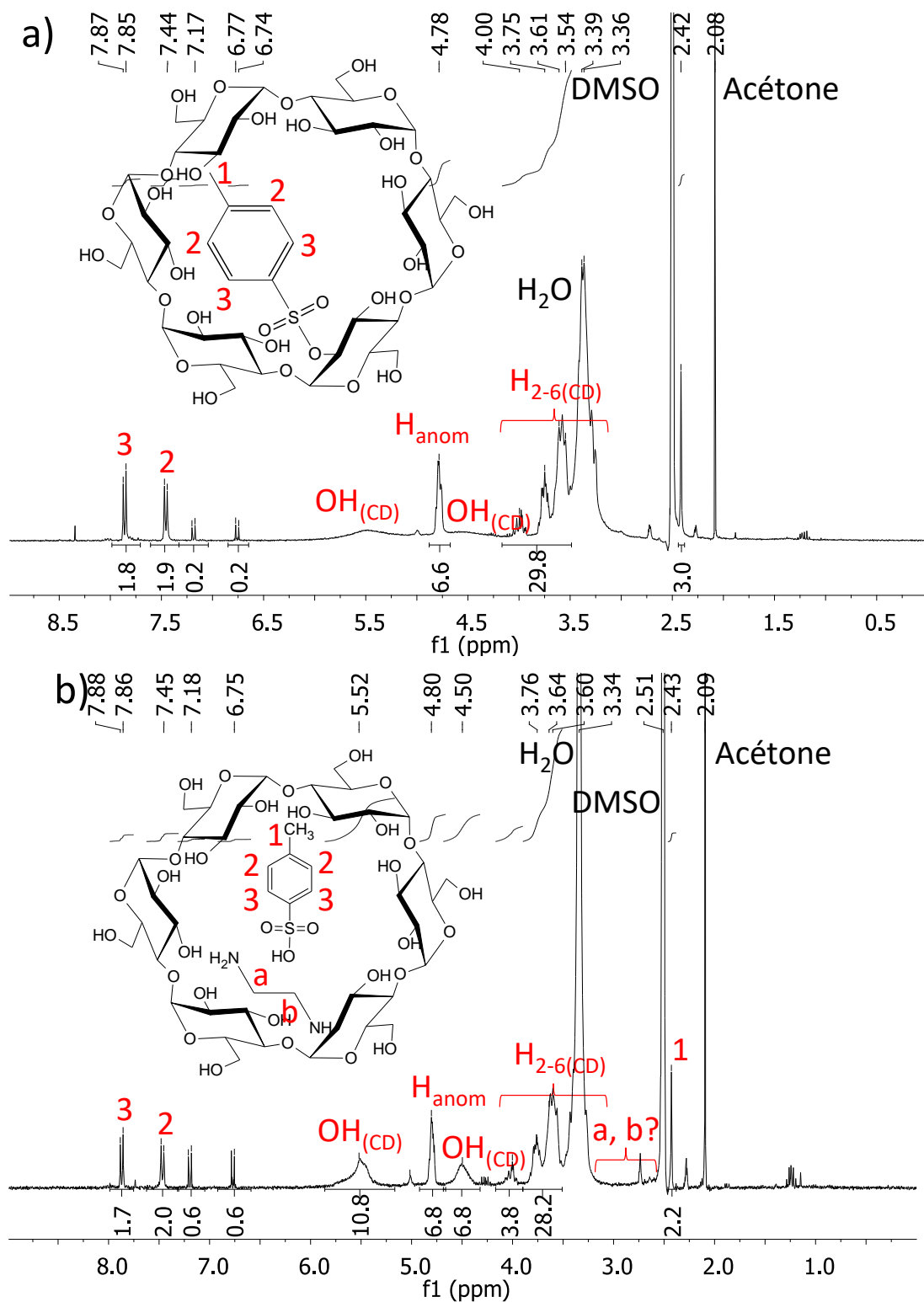


Figure E-18 Spectres RMN ¹H (solvant : DMSO-d₆) **a)** de la Mono-2-O-(p-toluenesulfonyl)-α-cyclodextrine (pics attribués en s'aidant de la référence 21) et **b)** du produit de la réaction entre la Mono-2-O-(p-toluenesulfonyl)-α-cyclodextrine et l'éthylène diamine).

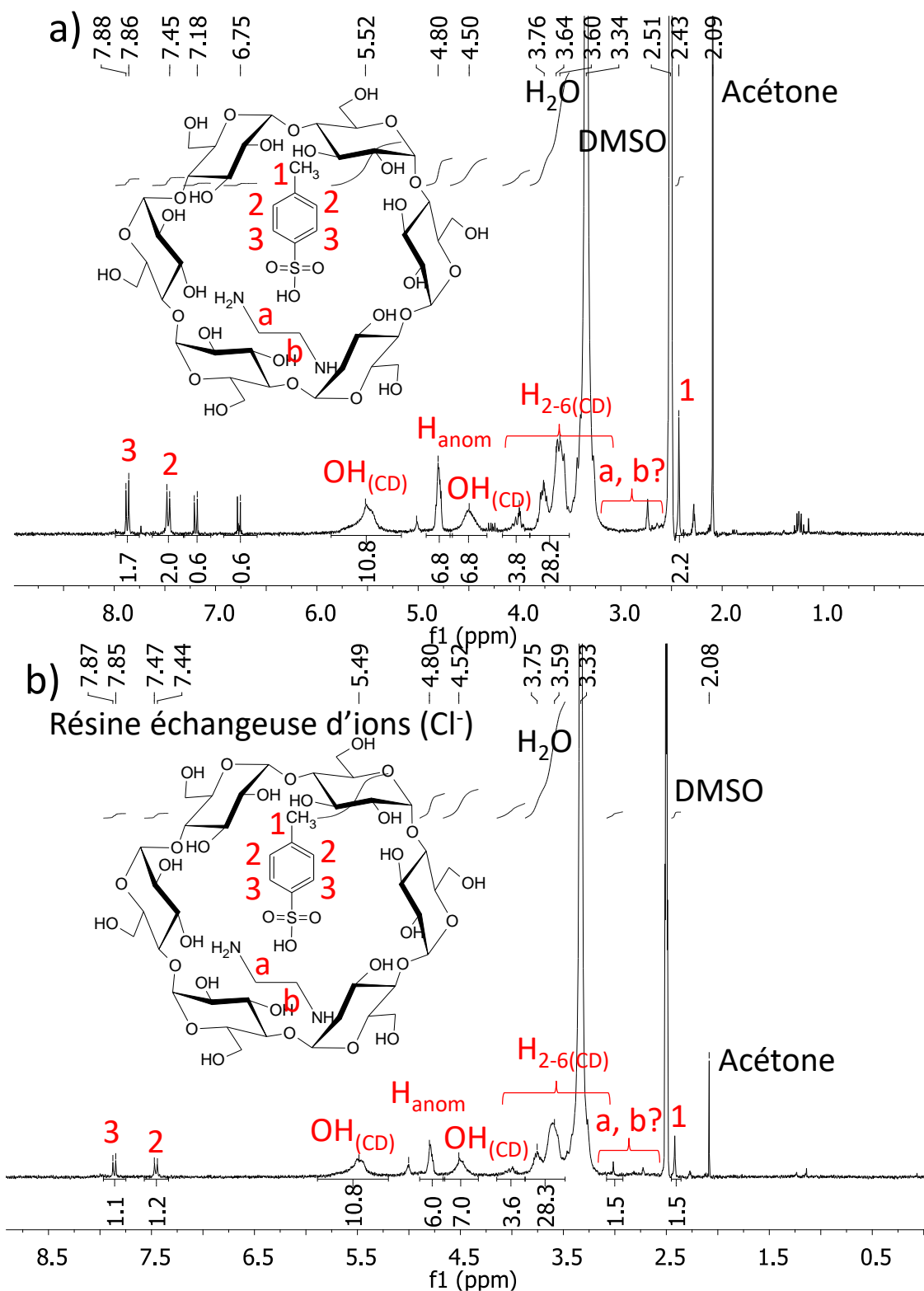


Figure E-19 Spectres RMN ^1H (solvant : DMSO- d_6) du produit de la réaction entre la Mono-2-O-(p-toluenesulfonyl)- α -cyclodextrine et l'éthylène diamine **a)** sans et **b)** avec traitement par une résine échangeuse d'ions (anionique, Cl⁻).

L'analyse élémentaire a permis de mettre en évidence la présence d'atomes d'azote au sein de la molécule formée, à hauteur de 1,8 % (2,3 % en théorie si on tient compte de la présence du tosylate). Si on fait le rapport N/C (C : 37 % contre 45 % en théorie), on obtient un résultat de 0,048, ce qui est très proche du rapport théorique de 0,051.

Le composé a également été analysé par spectroscopie de masse. Les échantillons sont séparés par chromatographie en phase liquide avant d'être introduits dans la source d'ionisation. L'ionisation a été effectuée par électrospray et l'analyse par temps de vol. Le spectre résultant est représenté Figure E-20. On repère un pic à 1015,38 Da, qui correspond à une formule brute de $C_{38}H_{67}N_2O_{29}$ qui est celle de la Mono-2-N-(2-aminoéthyl)- α -cyclodextrine. Le produit de la réaction désiré est donc bien présent. Il est cependant accompagné de plusieurs impuretés. En particulier, les pics à 973,32 Da et à 995,31 Da correspondent à l' α -cyclodextrine chargée avec respectivement un H^+ et un adduit de Na^+ . Ce produit a également été repéré au sein du spectre de masse de la Mono-2-O-(*p*-toluenesulfonyl)- α -cyclodextrine initiale. On retrouve également des pics à 990,35 Da et à 1011,28 Da qui sont difficiles à attribuer si on se base sur la structure de l' α -CD.

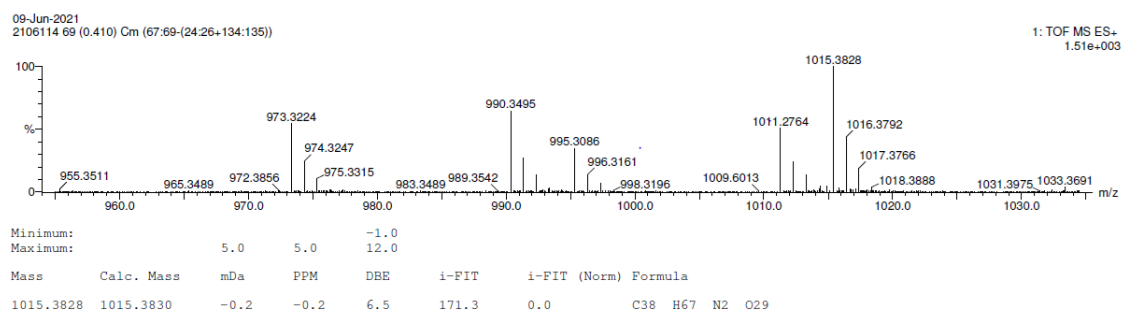


Figure E-20 Spectre de masse (ionisation par électrospray, analyseur à temps de vol) du produit de la réaction entre la Mono-2-O-(*p*-toluenesulfonyl)- α -cyclodextrine et l'éthylène diamine.

Malgré la présence d'impuretés, le produit désiré étant présent, son greffage sur le HA a été tenté en milieu aqueux sur le HA_{140k}. Le protocole est le même que pour le greffage de la 3A-Amino-3A-deoxy-(2AS,3AS)- α -cyclodextrine. Les ratios molaires $n_{CD}/n_{\text{unité HA}}$, $n_{EDC}/n_{\text{unité HA}}$ et n_{EDC}/n_{NHS} étaient respectivement de 0,5; 1 et de 0,04. Malheureusement, ni la RMN, ni la SEC/MALLS (M_n : 120 kg.mol⁻¹, M_w : 190 kg.mol⁻¹ contre respectivement 140 kg.mol⁻¹ et 210 kg.mol⁻¹ pour le HA_{140k} de départ) n'ont permis de montrer que le greffage a fonctionné.

La technique nécessite donc d'être optimisée. En particulier, la pureté de la Mono-2-*N*-(2-aminoéthyl)- α -cyclodextrine doit être améliorée en essayant d'effectuer la synthèse tosylation au laboratoire plutôt que de prendre un dérivé commercial qui n'était pas complètement pur. La réaction de l' α -CD tosylée peut être tentée avec une diamine plus longue (comme l'hexaméthylène diamine) en solvant organique.

5 Conclusion

L'acide hyaluronique a pu être fonctionnalisé avec la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide, un dérivé d'azobenzène comportant une fonction amine séparée des cycles aromatiques par un bras espaceur. Ce dérivé est en effet soluble en solution aqueuse acide, ce qui a permis l'utilisation du protocole visant à activer les fonctions acides carboxyliques du HA par le couple EDC/NHS en milieu aqueux. Une gamme de taux de greffage large a pu être atteinte en adaptant les ratios de réactifs employés, de 9 % à 29 %, et ce quel que soit le HA de départ. Les composés obtenus étaient photosensibles, avec la fonctionnalité azobenzène pouvant passer de conformation *trans* à conformation *cis* et inversement selon la longueur d'onde à laquelle elle est irradiée. La cinétique de changement conformationnel était identique à celle de la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide de départ. Les propriétés physico-chimiques des HA-*g*-azo obtenus n'ont cependant pas énormément évolué du fait du greffage : une légère baisse de la viscosité intrinsèque ainsi que du rayon hydrodynamique a pu être constatée pour un greffage supérieur à 20 %. De plus, l'état conformationnel *trans* ou *cis* n'a montré aucun impact sur ces propriétés.

Par contre, nous avons pu montrer que les greffons azobenzène conservaient leur aptitude à former des complexes d'inclusion avec l' α et la β -cyclodextrine. L' α -CD a notamment présenté la constante d'affinité la plus forte avec les HA-azo en conformation *trans*, avec une valeur d'environ 2800 L.mol⁻¹ déterminée par spectroscopie UV-visible. Il est bien établi qu'elle ne peut pas former de complexe d'inclusion avec les azobenzènes en conformation *cis*. Nous avons donc voulu exploiter cette propriété en greffant de l' α -CD sur le HA, afin de pouvoir obtenir des hydrogels par formation de complexe d'inclusion entre des HA-azo et des HA-CD. Deux stratégies reposant sur l'emploi de dérivés commerciaux ont été suivies : l'une reposant sur le greffage direct de 3A-Amino-3A-deoxy-(2AS,3AS)- α -cyclodextrine sur le HA et l'autre sur la fonctionnalisation de Mono-2-*N*-(2-aminoéthyl)- α -cyclodextrine avec de l'éthylène diamine, afin d'avoir un bras espaceur entre la fonction amine à greffer et la cyclodextrine, puis le greffage du composé obtenu sur le HA. Malheureusement, faute de temps, les réactions n'ont pu être

optimisées et les taux de greffages ainsi que la pureté des dérivés obtenus n'étaient pas suffisant pour permettre d'obtenir des HA-CD pouvant s'associer avec des HA-azo. Au vu de la constante d'affinité observée, cette méthode nécessiterait en effet d'avoir des DS au moins supérieurs à 20 % que ce soit dans le cas du HA-azo et du HA-CD et de travailler à des concentrations relativement élevées afin de favoriser la formation de complexes entre les azobenzènes et les cyclodextrines.

6 Références

1. Y. Zhao, Light-Responsive Block Copolymer Micelles, *Macromolecules* 45 (2012) 3647-3657.
2. F. Ercole, T.P. Davis, R.A. Evans, Photo-responsive systems and biomaterials: photochromic polymers, light-triggered self-assembly, surface modification, fluorescence modulation and beyond, *Polym. Chem.* 1 (2010) 37-54.
3. F. Serra, E.M. Terentjev, Effects of Solvent Viscosity and Polarity on the Isomerization of Azobenzene, *Macromolecules* 41 (2008) 981-986.
4. J.H. Kim, E. Koo, S.Y. Ju, W.D. Jang, Multimodal Stimuli-Responsive Poly(2-isopropyl-2-oxazoline) with Dual Molecular Logic Gate Operations, *Macromolecules* 48 (2015) 4951-4956.
5. S. Tamesue, Y. Takashima, H. Yamaguchi, S. Shinkai, A. Harada, Photoswitchable Supramolecular Hydrogels Formed by Cyclodextrins and Azobenzene Polymers, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 7461-7464.
6. V. Dulong, G. Mocanu, L. Picton, D. Le Cerf, Amphiphilic and thermosensitive copolymers based on pullulan and Jeffamine®: Synthesis, characterization and physicochemical properties, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1522-1531.
7. L. Chen, X. Zhao, Y. Lin, Z. Su, Q. Wang, Dual stimuli-responsive supramolecular hydrogel of bionanoparticles and hyaluronan, *Polym. Chem.* 5 (2014) 6754-6760.
8. I. Tomatsu, A. Hashidzune, A. Harada, Contrast Viscosity Changes upon Photoirradiation for Mixtures of Poly(acrylic acid)-Based α -Cyclodextrin and Azobenzene Polymers, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 2226-2227.
9. A.M. Rosales, C.B. Rodell, M.H. Chen, M.G. Morrow, K.S. Anseth, J.A. Burdick, Reversible Control of Network Properties in Azobenzene-Containing Hyaluronic Acid-Based Hydrogels, *Bioconjugate Chem.* 29 (2018) 905-913.

10. V.C. Anigbogu, A.M. de la Pena, T. Ndou, I.M. Warner, Determination of formation constants for β -cyclodextrin complexes of anthracene and pyrene using reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 64 (1992) 484-489.
11. J. Royes, C. Courtine, C. Lorenzo, N.L. de Viguerie, A.F. Mingotaud, V. Pimienta, Quantitative kinetic modeling in photoresponsive supramolecular chemistry: the case of water-soluble azobenzene/cyclodextrin complexes, *J. Org. Chem.* 85 (2020) 6509-6518.
12. W.-S. Lee, A. Ueno, Photocontrol of the Catalytic Activity of a β -Cyclodextrin Bearing Azobenzene and Histidine Moieties as a Pendant Group, *Macromol. Rapid Commun.* 22 (2001) 448-450.
13. A.M. Sanchez, R.H. de Rossi, Effect of β -Cyclodextrin on the Thermal Cis-Trans Isomerization of Azobenzenes, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 3446-3451.
14. L. Li, J. Johannes, M. Scheiger, P.A. Levkin, Design and Applications of Photoresponsive Hydrogels, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 3446-3451.
15. J.C. de Miranda, T.E.A. Martins, F. Veiga, H.G. Ferraz, Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs, *Braz. J. Pharm. Sci.* 47 (2011) 665-681.
16. S. Onozuka, M. Kojima, K. Hattori, F. Toda, The Regiospecific Mono Tosylation of Cyclodextrins, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 53 (1980) 3221-3224.
17. M. Kfoury, D. Landy, S. Fourmentin, Characterization of Cyclodextrin/Volatile Inclusion Complexes: A Review, *Molecules* 23 (2018) 1204.
18. A. Aksamija, A. Polidori, R. Plasson, O. Dangles, V. Tomao, The inclusion complex of rosmarinic acid into beta-cyclodextrin: A thermodynamic and structural analysis by NMR and capillary electrophoresis, *Food Chem.* 208 (2016) 258-263.
19. Y.-Y. Liu, X.-D. Fan, L. Gao, Synthesis and Characterization of β -Cyclodextrin Based Functional Monomers and its Copolymers with *N*-isopropylacrylamide, *Macromol. Biosci.* 3 (2003) 715-719.
20. K. Takahashi, K. Andou, S. Fujiwara, Characterization and structural determination of 3A-amino-3A-deoxy-(2AS, 3AS)-cyclodextrins by NMR spectroscopy, *Polym. J. (Tokyo, Jpn.)* 44 (2012) 850-854.
21. G. Tripodo, A. Trapani, M.L. Torre, G. Giammona, G. Trapani, D. Mandracchia, Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97 (2015) 400-416.

Conclusion générale et perspectives

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane ayant un rôle structurel au sein de la matrice extracellulaire et du liquide synovial et étant impliqué dans les procédés de prolifération et de motilité cellulaire. Il présente donc un intérêt évident pour le secteur biomédical. L'acide hyaluronique donne des solutions aqueuses très visqueuses mais ne permet pas l'établissement de réticulations physiques inter-chaîne indispensables pour former des hydrogels. Pourtant, pour un grand nombre d'applications, des structures tridimensionnelles à base d'acide hyaluronique sont de plus en plus recherchées. Si ces systèmes peuvent présenter un contrôle sol/gel stimuli répondant, le potentiel devient alors encore plus important.

L'objectif de cette thèse a donc visé à fonctionnaliser l'acide hyaluronique avec des groupements thermosensibles ou photosensibles afin de lui conférer des propriétés gélifiantes par modification de la température ou par rayonnement à des longueurs d'ondes spécifiques. Le but était d'obtenir des hydrogels physiques stimuli sensibles et réversibles, dont les réticulations sont de nature non-covalente. Plusieurs acides hyaluroniques, de masses molaires différentes, ont été utilisés au cours de l'étude. La société Givaudan nous a offert 3 lots. Leurs masses molaires moyennes en nombre respectives de 38 000 g.mol⁻¹ (HA_{38k}), 140 000 g.mol⁻¹ (HA_{140k}) et 990 000 g.mol⁻¹ (HA_{990k}) ont été déterminées par SEC/MALLS au sein de l'équipe. Leurs concentrations critiques de recouvrement C* ont également été obtenues par mesures viscosimétriques. Un autre lot d'acide hyaluronique a été acquis auprès de Sigma-Aldrich : il présentait des propriétés très proches du HA_{990k} avec en particulier une M_n de 1 200 000 g.mol⁻¹ (HA_{1200k}).

Les groupements thermosensibles étaient des polymères à LCST. Ils précipitent au-delà d'une certaine température par déshydratation (les associations polymère-polymère deviennent prépondérantes par rapport aux associations polymère-solvant). Les causes de ce phénomène associé à une augmentation de l'entropie demeurent encore mal connues. L'acide hyaluronique fonctionnalisé de cette façon présentait ainsi une structure de type copolymère en peigne, avec des chaînes latérales devenant associatives par élévation de température et pouvant ainsi former des hydrogels physiques.

Dans un premier temps, un polyétheramine commercial bien connu de l'équipe, la Jeffamine® M2005 (fourni gracieusement par la société Hunstman), a été greffé sur l'acide hyaluronique. Ce composé est un copolymère bloc de polypropylène glycol-*b*-polyéthylène glycol, avec une LCST à 14 °C et qui a la particularité d'avoir une fonction amine terminale

pouvant être utilisée pour réaliser un greffage par voie 'grafting to'. L'amine peut en particulier réagir avec le groupe acide carboxylique de l'acide hyaluronique pour former une liaison amide entre les deux polymères. Cette réaction peut être réalisée en activant au préalable l'acide carboxylique avec un agent de couplage électrophile, comme un carbodiimide, qui va constituer un groupe partant au sein du groupe ester formé. Deux voies de synthèse ont été explorées sur cette base. Elles différaient essentiellement sur le solvant de la réaction employé, qui était soit de l'eau Milli-Q, soit du *N,N*-Diméthylformamide. L'agent de couplage employé était différent selon le solvant : en milieu aqueux, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (il est l'un des rares agents compatibles avec ce milieu) en conjonction avec du *N*-hydroxysuccinimide ont été utilisés; en milieu organique l'anhydride propylphosphonique a été employé. La réaction dans l'eau a été réalisée à 4 °C, afin que la Jeffamine® M2005 soit toujours soluble. Un taux de greffage théorique d'une chaîne de polyétheramine par unité de glycosaminoglycane a été ciblé, tout en sachant que le résultat expérimental serait nettement inférieur. De nombreuses étapes de purification ont été nécessaires afin d'éliminer à la fois l'agent de couplage ainsi que les chaînes de polyétheramines libres. Des étapes de dialyse successives en milieu basique et acide ont permis l'élimination de l'EDC, tandis que des lavages dans l'acétone ont constitué la méthode la plus efficace pour extraire la Jeffamine® libre du polysaccharide, la dialyse s'étant révélée peu efficace à ce niveau. Une fois la purification achevée, les taux de greffage (déterminés par ¹H RMN) étaient compris entre 2,7 et 3,9 %, soit des valeurs relativement faibles. L'utilisation d'un excès de Jeffamine® M2005 a permis d'atteindre un DS de 4,5 %, ce qui reste limité. Ces résultats sont similaires à ce qui avait déjà été constaté par le groupe, même si la réaction est encore plus difficile à appliquer ici sur le HA que sur d'autres polysaccharides comme le carboxyméthylpullulane. Ceci est probablement dû à la structure particulièrement rigide du HA. La réaction et les étapes de dialyse ont toutes deux entraîné une dégradation des chaînes de HA de forte masse molaire (les dérivés de HA_{1200k}), ces dernières étant particulièrement sensibles aux conditions basiques. Les HA de plus faibles masses (HA_{140k} et HA_{38k}) ont été plus faiblement impactés. Toutefois, ce faible taux de greffage s'est tout de même avéré suffisant pour obtenir des hydrogels physiques par augmentation de la température, comme l'ont montré les mesures rhéologiques effectuées sur des solutions de HA-g-M2005. Ces dernières ont en effet mis en évidence le passage d'un état SOL à température ambiante à un état GEL quand on élève la température au-delà de 40°C. A l'état SOL, la valeur du module de perte G'' mesurée (énergie de déformation perdue) est supérieure au module de conservation

élastique G' (énergie de déformation stockée), ce qui est caractéristique d'une prépondérance du caractère visqueux de l'échantillon par rapport à son caractère élastique. Dans un premier temps, l'augmentation de la température entraîne logiquement une baisse de ces deux modules. A partir d'un certain seuil de température, les greffons de Jeffamine[®] commencent à s'associer ce qui se traduit par une augmentation du G' et du G'' . Les deux modules finissent par se croiser à la T_{trans} , puis G' devient supérieur à G'' pour atteindre un plateau, ce qui traduit le passage de l'échantillon à un état GEL. Les T_{trans} des dérivés de HA_{1200k} en solution dans l'eau Milli-Q à 10 g.L⁻¹ étaient respectivement de 43,7 °C (HA_{1200k}-g_(EDC)-M2005-2,7%) et de 41,5 °C (HA_{1200k}-g_(EDC)-M2005-4,5%), soit des valeurs qui se rapprochent de 37 °C mais qui demeurent encore trop élevées. Les dérivés de HA_{38k} et de HA_{140k} ont donné des solutions avec des T_{trans} nettement plus élevées, supérieures à 50 °C, malgré les concentrations ajustées à la hausse lors des mesures rhéologiques du fait de la différence de C^* des différents lots. Nous avons toutefois pu noter que l'amplitude de variation des modules était plus importante pour ces échantillons comparés aux dérivés de HA_{1200k}, ce qui est intéressant pour la constitution de systèmes injectables. La réaction en milieu organique avec le T3P[®] comme agent de couplage a d'abord nécessité de convertir le HA sous forme de sel de tétrabutylammonium (un agent de transfert de phase) afin de le rendre soluble en milieu organique. Cette conversion a été réalisée en deux étapes, la première consistant en l'acidification du HA par le biais d'une résine échangeuse d'ions et la seconde en la neutralisation de la forme acide obtenue par de l'hydroxyde de tétrabutylammonium. La réussite de la conversion a été vérifiée par RMN du proton. La SEC/MALLS a permis de montrer que cette conversion n'était pas dégradante pour le HA. La réaction en milieu organique a permis d'atteindre des taux de greffages supérieurs, de l'ordre de 8 %. Cependant, il s'est avéré que le T3P[®] pouvait induire une réticulation partielle des chaînes de HA à la manière du trimétaphosphate de sodium. Les dérivés de HA_{140k} et de HA_{1200k} fonctionnalisés de cette manière n'étaient ainsi pas entièrement solubles dans l'eau et formaient des microgels (forte rétention à la filtration notamment). Ils demeuraient toutefois thermosensibles, ce qui se traduisait par une augmentation des modules G' et G'' par élévation de la température, qui étaient multipliés par un ordre de grandeur de 8 quand on passait de 25 °C à 60 °C. Seul le HA_{38k}-g_(T3P)-M2005-8,3% a montré la présence d'une transition d'un état SOL à un état GEL réversible à 30 g.L⁻¹ dans l'eau Milli-Q avec une T_{trans} de 33,7 °C. Cet échantillon (HA₃₈) est celui sur lequel la réticulation par le T3P[®] était la moins probable, car il a la chaîne la plus courte parmi les lots employés.

Afin de mieux pouvoir ajuster les propriétés thermosensibles de nos copolymères en peigne à base de HA, il a été décidé de le fonctionnaliser avec des copolymères de polyoxazolines thermosensibles synthétisés au laboratoire, dont nous pouvons ajuster la T_{cp} en fonction de sa composition monomérique. Cette famille de polymère est en outre de plus en plus étudiée en vue de remplacer les polyéthers de glycol, dont l'innocuité est remise en cause et qui sont obtenus à partir d'époxydes toxiques. Nous avons dans un premier temps cherché à établir et valider un protocole de greffage original en une seule étape en utilisant la poly(2-méthyl-2-oxazoline), non thermosensible, mais présentant la structure la plus simple au sein des polyoxazolines. La stratégie retenue consistait à effectuer le greffage au cours d'une synthèse 'one-pot' où la chaîne de PMeOx formée serait directement terminée par la fonction acide carboxylique du HA, ce qui aboutirait à la formation d'une liaison ester. Si cette dernière est moins stable qu'une liaison amide, le grand avantage de cette réaction est qu'elle permet de supprimer une étape de synthèse, à savoir la terminaison de la chaîne PMeOx avec une fonction amine qui se serait accompagnée d'une étape de purification supplémentaire qui aurait été délicate du fait des faibles DP_s ciblés (DP : 15, 30 ou 50). La polymérisation du PMeOx a été effectuée à 70 °C dans l'acétonitrile, le *p*-méthyltoluène sulfonate étant utilisé comme amorceur. Une fois le monomère entièrement consommé après une journée de réaction, le contenu du ballon a été introduit dans une solution de TBA-HA dans le DMSO, et la réaction a été effectuée pendant une journée à 60 °C. Le HA a ensuite été reconverti sous forme de sel de sodium par addition d'une solution de NaCl dans le milieu réactionnel, puis a été précipité dans l'acétone et purifié par dialyse. A ce stade, la SEC/MALLS a montré qu'il y avait encore du PMeOx libre en grande quantité au sein de l'échantillon. L'acétone s'est en effet révélé être un mauvais solvant pour ce polymère et la dialyse a de nouveau été inefficace pour éliminer les chaînes libres malgré l'emploi de membranes de porosité appropriée *a priori*. Des lavages successifs dans l'éthanol ont permis d'extraire totalement le PMeOx libre du HA fonctionnalisé comme l'ont montré les mesures SEC/MALLS et DOSY. L'efficacité de la réaction était d'environ 10 % pour un greffon de DP_{PMeOx} de 29 lorsqu'un taux de greffage théorique de 100 % était ciblé quel que soit le lot de HA employé, ce qui était supérieur à ce qui avait été obtenu avec la Jeffamine® (de DP 35). Cette efficacité a été divisée par 2 pour des PMeOx de DP 47. Malgré l'absence de traitement en milieu basique, les dérivés de HA de forte masse molaire (HA_{990k}) ont à nouveau été dégradés comme l'ont montré les mesures SEC/MALLS. Ceux de HA_{140k} ne l'ont été que légèrement tandis que le HA_{38k} n'a quasiment pas été affecté par la réaction. Les propriétés physico-chimiques des HA_{38k}-

g-PMeOx et de HA_{140k}-*g*-PMeOx ont peu varié, tandis que les HA_{990k}-*g*-PMeOx ont vu leur viscosité intrinsèque ainsi que leurs rayons hydrodynamique et de giration diminuer du fait de la dégradation du squelette HA. Au final, la méthode s'est révélée suffisamment efficace pour envisager de l'étendre aux polyoxazolines thermosensibles et a fait l'objet d'un article.

Le système thermosensible retenu était un copolymère de 2-isopropyl-2-oxazoline et de 2-*n*-butyl-2-oxazoline. Le *PiPrOx* présente un point trouble dans l'eau supérieur à 40 °C tandis que le *PnBuOx* est non hydrosoluble. Une étude de la variation du point trouble des copolymères (de DP : 30) a été effectuée en faisant varier le ratio entre les deux monomères. Elle a mis en évidence que la T_{cp} pouvait aisément être ajustée de cette façon, avec des valeurs pour des solutions à 10 g.L⁻¹ comprises entre 11 °C (ratio *iPrOx/nBuOx* de 50/50) et 30 °C (ratio *iPrOx/nBuOx* de 87/13). Si cette T_{cp} était affectée par la concentration du copolymère, la présence ou non de sel lyotrope n'a eu aucun impact sur sa valeur. Les *PiPrOx-co-PnBuOx* ont ensuite été greffés sur le HA en utilisant le même protocole que pour le PMeOx. La réaction a présenté une efficacité similaire avec des taux de greffage d'environ 11 % pour un taux de greffage théorique de 100 %. Les HA-*g*-(*PiPrOx-co-PnBuOx*) obtenus présentaient bien des propriétés thermosensibles : leur point trouble en solution saline a été mesuré par spectroscopie UV-visible tandis que leur transition SOL-GEL a été évaluée par rhéologie. L'étude a porté sur des solutions dans le PBS de concentrations respectives de 15 g.L⁻¹, 10 g.L⁻¹ et 5 g.L⁻¹ (HA_{990k}-*g*-(*PiPrOx-co-PnBuOx*)) ou de 50 g.L⁻¹ (HA_{140k}-*g*-(*PiPrOx-co-PnBuOx*), HA_{38k}-*g*-(*PiPrOx-co-PnBuOx*)). Il y a eu une bonne corrélation entre la température à partir de laquelle la solution commençait à se troubler (augmentation de l'absorbance) et celle où les deux modules G' et G'' commençaient à augmenter. Au contraire des polyoxazolines libres, la présence ou non de sel lyotrope a eu un impact important sur l'évolution de la turbidité des échantillons : le HA_{990k}-*g*-(*PiPrOx*₁₅-*co-PnBuOx*₁₂)-0,12 présentait un point trouble particulièrement marqué dans le PBS, similaire à celui obtenu avec le copolymère libre, tandis que son absorbance a à peine augmenté avec la température quand il était dissout dans l'eau Milli-Q. Ce résultat s'explique en partie par la compétition entre les associations des groupes thermosensibles et les répulsions électrostatiques au sein du squelette HA, effectives en absence de force ionique. De même, là où tous les *PiPrOx-co-PnBuOx* étudiés présentaient des profils d'absorbance indépendants de leur composition monomérique en fonction de la température pour une même concentration (eau Milli-Q ou milieu salin NaCl 0,15 mol.L⁻¹), l'augmentation du taux d'*iPrOx* au sein du greffon (et donc de l'hydrophilie de ce dernier) s'accompagnait d'une baisse de l'augmentation de

l'absorbance dans le PBS, qui semble donc ici principalement provoquée par les interactions hydrophobes du *PnBuOx*. Pour ce qui est des propriétés rhéologiques des échantillons, plusieurs paramètres ont été comparés comme le ratio *iPrOx/nBuOx* au sein du greffon, le DS_{POx} , le DP_{POx} ou la masse molaire du HA de départ. La variation du ratio *iPrOx/nBuOx* au sein du greffon a permis un très bon contrôle de la T_{trans} (pour des échantillons de composition autrement similaire) : cette dernière augmente d'environ 1 °C lorsque la teneur en *iPrOx* du greffon est accrue de 1 %. L'augmentation du DP_{POx} et du DS_{POx} conduisent toutes deux à une diminution de la T_{trans} du fait du renforcement des associations entre greffons qui en résulte. La longueur du squelette HA impacte fortement la C^* de l'échantillon, ce qui implique qu'il faut employer des concentrations plus élevées avec les dérivés de HA_{140k} et de HA_{38k}. Il est donc plus difficile de comparer les échantillons sur cette base, cependant, on peut constater que pour un même greffon, plus le HA a une M_n élevée, plus la T_{trans} va diminuer. Les temps de relaxation des hydrogels ont été mesurés par balayage en fréquence à diverses températures. On constate qu'ils sont en fait très courts, environ 2-3 s, lorsqu'on se place à proximité de la T_{trans} . Si on se place 5 °C au-dessus de la T_{trans} , on constate que le temps de relaxation augmente très sensiblement (environ 100 s). Puis, il n'est plus possible de le mesurer à 12 °C au-dessus de la T_{trans} , où l'on peut observer des modules G' et G'' quasi indépendants de la fréquence : l'échantillon présente alors toutes les caractéristiques d'un gel. Le seuil de percolation est donc atteint bien après T_{trans} . Nous avons enfin pu constater que la transition thermique de l'échantillon était quasi-instantanée, ce qui est utile pour des applications en tant que système injectable. L'étude a donc permis de déterminer qu'il est important de cibler une T_{trans} inférieure d'au moins 12 °C à celle où l'hydrogel sera employé en ajustant la composition monomérique du greffon. Les *PiPrOx-co-PnBuOx* de DP 50 sont plus intéressants que ceux de DP 27 car ils permettent l'obtention de T_{trans} moindres malgré des taux de greffage plus faibles et ils contribuent moins à l'augmentation de la turbidité de l'échantillon. Par la suite, il peut être utile d'essayer la réaction sur des greffons encore plus longs, de DP 70 par exemple.

Dans un cadre plus prospectif, nous avons également recherché le contrôle photosensible de la transition sol/gel. Notre choix s'est porté sur le greffage d'un groupe chromophore à base d'azobenzène, pouvant passer de conformation *trans* apolaire à une conformation *cis* relativement plus polaire et inversement par irradiation UV-visible à des longueurs d'onde spécifiques (365 nm pour la transition *trans*→*cis* et 254 nm pour la transition inverse). Il a fallu sélectionner, puis modifier un dérivé commercial d'azobenzène avant de

pouvoir envisager de fonctionnaliser le HA. La chimie envisagée reste classique avec la formation d'un lien amide entre le polymère et le greffon. Pour cela un dérivé de chlorure de 4-(Phénylazo)benzoyle a ainsi été modifié en *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide par réaction avec de l'éthylène diamine. La présence d'une fonction amine dont le doublet non-liant ne peut être délocalisé sur le cycle azobenzène a permis d'envisager le greffage du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide sur le HA en milieu aqueux, par la formation d'une liaison amide promue par l'utilisation de l'EDC et du NHS comme agents de couplage. Le *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide est en effet soluble en milieu acide, car sa fonction amine y est protonée, ce qui est compatible avec cette réaction effectuée à pH 4,7. Divers taux de greffages ont été ciblés. Au final, le DS a pu être modulé de 10 % à 30 % de façon indépendante du lot de HA employé. Ces valeurs de DS ont été obtenues par dosage UV-visible (étalonnage à partir du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide), cette méthode s'étant révélée bien plus efficace que par RMN pour laquelle les spectres obtenus n'étaient pas exploitables. Le greffage a pu être confirmé par mesure SEC/MALLS, avec une réponse nette en détection UV sur le profil d'éluion du polymère. Les cinétiques de transitions *trans*→*cis* et *cis*→*trans* du *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide et des dérivés de HA (étudiées par spectroscopie UV-visible), étaient toutes du premier ordre avec des constantes de vitesse de $0,02 \text{ s}^{-1}$ (*trans*→*cis*) et de $0,04 \text{ s}^{-1}$ (*cis*→*trans*). Les HA-azobenzène obtenus devenaient insolubles en milieu acide en raison de l'amphiphilie apportée par les groupes azo et de l'extinction des répulsions électrostatiques du HA par la protonation des fonctions acide. Autrement, leurs propriétés physico-chimiques n'ont pas été fortement impactées. Afin de pouvoir obtenir des hydrogels photosensibles à partir de ces composés, on peut envisager des complexes d'inclusion entre les azobenzènes et un site hôte, en l'occurrence l' α -cyclodextrine, ces derniers ne pouvant se former uniquement quand l'azobenzène est en conformation *trans*. Après avoir déterminé une constante d'affinité d'environ $2800 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ entre les HA-*g*-azobenzène et les α -cyclodextrines, nous avons tenté de greffer de l' α -cyclodextrine sur du HA. Si le greffage de la β -cyclodextrine (moins adaptée pour l'inclusion des azobenzènes) sur le HA est maîtrisé dans la littérature, le greffage de l' α -cyclodextrine est beaucoup moins connu. Deux voies ont été tentées : la première visait à directement fonctionnaliser le HA avec de la 3A-Amino-3A-deoxy-(2AS,3AS)- α -cyclodextrine et la seconde à faire réagir au préalable de la Mono-2-*O*-(*p*-toluenesulfonyl)- α -cyclodextrine avec de l'éthylène diamine avant de la greffer sur le HA. Malheureusement, dans les deux cas, les DS obtenus ont été trop faibles pour pouvoir obtenir des hydrogels. La constante d'affinité déterminée au préalable implique en effet de travailler à

des concentrations relativement élevées en HA (environ 100 g.L⁻¹) avec des taux de fonctionnalisation d'au moins 20 % à la fois en azobenzène et en cyclodextrine pour obtenir un taux de formation de complexe de 89 % au plus (il peut être réduit par la gêne stérique entre groupement cyclodextrine sur la chaîne HA). Le greffage de l' α -cyclodextrine sur le HA doit donc être amélioré de façon significative.

Pour conclure, les dérivés de HA les plus prometteurs obtenus au cours de cette thèse pour des applications comme hydrogels physiques sont les HA-*g*-(PiPrOx-co-PnBuOx), dont la cytocompatibilité doit dorénavant être évaluée. La poursuite de l'étude s'oriente vers des applications médicales, notamment une utilisation de ces gels thermosensibles dans des systèmes injectables thermogélifiants in situ au sein des cavités d'exérèse du glioblastome dans un contexte théranostique (Projet Réseau Normand Innovant (RIN) Neuro-Onco-Chim 2021-2024).

Annexe 1 : Estimation du DS des HA-g-PMeOx impurs

Nous avons vu au chapitre D, section 2.3.3, page 198 qu'il est possible de déterminer la quantité de PMeOx libre contenue dans un échantillon de HA-g-PMeOx à partir de son chromatogramme obtenu en SEC/MALLS. Il devient alors possible de déduire de ces analyses le degré de substitution de PMeOx greffé sur le HA. Pour cela, il faut d'abord estimer la fraction massique totale (greffé et libre) du PMeOx au sein du copolymère à partir des résultats RMN des échantillons avant optimisation de la purification :

$$m\%_{PMeOxtot} = \frac{Mn_{PMeOx} \times DS_{exp}}{DS_{exp} \times (Mn_{PMeOx} + Mu_{HA} - M_H) + (1 - DS_{exp}) \times Mu_{NaHA}} \times 100 \quad (A_1)$$

Où $m\%_{PMeOxtot}$ est la fraction massique de PMeOx greffé et libre dans l'échantillon de HA-g-PMeOx analysé, DS_{exp} est le degré de substitution obtenu par RMN avec l'équation D2, M_{uHA} la masse molaire de l'unité disaccharide du HA sous forme acide ($379,3 \text{ g.mol}^{-1}$), M_H celle de l'hydrogène (1 g.mol^{-1}), M_{uNaHA} celle de l'unité disaccharide du HA sous forme de sel de sodium ($401,3 \text{ g.mol}^{-1}$) et Mn_{PMeOx} la masse molaire moyenne en nombre du PMeOx, déterminée à partir des résultats RMN avant la terminaison (Figure D-4) à partir de la relation suivante (D4):

$$Mn_{PMeOx} = M_{MeOx} \times DP_{PMeOx} + (M_{CH_3} + M_{OH}) \quad (A_2)$$

Où M_{MeOx} est la masse molaire du MeOx ($85,1 \text{ g.mol}^{-1}$), M_{CH_3} celle du groupe méthyle à l'extrémité α de la chaîne PMeOx (15 g.mol^{-1}), M_{OH} celle de la fonction hydroxyle à l'extrémité ω de ce même polymère (17 g.mol^{-1}) et DP_{PMeOx} le degré de polymérisation de la chaîne (Equation B20 page 135).

Une fois que l'on connaît les fractions massiques totale et libre du PMeOx au sein de l'échantillon, il devient possible de calculer la fraction massique greffée avec la relation suivante (D5):

$$m\%_{PMeOxréel} = \frac{m\%_{PMeOxtot} - m\%_{PMeOxlibre}}{(100\% - m\%_{PMeOxlibre})} \times 100 \quad (A_3)$$

Où $m\%_{PMeOxréel}$ est la fraction massique de PMeOx greffé au sein du HA-g-PMeOx, $m\%_{PMeOxtot}$ la fraction massique de PMeOx greffé et libre (équation D3) et $m\%_{PMeOxlibre}$ la fraction massique de PMeOx libre au sein de l'échantillon analysé (déterminé par le détecteur DRI). Le terme du numérateur sert à déterminer le pourcentage massique du PMeOx greffé au sein de l'échantillon

total (HA-g-PMeOx + PMeOx libre) et celui du dénominateur correspond au pourcentage massique de HA-g-PMeOx au sein de l'échantillon total (HA-g-PMeOx + PMeOx libre).

Il est ainsi possible de remonter au DS réel attendu ($DS_{réelatt}$) de l'échantillon avec la relation suivante (D3), qui est une adaptation de l'équation A₁1 :

$$DS_{réelatt} = \frac{m\%_{PMeOxréel} \times M_{uNaHA}}{m\%_{PMeOxréel} (M_{uNaHA} - Mn_{PMeOx} - M_{uHA} + M_H) + 100 \times Mn_{PMeOx}} \quad (D3)$$

Annexe 2 : RMN 2D du HA-g-PMeOx

Au cours du chapitre D, nous avons vu comment la spectroscopie RMN de diffusion DOSY, une méthode de RMN 2D, appliquée aux HA-g-PMeOx, permettait de confirmer que le PMeOx était bien greffé sur le HA par la présence d'une seule distribution de polymère et donc d'un seul coefficient de diffusion pour toute la structure. La mesure a été réalisée avec un spectromètre Bruker Avance III 600 MHz au sein de l'équipe de Hassan Oulyadi (COBRA, équipe analyse et modélisation). D'autres mesures de RMN 2D ont été réalisées sur cet instrument afin d'affiner la caractérisation du copolymère. Nous avons ainsi réalisé des spectres RMN 2D de type HSQC ('heteronuclear single quantum coherence spectroscopy') (Figure A2-1) ainsi que COSY (Figure A2-2) ('correlated spectroscopy') afin de vérifier si le méthylène du PMeOx relié au HA à l'extrémité ω était visible.

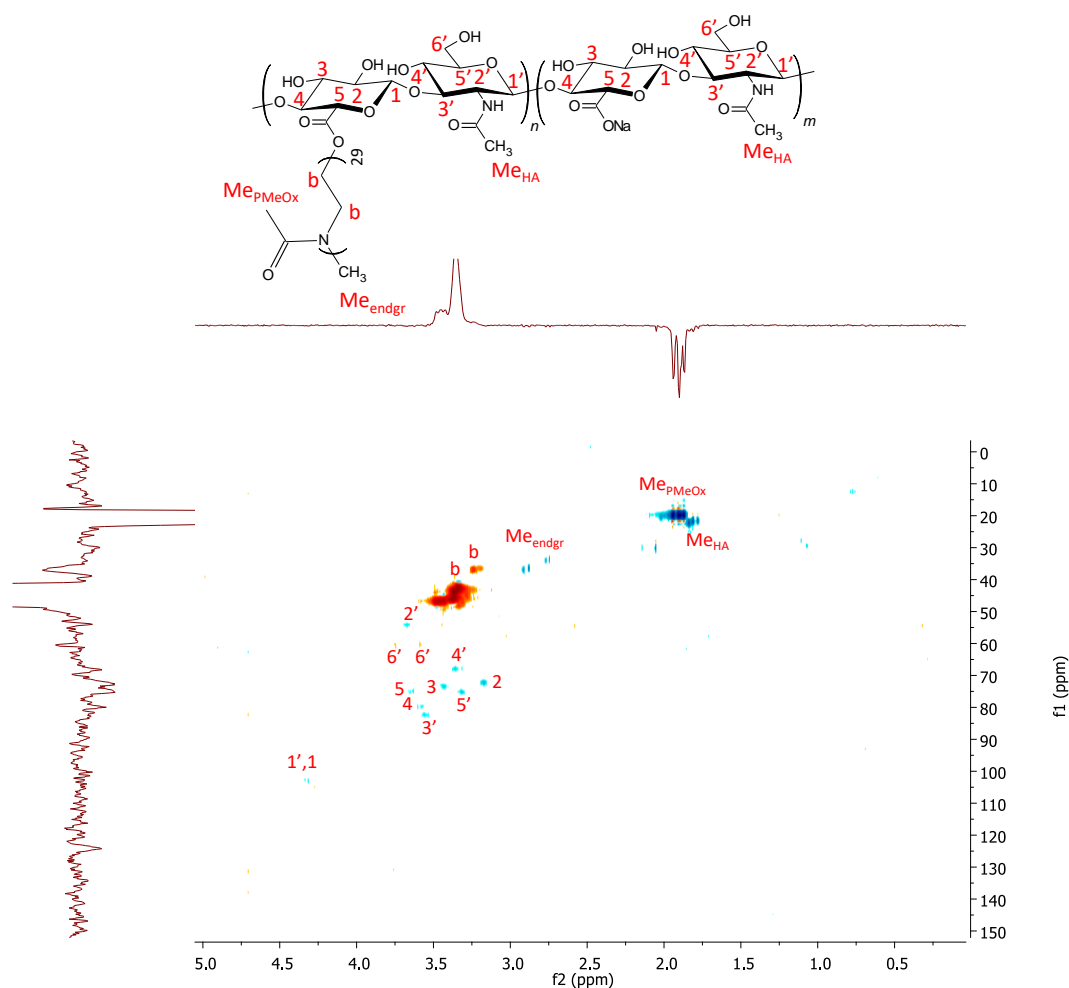


Figure A2-1 Spectre RMN 2D HSQC avec gradient écho/antiécho du HA₁₄₀-g-PMeOx₂₉-0,13 (600 MHz, D₂O, 290 K) (bleu : CH, CH₃; rouge : CH₂).

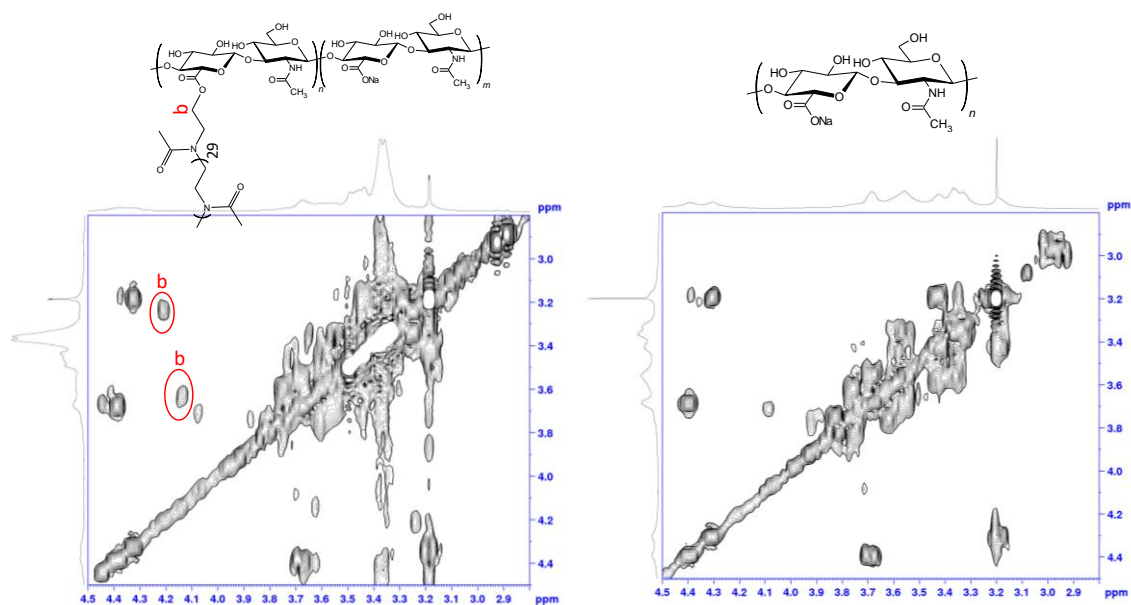


Figure A2-2 Spectre RMN 2D COSY (600 MHz, D₂O, 290 K) du HA_{140k}-g-PMeOx₂₉-0,13 (gauche) et du HA_{140k} (droite).

La HSQC vise à corrélérer les protons avec les hétéroatomes (¹³C dans notre cas) auxquels ils sont directement liés par une liaison covalente. Quant à la COSY, elle sert à identifier les couplages entre les différents protons sur un spectre 2D ¹H-¹H. Les couplages en HSQC permettent d'attribuer les pics des protons du cycle saccharide avec plus de précision en se servant des déplacements chimiques des carbones associés à l'aide de tables (ex : le δ du C_{2'} en α d'un amide est de 54 ppm) et de la littérature¹. Le gradient écho-antiécho permet de distinguer les méthylènes (pics du spectre 1D vers le haut) des méthyles et CH (pics du spectre 1D vers le bas). Par contre, aucune distribution supplémentaire pouvant correspondre à un méthylène terminal en ω n'a pu être observée. Il devrait en effet apparaître comme un triplet vers 4,2-4,1 ppm (méthylène en α de l'oxygène d'une fonction ester), mais le signal est probablement trop élargi et de trop faible intensité par rapport aux protons présents sur les unités de répétition pour être visible (Figure A2-1). La RMN COSY révèle par contre deux pics à 4,2 ppm et 4,1 ppm qui sont couplés à des protons du squelette polymère à 3,25 ppm et 3,7 ppm et pourraient correspondre au méthylène terminal (Figure A2-2). Les deux protons ne seraient donc pas équivalents, ce qui est également le cas pour ceux du méthylène en C_{6'} du HA (Figure A2-1). Cela serait une explication complémentaire sur le fait qu'ils soient compliqués à repérer.

Référence

1. T. Figueiredo, J. Jing, I. Jeacomine, J. Olsson, T. Gerfaud, J.G. Boiteau, C. Rome, C. Harris, R. Auzély-Velty, Injectable Self-Healing Hydrogels Based on Boronate Ester Formation between hyaluronic Acid Partners Modified with Benzoxaborin Derivatives and Saccharides, *Biomacromolecules* 21 (2020) 230-239.

Annexe 3 : Balayage en fréquence du HA_{990k}-g-(PiPrOx-co-PnBuOx)-0,15 à 10 g.L⁻¹ dans le PBS

La Figure A3-1 est donné en complément de la Figure D-28 (page 234) afin de montrer que le temps de relaxation (intersection G'/G'') du HA_{990k}-g-(PiPrOx-co-PnBuOx)-0,15 (T_{trans} : 24,7 °C) en solution dans le PBS à 10 g.L⁻¹ n'est pas mesurable non plus à 37 °C, tout comme on n'avait pu l'observer avec la solution à 15 g.L⁻¹.

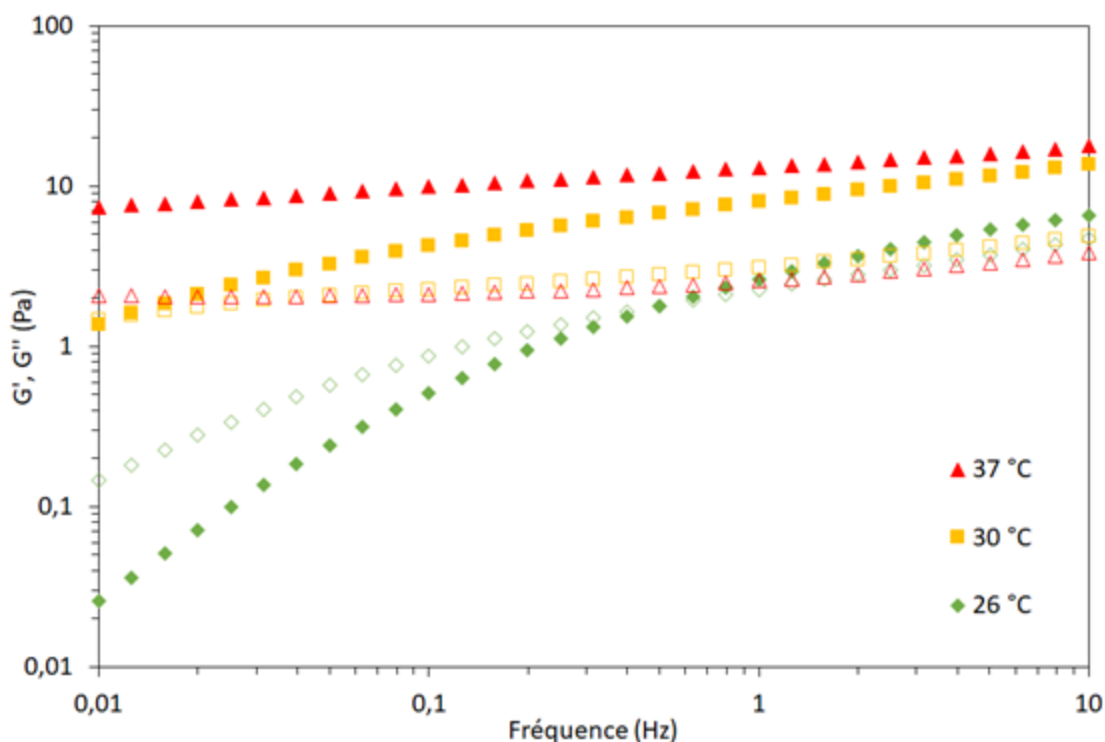


Figure A3-1 Balayage en fréquence d'une solution de HA_{990k}-g-(PiPrOx₁₈-co-PnBuOx₉)-0,15 à 10 g.L⁻¹ dans le PBS (G' : symboles pleins; G'' : symboles vides) (Stress : 0,1 Pa).

Annexe 4 : Détail du calcul de la concentration molaire en azobenzène d'une solution de HA-g-azo

Cette annexe donne le détail du calcul de la concentration molaire en azobenzène d'une solution de HA_{140k}-g-azo-0,22 de concentration massique de 0,125 g.L⁻¹ (voir chapitre E, section 4.1, page 266).

On détermine d'abord la masse molaire moyenne M_{umoy} de l'unité du HA_{140k}-g-azo-0,22 à partir de la formule suivante :

$$M_{umoy} = DS \times M_{uHA-g-azo} + (1 - DS) \times M_{uNaHA}$$

Où DS est le taux de greffage d'azobenzène sur le HA (0,22) $M_{uHA-g-azo}$ est la masse molaire de l'unité HA sur laquelle a été greffée la *N*-(2-aminoéthyl)-4-azoamide (629,6 g.mol⁻¹) et M_{uNaHA} celle de l'unité HA sous forme de sel de sodium (401,3 g.mol⁻¹). On obtient une valeur de 451,9 g.mol⁻¹.

On peut alors calculer la concentration molaire de HA_{140k}-g-azo-0,22 et en déduire celle en azobenzène en utilisant la formule suivante :

$$C_{azo} = \frac{C_{massHA-g-azo}}{M_{umoy}} \times DS$$

Où C_{azo} est la concentration molaire en azobenzène et $C_{massHA-g-azo}$ est la concentration massique en HA-g-azo (0,125 g.L⁻¹). On obtient un résultat de 6,1 x 10⁻⁵ mol.L⁻¹.

Annexe 5 : Communications et articles

Communications :

- 1) 40^{ème} journées GFP Grand-ouest – 23-24 Mai 2019, Orléans – Présentation orale, Hydrogels adaptatifs Thermo-sensibles à base d'acide hyaluronique (HA) : Fonctionnalisation et transition sol-gel.
- 2) JEDNC 2019 – July, 5th 2019, Caen – Poster, Synthesis and Characterisation of hyaluronic acid based thermo-responsive hydrogels
- 3) 47^{ème} JEPO 2019 – 29 Septembre-4 Octobre 2019, Aérocampus de Latresnes – Présentation orale, Synthèse et caractérisation d'hydrogels thermo-sensibles à base d'acide hyaluronique.
- 4) 1st french-Japanese Symposium on Polymer Science – January 29th - 31st 2020, Montpellier, France – Oral Presentation, Functionalization of hyaluronic acid with LCST moieties in aqueous or organic solvent and characterization of the subsequent thermo-responsive hydrogels.
- 5) JEDNC 2020 – November 26th - 27th 2020, Rouen – Oral Presentation, Synthesis and Characterisation of hyaluronic acid based thermo-responsive hydrogels
- 6) GFP 2021 – November 15th - 19th 2021, Lyon – Poster, Elaboration d'hydrogels à base d'acide hyaluronique aux propriétés thermosensibles contrôlées

Articles :

- 1) M. Madau, D. Le Cerf, V. Dulong, L. Picton, HA functionalization with Jeffamine® M2005: a comparison of the thermo-responsiveness properties of the hydrogel obtained through two different synthesis route, Gels 7 (2021) 88.
- 2) M. Madau, G. Morandi, C. Rihouey, V. Lapinte, H. Oulyadi, D. LE Cerf, V. Dulong, L. Picton, A mild and straightforward one-pot hyaluronic acid functionalization through termination of poly(2-alkyl-2-oxazoline), Polymer 230 (2021) 124059.
- 3) M. Madau, G. Morandi, V. Lapinte, D. LE Cerf, V. Dulong, L. Picton, Thermo-responsive hydrogels from hyaluronic acid functionalized with poly(2-alkyl-2-oxazoline) copolymers with tuneable transition temperature, Polymer Article soumis.

Hydrogels adaptatifs stimuli-sensibles (température et lumière) à base d'acide hyaluronique

Résumé

Les hydrogels sont des matériaux mous constitués d'un réseau de polymères hydrophiles réticulés capables d'absorber et de retenir un volume important d'eau. Ils trouvent de nombreuses applications dans le domaine biomédical, ce qui nécessite l'emploi de matériaux biocompatibles. Dans cette optique, l'acide hyaluronique (HA), un glycosaminoglycane de la matrice extracellulaire, est un candidat prometteur du fait de sa biocompatibilité et de la présence de nombreux groupes fonctionnels sur son unité disaccharide permettant de le réticuler pour obtenir des hydrogels. Ce manuscrit porte donc sur sa fonctionnalisation par des groupements stimuli-sensibles afin de lui permettre de former des hydrogels physiques en modifiant son environnement physico-chimique. Dans un premier temps, des hydrogels thermosensibles seront obtenus par le greffage de polymère à LCST. La fonctionnalisation sera réalisée dans un premier temps avec un polyétheramine commercial, la Jeffamine[®] M2005, qui a permis l'obtention de dérivés capables de former des hydrogels par élévation de la température, comme l'ont montré des mesures rhéologiques. Cependant, les transitions obtenues ont été observées à des températures plus élevées que 37 °C. Par la suite, un copolymère de Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-co-Poly(2-*n*-butyl-2-oxazoline), synthétisé au laboratoire a été greffé sur l'acide hyaluronique selon une stratégie « one-pot ». L'ajustement possible de la composition du greffon a permis d'obtenir un meilleur contrôle des propriétés thermosensibles des hydrogels, avec une transition pouvant être inférieure à 37 °C. Finalement, une fonctionnalité azobenzène photosensible sera greffée sur l'acide hyaluronique. Elle peut passer d'une conformation *trans* apolaire à une conformation *cis* légèrement polaire et inversement par irradiation UV-visible à des longueurs d'ondes spécifiques. Leur inclusion sélective au sein des cavités d' α -cyclodextrine (α -CD), uniquement possible en conformation *trans* sera étudiée, ainsi que la possibilité de former des hydrogels en mélangeant les HA-azobenzène avec du HA fonctionnalisé avec de l' α -CD.

Mots clés : hydrogels physiques, acide hyaluronique, Jeffamine[®] M2005, polyoxazolines, azobenzène

Abstract

Hydrogels are soft materials made of a cross-linked hydrophilic polymer able to swell and to absorb a large amount of water. They are particularly applied in the biomedical field, which requires the use of biocompatible materials. Hyaluronic acid (HA), a glycosaminoglycan from the extracellular matrix, is a promising choice because of its biocompatibility and its numerous functional groups, which allow its cross-linking in order to obtain a hydrogel. This manuscript will therefore deal with its functionalization with stimuli-responsive moieties to achieve physical hydrogels by modifying its physico-chemical environment. Firstly, thermo-responsive hydrogels will be obtained by grafting polymers displaying a LCST onto hyaluronic acid. It will be realised first with a commercial polyetheramine, Jeffamine[®] M2005, which resulted in derivatives able to undergo a transition towards a hydrogel by raising the temperature, as evidenced by rheological measurements. However, the transitions were taking place above 37 °C. Therefore, the grafting of a Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)-co-Poly(2-*n*-butyl-2-oxazoline) synthesized in the lab was attempted through a one-pot reaction scheme. The tuning of the monomeric composition of the graft allowed a much better control of the hydrogel's thermo-responsiveness, with transitions below 37 °C becoming achievable. Finally, a photo-responsive azobenzene moiety was also grafted on hyaluronic acid. Azobenzenes are able to shift from *trans* to *cis* conformation through exposure to UV-visible light of specific wavelengths. Their selective inclusion within α -cyclodextrin (α -CD), only possible with the *trans* conformation, will be evaluated as well as the possibility to design photo-responsive hydrogels by mixing HA-azobenzene with HA functionalized with α -CD.

Keywords: physical hydrogels, hyaluronic acid, Jeffamine[®] M2005, polyoxazolines, azobenzene