



HAL
open science

Exploration de la biodiversité microbienne marine pour la production de polyhydroxycanoates et étude de leur potentiel pour l'élaboration de nouveaux biomatériaux visibles en Imagerie par Résonance Magnétique

Marion Le Gal

► To cite this version:

Marion Le Gal. Exploration de la biodiversité microbienne marine pour la production de polyhydroxycanoates et étude de leur potentiel pour l'élaboration de nouveaux biomatériaux visibles en Imagerie par Résonance Magnétique. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2021. Français. NNT : 2021BRES0059 . tel-03651517

HAL Id: tel-03651517

<https://theses.hal.science/tel-03651517>

Submitted on 25 Apr 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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du Littoral
Spécialité : *Microbiologie*

Par

Marion LE GAL

Exploration de la biodiversité microbienne marine pour la production de polyhydroxycanoates et étude de leur potentiel pour l'élaboration de nouveaux biomatériaux visibles en Imagerie par Résonance Magnétique.

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 12 juillet 2021

Unités de recherche :

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E - UMR6197) Ifremer Plouzané
Institut de Chimie des Matériaux de Paris-Est (ICMPE – UMR7182) CNRS Thiais

Rapporteurs avant soutenance :

Ridha MOSRATI

Professeur

Université de Caen (UNICAEN) / ABTE

Benjamin NOTTELET

Professeur

Université de Montpellier (UM) / IBMM

Composition du Jury :

Claire HELLIO

Professeur (Présidente du Jury)

Université de Bretagne Occidentale (UBO) / LEMAR

Ridha MOSRATI

Professeur (Rapporteur)

Université de Caen (UNICAEN) / ABTE

Benjamin NOTTELET

Professeur (Rapporteur)

Université de Montpellier (UM) / IBMM

Etienne PAUL

Professeur (Examinateur)

Université de Toulouse (INSA) / TBI

Valérie LANGLOIS

Professeur (Co-directeur de thèse)

Université de Paris Est Créteil (UPEC) / ICMPE

Christelle SIMON-COLIN

Cadre de Recherche (Directeur de thèse)

Ifremer, Plouzané / LM2E

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E) de Brest, ainsi qu'à l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE) de Thiais. Ainsi, je tiens à remercier Mohamed JEBBAR et Didier FLAMENT, directeurs du LM2E, ainsi que Daniel GRANDE directeur de l'ICMPE, pour m'avoir accueillie au sein de leurs établissements.

Je souhaite remercier Benjamin NOTTELET, Professeur de l'Université de Montpellier et Ridha MOSRATI, Professeur de l'Université de Caen d'avoir accepté de rapporter ce travail ainsi que Claire HELLIO, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale et Etienne PAUL, Professeur à l'Université de Toulouse, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) et la Région Bretagne pour le soutien financier de ce projet de thèse. Je remercie également les membres de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Mer et du Littoral (EDSML) pour m'avoir accompagnée tout au long de ce doctorat.

Je remercie très chaleureusement mes directrices de thèse Christelle SIMON-COLIN et Valérie LANGLOIS pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir accompagnée tout au long de ce projet de thèse. Merci à vous pour vos conseils constructifs et enrichissants, qui m'ont aidée à prendre le recul nécessaire. Merci pour votre soutien et votre compréhension.

Merci à Estelle RENARD pour sa disponibilité, sa bonne humeur quotidienne, ses conseils et sa bienveillance. Je remercie également Karine REHEL, Solène CONNAN et Géraldine ROHMAN d'avoir participé à mon comité de suivi individuel tout au long de la thèse.

Un grand merci aux personnes qui m'ont particulièrement aidée et conseillée lors des expérimentations, Raphaël BRIZARD pour me dépanner avec un bioréacteur capricieux, Pierre-Yves LE GAC pour les analyses en DSC. Merci à l'ensemble du laboratoire EM3B de l'IFREMER de Nantes pour leur accueil, et particulièrement à Corinne SINQUIN et Laetitia MARCHAND pour leur aide lors des fermentations en grands volumes. Merci à Laurent MICHELY pour l'impression 3D, Éric LEROY pour les analyses en TEM, Remy PIRES pour le MEB-EDX, Agustín RIOS DE ANDA pour la RMN solide et la DSC modulée. Merci également à Benoit

LARRAT pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire Neurospin (CEA-Saclay), de m'avoir conseillée et accompagnée pour les analyses de mes échantillons en IRM.

Merci aux membres du LM2E de l'IFREMER à Brest, les permanents, doctorants et stagiaires qui ont croisé mon chemin et qui ont permis une ambiance de travail agréable dans un cadre qui l'est tout autant. Merci en particulier aux participants des activités de cohésions en dehors du laboratoire. Qu'il s'agisse d'aller courir sur l'heure de midi, de faire la tournée des bars brestois, les apéros à Trégana ou au Dellec et les sessions escalade : Yang, Seb, Florian, Clarisse, Sarah, Jordan, Elodie, Maurane, Marc, Blandine, Maxime, Ashley, Gaele et Johanne. Merci d'avoir rendu mon séjour à Brest si plaisant alors que je ne connaissais personne en arrivant.

Je remercie les membres de l'ICMPE à Thiais, ceux qui ont contribué au quotidien à la bonne ambiance, au soutien technique, aux conseils et en particulier les doctorants et post-doc pour leur accueil. Ce n'est pas évident de débarquer en cours de route dans un nouveau laboratoire mais j'ai eu la chance de bénéficier d'un accueil des plus chaleureux, et d'avoir pu m'intégrer dans les meilleures conditions possibles. Merci à Fannie, Louise, Laura, Pauline, Viera, Nour, Bao, Lucie, Fanny, avec une pensée particulière pour Audrey, pour avoir partagé les expériences impliquant du PHOU pas toujours très coopératif et pour m'être venue en aide dès que je cherchais un ustensile ou un produit dans le labo. Merci en particulier à Maxime, Fannie, Louise, Agustín et Benoit pour les activités en dehors du labo : les footings, les sessions d'escalade, sans oublier la bière de récup qui m'a permis de ne pas me sentir trop dépaysée malgré le changement de décor.

Pour leur soutien, leur bonne humeur et les festivités, je remercie bien évidemment mes amis de longue date : mes chères suricates Johan, Lolita et Aymeric, Lauranne et Sylvain, Violaine et Priscaël, Arthur et Alice. Merci d'avoir été là déjà bien avant, de m'avoir supportée pendant, et d'être toujours présents après la thèse. Même si la distance ne nous permet pas toujours de se voir régulièrement, c'est à chaque fois un vrai plaisir de vous retrouver et de sortir un peu la tête du contexte de la thèse. Merci au groupe des irréductibles de la Taverne depuis Lorient : Margot, Victor, Marina et Annaïg toujours présents aux rendez-vous, pour trinquer ou pour papoter. Merci à Marion, à mes côtés depuis des années pour se raconter

nos vies autour d'un verre avec vue mer. Un grand merci à Laora pour la bouffée d'air frais de la montagne, les bons conseils, les heures au téléphone à se raconter nos péripéties de thèse.

Bien sûr, un immense merci à ma famille pour m'avoir toujours soutenue jusque dans les moments de doutes, pour m'avoir accompagnée et cru en moi. Merci à mes parents qui m'ont toujours encouragée, mes sœurs toujours à l'écoute, et à mes adorables petits neveux et leurs sourires inégalables.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	14
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
I.1 Le monde des bioplastiques	20
I.2 Les Polyhydroxyalcanoates	24
I.2.1 Présentation des polyhydroxyalcanoates	24
I.2.2 Biosynthèse des polyhydroxyalcanoates	25
I.2.2.1 Biosynthèse des PHA _{SCL}	27
I.2.2.2 Biosynthèse des PHA _{MCL}	28
I.2.2.3 Granules de PHA	31
I.2.2.4 Extraction des PHA.....	32
I.2.3 Propriétés des Polyhydroxyalcanoates	33
I.2.3.1 Biodégradation.....	33
I.2.3.2 Biocompatibilité	36
I.2.3.3 Propriétés mécaniques	37
I.2.4 Applications des polyhydroxyalcanoates	39
I.2.4.1 Emballage.....	39
I.2.4.2 Agriculture	41
I.2.4.3 Domaine biomédical	42
I.2.5 Biomatériaux et principe de théranostique	46
I.3 Les biomatériaux visibles en Imagerie par Résonance Magnétique	48
I.3.1 Principe de l'IRM.....	48
I.3.1.1 Agents de contraste utilisé en IRM	51
I.3.2 Biomatériaux à base de polyesters biodégradables visibles par IRM	54
I.3.3 Développement de l'IRM du fluor	58
I.4 Conclusion	60
I.5 Références bibliographiques	62

CHAPITRE II : PRODUCTION DE POLYHYDROXYALCANOATES FONCTIONNALISABLES A PARTIR DE LA BIODIVERSITE BACTERIENNE MARINE.....	76
II.1 Introduction	78
II.2 Matériels & Méthodes	79
II.2.1 Création d'une collection de travail	79
II.2.2 Production de PHA.....	79
II.2.2.1 Enrichissement cellulaire	79
II.2.2.2 Production des PHA	80
II.2.3 Extraction et purification des PHA	81
II.2.3.1 Extraction.....	81
II.2.3.2 Purification.....	81
II.2.4 Résonance Magnétique Nucléaire ¹ H et ¹³ C	84
II.2.5 Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CGSM)	84
II.2.6 Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier – Réflectance Totale Atténuée (FTIR-ATR)	85
II.2.7 Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES)	86
II.2.8 Analyse Enthalpique Différentielle (AED).....	86
II.3 Résultats et discussion	88
II.3.1 Production de Polyhydroxyalcanoates : choix du couple souche bactérienne / substrat carboné.....	88
II.3.1.1 Suivi des cultures par microscopie optique à contraste de phase	89
II.3.1.1.a Phase d'enrichissement cellulaire	89
II.3.1.1.b Phase de production de PHA	89
II.3.1.2 Influence du substrat carboné et des conditions de culture sur la production de PHA .	92
II.3.2 Caractérisation des PHA.....	96
II.3.2.1 Analyse de la structure chimique des PHA par FTIR-ATR	96
II.3.2.2 Caractérisation de la structure chimique par RMN ¹ H et ¹³ C	99
II.3.2.3 Détermination de la composition monomérique des PHA par CGSM.....	106
II.3.2.4 Localisation des insaturations au sein des PHA par CGSM.....	112
II.3.2.5 Détermination de la masse molaire par CES	115
II.3.2.6 Détermination des propriétés thermiques par AED.....	116
II.4 Conclusion	119

II.5 Références bibliographiques	121
CHAPITRE III : NANOCAPSULES DE POLY(3-HYDROXYALCANOATE) AMPHIPHILES ET PERFLUOREES POUR L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE ¹⁹F	126
Présentation de l'article.....	128
III.1 Abstract.....	132
III.2 Introduction	132
III.3 Materials and methods.....	134
III.3.1 Materials	134
III.3.2 PHA ₍₇₂₎ U ₍₂₈₎ biosynthesis	134
III.3.3 PEG-SH synthesis	135
III.3.4 Synthesis of PHAU-g-(F)	136
III.3.5 Synthesis of PHA-g-(F ; PEG)	136
III.3.6 Polymer characterization	136
III.3.7 Preparation of nanoparticles	137
III.3.8 Nanoparticles characterization	137
III.3.9 ¹ H/ ¹⁹ F MRI Imaging	138
III.4 Results and discussion	138
III.4.1 PHAU production	138
III.4.2 PHA-g-(F; PEG) synthesis from PHAU.....	139
III.4.3 Synthesis and characterization of the nanoparticles	145
III.4.4 <i>In vitro</i> ¹⁹ F NMR	148
III.5 Conclusion	149
III.6 References	150

CHAPITRE IV : SYNTHÈSE DE POLYHYDROXYALCANOATE FLUORÉ À PARTIR DE BIORESSOURCES MARINES COMME REVÊTEMENT DE BIOMATÉRIAU	156
Présentation de l'article.....	158
IV.1 Abstract	162
IV.2 Introduction.....	162
IV.3 Materials and methods.....	164
IV.3.1 PHA ₍₇₂₎ U ₍₂₈₎ biosynthesis	164
IV.3.2 Synthesis of PHA-g-C ₈ F ₁₇	165
IV.3.3 Polymer characterization.....	166
IV.3.4 Differential Scanning Calorimetry.....	166
IV.3.5 Hahn echo measurements.....	167
IV.3.6 3D printing.....	167
IV.3.7 SEM-EDX characterization	168
IV.4 Results and discussion	168
IV.4.1 PHAU production.....	168
IV.4.2 Synthesis of PHA-g-C ₈ F ₁₇ and characterization	169
IV.4.3 Fluorinated polyhydroxyalkanoate PHA-g-(C ₈ F ₁₇) as biomaterial coating for MRI detection.....	180
IV.5 Conclusion	184
IV.6 References.....	186
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	191

Liste des abréviations

ΔH_m	Enthalpie de fusion
ACP	Acyl carrier protein
AED (DSC)	Analyse Enthalpique Différentielle (Differential Scanning Calorimetry)
BSTFA	Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
CES (SEC)	Chromatographie d'exclusion stérique (Size exclusion chromatography)
CGSM	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CPG (GPC)	Chromatographie par perméation de gel (Gel permeation chromatography)
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic light scattering)
DMDS	Diméthyldisulfide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDX	Energie dispersive de rayons X
EPS	Exopolysaccharide
FDA	Food and drug administration
FTIR-ATR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier réflectance totale atténuée
GO	Oxyde de graphite (Graphite oxide)
HA	Hydroxyapatite
IC	Indice de cristallinité
IP (PI)	Indice de polydispersité (Polydispersity index)
IRM (MRI)	Imagerie par résonance magnétique (Magnetic resonance imaging)
MCS	Masse de cellules sèches
MEB (SEM)	Microscopie électronique à balayage (Scanning electron microscopy)
MET (TEM)	Microscopie électronique en transmission (Transmission electron microscopy)
Mn	Masse molaire moyenne en nombre
MOF	Metal organic framework
Mw	Masse molaire moyenne en en masse
P3HB	Poly(3-hydroxybutyrate)
PA	Poly(amide)
PBAT	Poly(éthylène adipate téréphtalate)
PBS	Poly(butylène succinate)
PBSA	Poly(butylene succinate-co-butylene adipate)
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEGMA	Méthacrylate de poly(éthylène glycol)
PEHD	Poly(éthylène haute densité)
PET	Poly(téréphtalate d'éthylène)
PFC	Perfluorocarbure
PFDT	Perfluorodécane-thiol
PFOB	Broure de perfluorooctyle
PFPE	Perfluoropolyéther
P3HB	Poly(3-hydroxybutyrate)
P4HB	Poly(4-hydroxybutyrate)
PHA	Poly(hydroxyalcanoate)
PHAM _{MCL}	Poly(hydroxyalcanoate) à moyennes chaînes (medium chain length)
PHAS _{SCL}	Poly(hydroxyalcanoate) à courtes chaînes (short chain length)

PHAU	Poly(hydroxyalcanoate) insaturé (unsaturated poly(hydroxyalkanoate))
PHBHHx	Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate)
PHBHV	Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate)
PHHx	Poly(hydroxyhexanoate)
PHO	Poly(hydroxyoctanoate)
PHOU	Poly(hydroxyoctanoate-co-hydroxyundécénoate)
PHV	Poly(hydroxyvalérate)
PLA	Poly(acide lactique) (poly lactic acid)
PLGA	Poly(acide lactique-co- acide glycolique) (Polylactic-co-glycolic acid)
PP	Poly(propylène)
PTT	Poly(téréphtalate de triméthylène)
PVC	Poly(chlorure de vinyle) (polyvinyl chloride)
RMN (NMR)	Résonance magnétique nucléaire (Nuclear magnetic resonance)
SPIO	Oxyde de fer superparamagnétique (Superparamagnetic iron oxide)
Tg	Température de transition vitreuse (Glass temperature)
THF	Tétrahydrofurane
Tm	Température de fusion (Melting temperature)
TMSi	Iodure de triméthylsilyle
USPIO	Oxyde de fer superparamagnétique ultrapetite (Ultrasmall superparamagnetic iron oxide)
UTE	Ultrashort time echo
ZTE	Zero time echo

INTRODUCTION GENERALE

Le plastique est un terme générique communément utilisé pour désigner les matériaux polymères usuellement dérivés des produits pétrochimiques à partir de combustibles fossiles. L'utilisation de ces plastiques pétrosourcés est de plus en plus remise en question en raison de la raréfaction des ressources fossiles et des problèmes liés à l'accumulation de produits non biodégradables dans l'environnement. En réponse à cette problématique grandissante, le développement de polymères durables issus de ressources renouvelables, et qualifiés de « bioplastiques », a particulièrement suscité l'intérêt au cours des dernières décennies. Parmi eux, les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont des biopolymères produits par de nombreuses bactéries comme réserve intracellulaire de carbone et d'énergie. Les PHA sont les seuls bioplastiques combinant à la fois les caractéristiques biosourcés, biodégradables et biocompatibles, ils présentent donc un intérêt majeur pour nos sociétés modernes. De plus, les PHA sont d'excellents candidats pour des applications dans le domaine biomédical où ils sont déjà utilisés en tant que support résorbable dans le cadre de l'ingénierie tissulaire (prothèses, valves cardiaques, stents...), la régénération tissulaire ou pour élaborer des systèmes de libération contrôlée de principes actifs et sont déjà commercialisés en tant que fils de suture résorbables. Parmi les différentes techniques d'imagerie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est la technique la plus couramment étudiée et de nombreuses recherches ont été consacrées pour assurer à la fois le diagnostic, le suivi des maladies et le suivi postopératoire. Cependant, les biopolymères utilisés pour les applications biomédicales ne sont pas visualisables par IRM. De ce fait, l'association d'un agent de contraste à un biopolymère permet d'une part la visualisation des biomatériaux afin d'en assurer le suivi et l'implantation, son intégration tissulaire ainsi que pour suivre le processus de dégradation dans le cas de polymères résorbables. D'autre part, dans le cas d'administration ciblée de médicaments, l'association d'agents de contraste à la matrice de biopolymère apporte la possibilité de visualiser l'adressage au plus près des cellules cibles. Ce concept qui vise à développer des biomatériaux à double usage permet de coupler diagnostic et traitement est appelé « théranostique », contraction de thérapeutique et diagnostic. La mise en œuvre de nouveaux dispositifs médicaux à base de PHA associés à un agent de contraste visible en IRM constitue donc un concept tout à fait innovant.

Selon la longueur de la chaîne latérale, on distingue les PHA à courte chaîne (PHA_{SCL}) et les PHA à moyenne chaîne (PHA_{MCL}). La structure du PHA dépend à la fois de la souche bactérienne qui le synthétise et de la source de carbone qui lui est fournie. Ainsi, dans certaines conditions de culture, il est possible d'induire l'incorporation de groupes fonctionnels au sein des chaînes latérales. Ceci permet d'envisager des fonctionnalisations chimiques, notamment des greffages de molécules actives. De tels PHA_{MCL} n'étant pas disponibles commercialement, la production de PHA_{MCL} de structure contrôlée est donc particulièrement intéressante.

L'objectif principal de ce projet de thèse est l'étude des potentialités des PHA fonctionnalisables en association à des agents de contraste pour une application en Imagerie par Résonance Magnétique.

Le premier chapitre de cette thèse sera consacré à une revue bibliographique dans laquelle nous présenterons les PHA, leur biosynthèse et leurs propriétés ainsi que les principaux domaines d'application dans lesquels ils sont utilisés. La technique de l'IRM sera également décrite ainsi que le développement de biomatériaux visibles par IRM.

Dans le deuxième chapitre, nous avons cherché à produire une large gamme de PHA_{MCL} insaturés à partir de la biodiversité bactérienne marine. La caractérisation physicochimique des PHA obtenus et l'optimisation des conditions de fermentation a permis la biosynthèse de PHA de structure contrôlée en vue de leur fonctionnalisation.

A partir des PHA_{MCL} insaturés ainsi produits, nous présenterons dans le troisième chapitre, la conception de PHA fluorés amphiphiles. Notre stratégie repose sur une utilisation successive de l'addition thiol-ène pour greffer des chaînes fluorées et des chaînes hydrophiles de poly(éthylène glycol). Des nanocapsules contenant un noyau liquide de bromure de perfluorooctyle détectables en IRM ¹⁹F ont ainsi été développées.

Enfin, le quatrième chapitre porte sur la synthèse d'un copolymère fluoré par greffage de perfluorodécane-thiol *via* une réaction thiol-ène. La caractérisation de la microstructure et la mesure du temps de relaxation transversale révèlent un potentiel prometteur pour l'utilisation de ces polymères comme revêtement de biomatériaux visibles par IRM ¹⁹F.

CHAPITRE I :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Le monde des bioplastiques

Depuis leur apparition dans les années 1950, l'utilisation de matières plastiques n'a cessé de croître. Leurs propriétés telles que leur légèreté, leur robustesse, leur résistance aux chocs, leur facilité de mise en œuvre en font des matériaux de choix pour la conception d'objets dans de nombreux domaines, au point qu'ils sont devenus incontournables dans notre quotidien. Néanmoins, ce qui représentait un des avantages principaux de résistance face à la dégradation chimique et biologique s'avère à l'heure actuelle un problème grandissant aux vues de leur durée de vie et de leur impact sur l'environnement. La production de matières plastiques a atteint en 2015 le taux record de 322 millions de tonnes, contre à peine 2 millions en 1950 ¹. Cette utilisation de plastique à grande échelle a conduit à l'apparition de deux problèmes majeurs : l'appauvrissement des ressources pétrolières nécessaires à la fabrication du plastique, induisant une diminution irréversible du stock terrestre en énergies fossiles, et la forte pollution engendrée par la production massive et le manque de recyclage de ces matériaux. Aujourd'hui, on estime qu'au moins 8 millions de tonnes de déchets plastiques finissent dans l'océan chaque année, conduisant à l'apparition d'un 7^{ème} continent constitué de déchets d'origine humaine. L'association Cleanseas prévoit qu'en 2050, 99 % d'oiseaux marins auront déjà ingéré du plastique ². Par ailleurs, plusieurs projections estiment que si rien n'est fait, il pourrait y avoir, cette année-là, plus de plastiques dans les océans que de poissons³.

Les enjeux environnementaux auxquels l'homme est confronté en ce début de XXI^e siècle sont particulièrement importants. La prise de conscience à l'échelle mondiale du changement climatique et l'appauvrissement des ressources fossiles de notre planète représentent un défi majeur. Les gouvernements, les entreprises et les scientifiques encouragent la recherche d'alternatives au pétrole, plus respectueuses de l'environnement. Une solution évoquée dans ce manuscrit est le recours aux polymères biosourcés et / ou biodégradables. Actuellement, les bioplastiques représentent seulement environ 1% des quelques 320 millions de tonnes de plastique produites chaque année.

La définition du terme bioplastique ne caractérise pas spécifiquement un type de polymère, il regroupe à la fois les polymères biosourcés et les polymères biodégradables. European Bioplastics les définit de la façon suivante : « les bioplastiques regroupent un grand nombre des matériaux biosourcés, biodégradables/compostables ou les deux ». La distinction entre les termes « bioplastique » ; « biopolymère » et « polymère biosourcé » pouvant être sujette à controverse, ces termes seront explicités au cours des paragraphes suivants.

Les biopolymères peuvent être classés selon deux critères distincts : l'origine de la ressource à partir de laquelle ils sont produits et la gestion de fin de vie (notion de biodégradabilité) (Figure I.1). En fonction du critère de biodégradabilité et de l'origine des ressources utilisées pour leur production, les biopolymères peuvent être classés en trois groupes ⁴ :

- Les polymères biodégradables issus de ressources renouvelables.
- Les polymères biodégradables issus de ressources fossiles.
- Les polymères non biodégradables issus de ressources renouvelables.

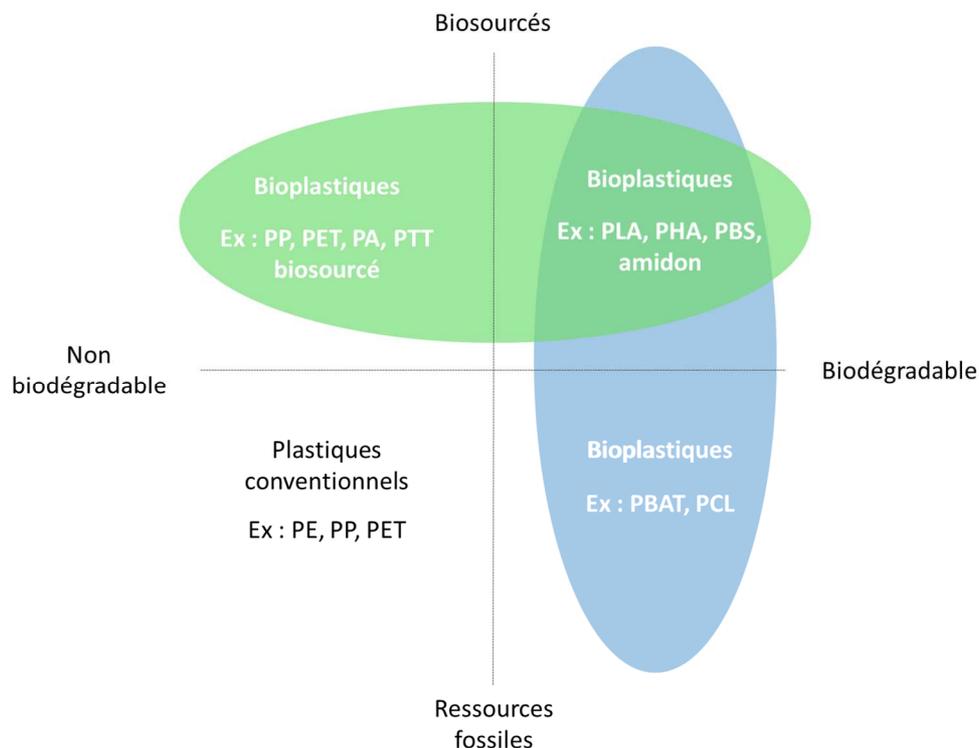


Figure I.1 : Nature des différents plastiques selon leur provenance et leur fin de vie (source : European Bioplastics) PP : polypropylène, PET : polyéthylène téréphtalate, PA : polyamide,

PTT : polytriméthylène téréphtalate, PLA : Polyacide lactique, PHA : polyhydroxyalcanoate, PBS : polysuccinate de butyle, PE : polyéthylène, PBAT : polybutylène-adipate-co-téréphtalate, PCL : polycaprolactone.

La confusion suscitée par l'utilisation du terme « bioplastique » vient en partie du fait qu'un polymère non biodégradable peut en effet être qualifié de « biopolymère » à partir du moment où il est issu (même partiellement) de matière renouvelable. Ils seront alors qualifiés de « biosourcés ». Le sujet de cette étude étant les PHA, seuls quelques exemples de polymères non biodégradables issus partiellement ou en totalité de ressources renouvelables seront présentés ici à titre d'exemple.

Parmi les polymères non biodégradables les plus utilisés, il existe les polyamides biosourcés, tels que le polyamide 11 commercialisé par ARKEMA et produit à partir d'huile de ricin (100% biosourcé) ou le polyamide 6/10, partiellement biosourcé, synthétisé à partir de l'acide sébacique obtenu à partir d'huile de ricin ⁵. Le développement de polyéthylène téréphtalate (PET) biosourcé et d'autres polyesters à partir de synthons biosourcés a déjà fait l'objet de plusieurs recherches ⁶. Il a également été possible de synthétiser du polychlorure de vinyle (PVC) biosourcé à partir d'éthylène dérivé du bioéthanol ⁶.

Un matériau biodégradable doit pouvoir être dégradé sous l'action de microorganismes tel que défini par l'Agence De l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie (ADEME) : «la biodégradabilité est la capacité intrinsèque d'un matériau à être dégradé par une attaque microbienne, pour simplifier progressivement sa structure et finalement se convertir facilement en eau, CO₂ et/ou CH₄ et une nouvelle biomasse ». Il existe une grande variété de polymères biodégradables. Averous ⁷ propose de les classer selon leur mode de synthèse, l'origine et la nature de la matière première. Quatre catégories sont différenciées, dont les trois premières comportent les polymères issus de ressources renouvelables (Figure I.2) :

- Les polymères issus de la biomasse, c'est-à-dire produit à partir d'agro-ressources : il s'agit d'une part de polysaccharides tels que l'amidon et ses dérivés, la cellulose, la chitine, et d'autre part des protéines d'origine animale ou végétale.
- Les polymères produits par la fermentation de micro-organismes et obtenus par extraction : les polyhydroxyalcanoates.

- Les polymères synthétisés par voie conventionnelle, à partir de monomères issus de ressources renouvelables et/ou de biotechnologie : le poly(acide lactique).
- Les polymères dont les monomères proviennent de ressources fossiles et sont obtenus par synthèse chimique classique tels que le poly(ϵ -caprolactone), les polyesteramides et les copolyesters aliphatiques (PBSA) ou aromatiques (PBAT).

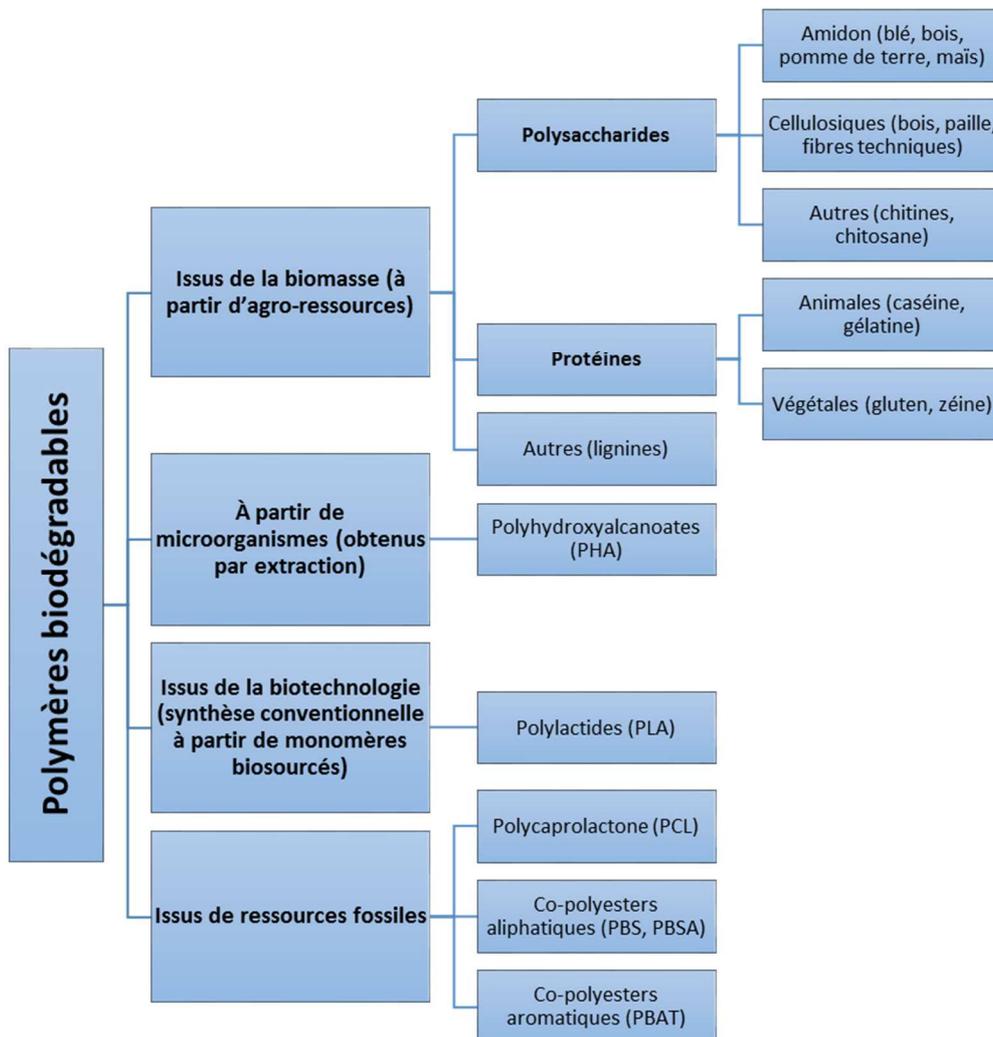


Figure I.2 : Classification des polymères biodégradables ⁷.

I.2 Les Polyhydroxyalcanoates

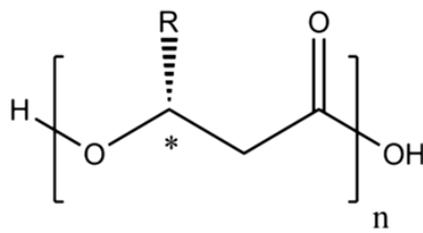
I.2.1 Présentation des polyhydroxyalcanoates

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) ont été identifiés pour la première fois par Lemoigne en 1926, qui a observé la formation de granules intracellulaires chez les bactéries à Gram positif *Bacillus megaterium*, il s'agissait alors du poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB).

Les PHA sont des polymères thermoplastiques naturels produits par de nombreux micro-organismes en réponse à un stress énergétique résultant d'un appauvrissement en éléments nécessaires à la croissance (tels que l'azote, le phosphore ou l'oxygène) et d'un excès simultané de carbone. Ils sont accumulés à l'intérieur de la cellule sous forme de granules et constituent une réserve d'énergie et de carbone ⁸. Ces polymères possèdent un carbone asymétrique sur leur chaîne principale, de configuration (R) ; ce sont donc des polymères isotactiques. Cette isotacticité, qui leur confère un caractère cristallin, est due à la stéréospécificité des enzymes responsables de leur biosynthèse (PHA polymérase); elle explique par ailleurs le caractère biodégradable de ces polymères, les enzymes dégradant les PHA (PHA dépolymérases) étant elles aussi stéréospécifiques.

Selon les substrats carbonés et les microorganismes utilisés, différents types de copolymères peuvent être obtenus ⁹. La longueur des groupes alkyles (R) peut varier (Figure I.3), classifiant ainsi les PHA en trois catégories :

- Les PHA à chaînes courtes : PHA_{SCL} (short chain length) si le groupe alkyle comporte 1 ou 2 atomes de carbones.
- Les PHA à moyennes chaînes : PHA_{MCL} (medium chain length) si le groupe alkyle comporte entre 3 et 9 atomes.
- Les PHA à chaînes longues : PHA_{LCL} (long chain length) pour des groupes alkyles de plus de 9 carbones.



R	Nomenclature
CH ₃	Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)
C ₂ H ₅	Poly(3-hydroxyvalérate) (PHV)
C ₃ H ₇	Poly(3-hydroxyhexanoate) (PHHx)
C ₅ H ₁₁	Poly(3-hydroxyoctanoate) (PHO)

Figure I.3 : Formule générale et nomenclature des P(3HA).

Plus de 150 unités monomériques différentes constitutives des PHA ont été décrites à ce jour ¹⁰. La famille des PHA offre ainsi une grande variété de matériaux polymères aux propriétés variées, allant de plastiques durs et cristallins pour les PHA_{SCL}, aux élastomères pour les PHA_{LCL}. Malgré la grande diversité des PHA, les PHA_{SCL} demeurent les plus largement produits et étudiés. Le plus connu et le plus courant des PHA_{SCL} est le poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) et est composé d'unités 3-hydroxybutyrate de configuration (R).

I.2.2 Biosynthèse des polyhydroxyalcanoates

La biosynthèse bactérienne des PHA s'effectue à partir d'une enzyme clé, la PHA synthase, ou protéine phaC. Cette enzyme catalyse la polymérisation des (R)-3-hydroxyacyl-CoenzymeA (thioesters Co-A) pour former des PHA.

Chez les microorganismes bactériens, les PHA synthases sont rassemblées au sein d'opérons en présence d'autres gènes spécifiques impliqués dans la synthèse des PHA. Quatre grands types d'opérons ont été décrits qui définissent quatre classes de PHA synthases mises en jeu dans les principales voies métaboliques ^{11,12} (Figure I.4).

La PHA synthase de classe I est représentée par la souche *Cupriavidus necator* (anciennement *Ralstonia eutropha*) et présente chez un grand nombre de Protéobactéries. Elle utilise préférentiellement les thioesters Co-A contenant 3 à 5 atomes de carbone, et est retrouvée principalement chez les producteurs de PHA_{SCL}.

La PHA synthase de type II, majoritairement retrouvée chez les bactéries du genre *Pseudomonas*, est codée par un agencement génétique composé de deux gènes correspondant aux 2 sous-unités de la PHA synthase (phaC1 et phaC2). La PHA de type II affiche une affinité spécifique pour les thioesters Co-A de 6 à 14 atomes de carbone et est donc présente chez les organismes producteurs de PHA_{MCL}¹¹.

Les PHA synthase de type III et IV correspondant aux modèles d'opérons III et IV, ont été décrites respectivement chez *Allochrodatum vinosum* et *Bacillus megaterium*, et comme la PHA synthase de type I, elles sont impliquées dans la biosynthèse de PHA_{SCL}.

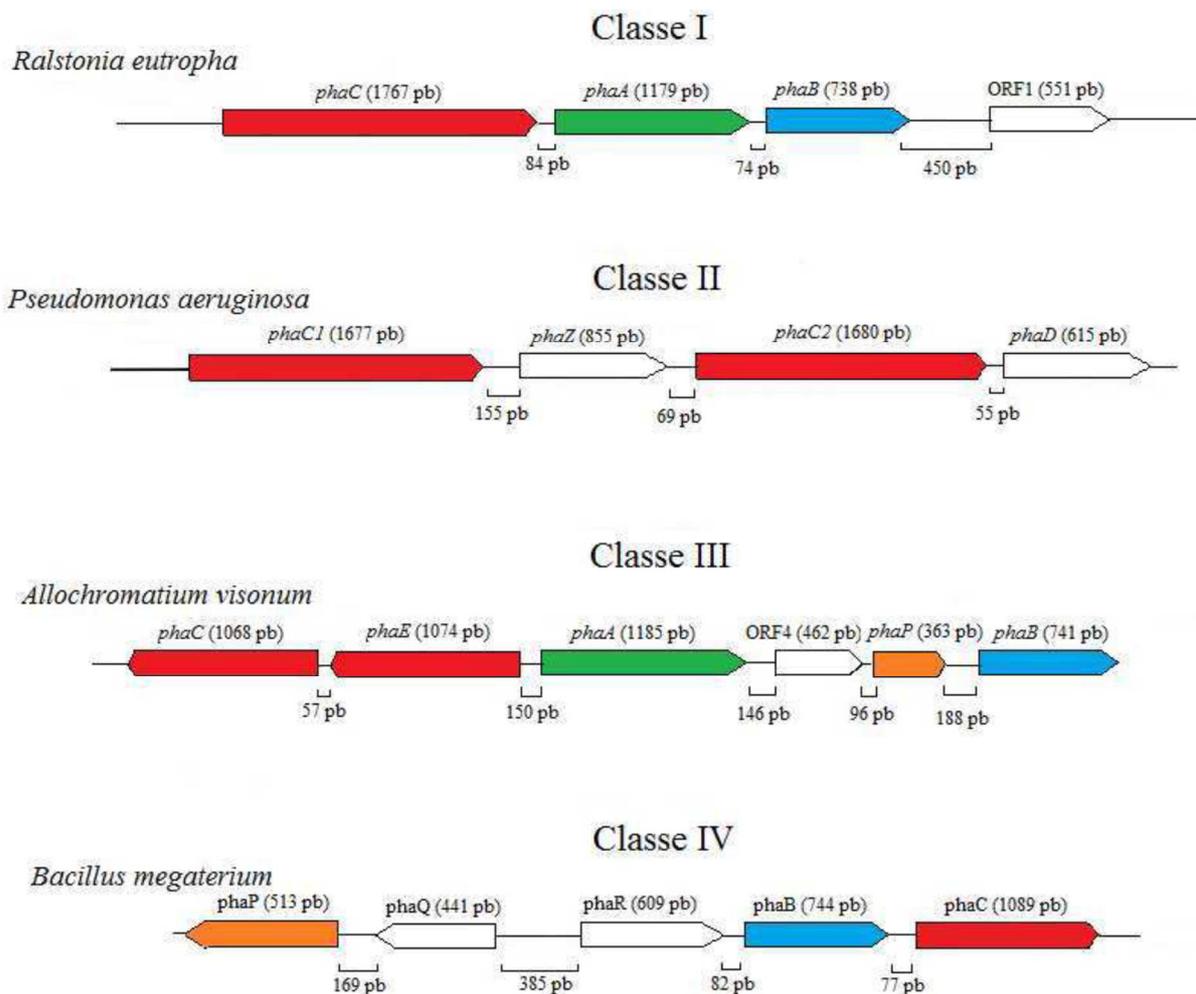


Figure I.4 : Les opérons associés aux différentes classes de PHA synthases ¹¹.

phaC/C1/C2 : (gènes codant la) PHA synthase

phaA : (gène codant la) β -cetothiolase

phaB : (gène codant la) acétoacétyl-coA-réductase NADPH dépendante
 phaZ : (gène codant la) PHA dépolymérase
 phaD/phaE/phaQ/phaR : (gènes codant les) protéines de régulation
 phaF/phaI/phaP : (gènes codant les) phasines
 phaJ : (gène codant la) enoyl-coA-hydratase

Les voies de synthèse décrites précédemment ne sont pas les seules voies existantes. De nombreux travaux ont permis la description de voies de synthèse supplémentaires chez d'autres bactéries sauvages ou recombinantes ^{13,14} permettant la production de copolymères de structure variée.

1.2.2.1 Biosynthèse des PHA_{SCL}

Le schéma de biosynthèse des PHA_{SCL} est présenté Figure 1.5. *Cupriavidus necator* synthétise du P3HB à partir de l'acétyl-CoenzymeA (acétyl-CoA) via une succession de trois réactions, catalysées par trois enzymes : la β-cétothiolase, l'acétoacétyl-CoA réductase et la PHA polymérase ¹⁵.

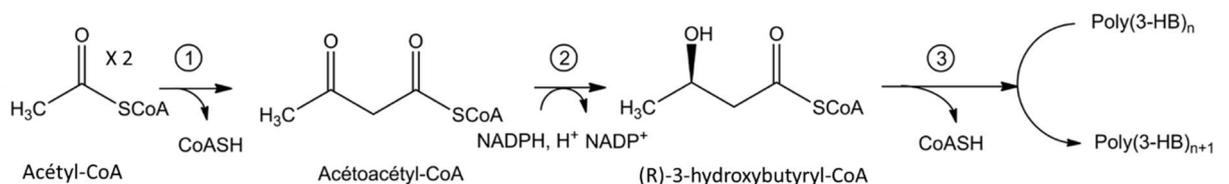


Figure 1.5 : Métabolisme du P3HB chez *Cupriavidus necator*. 1 : β-cétothiolase, 2 : acétoacétyl-CoA réductase, 3 : PHB polymérase.

L'acétyl-CoA est un intermédiaire clé du métabolisme primaire, il est produit à la fois lors de l'oxydation des acides gras et des sucres. Deux molécules d'acétyl-CoA sont condensées sous l'action de la β-cétothiolase, produisant l'acétoacétyl-CoA. Ensuite, la réductase, NADPH dépendante, réduit le carbonyle en alcool pour donner le (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. La PHB

polymérase, la dernière enzyme, catalyse les étapes successives de condensation des résidus 3-hydroxybutyryl-CoA pour aboutir à la synthèse du P3HB. Cette enzyme est stéréospécifique et ne reconnaît que les (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. Le P3HB peut ainsi être accumulé à partir de différents substrats comme le glucose, le méthanol, ou le dioxyde de carbone.

1.2.2.2 Biosynthèse des PHA_{MCL}

Le métabolisme des PHA_{MCL} constitue une déviation des voies métaboliques impliquant les acides gras. Selon le substrat présent dans le milieu de culture, le métabolisme anabolique (*de novo*) ou catabolique (β -oxydation) des acides gras est activé et la synthèse des PHA_{MCL} utilise des intermédiaires métaboliques de ces deux voies. On distingue ainsi :

- La dégradation des acides gras par β -oxydation, qui est la voie principale de biosynthèse des PHA_{MCL} lorsque des acides gras sont utilisés comme substrats carbonés.
- La biosynthèse *de novo* des acides gras qui est la voie principale lorsque les substrats sont des sucres ¹⁶.

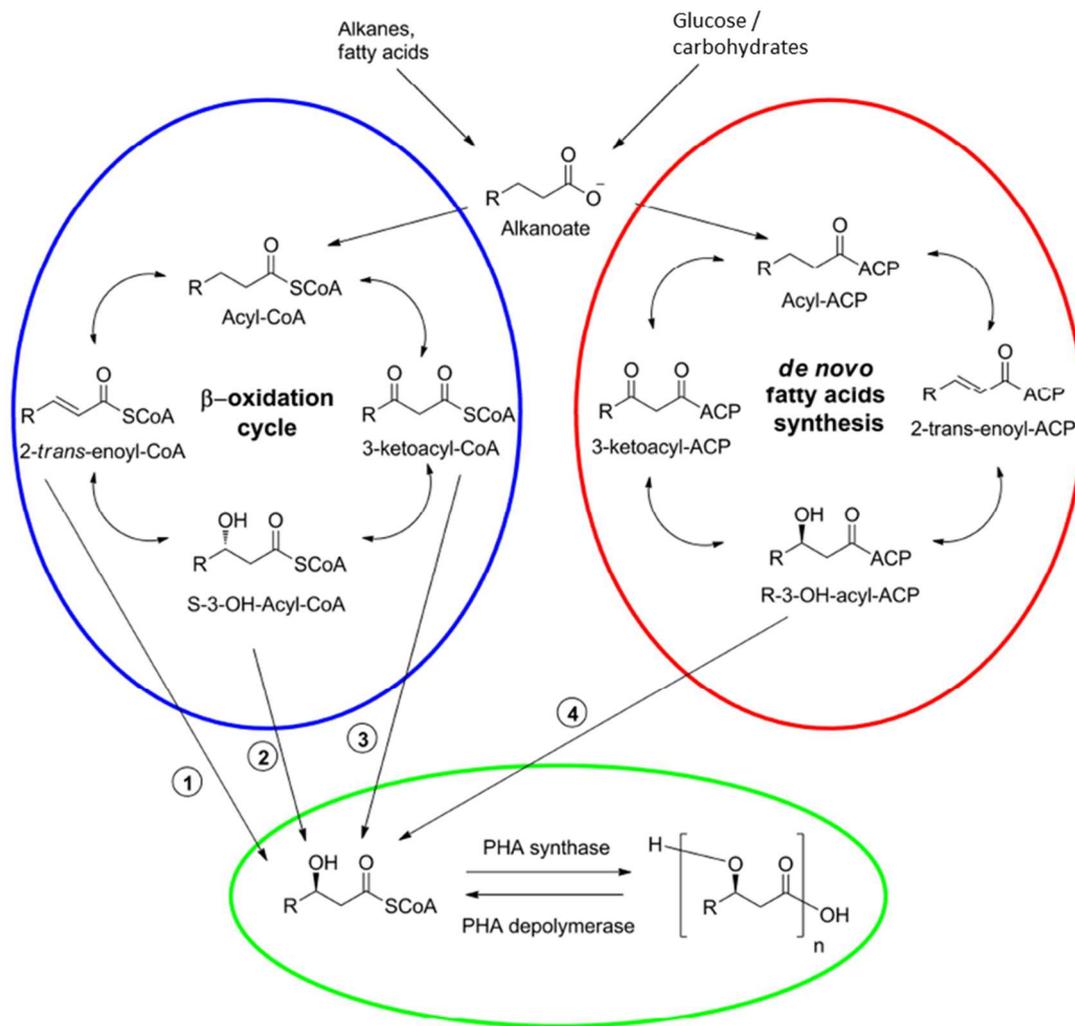


Figure I.6 : Voies métaboliques de biosynthèse des PHA_{MCL}. (CoA : Coenzyme A, ACP : Acyl Carrier Protein, 1 : Hydratases, 2 : Epimérase, 3 : Réductase, 4 ; Transacylases ¹³

Le métabolisme de synthèse des PHA_{MCL} à partir d'acides gras est directement associé au métabolisme catabolique des acides gras (β -oxydation) (cercle bleu, Figure I.6) ^{13,17}. Plusieurs intermédiaires sont utilisés pour la synthèse des PHA (cercle vert, Figure I.6) via l'utilisation d'enzymes telles que des hydratases, des épimérase ou des réductases.

- Lorsque l'acide gras (source de carbone) comporte 6 à 12 atomes de carbone, les PHA_{MCL} formés comportent, dans la plupart des cas, des unités de répétition avec un nombre d'atomes de carbone égal à celui de la source de carbone ou comptant deux atomes de carbone en moins, correspondant à la libération d'un groupement acétyl-CoA à chaque cycle.

L'utilisation de mélanges d'acides gras, d'alcanes et d'alcènes comme source de carbone se traduit par la formation de PHA dont la composition est le plus souvent le reflet du ratio de chacun des composants du milieu de culture ¹⁸. Cependant, l'utilisation de n-alcanes ou de n-alcènes comme substrat n'est possible que si la bactérie possède le plasmide OCT qui contient les gènes permettant l'oxydation des alcanes ou des alcènes en acides carboxyliques ¹⁹.

Si la bactérie est cultivée sur un mélange d'octane et d'octène, le ratio de monomères présentant une insaturation est fonction de la quantité initiale d'octène. De plus, l'introduction dans le milieu de culture de différents alcanes substitués en tant que co-substrats (7-méthyl-octanoate, 8-bromo-octanoate, phényl-décanoate, cyanophénoxy-hexanoate) permet de synthétiser des polymères originaux du point de vue de leur composition ^{20,21}. Cette facilité à incorporer directement des monomères « exotiques » explique en partie la diversité des copolymères de PHA générés par les bactéries.

- Lorsque la source de carbone est composée de sucres, comme le glucose, le PHA_{MCL} accumulé dans les bactéries est majoritairement composé de monomères constitués de 8 à 10 atomes de carbone ²²⁻²⁴. Ces monomères dérivent de la biosynthèse *de novo* des acides gras (cercle rouge, Figure I.6). Les différentes étapes de la biosynthèse des acides gras se déroulent grâce à un complexe multi-enzymatique de grande taille, l'ACP (Acyl-Carrier-Protein). A l'issue de cette suite de réactions, un dérivé (R)-3-hydroxyacyl-CoA quitte le site actif de l'ACP via une enzyme transacylase. Ce composé est ensuite polymérisé grâce à une PHA synthase (cercle vert, Figure I.6). La composition du PHA accumulé reflète la composition chimique des intermédiaires métaboliques de la biosynthèse des acides gras ainsi que l'affinité de la PHA synthase pour ces différents substrats.

De nombreuses espèces de *Pseudomonas* utilisent les deux voies métaboliques, c'est par exemple le cas de *Pseudomonas putida* pour laquelle le cycle de la β -oxydation et la synthèse *de novo* des acides gras contribuent à la formation des substrats de la PHA synthase ^{23,25}.

I.2.2.3 Granules de PHA

Les PHA sont accumulés *in vivo* sous la forme d'inclusions intracytoplasmiques de 0,1 à 0,5 μm de diamètre (Figure I.7)

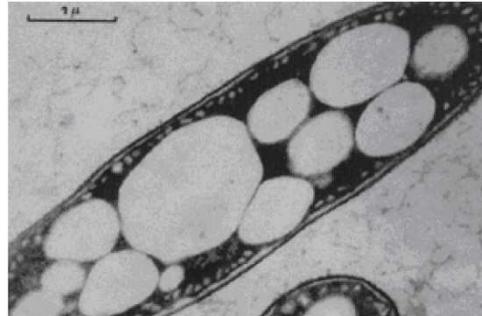


Figure I.7 : Inclusions de PHBHV chez *Azotobacter chroococcum* observées en microscopie électronique à transmission ²⁶.

Les chaînes de PHA sont organisées en microfibrilles de 10-15 nm de diamètre qui s'enroulent pour former un granule de forme sphérique. Les granules de polymères sont constitués d'un cœur hydrophobe amorphe entouré d'une couche de phospholipides contenant des phasines ^{8 15}, des polymérase, des dépolymérase ²⁷ et des protéines régulatrices (Figure I.8) ²⁸. Les phasines sont des protéines non catalytiques qui permettent la formation et la stabilisation des granules hydrophobes dans un milieu hydrophile, tandis que les protéines régulatrices servent à la synthèse des granules de PHA.

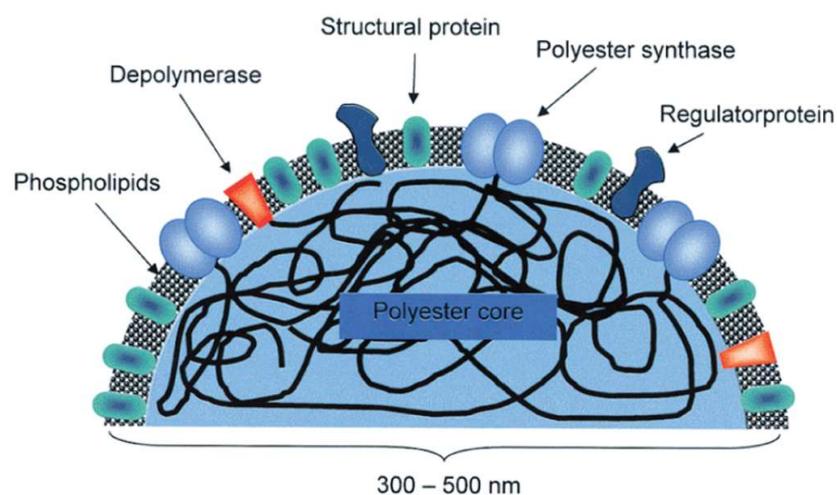


Figure I.8 : Schéma d'un granule de PHA ²⁸.

1.2.2.4 Extraction des PHA

La récupération des PHA à partir des bactéries peut être effectuée par extraction au solvant ou par digestion chimique. Cette première méthode nécessite un bon solvant pour les polymères, comme le dichlorométhane ou le chloroforme, tandis que la deuxième méthode utilise des produits chimiques qui dégradent la biomasse, tels que l'hypochlorite de sodium ou les enzymes hydrolytiques. Cette dernière induit cependant une dégradation simultanée des PHA avec diminution des poids moléculaires.

L'extraction de PHA par dissolution dans des solvants chlorés était en fait le premier procédé de purification proposé dans l'étude pionnière de Lemoigne (1926). En tant que description générale de la procédure de purification, les cellules sont d'abord séparées de la biomasse par filtration ou centrifugation, puis, pour une meilleure extraction, l'eau est éliminée. Ensuite, l'extraction du polymère est effectuée avec du chlorure de méthylène, du chloroforme, du 1,2-dichloroéthane, du 1,1,2-trichloroéthane ou du 1,1,2,2-tétrachloroéthane chlorés²⁹. L'utilisation de ces solvants favorise principalement l'extraction du polymère en raison de sa solubilité élevée alors que le reste de la matière biologique est peu soluble. Les résultats d'extraction peuvent être améliorés en travaillant à des températures élevées, parfois à des pressions élevées, ce qui favorise la solvatisation du polymère tout en réduisant la viscosité des mélanges. Une fois que le polymère est dissous, il peut être purifié par précipitation dans des non solvants tels que des alcools, de l'eau ou même des éthers dans le cas des PHA_{SCL}³⁰ ou par évaporation de solvant³¹. L'extraction par solvant est utilisée principalement en laboratoire mais rarement dans la production industrielle. Le principal avantage de cette méthode de récupération réside dans le fait que les processus de dégradation sont plutôt faibles, en particulier lorsque la purification a lieu à basse température, et que le niveau d'endotoxines présentes dans les polymères purifiés peut être réduit à des niveaux acceptables pour les applications biomédicales. Des purifications successives permettent d'augmenter la pureté du produit.

Une méthode alternative à l'utilisation de solvants organiques concerne l'utilisation d'hypochlorite de sodium. Utilisée pendant 30 à 60 minutes, une solution aqueuse à 30%

d'hypochlorite de sodium induit la désorganisation de la membrane cellulaire et ainsi la libération des granules de PHA ³². Néanmoins, un traitement supérieur à 60 minutes entraîne la dégradation des chaînes de polyester. Les granules obtenus sont ensuite précipités dans du méthanol ou de l'éthanol afin d'éliminer les lipides membranaires.

L'extraction du polymère peut également se faire par traitement enzymatique, permettant la destruction de tous les composés cellulaires à l'exception du PHA ³³. Ce procédé implique un traitement des cellules au lysozyme suivi d'une étape de sonication pour permettre la libération des granules de PHA. Les granules sont ensuite séparés des débris cellulaires par centrifugation à faible vitesse.

I.2.3 Propriétés des Polyhydroxyalcanoates

I.2.3.1 Biodégradation

Les PHA sont biodégradables c'est-à-dire qu'ils ont la capacité d'être dégradés sous l'action de microorganismes naturellement présents dans l'environnement. Ces microorganismes sont capables de sécréter des enzymes (PHA dépolymérase, lipases, autres enzymes hydrolytiques) permettant de dégrader les PHA en oligomères et monomères qu'ils utilisent pour leur métabolisme, et en molécules de base (eau, CO₂, CH₄). On distingue 2 types de dégradation selon que le PHA est dégradé de manière extracellulaire par des enzymes n'appartenant pas à l'organisme producteur ; et la dégradation intracellulaire, lorsque cette dégradation se fait au sein des cellules productrices.

1) Dégradation extracellulaire

Lorsque les PHA se retrouvent dans l'environnement, leur biodégradation est réalisée par des microorganismes qui excrètent des PHA dépolymérase qui assurent la dégradation des PHA, ensuite utilisés par les microorganismes de l'environnement pour leur métabolisme. Le taux et la vitesse de dégradation des PHA dans l'environnement dépendent de nombreux facteurs dont la population microbienne, la température, le pH, et la nature du polymère.

Lorsque les PHA sont utilisés comme biomatériaux sous forme d'implants médicaux dans l'organisme humain, ils subissent une dégradation sous l'action d'enzymes de type lipases et d'autres enzymes hydrolytiques, qui vont hydrolyser les PHA et en libérer très progressivement les monomères dans l'organisme. L'attaque enzymatique dépend de divers facteurs comme la nature de la lipase ³⁴, le pH de l'environnement physiologique ³⁵, mais également des propriétés intrinsèques au PHA telles que la cristallinité et la longueur des chaînes latérales ³⁶. Par exemple, le P(3HB) est moins favorable à la dégradation comparé au P(4HB) (poly(4-hydroxybutyrate))³⁷. Il a également été constaté que la dégradation enzymatique se produit par érosion de surface ³⁸ et que la dégradation est beaucoup plus rapide dans la région amorphe de la chaîne polymère ³⁹⁻⁴¹. Par ailleurs, la présence de comonomères au sein des PHA induit une diminution de la cristallinité globale ⁴² et favorise ainsi la biodégradation des PHA. Ainsi, pour un même degré de cristallinité, la dégradation des copolymères est généralement plus rapide que celles d'homopolymères. Il a été démontré que la morphologie de surface des PHA joue un rôle important dans les processus de biodégradation ⁴³.

2) Dégradation intracellulaire

Les PHA sont produits par de nombreuses bactéries et accumulés au sein des cellules sous la forme de réserve de carbone et d'énergie. Selon les besoins cellulaires, les PHA peuvent être (re)mobilisés et dégradés grâce à l'intervention d'une PHA dépolymérase intracellulaire ⁴⁴. La PHA dépolymérase est une enzyme intra-cytoplasmique située à la surface des granules de PHA. Son mécanisme d'action est illustré en figure I.9. Dans un premier temps, le P3HB est dépolymérisé par la PHB dépolymérase en présence d'une hydrolase pour donner l'acide (R)- β -hydroxybutyrique. Cet acide est oxydé par la déshydrogénase pour former l'acide acétoacétique à son tour thioestérifié en acétoacétyl-CoA. Ce dernier est ensuite dégradé en acétyl-CoA par la β -cétotliolase, enzyme de régulation impliquée à la fois dans la biosynthèse et la dégradation des PHA. En présence d'oxygène, l'acétyl-CoA ainsi produit peut entrer dans le cycle de l'acide citrique puis être oxydé en deux molécules de dioxyde de carbone.

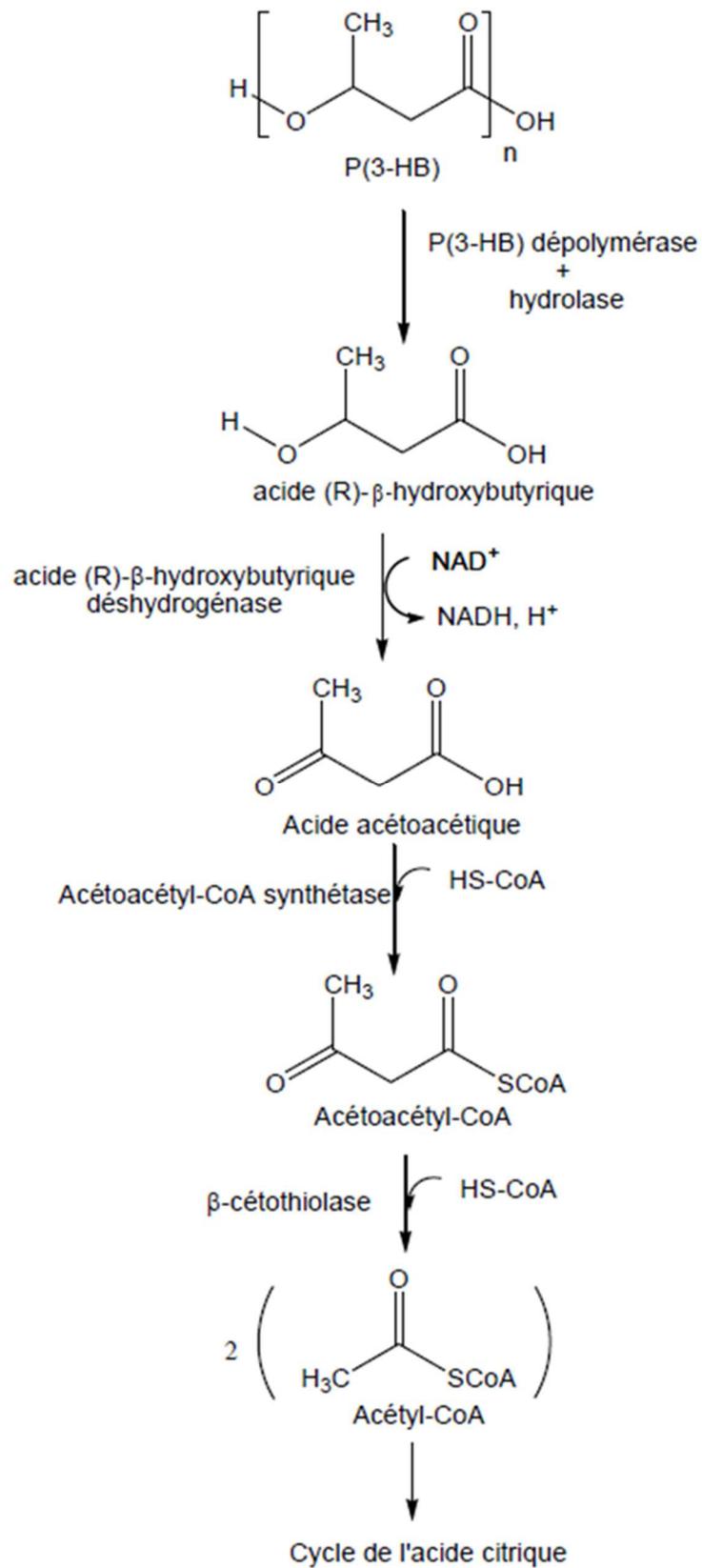


Figure I.9 : Schéma de dégradation intracellulaire du P(3HB) ⁴⁵.

1.2.3.2 Biocompatibilité

La biocompatibilité est l'aptitude des matériaux à remplir une fonction donnée sans avoir d'effets indésirables dans un environnement biologique (dégradations, interférences...) dans lequel le matériau est utilisé ⁴⁶. Le critère de biocompatibilité est essentiel pour tout matériau destiné à être utilisé dans des applications médicales. Cela s'applique aux biomatériaux, aux implants, aux dispositifs médicaux et aux prothèses. Comme le sang humain contient entre 3 et 10 mg par 100 mL d'acide 3-hydroxybutyrique (3HB) ⁴⁷. On s'attend à ce que les implants ou les sutures fabriqués à partir de PHA contenant du P(3HB) ne déclenchent pas de réponse immunitaire dans l'organisme ⁴⁸. De plus, une étude *in vitro* a confirmé la biocompatibilité élevée du P3HB pour une série de lignées cellulaires différentes ^{49,50}. Sevastianov et ses collègues ont par ailleurs mesuré l'hémocompatibilité des PHA et ont démontré que le P3HB et le PHBHV étaient compatibles avec le sang et ne déclenchaient aucune réponse immunitaire ⁵¹. Le P3HB a été étudié pour l'ingénierie tissulaire et a démontré une bonne biocompatibilité avec plusieurs lignées cellulaires, telles que les fibroblastes, les chondroblastes ou les ostéoblastes ⁵².

Les PHA_{MCL}, généralement plus souples que les PHA_{SCL}, ont suscité l'intérêt en tant que candidats potentiels pour l'ingénierie des tissus mous. Bagdadi et al, ont observé une haute compatibilité des patches cardiaques en PHO avec les myocytes ventriculaires néonataux de rat ⁵³. Des mélanges de PHA_{SCL} et PHA_{MCL} ont été réalisés pour obtenir des matériaux aux propriétés intermédiaires. Par exemple, les mélanges PHA_{SCL} - PHA_{MCL}, PHO/PHB, ont démontré un bon support de croissance et de prolifération des cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1) ⁵⁴ ainsi que des cellules neuronales NG108-15 ⁵⁵. Dans une autre étude, Qu ont rapporté le développement d'un dispositif de croissance cellulaire à base de PHBHHx revêtu de fibronectine et d'une fonctionnalisation de surface supplémentaire par traitement au plasma. Ces modifications ont conduit à une augmentation de l'attachement et de la prolifération des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVECs) ainsi que des cellules musculaires lisses isolées de l'aorte de lapin (RaSMCs) ⁵⁶. Naveen *et al.* 2015 ont observé une bonne biocompatibilité des PHA_{MCL} avec les cellules stromales mésenchymateuses⁵⁷.

En raison de leur biocompatibilité élevée, les PHA sont des candidats prometteurs pour des applications médicales et pharmaceutiques, en tant que biomatériau pour l'ingénierie tissulaire (implants, sutures, prothèses) ou l'élaboration de systèmes micro/nanométriques destinés à l'encapsulation de molécules thérapeutiques et leur libération contrôlée dans l'organisme.

1.2.3.3 Propriétés thermiques et mécaniques

Le polyester le plus représentatif des PHA_{SCL} est le P3HB. C'est un polymère très cristallin dont les applications restent limitées du fait de sa rigidité et de son point de fusion élevé ($T_m = 177\text{ °C}$), trop proche de sa température de dégradation. Le module de Young et la résistance à la traction du P3HB sont respectivement de 3,5 GPa et de 40 MPa, ce qui en fait un bon candidat pour le remplacement du polypropylène. Cependant, l'allongement à la rupture du P3HB est de 7%, très inférieur à celui du polypropylène (400%).

Les PHA_{SCL} ont une cristallinité élevée, jusqu'à 60%, qui peut être diminuée par copolymérisation⁵⁸. Deux approches peuvent ainsi être envisagées pour améliorer les propriétés thermiques et mécaniques du P3HB : la diversification de la structure chimique par biosynthèse, par exemple l'insertion d'unités monomériques comme 3HV, ou par mélange physique avec d'autres polymères ou l'utilisation de plastifiants^{59,60}. L'effet de la composition monomérique sur les propriétés thermiques est rapporté dans le tableau I.1, et sur les propriétés mécaniques dans le tableau I.2. L'incorporation d'unités monomériques plus longues 3HV dans du P3HB produit un copolymère de type PHBHV, moins rigide et moins cassant, avec une température de transition vitreuse et une température de fusion réduites.

Tableau I.1 : Propriétés thermiques des PHA ⁶¹. (3HB : 3-hydroxybutyrate ; 3HO :3-hydroxyoctanoate ; 3HV : 3-hydrovalérate ; 3HHx : 3-hydroxyhexanoate).

Composition (%mol)				Tg (°C)	Tm (°C)	Crystallinité (%)
3HB	3HO	3HV	3HHx			
100	-	-	-	10	177	60
97	-	3	-	8	170	59
80	-	20	-	-1	145	56
75	-	25	-	-6	137	54
97	-	-	3	-4	177	42
90	-	-	10	-1	127	35
80	-	-	20	4	52	18
-	100	-	-	-38	49	25
-	88	-	12	-35	61	30

Tableau I.2 : Propriétés mécaniques des PHA (E : module de Young, σ : resistance à la traction, ϵ : allongement à la rupture)⁶²

Composition (%mol)				E (GPa)	σ (MPa)	ϵ (%)
3HB	3HO	3HV	3HHx			
100	-	-	-	3,5	40	4
97	-	3	-	2,9	38	5
80	-	20	-	1,2	32	50
75	-	25	-	0,7	30	-
97	-	-	3	0,63	43	6
90	-	-	10	0,23	21	400
80	-	-	20	0,15	20	850
-	100	-	-	0,017	-	300
-	88	-	12	0,008	9	380

Les PHA_{MCL} sont des thermoplastiques élastomères présentant un faible taux de cristallinité en raison de leurs chaînes latérales plus longues. Ils présentent un point de fusion entre 40° et 65°C et une température de transition vitreuse comprise en -25°C et -40 °C, selon

la longueur de la chaîne latérale. L'élongation à la rupture et la résistance à la traction étant plus élevées que celles des PHA_{SCL}, les PHA_{MCL} sont donc plus souples et plus élastiques.

1.2.4 Applications des polyhydroxyalcanoates

De par leur caractère biosourcé et biodégradable et des propriétés physico-chimiques proches de celles des plastiques synthétiques, les PHA constituent une alternative intéressante aux plastiques d'origine fossile et trouvent des applications dans de nombreux domaines. Parmi les différentes applications des PHA, les études sur l'utilisation des PHA en agriculture et dans l'emballage se développent malgré la limitation majeure que représente encore le coût de production des PHA.

Par ailleurs, la biocompatibilité, la biodégradabilité et la non-toxicité des PHA les rendent particulièrement intéressants pour des applications dans le domaine médical, comme substitut résorbable dans le cadre de l'ingénierie tissulaire pour l'élaboration de systèmes de libération contrôlée de molécules destinés au traitement thérapeutique et /ou au diagnostic.

1.2.4.1 Emballage

L'utilisation des plastiques dans l'emballage est très répandue. L'emballage des produits alimentaires représente une part importante du marché de ces matériaux et nécessite une attention particulière. L'industrie de l'emballage exige des propriétés telles que la résistance à la traction, les propriétés barrières aux gaz, aux arômes, la résistance aux ultraviolets (UV) et à l'eau, conduisant ainsi aux problématiques liées à la fin de vie de ces emballages. Les PHA proposent une autre alternative liée à leur biodégradabilité. De plus, l'hydrophobie, la biodégradabilité et la large gamme de propriétés inhérentes aux PHA en font des candidats prometteurs face aux produits pétrosourcés présents sur le marché de l'emballage.

Les exigences spécifiques pour un emballage comprennent la protection contre la poussière, les contaminants, la stabilité alimentaire et la dégradation des produits⁶³. Les PHA peuvent potentiellement répondre aux exigences en matière d'emballage alimentaire, en particulier en raison de leurs propriétés barrières aux gaz, notamment à l'O₂, qui permettent d'envisager la conservation des aliments (sous atmosphère protectrice)^{4,64,65}. Le faible coefficient de perméabilité à l'oxygène des PHA permet de maintenir une faible pression en oxygène à l'intérieur de l'emballage, retardant ainsi l'oxydation et prolongeant la conservation du produit. Les propriétés barrières du P3HB et du PHBHV vis-à-vis de l'eau et de l'oxygène sont légèrement supérieures à celles des PLA et potentiellement compétitives par rapport à celles des plastiques synthétiques couramment utilisés^{9,66,67}. Concernant la perméabilité à la vapeur d'eau du P3HB et des copolymères PHBHV, les valeurs obtenues sont comparables à celles des plastiques traditionnels tels que le PET et le PVC⁶⁸⁻⁷⁰.

Plusieurs études ont permis de démontrer de manière concrète l'intérêt des PHA pour l'emballage de produits alimentaires. Haugaard *et al.*⁷¹ ont montré que les emballages en P3HB et en PLA pouvaient être aussi efficaces que le PEHD classique pour le stockage de jus d'orange (aliments acides) et de vinaigrette (aliments gras) sous une lumière fluorescente ou à l'obscurité à 4°C pendant 10 semaines. Levkane *et al.*⁷² ont proposé l'utilisation de films d'emballage de P3HB et de PLA plastifiés pour la conservation sous vide d'échantillons de viande et de mayonnaise. Il a été démontré que la consistance des préparations était conservée avec un nombre de colonies microbiennes total réduit. Une structure multicouche constituée de PHBHV et de P3HB contenant de l'eugénol a également été produite⁷³. Le système multicouche a révélé une adhésion entre les différentes couches, une résistance mécanique, une stabilité thermique ainsi que des propriétés barrière contre les vapeurs d'eau et d'arômes tout à fait satisfaisantes, auxquelles s'ajoutent des propriétés antibactériennes contre les souches bactériennes de *S. aureus* et *E. coli*, grâce à l'ajout d'eugénol. Enfin, Hermida *et al.*⁷⁴ ont décrit la résistance du P3HB au rayonnement gamma (procédé utilisé pour la stérilisation des aliments ou des matériaux d'emballage), sans altération significative des propriétés du P3HB.

1.2.4.2 Agriculture

Certaines pratiques agricoles entraînent la diffusion de micro-plastiques et la contamination progressive des sols⁷⁵⁻⁷⁸. L'utilisation des PHA dans l'agriculture n'a été explorée que dans une mesure limitée, cependant quelques recherches ont été menées afin de mettre au point des matériaux respectueux de l'environnement dans le domaine de l'agriculture. Ces études ont révélé un potentiel prometteur quant à l'utilisation des PHA pour l'élaboration de films de protection des cultures.

Le paillage aide à améliorer et à maintenir une bonne structure de sol, à contrôler la contamination et à réguler les mauvaises herbes. Le paillis de plastique est généralement constitué de polyéthylène haute densité (PEHD), de polyéthylène basse densité (PEBD) et de PEBD linéaire, qui ne se dégradent pas facilement dans l'environnement^{79,80}. Le copolymère à base de PHA (PHBHHx) Nodax™ a été utilisé pour préparer à l'échelle commerciale du paillis agricole⁸¹.

Les filets agricoles sont essentiels car ils garantissent le rendement et la qualité des cultures, les protègent des aléas météorologiques, oiseaux et insectes, ainsi que de la chaleur en favorisant la ventilation⁸²⁻⁸⁴. La matière première couramment utilisée dans les filets agricoles commerciaux est le PEHD⁸⁵. L'avantage majeur des filets biodégradables est leur compostabilité, qui permet de les enfouir directement dans le sol avec des matières organiques. Les sacs de culture à base de PHA ont également été utilisés pour les semis, la rétention d'eau et la régulation de la température^{86,87}.

Les nanomatériaux à base de PHA, en particulier les nanosphères, ont également trouvé une application en tant que nanoherbicide qui ont une génotoxicité inférieure et une biodégradabilité élevée, augmentant ainsi l'efficacité des herbicides^{88,89}.

Les PHA constituent une famille de candidats pertinents dans certaines applications agricoles aux vues de leurs propriétés physico-chimiques, et plus particulièrement de leur caractère biodégradable. Cependant le frein majeur à leur utilisation à grande échelle reste leur coût de production encore trop élevé pour pouvoir être développé de manière rentable. Le prix des sources de carbone influant significativement sur le coût final des PHA, l'attention

s'est portée récemment sur l'utilisation de co-produits industriels qui pourraient être utilisés comme substrats carbonés à bas coût et ainsi permettre de développer plus largement l'utilisation de ces polymères^{90,91}.

1.2.4.3 Domaine biomédical

Les PHA sont largement utilisés dans le domaine des applications biomédicales et ont fait l'objet de plusieurs revues^{15,37,48,92-95}. Ils ont par exemple été utilisés pour élaborer des dispositifs tels que des pansements, des dispositifs cardiovasculaires, des supports pour la croissance cellulaire, des dispositifs de réparation des tendons, des stents, des broches orthopédiques⁹⁶, des patchs cardiovasculaires, des dispositifs de réparation des nerfs et des sutures⁹⁷. Nous nous limiterons ici à l'utilisation des PHA dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et de la libération contrôlée de principes actifs.

- Ingénierie tissulaire

En raison de leur polyvalence, les PHA constituent une alternative intéressante pour l'ingénierie de différents tissus, et ils ont été exploités comme support résorbable pour réparer le cartilage, les os, la peau, les tissus cardiovasculaires⁹⁸.

L'ingénierie tissulaire cardiaque est une application médicale pour laquelle les PHA_{MCL} ont démontré des propriétés intéressantes en raison de leur nature élastomérique et de leur potentiel d'intégration au réseau myocardique, en plus de la possibilité de les conjuguer à des molécules bioactives⁹⁸. Les greffons vasculaires issus de l'ingénierie tissulaire ont remplacé avec succès les vaisseaux endommagés et constituent un autre domaine d'application des PHA, qui ont été utilisés pour la fabrication de support de croissance cellulaire de valves cardiaques⁹⁹. Une autre étude a utilisé du P3HB pour imprégner la surface d'une matrice tissulaire aortique de porc, afin de développer une valve cardiaque capable de résister à la coagulation plasmatique et à la calcification¹⁰⁰ (Figure I.10a).

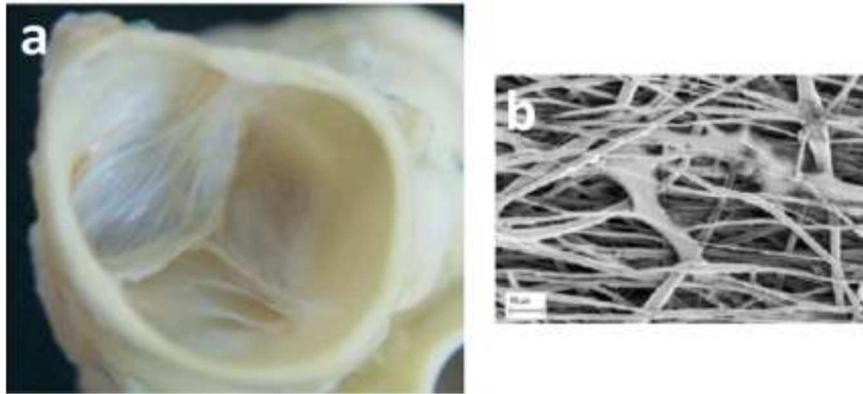


Figure I.10 : a) Valve cardiaque à base de P3HB¹⁰⁰ b) Image de nanofibres régénératives à base de PHBHV par MEB¹⁰¹

Le P3HB a été complexé avec de l'hydroxyapatite pour le développement de supports poreux utilisés pour la régénération des tissus osseux¹⁰². L'hydroxyapatite est un constituant de la matrice osseuse fréquemment utilisé pour la confection de biomatériaux. Le mélange de P3HB et d'hydroxyapatite a permis la croissance et la prolifération optimales d'ostéoblastes de moelle osseuse¹⁰³ et a favorisé la régénération osseuse dans plusieurs études^{104,105}. Ce mélange a également été utilisé pour améliorer la stabilité mécanique des hydrogels, qui sont couramment utilisés pour interconnecter la structure poreuse des supports de croissance cellulaire¹⁰⁶. Les nanofibres de PHA ont permis une augmentation de la croissance cellulaire et un taux de biominéralisation élevé avec une bonne différenciation ostéoblastique^{107,108}. Des supports pour la régénération osseuse ont été élaborés par un procédé d'électrospinning à partir de PHBHV et ont démontré des capacités de prolifération et différenciation cellulaire prometteuses¹⁰¹ (Figure I.10b). Des échafaudages de régénération du cartilage ont également été fabriqués à l'aide d'un mélange de P3HB, de chitosan et de nanofibres d'alumine, qui se sont avérés efficaces pour la multiplication des chondrocytes¹⁰⁹. La réparation *in vivo* de cartilage a été étudiée en comparant l'utilisation de matrices à base de PHBHV à un mélange collagène / phosphate de calcium. Il s'est avéré que les matrices de PHBHV ont favorisé la formation précoce de tissus cartilagineux et ont permis une meilleure régénération tissulaire qu'avec le mélange collagène / phosphate de calcium¹¹⁰. Enfin, des supports conçus à partir de PHBHV ont permis l'amélioration de la prolifération cellulaire de l'épithélium cornéen¹¹¹.

- Systèmes de libération contrôlée de principes actifs.

L'efficacité de l'administration de principes actifs dans le corps humain peut être limitée par la stabilité, la solubilité, la toxicité et la distribution non ciblée de ces principes actifs.

L'élaboration de systèmes de libération contrôlée permet d'encapsuler le principe actif et ainsi le protéger de la dégradation et du milieu environnant ; et de le cibler afin qu'il soit distribué en quantité efficace sur son site d'action¹¹². Les PHA ont d'ores et déjà été utilisés pour l'élaboration de systèmes de libération contrôlée de molécules thérapeutiques sous forme de particules micro ou nanométriques, ou sous forme d'implants.

Des antibiotiques, tels que la tétracycline, ont été piégés dans des microsphères de PHA, et utilisés pour lutter contre des maladies liées à une infection microbienne¹⁰⁷. Un système de nanocapsules permettant une administration ciblée de médicaments jusqu'aux cellules tumorales a été développé à partir de l'activité catalytique de la PHA synthase. Les nanoparticules ont été fonctionnalisées avec des ligands tumoraux et ont montré une affinité spécifique pour les cellules du cancer du sein¹¹⁵. Ainsi, les microsphères et les nanoparticules de PHA pour l'encapsulation et la délivrance de composés thérapeutiques ont été largement explorées, l'avantage principal des nanoparticules à base de PHA est leur capacité à encapsuler des principes actifs hydrophobes et hautement toxiques^{108,116,117}. L'efficacité anticarcinogène de l'ellipticine a été augmentée après encapsulation dans des nanoparticules de PHBV¹¹⁸. L'administration de nanoparticules composées de P3HB4HB couplées à du méthoxypolyéthylène glycol pour la libération ciblée et contrôlée de cisplatine a abouti à une accumulation plus importante de cet agent chimiothérapeutique par rapport au médicament libre, ainsi qu'une nette réduction de la croissance des cellules tumorales et de l'apoptose^{117,119}. Des molécules utilisées pour le traitement de l'ostéoporose ont également été encapsulées au sein de microsphères de PHBV (Figure I.11). Ce système particulière a permis la libération constante du principe actif, l'alendronate, sur une période de 26 jours¹²⁰.

Récemment, des systèmes hybrides PHA-MOF ont été développés en tant que nouvelle génération de vecteurs pour la libération contrôlée de médicament. Les MOF enrobés de PHA fonctionnalisés se sont avérés stables dans les fluides aqueux et physiologiques. Des tests de prolifération cellulaire et de cytotoxicité n'ont révélé aucun effet secondaire cytotoxique¹²¹.

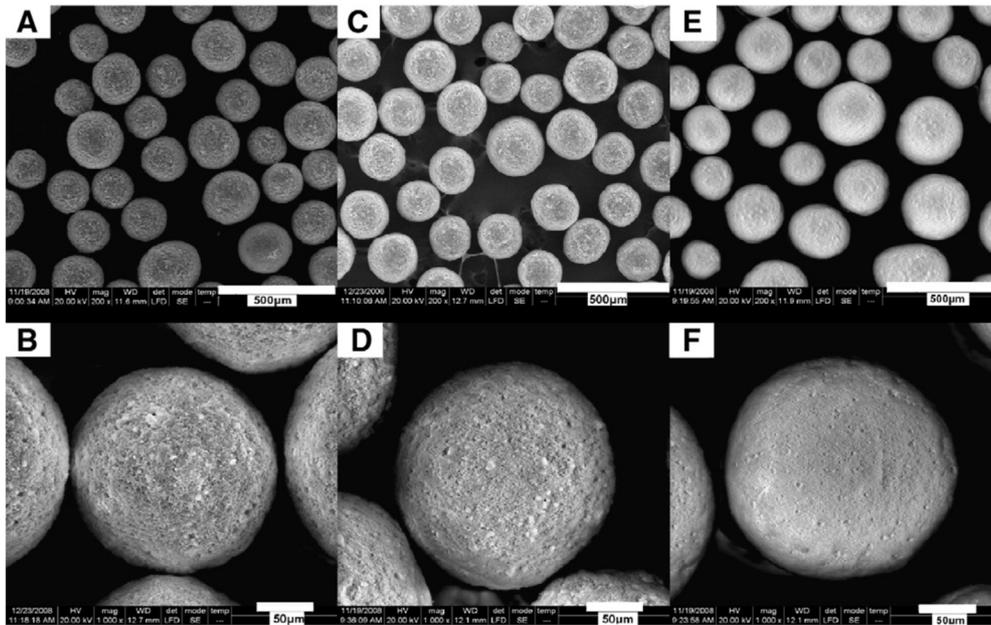


Figure I.11 : A) et B) : microsphères de PHBHV/HA-AL (30%HA) ; C) et D) microsphères de PHBHV/HA-AL (50%HA) ; F) microsphères de PHBHV pur. (Images en microscopie électronique à balayage. A, C et E : x200 ; B, d et F : x1000). HA : hydroxyapatite ; AL : alendronate¹²⁰.

Les PHA peuvent également être utilisés sous forme d'implants pour le relargage de principe actif. Un antibiotique a été intégré dans des bâtonnets de PHBHV (22%HV) qui ont été implantés dans le tibia d'un lapin infecté par *Staphylococcus aureus*. Le relargage complet du principe actif a été démontré après une semaine ; le temps de relargage a été augmenté à 2 semaines en effectuant un revêtement des bâtonnets incorporant le principe actif avec du PHBHV. Il a par ailleurs été montré que l'infection était réduite au 15ème jour d'implant et que la guérison était complète après un mois (Figure I.12a). Des endoprothèses métalliques ont été recouvertes par du PHBHV, PHO, PHO-COOH et PHBHV-b-PLA contenant un immunosuppresseur, le sirolimus¹²². Le principe actif a été relargué à plus de 80% en quelques heures sauf pour le copolymère PHBHV-b-PLA où l'effet a été moins prononcé. Cependant, il a été montré qu'en rajoutant une couche de PHBHV ne contenant pas de principe actif, sa libération est fortement ralentie¹²² (figure I.12b).

Enfin, des gels à base de PHO greffé avec du monoacrylate de poly(éthylène glycol) (PEGMA-g-PHO) ont été utilisés pour étudier le relargage d'ibuprofène¹²³. Il a été montré que

le taux de greffage du PEGMA influençait la cinétique de relargage. La cristallinité élevée des PHA_{SCL} engendre un relargage rapide alors que le système à base d'un PHA_{MCL}, le PHO, permet une libération constante d'ibuprofène en 9 jours.

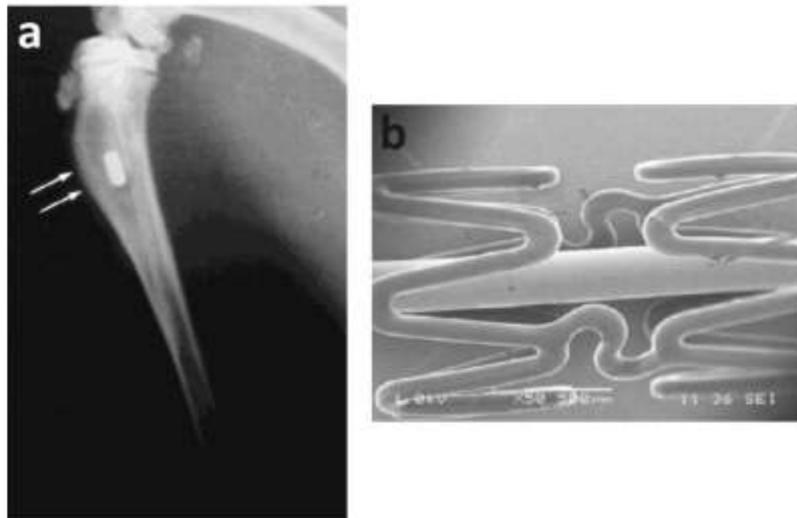


Figure I.12 : a. Implant antibiotique à base de PHBV¹²⁴ b. Image de stent enrobé de PHA¹²².

I.2.5 Biomatériaux et principe de théranostique

Au cours des dernières années, la recherche de nouveaux matériaux destinés aux applications médicales s'est fortement accentuée. On désigne comme biomatériau tout matériau d'origine naturelle ou synthétique qui entre en contact avec les tissus, le sang ou les liquides biologiques et qui est utilisé dans les applications prothétiques, diagnostiques, thérapeutiques ou de stockage, sans nuire à l'organisme vivant et à ses composantes¹²⁵.

Les biomatériaux peuvent être naturels ou synthétisés en laboratoire, à partir de matériaux métalliques, céramiques, composites, ou polymères, et sont souvent conçus pour soutenir la croissance cellulaire et la reconstruction tissulaire¹²⁶.

La visualisation de ces biomatériaux au sein de l'organisme constitue un enjeu majeur dans le suivi thérapeutique afin d'obtenir des informations quant à la localisation et l'implantation

du biomatériau, son intégration tissulaire ainsi que pour suivre le processus de dégradation dans le cas d'implants résorbables.

Appliquée à l'administration ciblée de médicaments, en particulier pour la délivrance ciblée d'anticancéreux, la possibilité de visualiser l'adressage du traitement, sa libération au plus près des cellules tumorales, et de suivre l'effet du traitement localement afin de l'adapter, constitue une réelle avancée médicale. Ce concept qui vise à développer des biomatériaux à double usage permettant de coupler diagnostique et traitement est appelé « theranostique », contraction de thérapie et diagnostic. La théranostique constitue une nouvelle discipline médicale qui permet d'étudier le comportement spécifique d'une tumeur afin de définir le traitement le plus adapté. Elle s'inscrit dans la lignée de la médecine dite « personnalisée », ainsi elle peut faire appel à l'utilisation de nanoparticules ou de nanomédicaments qui iront agir directement sur leur zone cible.

L'aspect diagnostique de la théranostique repose principalement sur des mécanismes d'imagerie utilisant différents agents de contraste, véhiculé par des nanoparticules, afin de permettre la visualisation précise et l'évolution de la zone à traiter.

Parmi les différentes techniques d'imagerie médicale, l'IRM est probablement la plus intéressante pour un tel suivi car elle est non invasive, n'utilise aucun rayonnement et ne présente aucun danger pour la santé du patient. Par ailleurs l'IRM est une technique hautement résolutive qui permet de détecter des images de grandes qualités sous différentes profondeurs de tissus¹²⁷.

Malgré les atouts de cette technique, l'utilisation de l'IRM pour la visualisation d'implants prothétiques reste très limitée du fait de la composition des biomatériaux qui sont invisibles/transparents en IRM, et il convient de développer de nouveaux biomatériaux visibles en IRM.

I.3 Les biomatériaux visibles en Imagerie par Résonance Magnétique

I.3.1 Principe de l'IRM

La découverte du concept de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en 1946 par Bloch et Purcell (Prix Nobel en 1952) a permis le développement d'une nouvelle technique d'imagerie permettant d'obtenir des images anatomiques en trois dimensions. Depuis sa première utilisation en imagerie médicale en 1978¹²⁸, la technique de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est devenue maintenant incontournable. L'IRM est une technique d'imagerie médicale non invasive permettant d'avoir une vue 2D ou 3D de tout ou partie du corps. Elle permet d'obtenir des images anatomiques de tissus mous sans limitation d'exploration en profondeur et avec une bonne résolution spatiale, et ceci sans irradiation.

L'IRM et la RMN reposent sur le même phénomène quantique observé pour certains noyaux atomiques à spin nucléaire non nuls. Le spin nucléaire est une caractéristique quantique intrinsèque du noyau qui peut prendre des valeurs entières ou demi-entières : 0, 1 ou 1/2 pour les noyaux les plus courants. L'hydrogène (noyau étudié dans la majorité des examens d'IRM car extrêmement abondant dans le corps humain) et le fluor possèdent un spin de 1/2. En l'absence de champ magnétique externe, l'orientation des moments magnétiques $\vec{\mu}$ au sein d'un échantillon est aléatoire et isotrope, c'est-à-dire qu'il présente des propriétés similaires quelle que soit sa direction (Figure I.13A). La somme de ces moments magnétiques correspond à une aimantation nulle à l'échelle macroscopique.

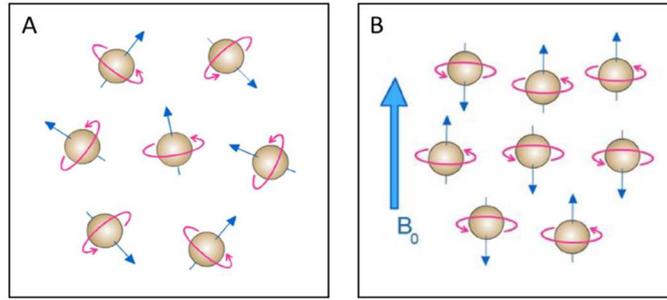


Figure I.13 : Orientation des moments magnétiques en absence (A) et en présence (B) de champ magnétique externe.

En présence d'un champ magnétique uniforme \vec{B}_0 dirigé arbitrairement selon un axe z, les moments magnétiques vont s'orienter dans les directions parallèles ou antiparallèles au champ (Figure I.13B), correspondant respectivement aux états énergétiques fondamental et excité. Les noyaux vont alors se distribuer sur deux niveaux d'énergie : spin +1/2 et spin -1/2 (Figure I.14). La répartition des moments magnétiques sur les deux niveaux d'énergie n'étant pas symétrique, il en résulte une aimantation totale non nulle \vec{M}_0 .

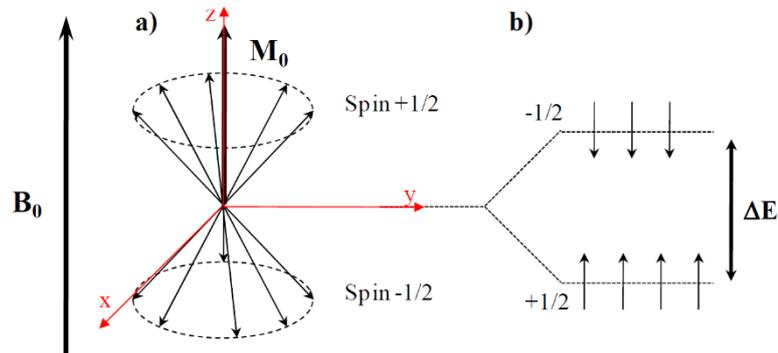


Figure I.14 : a) Orientation des moments magnétiques placés dans un champ magnétique \vec{B}_0 . b) Distribution des niveaux d'énergie

Un champ magnétique variable (\vec{B}_1), perpendiculaire à \vec{B}_0 , est ensuite appliqué de façon transitoire sous la forme d'une impulsion électromagnétique radio fréquence. L'aimantation \vec{M}_0 est alors écartée de sa position d'équilibre pour entrer dans un mouvement de précession autour de \vec{B}_0 (Figure I. 15A).

À la fin de l'impulsion radio fréquence, le retour de l'aimantation à sa position d'équilibre (Figure I.15B), appelée relaxation, se réalise selon deux temps caractéristiques, T1 : relaxation longitudinale et T2 : relaxation transversale.

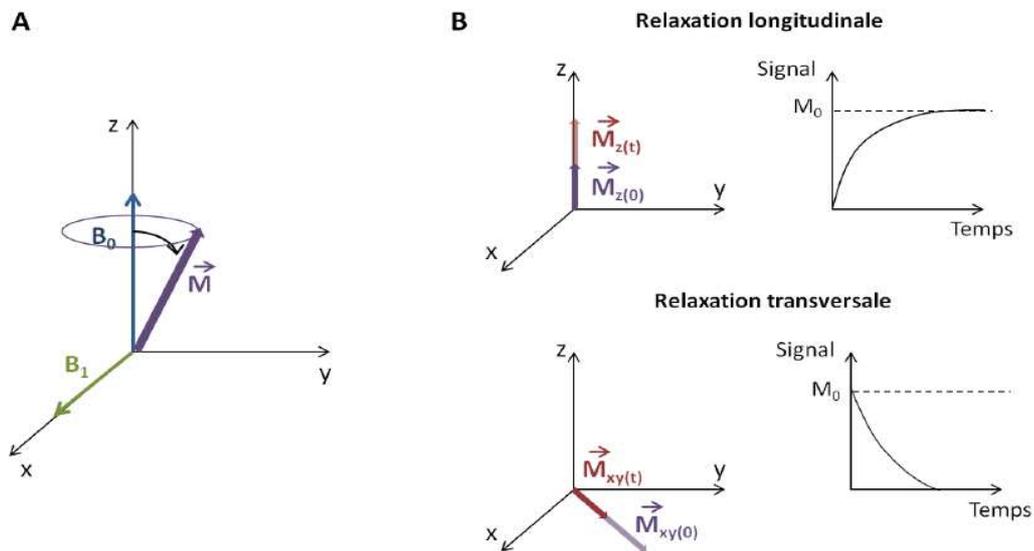


Figure I.15 : A) Bascule de l'aimantation après application d'un champ magnétique \vec{B}_1 .
 B) Relaxation de l'aimantation selon z : longitudinale et dans le plan xy : transversale.

Les temps de relaxation T1 et T2 dépendent de nombreux paramètres tels que la mobilité, l'environnement des protons de l'eau, la température et la viscosité du milieu. Dans les tissus biologiques, la perte du signal transversal est toujours plus rapide que le retour à l'équilibre de l'aimantation longitudinale. En effet, le temps de relaxation transversale T2 est plus court que le temps de relaxation longitudinale T1. En fonction de leur nature, les tissus et organes du corps humain sont caractérisés par des temps de relaxation différents. Cette différence est à l'origine des différents niveaux de gris observables dans les images IRM, permettant de distinguer chaque type de tissu et de leurs éventuelles altérations (tumeurs).

I.3.1.1 Agents de contraste utilisé en IRM

Les temps de relaxation T1 et T2 dépendent de nombreux paramètres. Parfois le contraste intrinsèque des tissus n'est pas suffisant pour observer des variations sensibles. Le choix de la séquence (écho de spin ou écho de gradient) ainsi que la pondération des temps de relaxation peuvent permettre d'augmenter ce contraste. Cependant, dans la plupart des cas ces paramètres sont insuffisants et l'utilisation d'agents de contraste s'avère indispensable. L'injection d'agents de contraste a pour but d'augmenter les vitesses de relaxation ($1/T1$ et $1/T2$) des protons des molécules d'eau, c'est-à-dire de raccourcir le temps pendant lequel les spins de ces protons regagnent leur état initial après excitation par l'onde de radiofréquence. Ce phénomène permet donc d'augmenter le contraste du signal observé par IRM. Il est intéressant de préciser que ce n'est pas l'agent de contraste qui est visualisé en IRM mais bien son influence sur la relaxation des protons de l'eau situés dans l'environnement proche de l'agent de contraste. Il existe deux grandes familles d'agents de contraste : les agents de contraste positifs ou agents T1, et les agents de contraste négatifs ou T2.

- Les agents de contraste positifs « T1 » induisent une augmentation du signal. Ils diminuent à la fois les temps de relaxation T1 et T2 mais ils ont une plus forte influence sur le temps de relaxation longitudinale (T1).
- Les agents de contraste négatifs « T2 » induisent une diminution de l'intensité du signal en agissant préférentiellement sur le temps de relaxation transversale (T2).

Les agents de contraste négatifs sont composés d'éléments superparamagnétiques comme les particules d'oxyde de fer. Elles sont composées d'un cœur cristallin d'oxydes de fer enrobés d'une matrice de dextrane ou de siloxane pour empêcher leur agrégation et ainsi les stabiliser dans les milieux biologiques¹²⁹. La taille de la particule détermine sa relaxivité (vitesse de relaxation normalisée par la concentration de l'agent de contraste). Il existe trois grandes familles de particules d'oxydes de fer, classées selon leur taille :

- Les USPIO (Ultra-Small SuperParamagnetic Iron Oxide) dont le diamètre est inférieur à 50 nm,
- Les SPIO (SuperParamagnetic Iron Oxide) dont le diamètre est compris entre 50 nm et 1 μm ,
- MION (Micro Iron Oxide Nanoparticule) dont le diamètre est de l'ordre du micromètre.

La toxicité du fer contenu dans ces nanoparticules, utilisées pour un usage diagnostique ponctuel, est considérée comme négligeable car celui-ci est éliminé *via* le cycle du fer endogène¹³⁰.

Les agents de contraste positifs sont composés d'atomes paramagnétiques, c'est-à-dire d'éléments comportant un moment magnétique élevé du fait de leurs électrons non appariés. Ils ont pour effet de raccourcir le temps de relaxation T1 du proton. Plus leur concentration et leur relaxivité sont importantes, plus les zones où se retrouvent ces agents apparaissent claires sur l'image IRM. C'est le cas entre autres du manganèse, du fer et du dysprosium mais le gadolinium reste l'élément le plus utilisé. En effet ses sept électrons non appariés lui confèrent un moment magnétique élevé et son état électronique symétrique lui confère également un temps de relaxation plus long que les autres éléments de la famille des lanthanides (10^{-8} , 10^{-9} s). L'ion gadolinium (Gd^{3+}) est utilisé depuis les années 1980 pour la formulation d'agents de contraste¹³¹. Sous sa forme ionique libre, le Gd^{3+} est potentiellement toxique car il est antagoniste de l'ion calcium (Ca^{2+}) et entre donc en compétition avec ses récepteurs biologiques. Cependant, sa toxicité est considérablement diminuée lorsqu'il est chélaté au sein de molécules, linéaires ou macrocycliques. Parmi les nombreuses architectures des ligands, neuf chélates de Gd^{3+} ont été développés (Figure I.16).

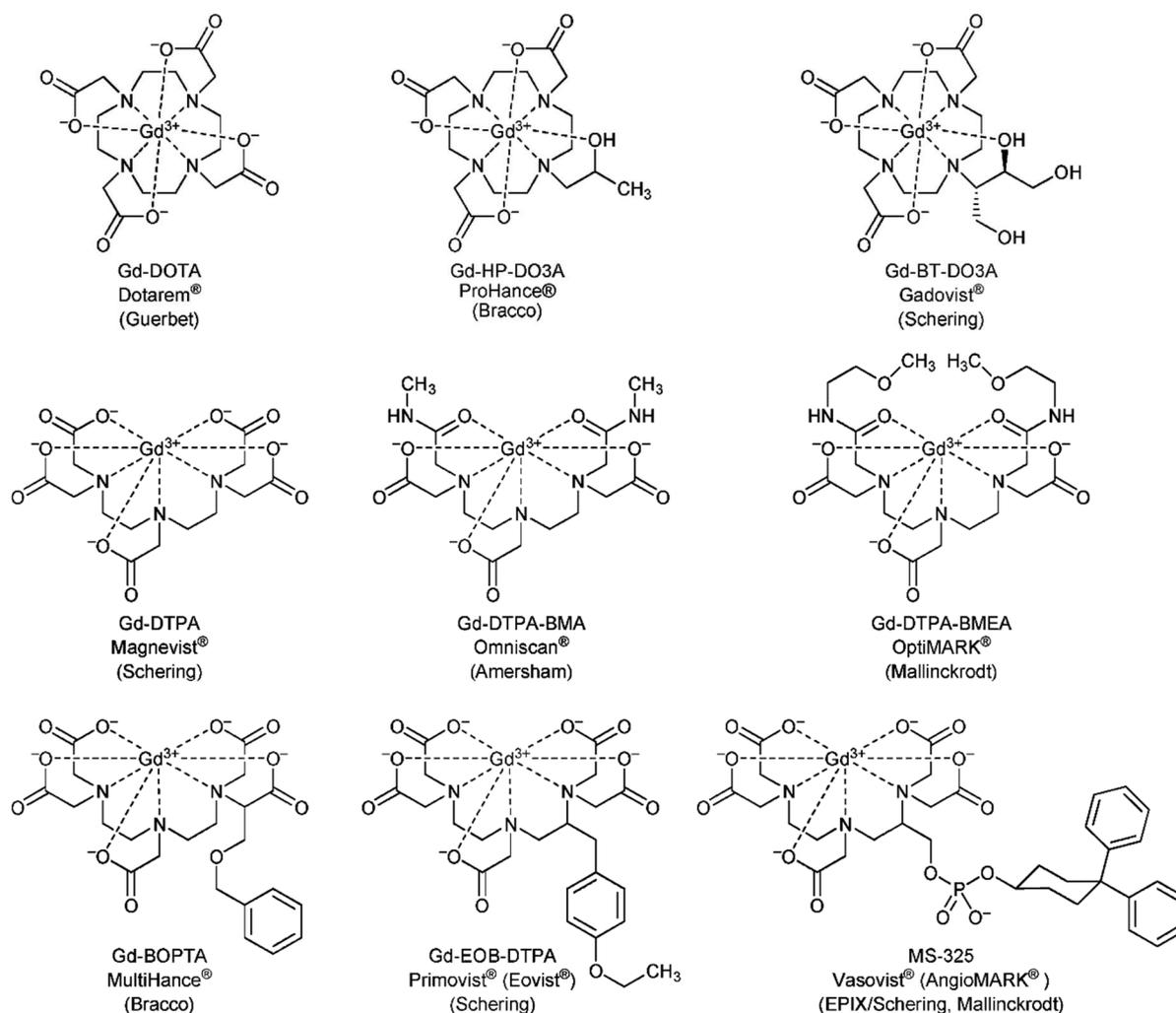


Figure I.16 : Structure chimique des principaux agents de contraste à base de gadolinium commercialisés¹³¹.

La stabilité dans l'organisme de ces complexes a été récemment mise en cause, à la suite de la découverte d'une pathologie : la fibrose néphrogénique systémique causée par la décomplexation du Gd^{3+} en milieu acide chez certains patients, conduisant à des défaillances rénales¹³². Aux États-Unis en 2012, la Food and Drug Administration (FDA) a émis une alerte sur l'injection de tous les chélates de gadolinium, notamment aux patients en insuffisance rénale sévère^{133,134}; tandis qu'en Europe, trois des produits les moins stables (Omniscan®, Optimark® et Magnevist®) sont contre-indiqués chez ces patients. En 2017, l'Agence européenne des médicaments (EMA) étend la recommandation de prudence à l'utilisation de tous les autres chélates de gadolinium chez les patients en insuffisance rénale sévère^{135,136}.

I.3.2 Biomatériaux à base de polyesters biodégradables visibles par IRM

L'intérêt des biopolymères pour l'élaboration de biomatériaux visibles en IRM repose sur leur très grande diversité de composition, d'architecture et la possibilité de les fonctionnaliser. Les polymères les plus utilisés dans le domaine biomédical sont les polyesters aliphatiques¹³⁷ : poly(acide lactique) (PLA), le poly(e-caprolactone) (PCL), le poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) et la famille des PHA. Les polyesters aliphatiques et leurs copolymères sont des thermoplastiques qui présentent de nombreux avantages, tels qu'une facilité de mise en forme et d'utilisation et un large éventail de propriétés facilement ajustables et personnalisables.

Tableau I.3 : Biomatériaux à base de polyesters visibles par IRM

Système	Polyester	Agent de contraste utilisé	Référence	
Nano-microparticules	PLA	SPIO (Fe ₃ O ₄)	Xiong 2017 ¹³⁸ Cheng 2015 ¹³⁹ Li 2014 ¹⁴⁰	
		Gd (DTPA)	Kim 2014 ¹⁴¹ Liu 2011 ¹⁴²	
	PGLA	SPIO (Fe ₃ O ₄) Gd (Gd ₂ O ₃)	Xiao 2019 ¹⁴³ Bennewitz 2013 ¹⁴⁴	
	PCL	Gd	Cao 2017 ¹⁴⁵ Porsio 2015 ¹⁴⁶ Li 2011 ¹⁴⁷	
		SPIO (Fe ₃ O ₄)	Yang 2019 ¹⁴⁸ Yang 2019 ¹⁴⁹ Wei 2017 ¹⁵⁰ Wang 2018 ¹⁵¹ Liu 2017 ¹⁵² Cui 2017 ¹⁵³	
	PHBHV	SPIO (Fe ₃ O ₄)	Vilos 2013 ¹⁵⁴	
		Holmium	De Burgos 2019 ¹⁵⁵	
	Dispositifs médicaux	PLA et PCL	Gd (DOTA)	Schulz 2019 ¹⁵⁶
		PLA	Gd (Gadodiamide) Gd (Dotarem)	Goodfriend 2015 ¹⁵⁷ Hickethier 2016 ¹⁵⁸
	PCL	MOF	Hamideh 2020 ¹⁵⁹	
		DTPA-Gd	Blanquer 2012 ¹⁶⁰ El Haboubni 2013 ¹⁶¹	
	PHBHV	Gd	Letouzey 2015 ¹⁶²	
		Gd (MF-nHAp)	Ganesh 2014 ¹⁶³	
	PHBHV	Fe ₃ O ₄	Pramanik 2019 ¹⁶⁴	

Afin d'élaborer des systèmes nanoparticulaires visibles en IRM, le poly(acide lactique) (PLA) et son copolymère le poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) ont été associés à des SPIO et des chélates de gadolinium. Ainsi, un agent de contraste multifonctionnel à base de PLA-PEG et chargé avec un complexe Gd-DTPA a permis une augmentation de la relaxivité tout en garantissant une absence de cytotoxicité, présentant un grand potentiel pour le diagnostic précoce des tumeurs du foie¹⁴². Ce copolymère amphiphile PLA-PEG a servi à la l'élaboration de micelles chargées de Gd-DTPA sensibles au pH, qui se désorganisent en milieu acide. Une augmentation du contraste T1 a été observé dans les régions tumorales grâce à ces micelles¹⁴¹. Le Gadolinium, utilisé sous forme de nanocristaux de Gd₂O₃ a été encapsulé dans une matrice de PLGA, permettant le suivi de cellules marquées par IRM¹⁴⁴. Des oxydes de fer encapsulés au sein de matrice de PLA ont également montré des capacités de visualisation en IRM tout en assurant une bonne biocompatibilité^{138,140} (Figure I.17). Une formulation de nanoparticules oxyde de fer enrobés de PEG-PLA associé à de la curcumine a permis le passage de la barrière hémato-encéphalique, et ainsi la visualisation spécifique par IRM des plaques amyloïdes impliquées dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer¹³⁹.

Le poly(ϵ -caprolactone) (PCL) est un polyester couramment utilisé pour l'élaboration de nanovecteurs théranostiques. D'une part, des micelles de PCL associés à des chélates de gadolinium ont montré un renforcement du contraste en IRM ainsi qu'une bonne biocompatibilité démontrée lors de tests réalisés *in vivo*¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. D'autre part, le PCL a servi de matrice pour l'élaboration de systèmes théranostiques avec des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques (SPION). Des micelles constituées de PCL-PEG en combinaison avec des SPION ont montré un excellent effet contraste *in vitro*¹⁵⁰. La présence d'acide folique (FA) au sein de systèmes théranostiques permet le ciblage efficace des cellules tumorales. Ainsi des polymersomes FA-PGA-b-PCL¹⁵² et des micelles FA-PEG-PCL¹⁵³ associées à des SPION se sont révélés être de très bons candidats pour des applications théranostiques en associant un contraste élevé en IRM et un ciblage efficace ces cellules tumorales (Figure I.17). Enfin, des études ont également incorporé une molécule anticancéreuse modèle : la doxorubicine (DOX) au sein de nanovecteurs à base de PCL, permettant ainsi le développement de candidats prometteurs pour l'IRM et la chimiothérapie tumorale guidée par imagerie^{148,149,151}.

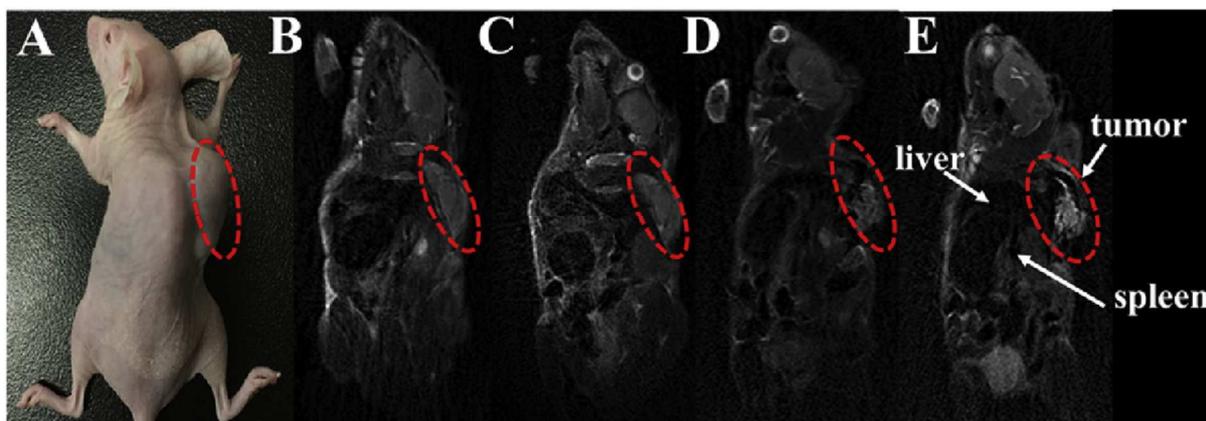


Figure I.17 : Images IRM pondérées en T2 enregistrées sur une souris nude portant une tumeur HeLa (cercle rouge A). B : avant l'injection ; C : 10 min ; D : 30 min ; E : 60 min (E) après l'injection intraveineuse d'une solution de FA-PGA-b-PCL¹⁵².

Concernant le développement de nano et microparticules visibles par IRM à base de PHA, le PHBHV a été utilisé lors de deux études. Vilos¹⁵⁴ a développé des nanoparticules multifonctionnelles à base de PHBHV comprenant un agent de contraste pour l'IRM un oxyde de fer (Fe_3O_4) ainsi qu'un agent d'hyperthermie. Les nanoparticules d'une taille de 250 nm se sont avérées prometteuses en tant qu'agent de contraste pour l'IRM et pour le traitement de l'hyperthermie. Plus récemment, des microsphères de PHBHV chargées d'holmium, un agent paramagnétique, ont été développées¹⁵⁵. Il a été montré que ces microsphères étaient stables dans le temps car aucune libération d'holmium (III) n'a été détectée lors d'une exposition de 9 jours à un tampon de phosphate de sodium. De plus, ces microsphères étaient très efficaces pour obtenir des images pondérées T2 et T2* en IRM, et pourraient donc être utilisées comme agent de contraste.

La mise en œuvre de dispositifs médicaux implantables visible par IRM à base de polyesters a également été décrite. Afin de les rendre visibles en IRM, Schulz¹⁵⁶ a greffé de manière covalente du Gadolinium (Gd) à la surface de divers biomatériaux polymères, dont le PCL et le PLA, utilisés pour l'élaboration d'un treillis de soutien tissulaire. Ces supports ont été implantés chez des rats pour une évaluation *in vivo* de leur capacité à être détecté en IRM pendant 1 mois. Une évaluation histologique et des études de biodistribution du Gd ont confirmé le potentiel de cette approche pour la visualisation des dispositifs par IRM. Un stent à base de PLA associé à du Gd a provoqué une réponse inflammatoire moins importante

qu'une endoprothèse métallique de contrôle. Par ailleurs, ce stent visible par IRM a permis de délivrer de manière contrôlée de la ciprofloxacine (antibiotique) pendant une semaine et de la dexaméthasone (agent anti-inflammatoire) pendant trois mois¹⁵⁷. L'implantation de stents à base de PLA marqués au Dotarem (Gd) a permis de suivre par IRM, de manière non invasive, l'évolution de la perméabilité de l'artère coronaire suite à une angioplastie¹⁵⁸. La visualisation de stents formulés à base de PCL recouverts d'héparine a également été étudiée grâce à la présence de MOF (Metal Organic Framework) incorporés dans le biomatériau¹⁵⁹. Ces derniers se sont révélés hautement biodégradables lors des tests de dégradation dans diverses conditions. De plus, la libération *in vitro* de l'héparine et de la rapamycine assurent la prévention de la coagulation du sang immédiatement après la pose du stent dans l'artère et, limite donc à plus long terme les risques de sténose.

Des treillis à base de PCL ont été mises au point dans différentes études. Un complexe Gd-DTPA a été greffé au PCL puis déposé à la surface d'un support en PP commercial, permettant sa visualisation par IRM *in vitro* pendant au moins un an, tout en garantissant un relargage très faible du Gd¹⁶⁰ (Figure I.18). La stabilité et la cytocompatibilité de PCL propargylé greffé avec du Gd-DTPA ont également été évaluées¹⁶¹. Des images à haute résolution du treillis revêtu de PCL-Gd ont été obtenues *in vivo* avec une IRM expérimentale de 7T ainsi qu'une IRM clinique de 3T¹⁶². Un mât électrospinné en PCL dans lequel ont été incorporés des nanocristaux d'hydroxyapatite contenant du Gd (MF-nHAp) a été mis au point par Ganesh et al¹⁶³. L'incorporation de MF-nHAp dans les nanofibres a montré une augmentation substantielle de la résistance du mât électrospinné, de l'adsorption des protéines, de la prolifération et de la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses humaines ainsi qu'une amélioration de l'imagerie.

Concernant la famille des PHA, du PHBHV a été fonctionnalisé par l'oxyde de graphite (GO) et du Fe₃O₄¹⁶⁴ (Fe₃O₄/GO-PHBHV). L'analyse IRM a révélé l'efficacité des nanoparticules de Fe₃O₄ en tant qu'agent de contraste négatif avec une valeur de relaxivité plus élevée. L'adhésion et la prolifération de cellules de fibroblastes sur la surface du Fe₃O₄/GO-PHBHV ont montré une stabilité physiologique et une biocompatibilité de ce composite.

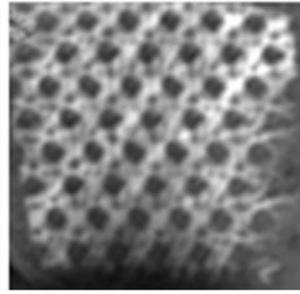


Figure I.18 : Image IRM d'un treillis commerciale recouvert de DTPA-Gd-PCL¹⁶⁰.

Le Gd est donc le principal agent de contraste utilisé en IRM clinique. Cependant les récentes limitations remettent en question son utilisation et encouragent la recherche de nouveaux agents contrastants, afin que l'IRM, en tant que technique non-invasive et hautement résolue, reste accessible au plus grand nombre de patients.

Parmi ces nouveaux agents potentiels visibles en IRM, les marqueurs fluorés représentent une alternative intéressante.

I.3.3 Développement de l'IRM du fluor

Comme mentionné précédemment, l'IRM ^1H conventionnel repose sur la propriété des noyaux d'hydrogène à s'aligner dans un champ magnétique et être ensuite perturbés par des impulsions de radiofréquence. Comme le fluor ^{19}F a un noyau de spin 1/2 et un rapport gyromagnétique très proche de celui du proton, la détection du fluor peut s'effectuer à l'aide de spectromètres à protons. Les images IRM ^{19}F peuvent être superposées aux images anatomiques d'IRM ^1H pour mieux localiser la tumeur^{165,166}. De plus, comme le ^{19}F se trouve uniquement à l'état de traces dans les tissus biologiques, le signal ^{19}F ne sera pas perturbé par un signal de fond endogène. En revanche, les molécules fluorées possèdent de longs temps de relaxation T1 et des T2 courts, qui se traduit par des temps d'acquisition d'image longs et pouvant entraîner une atténuation du signal.

Au cours des dernières années, le développement et la pertinence de l'IRM ^{19}F ont suscité un intérêt croissant pour une utilisation en pratique clinique. Pour assurer une sensibilité suffisante de l'IRM ^{19}F , des sondes fluorées à forte teneur en fluor ont été envisagées. Actuellement, il existe une large gamme de sondes fluorées disponibles pour des applications expérimentales et même cliniques¹⁶⁷. Elles ont été répertoriées dans différentes revues¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. On retrouve parmi ces applications, la mise en œuvre des sondes IRM ^{19}F , destinées au ciblage cellulaire¹⁷¹⁻¹⁷³, le suivi *in vivo* de cellules marquées¹⁷⁴⁻¹⁷⁸ et aussi le diagnostic du cancer¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Les sondes polymères peuvent être chargées en fluor et représentent des plateformes polyvalentes propices à une grande variété d'applications biomédicales. Par exemple, les perfluorocarbones (PFC) et les perfluoropolyéthers sont des agents fluorés utilisés pour l'IRM ^{19}F *in vivo* et *in vitro*. Les PFC sont des molécules organiques où tous les atomes d'hydrogène ont été remplacés par des atomes de fluor^{182,183}. Leurs propriétés physico-chimiques les rendent attractives pour les applications médicales. De plus, de nombreuses caractéristiques telles que la faible tension superficielle, l'hydrophobicité et la lipophobicité, et l'absence de métabolisme sont particulièrement intéressantes pour des applications cliniques¹⁸⁴. Les PFC sont biologiquement inertes : faible toxicité, absence d'effets cancérogènes, mutagènes ou tératogènes et ne provoquent pas de réactions immunologiques¹⁸⁵. La biocompatibilité et la toxicité des PFC a été rigoureusement décrite^{186,187} car les PFC liquides étaient initialement utilisés comme substituts de sang artificiel pour la ventilation liquide en raison de leur grande solubilité dans l'oxygène. Les PFC utilisés dans le domaine biomédical ont des structures variées, ils peuvent exister sous forme de gaz, de liquides ou même de solides selon leur poids moléculaire et leur structure chimique (tableau I.4)¹⁸⁸. Pour les PFC liquides, étant donné leur faible solubilité dans l'eau, ils ont été formulés sous forme de nanoémulsions ou de nanocapsules pour permettre une injection intraveineuse^{189,190}. Les PFC ont également été testés comme agents de contraste pour l'échographie et l'IRM du fluor depuis la fin des années 1970.

Tableau I.4 : Paramètres physico-chimiques des PFC utilisés couramment en IRM ¹⁹F.

PFCs	Formula	MW ^a	Density (g/mL)	BP (°C) ^b
Sulfur hexafluoride	SF ₆	146	NA	-64
Perfluoropropane	C ₃ F ₈	188	NA	-37
Perfluorobutane	C ₄ F ₁₀	238	NA	-2
Perfluoropentane	C ₅ F ₁₂	288	1.62	26-36
Perfluorohexane	C ₆ F ₁₄	338	1.76	58-60
Perfluorodichlorooctane	C ₈ F ₁₆ Cl ₂	471	1.84	115
Perfluorooctyl bromide	C ₈ F ₁₇ Br	499	1.93	140.5
Perfluorononane	C ₉ F ₂₀	488	1.80	126
Perfluorodecalin	C ₁₀ F ₁₈	462	1.99	144
Perfluoro-15-crown-5-ether	C ₁₀ F ₂₀ O ₅	580	1.78	145
Perfluorotributylamine	C ₁₂ F ₂₇ N	671	1.88	173-181
PERFECTA	C ₂₁ H ₈ F ₃₆ O ₄	1008	2.09	ND

^a Molecular weight.

^b Boiling point.

I.4 Conclusion

Les polyhydroxyalcanoates se sont imposés au cours des dernières décennies comme des biopolyesters à fort potentiel. En raison de leurs propriétés attrayantes liées à leur biodégradabilité, biocompatibilité et leur capacité à être fonctionnalisés, les PHA sont de plus en plus utilisés pour des applications biomédicales. En effet, la grande diversité structurale des PHA, en particulier celle des PHA_{MCL}, permet d'envisager des modifications de leur structure conduisant au développement de produits aux propriétés mécaniques et physico-chimiques très spécifiques. L'Imagerie par Résonance Magnétique est une technique non invasive aujourd'hui très largement utilisée pour le diagnostic, le suivi des maladies, le suivi postopératoire, et de plus en plus pour le développement de la théranostique. Elle utilise des agents de contraste dont le plus utilisé est le Gd mais dont l'utilisation a été récemment limitée du fait des risques pour la santé du patient. La mise en œuvre de nouveaux dispositifs médicaux visibles en IRM, utilisant des agents de contraste alternatifs au Gd constitue un nouveau concept tout à fait intéressant pour une application en IRM.

Dans ce projet de thèse, nous proposons d'étudier les potentialités des PHA en association avec des marqueurs fluorés utilisés comme agents de visualisation pour une application en Imagerie par Résonance Magnétique médicale. Dans un premier temps, nous chercherons à produire des PHA_{MCL} insaturés à partir de bactéries marines. L'optimisation des conditions de fermentation et la caractérisation physico-chimique des polymères ainsi produits va permettre la production de PHA de structure contrôlée. La particularité est des PHA_{MCL} est la présence de groupements fonctionnalisables au sein de leurs chaînes latérales qui devrait permettre de réaliser des réactions de modifications chimiques. Ainsi, dans un deuxième temps, les PHA_{MCL} seront greffés à des molécules fluorées puis utilisés comme matrice pour l'élaboration de nouveaux biomatériaux visibles en IRM ¹⁹F. Dans cette optique, nous nous intéresserons au développement de nanocapsules de PHA amphiphiles perfluorées visibles en IRM ¹⁹F, et nous étudierons également le potentiel de PHA fluorés comme revêtement de biomatériau prometteur pour la détection par IRM.

I.5 Références bibliographiques

1. Geyer, R., Jambeck, J. R. & Law, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* **3**, e1700782 (2017).
2. Wilcox, C., Sebille, E. V. & Hardesty, B. D. Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 11899–11904 (2015).
3. Ellen Macarthur Foundation. The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics. *The New Plastics Economy* (2016).
4. Chanprateep, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 621–632 (2010).
5. Jasinska, L., Villani, M., Wu, J., Es, D., Klop, E., Rastogi, S., Koning, C.E. Novel, Fully Biobased Semicrystalline Polyamides. *Macromolecules* **44**, 3458–3466 (2011).
6. Shen, L., Haufe, J. & Patel, M. K. *Product overview and market projection of emerging bio-based plastics*. 243 (2009).
7. Avérous, L. Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review. *J. Macromol. Sci. Part C* **44**, 231–274 (2004).
8. Sudesh, K., Abe, H. & Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **10**, 1503–1555 (2000).
9. Front Matter. in *Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings* (ed. Plackett, D.) i–xviii (John Wiley & Sons, Ltd, 2011). doi:10.1002/9781119994312.fmatter.
10. Steinbüchel, A. & Valentin, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 219–228 (1995).
11. Rehm, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J.* **376**, 15–33 (2003).
12. Tsuge, T. Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis. *Polym. J.* **48**, 1051–1057 (2016).
13. Steinbüchel, A. & Lütke-Eversloh, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem. Eng. J.* **16**, 81–96 (2003).
14. Tappel, R. C., Wang, Q. & Nomura, C. T. Precise control of repeating unit composition in biodegradable poly(3-hydroxyalkanoate) polymers synthesized by *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 480–486 (2012).
15. Zinn, M., Witholt, B. & Egli, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 5–21 (2001).
16. Witholt, B. & Kessler, B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 279–285 (1999).
17. Lageveen, R. G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. & Witholt, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2924–2932 (1988).
18. Anderson, A. J. & Dawes, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**, 450–472 (1990).

19. Witholt, B., de Smet, M.J., Kingm, J., van Beilen, J.B., Kok, M., Lageveen, R.G., Eggink, G. Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors: background and economic potential. *Trends Biotechnol.* **8**, 46–52 (1990).
20. Fritzsche, K., Lenz, R. W. & Fuller, R. C. An unusual bacterial polyester with a phenyl pendant group. *Makromol. Chem.* **191**, 1957–1965 (1990).
21. Haywood, G. W., Anderson, A. J., Ewing, D. F. & Dawes, E. A. Accumulation of a Polyhydroxyalkanoate Containing Primarily 3-Hydroxydecanoate from Simple Carbohydrate Substrates by *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3354–3359 (1990).
22. Eggink, G., Waard, P. & Huijberts, G. N. M. The role of fatty acid biosynthesis and degradation in the supply of substrates for poly(3-hydroxyalkanoate) formation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **103**, 159–163 (1992).
23. Haywood, G. W., Anderson, A. J. & Dawes, E. A. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**, 1–6 (1989).
24. Huijberts, G. N., Eggink, G., de Waard, P., Huisman, G. W. & Witholt, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 536–544 (1992).
25. Huijberts, G. N., de Rijk, T. C., de Waard, P. & Eggink, G. ¹³C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly (3-hydroxyalkanoate) synthesis. *J. Bacteriol.* **176**, 1661–1666 (1994).
26. Lenz, R. W. & Marchessault, R. H. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* **6**, 1–8 (2005).
27. Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G. & Olivera, E. R. Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 251–260 (2003).
28. Grage, K., Jahns, C.A., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A., Rehm, B.H.A. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **10**, 660–669 (2009).
29. Ramsay, J. A., Berger, E., Voyer, R., Chavarie, C. & Ramsay, B. A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol. Tech.* **8**, 589–594 (1994).
30. Kessler, B. & Witholt, B. Synthesis, recovery and possible application of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: A short overview. *Macromol. Symp.* **130**, 245–260 (1998).
31. Jacquel, N., Lo, C.-W., Wei, Y.-H., Wu, H.-S. & Wang, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem. Eng. J.* **39**, 15–27 (2008).
32. Doi, Y. *Microbial Polyesters*. (VCH, 1990).
33. Griebel, R. & Merrick, J. M. Metabolism of Poly-P-hydroxybutyrate. I. Purification, Composition, and Properties of Native Poly-P-hydroxybutyrate Granules from *Bacillus megaterium*". 6.
34. Mok, P.-S., Ch'ng, D. H.-E., Ong, S.-P., Numata, K. & Sudesh, K. Characterization of the depolymerizing activity of commercial lipases and detection of lipase-like activities in animal organ extracts using poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) thin film. *AMB Express* **6**, (2016).

35. Ch'ng, D. H. E., Lee, W. H., & Sudesh, K. Biosynthesis and Lipase-Catalysed Hydrolysis of 4-Hydroxybutyrate-Containing Polyhydroxyalkanoates from *Delftia acidovorans*. *Malays. J. Microbiol.* (2012) doi:10.21161/mjm.04212.
36. Chuah, J.-A., Yamada, M., Taguchi, S., Sudesh, K., Doi, Y., Numata, K. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing 5-hydroxyvalerate units: Effects of 5HV units on biodegradability, cytotoxicity, mechanical and thermal properties. *Polym. Degrad. Stab.* (2013).
37. Wu, Q., Wang, Y. & Chen, G.-Q. Medical Application of Microbial Biopolyesters Polyhydroxyalkanoates. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **37**, 1–12 (2009).
38. Mukai, K., Doi, Y., Sema, Y. & Tomita, K. Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotechnol. Lett.* **15**, 601–604 (1993).
39. Marchessault, R. H., Monasterios, C.J., Jesudason, J.J., Ramsay, B., Saracovan, I., Ramsay, J. & Saito, T. Chemical, enzymatic and microbial degradation of bacterial and synthetic poly-3-hydroxyalkanoates. 10.
40. Ying, T. H., Ishii, D., Mahara, A., Murakami, S., Yamaoka, T., Sudesh, K., Samian, R., Fujita, M., Maeda, M. & Iwata, T. Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response. *Biomaterials* **29**, 1307–1317 (2008).
41. Kumagai, Y., Kanesawa, Y. & Doi, Y. Enzymatic degradation of microbial poly(3-hydroxybutyrate) films. *Makromol. Chem.* **193**, 53–57 (1992).
42. Doi, Y., Kitamura, S. & Abe, H. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* **28**, 4822–4828 (1995).
43. Wang, Y.-W. Mo, W., Yao, H., Wu, Q., Chen, J., Chen, G.-Q. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Polym. Degrad. Stab.* **85**, 815–821 (2004).
44. Moskowitz, G. J. & Merrick, J. M. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. II. Enzymatic synthesis of D-(-)-beta hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* **8**, 2748–2755 (1969).
45. Kaplan, D.L. (1998) Biopolymers from Renewable Resources. Springer, Berlin. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-03680-8>
46. Ratner, B. D. The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century. *J Cardiovasc. Transl. Res.* **4**, 523–527 (2011).
47. Pawan, G. L. & Semple, S. J. Effect of 3-hydroxybutyrate in obese subjects on very-low-energy diets and during therapeutic starvation. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 15–17 (1983).
48. Brigham, C. J. & Sinskey, A. J. Applications of polyhydroxyalkanoates in the medical industry. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* **1**, 52–60 (2012).
49. Misra, S. K., Valappil, S. P., Roy, I. & Boccaccini, A. R. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* **7**, 2249–2258 (2006).
50. Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., Puzyr, A. P., Mogilnaya, O. A. & Efremov, S. N. Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**, 719–728 (2004).
51. Sevastianov, V. I., Perova, N. V., Shishatskaya, E. I., Kalacheva, G. S. & Volova, T. G. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **14**, 1029–1042 (2003).

52. Köse, G. T., Korkusuz, F., Korkusuz, P., Purali, N., Ozkul, A., Hasirci, V. Bone generation on PHBV matrices: an in vitro study. *Biomaterials* **24**, 4999–5007 (2003).
53. Bagdadi, A. V., Safari, M., Dubey, P., Basnett, P., Sofokleous, P., Humphrey, E., Locke, I., Edirsinghe, M., Terracciano, C., Boccaccini, A., Knowles, J.C., Harding, S.E., Roy, I. Poly(3-hydroxyoctanoate), a promising new material for cardiac tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, e495–e512 (2018).
54. Basnett, P., Ching, K.Y., Stolz, M., Knowles, J.C., Boccaccini, A.R., Smith, C., Locke, I.C., Keshavarz, T., Roy, I. Novel Poly(3-hydroxyoctanoate)/Poly(3-hydroxybutyrate) blends for medical applications. *React. Funct. Polym.* **73**, 1340–1348 (2013).
55. Lizarraga-Valderrama, L. R., Nigmatullin, R., Talyor, C., Haycock, J.W., Claessens, F., Knowles, J.C., Roy, I. Nerve tissue engineering using blends of poly(3-hydroxyalkanoates) for peripheral nerve regeneration. *Eng. Life Sci.* **15**, 612–621 (2015).
56. Qu, X.-H., Wu, Q., Liang, j., Qu, X., Wang, S-G., Chen, Q-G. Enhanced vascular-related cellular affinity on surface modified copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate (PHBHHx). *Biomaterials* **26**, 6991–7001 (2005).
57. Naveen, S. V., Tan, I.K.P., Goh, Y.S., Raghavendran, H.R.B, Murali, M.R., Kamarul, T. Unmodified medium chain length polyhydroxyalkanoate (uMCL-PHA) as a thin film for tissue engineering application – characterization and in vitro biocompatibility. *Mater. Lett.* **141**, 55–58 (2015).
58. Mozejko-Ciesielska, J. & Kiewisz, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiol. Res.* **192**, 271–282 (2016).
59. Mangeon, C., Michely, L., Rios de Anda, A., Thevenieau, F., Renard, E., Langlois, V. Natural Terpenes Used as Plasticizers for Poly(3-hydroxybutyrate). *ACS Sustain. Chem. Eng.* **6**, 16160–16168 (2018).
60. Mangeon, C., Modjinou, T., Rios de Anda, A., Thevenieau, F., Renard, E., Langlois, V. Renewable Semi-Interpenetrating Polymer Networks Based on Vegetable Oils Used as Plasticized Systems of Poly(3-hydroxyalkanoate)s. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **6**, 5034–5042 (2018).
61. Hocking, P. J. & Marchessault, R. H. Polyhydroxyalkanoates. in *Biopolymers from Renewable Resources* (ed. Kaplan, D. L.) 220–248 (Springer, 1998). doi:10.1007/978-3-662-03680-8_9.
62. Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R. & Roy, I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **72**, 29–47 (2011).
63. Prasad, P. & Kochhar, A. Active Packaging in Food Industry: A Review. *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.* **8**, 01–07 (2014).
64. Chen, G.-Q. Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. in *Plastics from Bacteria* (ed. Chen, G. G.-Q.) vol. 14 17–37 (Springer Berlin Heidelberg, 2010).
65. Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R. & Roy, I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **72**, 29–47 (2011).
66. Thellen, C., Coyne, M., Froio, D., Auerbach, M., Wirsén, C., Ratto, J. A Processing, Characterization and Marine Biodegradation Study of Melt-Extruded Polyhydroxyalkanoate (PHA) Films. *J. Polym. Environ.* **16**, 1–11 (2008).
67. Sanchez-Garcia, M. D., Gimenez, E. & Lagaron, J. M. Morphology and barrier properties of nanobiocomposites of poly(3-hydroxybutyrate) and layered silicates. *J. Appl. Polym. Sci.* **108**, 2787–2801 (2008).

68. Miguel, O., Fernandez-Berridi, M. J. & Irui, J. J. Survey on transport properties of liquids, vapors, and gases in biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). *J. Appl. Polym. Sci.* **64**, 1849–1859 (1997).
69. Miguel, O. & Irui, J. J. Evaluation of the transport properties of Poly(3-hydroxybutyrate) and its 3-hydroxyvalerate copolymers for packaging applications. *Macromol. Symp.* **144**, 427–438 (1999).
70. Miguel, O. & Irui, J. J. Water transport properties in poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biopolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **73**, 455–468 (1999).
71. Haugaard, V. K., Danielsen, B. & Bertelsen, G. Impact of polylactate and poly(hydroxybutyrate) on food quality. *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 233–240 (2003).
72. Levkane, V., Muizniece-Brasava, S. & Dukalska, L. Pasteurization effect to quality of salad with meat and mayonnaise. *Foodbalt* **2008**, 69–73 (2008).
73. Figueroa-Lopez, K. J., Cabedo, L., Lagaron, J. M. & Torres-Giner, S. Development of Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Monolayers Containing Eugenol and Their Application in Multilayer Antimicrobial Food Packaging. *Front. Nutr.* **7**, (2020).
74. Hermida, É. B., Mega, V.I., Yashchuk, O., Fernández, V., Eisenberg, P., Miyazaki, S.S. Gamma Irradiation Effects on Mechanical and Thermal Properties and Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate) Based Films. *Macromol. Symp.* **263**, 102–113 (2008).
75. Qi, Y., Beriot, N., Gort, G., Lwanga, E.H., Gooren, H., Yang, X., Geissen, V. Impact of plastic mulch film debris on soil physicochemical and hydrological properties. *Environ. Pollut.* **266**, 115097 (2020).
76. Chae, Y. Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review. *Environ. Pollut.* **9** (2018).
77. Huang, Y., Liu, Q., Jia, W., Yan, C. & Wang, J. Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment. *Environ. Pollut.* **260**, 114096 (2020).
78. Brodhagen, M., Goldberger, J.R., Hayes, D.G., Inglis, D.A., Marsh, T.L., Miles, C. Policy considerations for limiting unintended residual plastic in agricultural soils. *Environ. Sci. Policy* **69**, 81–84 (2017).
79. Kasirajan, S. & Ngouajio, M. Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: a review. *Agron. Sustain. Dev.* **32**, 501–529 (2012).
80. Sintim, H. Y. & Flury, M. Is Biodegradable Plastic Mulch the Solution to Agriculture’s Plastic Problem? *Environ. Sci. Technol.* **51**, 1068–1069 (2017).
81. Hassan, M. K., Abou-Hussein, R., Zhang, X., Mark, J. E. & Noda, I. Biodegradable Copolymers of 3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate (Nodax™), Including Recent Improvements in their Mechanical Properties. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **447**, 23/[341]-44/[362] (2006).
82. Brown, R. Polymers in Agriculture and Horticulture. *Rapra Technology*, 25 58–58 (2004).
83. Martínez Álvarez, V., Baille, A., Molina Martínez, J. M. & González Real, M. M. Effect of black polyethylene shade covers on the evaporation rate of agricultural reservoirs. *Span. J. Agric. Res.* **4**, 280 (2006).
84. Guerrini, S., Borreani, G. & Voojjs, H. Biodegradable Materials in Agriculture: Case Histories and Perspectives. in *Soil Degradable Bioplastics for a Sustainable Modern Agriculture* (ed. Malinconico, M.) 35–65 (Springer Berlin Heidelberg, 2017). doi:10.1007/978-3-662-54130-2_3.

85. Castellano, S., Scarascia, G., Russo, G., Briassoulis, D., Mistriotis, A., Hemming, S., Waaijenberg, D. Design and use criteria of netting systems for agricultural production in Italy. *J. Agric. Eng.* **39**, 31 (2008).
86. Lu, H., Madbouly, S.A., Schrader, J.A., Kessler, M.R., Grewelle, D., Graves, W.R. Novel bio-based composites of polyhydroxyalkanoate (PHA)/distillers dried grains with solubles (DDGS). *RSC Adv* **4**, 39802–39808 (2014).
87. Schrader, J. A., McCabe, K. G., Kratsch, H. A. & Koeser, A. Degradability of Bioplastic Containers in Soil and Compost. 23.
88. Grillo, R., de Melo, N.F.S., de Lima, R., Lourenço, R.W., Rosa, A.H., Fraceto, L.F. Characterization of Atrazine-Loaded Biodegradable Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) Microspheres. *J. Polym. Environ.* **18**, 26–32 (2010).
89. Lobo, F. A., de Aguirre, C.L., Silva, M.S., Grillo, R., de Melo, N.F.S., de Oliveira, L.K., de Morais, L.C., Campos, V., Rosa, A.H., Fraceto, M.F. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres loaded with atrazine herbicide: screening of conditions for preparation, physico-chemical characterization, and in vitro release studies. *Polym. Bull.* **67**, 479–495 (2011).
90. Serafim, L. S., Lemos, P. C., Albuquerque, M. G. E. & Reis, M. A. M. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 615–628 (2008).
91. Pakalapati, H., Chang, C.-K., Show, P. L., Arumugasamy, S. K. & Lan, J. C.-W. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *J. Biosci. Bioeng.* **126**, 282–292 (2018).
92. Chen, Y., Hung, S.-T., Chou, E. & Wu, H.-S. Review of Polyhydroxyalkanoates Materials and other Biopolymers for Medical Applications. *Mini-Rev. Org. Chem.* **15**, 105–121 (2018).
93. Grigore, M. E., Grigorescu, R.M., Iancu, L., Ion, R-M., Zaharia, C., Andrei, E.R. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **30**, 695–712 (2019).
94. Ali, I. & Jamil, N. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Front. Biol.* **11**, 19–27 (2016).
95. Peptu, C. & Kowalczyk, M. 8 - Biomass-Derived Polyhydroxyalkanoates: Biomedical Applications. in *Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value* (eds. Popa, V. & Volf, I.) 271–313 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-444-63774-1.00008-9.
96. Li, Z. & Loh, X. J. Water soluble polyhydroxyalkanoates: future materials for therapeutic applications. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 2865–2879 (2015).
97. Martin, D. P. & Williams, S. F. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochem. Eng. J.* **16**, 97–105 (2003).
98. Rodriguez-Contreras, A. Recent Advances in the Use of Polyhydroxyalkanoates in Biomedicine. *Bioengineering* **6**, 82 (2019).
99. Sodian, R., Sperling, J.S., Martin, D.P., Egozy, A., Stock, U., Mayer Jr, J.E., Vacanti, J.P. Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering. *Tissue Eng.* **6**, 183–188 (2000).
100. Stamm, C., Khosravi, A., Grabow, N., Schmohl, K., Treckmann, N., Drechsel, A., Nan, M., Schmitz, K-P., Haubold, A., Steinhoff, G. Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering. *Ann. Thorac. Surg.* **78**, 2084–2092; discussion 2092-2093 (2004).

101. Lemechko, P., Ramier, J., Versace, D-L., Guezennec, J., Simon-Colin, C., Albanese, P., Renard, E., Langlois, V. Designing exopolysaccharide-graft-poly(3-hydroxyalkanoate) copolymers for electrospun scaffolds. *React. Funct. Polym.* **73**, 237–243 (2013).
102. Degli Esposti, M., Chiellini, F., Bondioli, F., Morselli, D. & Fabbri, P. Highly porous PHB-based bioactive scaffolds for bone tissue engineering by in situ synthesis of hydroxyapatite. *Mater. Sci. Eng. C* **100**, 286–296 (2019).
103. Shishatskaya, E. I., Khlusov, I. A. & Volova, T. G. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **17**, 481–498 (2006).
104. Doyle, C., Tanner, E. T. & Bonfield, W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials* **12**, 841–847 (1991).
105. Luklinska, Z. B. & Bonfield, W. Morphology and ultrastructure of the interface between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **8**, 379–383 (1997).
106. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.-T. & Jamshidi, A. A new strategy for fabrication of bone scaffolds using electrospun nano-HAp/PHB fibers and protein hydrogels. *Chem. Eng. J.* **289**, 38–47 (2016).
107. Jang, J.-H., Castano, O. & Kim, H.-W. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 1065–1083 (2009).
108. Grande, D., Ramier, J., Versace, D. L., Renard, E. & Langlois, V. Design of functionalized biodegradable PHA-based electrospun scaffolds meant for tissue engineering applications. *New Biotechnol.* **37**, 129–137 (2017).
109. Toloue, E. B., Karbasi, S., Salehi, H. & Rafienia, M. Evaluation of Mechanical Properties and Cell Viability of Poly (3-Hydroxybutyrate)-Chitosan/Al₂O₃ Nanocomposite Scaffold for Cartilage Tissue Engineering. *J. Med. Signals Sens.* **9**, 111–116 (2019).
110. Köse, G. T., Korkusuz, F., Ozkul, A., Soysal, Y., Ozdemir, T., Yildiz, C., Hasirci, V. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials* **26**, 5187–5197 (2005).
111. Kong, B. & Mi, S. Electrospun Scaffolds for Corneal Tissue Engineering: A Review. *Materials* **9**, (2016).
112. Pouton, C. W. & Akhtar, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **18**, 133–162 (1996).
113. Sendil, D., Gursel, I., Wise, D. L. & Hasirci, V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *J. Controlled Release* **11** (1999).
114. Shishatskaya, E. I., Goreva, A.V., Voinova, O.N., Inzhevatkin, E.V., Khlebopros, R.G., Volova T.G. Evaluation of antitumor activity of rubomycin deposited in absorbable polymeric microparticles. *Bull. Exp. Biol. Med.* **145**, 358–361 (2008).
115. Lee, J., Jung, S-G., Park, C-S., Kim, H-Y., Batt, C.A., Kim, Y-R. Tumor-specific hybrid polyhydroxybutyrate nanoparticle: Surface modification of nanoparticle by enzymatically synthesized functional block copolymer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 2941–2944 (2011).
116. Masood, F., Chen, P., Yasin, T., Hasan, F., Ahmad, B., Hameed, A. Synthesis of poly-(3-hydroxybutyrate-co-12 mol % 3-hydroxyvalerate) by *Bacillus cereus* FB11: its characterization and application as a drug carrier. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24**, 1927–1937 (2013).

117. Papaneophytou, C., Katsipis, G., Halevas, E. & Pantazaki, A. A. Polyhydroxyalkanoates Applications in Drug Carriers. in *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* (ed. Kalia, V. C.) 77–124 (Springer Singapore, 2019). doi:10.1007/978-981-13-3759-8_5.
118. Masood, F., Chen, P., Yasin, T., Fatima, N., Hasan, F., Hameed, A. Encapsulation of Ellipticine in poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based nanoparticles and its in vitro application. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 1054–1060 (2013).
119. Shah, M., Ullah, N., Choi, M. H., Kim, M. O. & Yoon, S. C. Amorphous amphiphilic P(3HV-co-4HB)-b-mPEG block copolymer synthesized from bacterial copolyester via melt transesterification: Nanoparticle preparation, cisplatin-loading for cancer therapy and in vitro evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **80**, 518–527 (2012).
120. Huang, W., Wang, Y., Ren, L., Du, C. & Shi, X. A novel PHBV/HA microsphere releasing system loaded with alendronate. *Mater. Sci. Eng. C* **29**, 2221–2225 (2009).
121. Jain-Beuguel, C., Li, X., Houel-Renault, L., Modjinou, T., Simon-Colin, C., Gref, R., Renard, E., Langlois, V. Water-Soluble Poly(3-hydroxyalkanoate) Sulfonate: Versatile Biomaterials Used as Coatings for Highly Porous Nano-Metal Organic Framework. *Biomacromolecules* acs.biomac.9b00870 (2019) doi:10.1021/acs.biomac.9b00870.
122. Vergnol, G., Sow, H., Renard, E., Haroun, F. & Langlois, V. Multilayer approach for tuning the drug delivery from poly(3-hydroxyalkanoate)s coatings. *React. Funct. Polym.* **72**, 260–267 (2012).
123. Kim, H. W., Chung, C. W., Hwang, S. J. & Rhee, Y. H. Drug release from and hydrolytic degradation of a poly(ethylene glycol) grafted poly(3-hydroxyoctanoate). *Int. J. Biol. Macromol.* **36**, 84–89 (2005).
124. Yagmurlu, M.F., Korkusuz, F., Gürsel, I., Korkusuz, P., Ors, U., Hasirci, V. Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: in vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis. *J. Biomed. Mater. Res.* **46**, 494–503 (1999).
125. Goode, P. *Biomedical Engineering Fundamentals*. 1569.
126. Biswal, T., BadJena, S. K. & Pradhan, D. Sustainable biomaterials and their applications: A short review. *Mater. Today Proc.* **30**, 274–282 (2020).
127. Gleich, B. *Principles and Applications of Magnetic Particle Imaging*. (Springer Vieweg, 2014). doi:10.1007/978-3-658-01961-7.
128. Damadian, R., Minkoff, L., Goldsmith, M., Koutcher, J.A. Field-focusing nuclear magnetic resonance (fomar). *Naturwissenschaften* **65**, 250–252 (1978).
129. Mornet, S., Portier, J. & Duguet, E. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 127–134 (2005).
130. Boldt, D. H. New Perspectives on Iron: An Introduction. *Am. J. Med. Sci.* **318**, 207–212 (1999).
131. Hermann, P., Kotek, J., Kubíček, V. & Lukeš, I. Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. *Dalton Trans.* **0**, 3027–3047 (2008).
132. Sadowski, E.A., Bennett, L.K., Chan, M.R., Wentland, A.L., Garrett, A.L., Garrett, R.W., Djamali, A. Nephrogenic systemic fibrosis: risk factors and incidence estimation. *Radiology* **243**, 148–157 (2007).

133. Yang, L., Krefting, I., Gorovets, A., Marzella, L., Kaiser, J., Boucher, R., Rieves, D. Nephrogenic Systemic Fibrosis and Class Labeling of Gadolinium-based Contrast Agents by the Food and Drug Administration. *Radiology* **265**, 248–253 (2012).
134. Nacif, M. S., Arai, A. E., Lima, J. A. & Bluemke, D. A. Gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance: administered dose in relationship to united states food and drug administration (FDA) guidelines. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **14**, 18 (2012).
135. Runge, V. M. Dechelation (Transmetalation): Consequences and Safety Concerns With the Linear Gadolinium-Based Contrast Agents, In View of Recent Health Care Rulings by the EMA (Europe), FDA (United States), and PMDA (Japan). *Invest. Radiol.* **53**, 571–578 (2018).
136. Behzadi, A. H., Zhao, Y., Farooq, Z. & Prince, M. R. Immediate Allergic Reactions to Gadolinium-based Contrast Agents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Radiology* **286**, 731 (2018).
137. Nottelet, B. Aliphatic polyesters for medical imaging and theranostic applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **21** (2015).
138. Xiong, F., Hu, K., Yu, H., Zhou, L., Song, L., Zhang, Y. Shan, X. Liu, Gu, J. Functional Iron Oxide Nanoparticles Modified with PLA-PEG-DG as Tumor-Targeted MRI Contrast Agent. *Pharm. Res.* **34**, 1683–1692 (2017).
139. Cheng, K.K., Chan, P.S., Fan, S., Kwan, S.M., Yeung, K.L., Wang, Y-X.J., Chow, A.H.L., Wu, E.X., Baum, L. Curcumin-conjugated magnetic nanoparticles for detecting amyloid plaques in Alzheimer's disease mice using magnetic resonance imaging (MRI). *Biomaterials* **44**, 155–172 (2015).
140. Li, X.-D., Liang, X-L., Yue, X-L., Wang, J-R., Li, C-H., Deng, Z-J., Jing, L-J., Lin, L., Qu, E-Z., Wang, S-M., Wu, C-L., Wu, H-X., Dai, Z-F. Imaging guided photothermal therapy using iron oxide loaded poly(lactic acid) microcapsules coated with graphene oxide. *J Mater Chem B* **2**, 217–223 (2014).
141. Kim, K. S., Park, W., Hu, J., Bae, Y. H. & Na, K. A cancer-recognizable MRI contrast agents using pH-responsive polymeric micelle. *Biomaterials* **35**, 337–343 (2014).
142. Liu, Y., Chen, Z., Liu, C., Yu, D., Lu, Z., Zhang, N. Gadolinium-loaded polymeric nanoparticles modified with Anti-VEGF as multifunctional MRI contrast agents for the diagnosis of liver cancer. *Biomaterials* **32**, 5167–5176 (2011).
143. Xiao, Z., Chan, L., Zhang, D., Huang, C., Mei, C., Gao, P., Huang, Y., Liang, J., He, L., Shi, C., Chen, T., Luo, L. Precise delivery of a multifunctional nanosystem for MRI-guided cancer therapy and monitoring of tumor response by functional diffusion-weighted MRI. *J. Mater. Chem. B* **7**, 2926–2937 (2019).
144. Bennewitz, M. F., Williams, S. S., Nkansah, M. K. & Shapiro, E. M. Poly(lactic-co-glycolic acid) Encapsulated Gadolinium Oxide Nanoparticles for MRI-Based Cell Tracking. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **13**, 3778–3783 (2013).
145. Cao, Y., Liu, M., Kuang, Y., Zu, G., Xiong, D., Pei, R. A poly(ϵ -caprolactone)–poly(glycerol)–poly(ϵ -caprolactone) triblock copolymer for designing a polymeric micelle as a tumor targeted magnetic resonance imaging contrast agent. *J. Mater. Chem. B* **5**, 8408–8416 (2017).
146. Porsio, B., Lemaire, L., El Habnoui, S., Darcos, V., Franconi, F., Garric, X., Coudane, J., Nottelet, B. MRI-visible nanoparticles from hydrophobic gadolinium poly(ϵ -caprolactone) conjugates. *Polymer* **56**, 135–140 (2015).
147. Li, X., Qian, Y., Liu, T., Hu, X., Zhang, G., You, Y., Liu, S. Amphiphilic multiarm star block copolymer-based multifunctional unimolecular micelles for cancer targeted drug delivery and MR imaging. *Biomaterials* **32**, 6595–6605 (2011).

148. Yang, H. Reduction sensitive hyaluronan-SS-poly(ϵ -caprolactone) block copolymers as theranostic nanocarriers for tumor diagnosis and treatment. *Mater. Sci.* 10 (2019).
149. Yang, T., Niu, D., Chen, J., He, J., Yang, S., Jia, X., Hao, J., Zhao, W. Biodegradable organosilica magnetic micelles for magnetically targeted MRI and GSH-triggered tumor chemotherapy. *Biomater. Sci.* 10 (2019).
150. Wei, J., Shuai, X., Wang, R., He, X., Li, Y., Ding, M., Li, J., Tan, H., Fu, Q. Clickable and imageable multiblock polymer micelles with magnetically guided and PEG-switched targeting and release property for precise tumor theranosis. 16 (2017).
151. Wang, G., Zhao, D., Li, N., Wang, X. & Ma, Y. Drug-loaded poly (ϵ -caprolactone)/Fe₃O₄ composite microspheres for magnetic resonance imaging and controlled drug delivery. *J. Magn. Magn. Mater.* **456**, 316–323 (2018).
152. Liu, Q., Song, L., Ghen, S., Gao, J., Zhao, P., Du, J. A superparamagnetic polymersome with extremely high T₂ relaxivity for MRI and cancer-targeted drug delivery. *Biomaterials* **114**, 23–33 (2017).
153. Cui, M., Dong, Z., Cai, H., Huang, K., Liu, Y., Fang, Z., Li, X., Luo, Y. Folate-targeted polymeric micelles loaded with superparamagnetic iron oxide as a contrast agent for magnetic resonance imaging of a human tongue cancer cell line. *Mol. Med. Rep.* 6 (2017).
154. Vilos, C., Gutierrez, M., Escobar, R.A., Morales, F., Denardin, J.C., Velasquez, L., Altbir, D. Superparamagnetic Poly (3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) nanoparticles for biomedical applications. *Electron. J. Biotechnol.* **16**, (2013).
155. de Azevedo, M., Melo, V.H., Soares, C.R., Gamarra, L.F., Barros, C.H., Tasic, L. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-valerate) (PHB-HV) microparticles loaded with holmium acetylacetonate as potential contrast agents for magnetic resonance images. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 14**, 6869–6889 (2019).
156. Schulz, A., Lemaire, L., Bethry, A., Allegre, L., Cardoso, M., Bernex, F., Franconi, F., Goze-Bac, C., Taillades, H., Garric, X. UV-triggered photoinsertion of contrast agent onto polymer surfaces for *in vivo* MRI-visible medical devices. *Multifunct. Mater.* **2**, 024001 (2019).
157. Goodfriend, A.C., Welch, T.R., Wang, J., Nguyen, K.T., Johnson, R.F., Xu, C.C., Reddy, S.R.V., Nugent, A., Richardson, J., Forbess, J.M. Design of a MRI-Visible and Radiopaque Drug Delivery Coating for Bioresorbable Stents. in *Volume 3: Biomedical and Biotechnology Engineering V003T03A031* (American Society of Mechanical Engineers, 2015). doi:10.1115/IMECE2015-52146.
158. Hickethier, T., Kröger, J.R., Spiczak, J.V., Baessler, B., Pfister, R., Maintz, D., Bunck, A.C., Michels, G. Non-invasive imaging of bioresorbable coronary scaffolds using CT and MRI: First in vitro experience. *Int. J. Cardiol.* 6 (2016).
159. Hamideh, R. A., Akbari, B., Fathi, P., Misra, S.K., Sutrisno, A., Lam, F., Pan, D. Biodegradable MRI Visible Drug Eluting Stent Reinforced by Metal Organic Frameworks. 9 (2020).
160. Blanquer, S., Guillaume, O., Letouzey, V., Lemaire, L., Franconi, F., Paniagua, C., Coudane, J., Garric, X. New magnetic-resonance-imaging-visible poly(ϵ -caprolactone)-based polyester for biomedical applications. *Acta Biomater.* 9 (2012).
161. El Habnoui, S., Nottelet, B., Darcos, V., Porsio, B., Lemaire, L., Franconi, F., Garric, X., Coudane, J. MRI-visible poly(ϵ -caprolactone) with controlled contrast agent ratios for enhanced visualization in temporary imaging applications. *Biomacromolecules* **14**, 3626–3634 (2013).

162. Letouzey, V., Huberlant, S., Cornille, A., Blanquer, S., Guillaume, O., Lemaire, L., Garric, X., de Tairac, R. Tolerance and Long-Term MRI Imaging of Gadolinium-Modified Meshes Used in Soft Organ Repair. *PLOS ONE* **10**, e0120218 (2015).
163. Ganesh, M. N., Ashokan, A., Rajeshkannan, R., Chennazhi, K., Koyakutty, M., Nair, S.V. MR Functional Nano-Hydroxyapatite Incorporated PCL Composite Scaffolds for In situ Monitoring of Bone Tissue Regeneration by MRI. *Tissue Eng. Part A* **47**.
164. Pramanik, N., bhattacharya, S., Rath, T., De, J., Adhikary, A., Basu, R.K., Kundu, P.P. Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate copolymer modified graphite oxide based 3D scaffold for tissue engineering application. *Mater. Sci.* **13** (2019).
165. Su, Y., DeGrado, W. F. & Hong, M. Orientation, Dynamics, and Lipid Interaction of an Antimicrobial Arylamide Investigated by ¹⁹F and ³¹P Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9197–9205 (2010).
166. Tirotta, I., Mastropietro, A., Cordiglieri, C., Gazzera, L., Baggi, F., Baselli, G., Bruzzone, M.G., Zucca, I., Cavallo, G., Terraneo, G., Bombelli, F.B., Metrangolo, P., Resnati, G. A Superfluorinated Molecular Probe for Highly Sensitive *in Vivo* ¹⁹F-MRI. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 8524–8527 (2014).
167. Jirak, D., Galisova, A., Kolouchova, K., Babuka, D. & Hruby, M. Fluorine polymer probes for magnetic resonance imaging: quo vadis? *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **32**, 173–185 (2019).
168. Ruiz-Cabello, J., Barnett, B. P., Bottomley, P. A. & Bulte, J. W. M. Fluorine (¹⁹F) MRS and MRI in biomedicine. *NMR Biomed.* **24**, 114–129 (2011).
169. Srinivas, M., Heerschap, A., Ahrens, E. T., Figdor, C. G. & Vries, I. J. M. de. ¹⁹F MRI for quantitative in vivo cell tracking. *Trends Biotechnol.* **28**, 363–370 (2010).
170. Yu, J.-X., Hallac, R. R., Chiguru, S. & Mason, R. P. New frontiers and developing applications in ¹⁹F NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **70**, 25–49 (2013).
171. Bulte, J. W. M. Hot spot MRI emerges from the background. *Nat. Biotechnol.* **23**, 945–946 (2005).
172. Blahut, J., Bernášek, K., Gálisová, A., Herynek, V., Císařová, I., Kotek, J., Lang, J., Matějková, S., Hermann, P. Paramagnetic ¹⁹F Relaxation Enhancement in Nickel(II) Complexes of N-Trifluoroethyl Cyclam Derivatives and Cell Labeling for ¹⁹F MRI. *Inorg. Chem.* **56**, 13337–13348 (2017).
173. Knight, J. C., Edwards, P. G. & Paisey, S. J. Fluorinated contrast agents for magnetic resonance imaging; a review of recent developments. *RSC Adv.* **1**, 1415 (2011).
174. Fink, C., Gaudet, J.M., Fox, M.S., Bhatt, S., Viswanathan, S., Smith, M., Chin, J., Foster, P.J., Dekaban, G.A. ¹⁹F-perfluorocarbon-labeled human peripheral blood mononuclear cells can be detected in vivo using clinical MRI parameters in a therapeutic cell setting. *Sci. Rep.* **8**, 590 (2018).
175. Gaudet, J. M., Ribot, E. J., Chen, Y., Gilbert, K. M. & Foster, P. J. Tracking the Fate of Stem Cell Implants with Fluorine-19 MRI. *PLOS ONE* **10**, e0118544 (2015).
176. Tennstaedt, A., Mastropietro, A., Nelles, M., Beyrau, A. & Hoehn, M. In Vivo Fate Imaging of Intracerebral Stem Cell Grafts in Mouse Brain. *PLOS ONE* **10**, e0144262 (2015).
177. Constantinides, C., Mguire, M., McNeill, E., Carnicer, R., Swider, E., Srinivas, M., Carr, C.A., Schneider, J.E. Fast, quantitative, murine cardiac ¹⁹F MRI/MRS of PFCE-labeled progenitor stem cells and macrophages at 9.4T. *PLOS ONE* **13**, e0190558 (2018).

178. Liang, S., Loucham, K., Holvoet, B., Verbeke, R., Deroose, C.M., Manshian, B., Soenen, S.J., Lentacker, I., Himmelreich, U. Tri-modal In vivo Imaging of Pancreatic Islets Transplanted Subcutaneously in Mice. *Mol. Imaging Biol.* **20**, 940–951 (2018).
179. Rolfe, B. E., Blakey, I., Squires, O., Peng, H., Boase, N.R.B., Alexander, C., Parsons, P.G., Boyle, G.M., Whittaker, A.K., Thurecht, K.J. Multimodal Polymer Nanoparticles with Combined ¹⁹F Magnetic Resonance and Optical Detection for Tunable, Targeted, Multimodal Imaging *in Vivo*. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 2413–2419 (2014).
180. Oishi, M., Sumitani, S. & Nagasaki, Y. On–Off Regulation of ¹⁹F Magnetic Resonance Signals Based on pH-Sensitive PEGylated Nanogels for Potential Tumor-Specific Smart ¹⁹F MRI Probes. *Bioconjug. Chem.* **18**, 1379–1382 (2007).
181. Zhang, C., Moonshi, S.S., Wang, W., Ta, H.T., Han, Y., Han, F.Y., Peng, H., Král, P., Rolfe, B.E., Gooding, J.J., Gaus, K., Whittaker, A.K. High F-Content Perfluoropolyether-Based Nanoparticles for Targeted Detection of Breast Cancer by ¹⁹F Magnetic Resonance and Optical Imaging. *ACS Nano* **12**, 9162–9176 (2018).
182. Zhao, Y. & Swager, T. M. Simultaneous Chirality Sensing of Multiple Amines by ¹⁹F NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 3221–3224 (2015).
183. Zhang, X.-Y., Robledo, B. N., Harris, S. S. & Hu, X. P. A bacterial gene, *mms6*, as a new reporter gene for magnetic resonance imaging of mammalian cells. *Mol. Imaging* **13**, (2014).
184. Riess, J. G. Blood substitutes and other potential biomedical applications of fluorinated colloids. *J. Fluor. Chem.* **8** (2002).
185. Riess, J. G. Oxygen Carriers (“Blood Substitutes”) Raison d’Etre, Chemistry, and Some Physiology *Blut ist ein ganz besonderer Saft*¹. *Chem. Rev.* **101**, 2797–2920 (2001).
186. Lowe, K. C. Engineering blood: synthetic substitutes from fluorinated compounds. *Tissue Eng.* **9**, 389–399 (2003).
187. Lozano, J. A., Castro, J. A. & Rodrigo, I. Partial liquid ventilation with perfluorocarbons for treatment of ARDS in burns. *Burns* **27**, 635–642 (2001).
188. Cosco, D., Fattal, E., Fresta, M. & Tsapis, N. Perfluorocarbon-loaded micro and nanosystems for medical imaging: A state of the art. *J. Fluor. Chem.* **171**, 18–26 (2015).
189. Diou, O., Tsapis, N., Giraudeau, C., Valette, J., Gueutin, C., Bourasset, F., Zanna, S., Vauthier, C., Fattal, E. Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by ¹⁹F MRI. *Biomaterials* **33**, 5593–5602 (2012).
190. Wickline, S. A., Hughes, M., Ngo, F.C., Hall, C.S., Marsh, J.N., Brown, P.A., Allen, J.S., McLean, M.D., Scott, M.J., Fuhrhop, R.W., M Lanza, G.M. Blood contrast enhancement with a novel, non-gaseous nanoparticle contrast agent. *Acad. Radiol.* **9 Suppl 2**, S290-293 (2002).

CHAPITRE II :

PRODUCTION DE POLYHYDROXYALCANOATES FONCTIONNALISABLES A PARTIR DE LA BIODIVERSITE BACTERIENNE MARINE

II.1 Introduction

Un atout majeur des PHA réside dans leur grande diversité structurale, et en particulier la possibilité d'introduire par bioconversion des groupements réactifs qui permettent des fonctionnalisations ultérieures par voie chimique ^{1,2}. La fonctionnalisation des polymères permet en effet de moduler leurs propriétés et de ce fait, élargir leur champ d'applications ³⁻⁵. Il a déjà été démontré qu'il est possible de biosynthétiser des PHA contenant des groupes fonctionnels tels que les doubles liaisons, triples liaisons, des groupements époxy, carbonyle, cyano, phényle ou halogène ⁶. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la synthèse de PHA_{MCL} portant des doubles liaisons en position terminale des chaînes latérales. En effet, la haute réactivité chimique des doubles liaisons carbone-carbone, et l'accessibilité aisée en bout de chaîne sont favorables à la réalisation de réactions de modifications chimiques.

La première partie de ce travail, réalisé à l'Ifremer, a consisté à étudier les capacités de production d'une sélection de souches issues de la biodiversité bactérienne marine, notamment appartenant au genre *Pseudomonas* ou pour lesquelles a capacité à produire des PHA_{MCL} avérée. Ces souches sont issues de tapis microbiens stratifiés situés sur certains atolls de Polynésie Française (souches RA26 *Pseudomonas guezennei* ⁷, TE9 *Pseudomonas ragenesii* ⁸, TIK669 *Pseudomonas guezennei* biovar. *tikehau* ⁷, TIK771, RA16) ou de Nouvelle Calédonie (NC532). L'objectif étant d'orienter le métabolisme bactérien vers la biosynthèse de PHA_{MCL}, le choix des substrats s'est donc porté sur des acides gras tels que l'acide octanoïque, (C8), l'acide décanoïque (C10), l'huile de coprah (huile végétale issue de la gangue de noix de coco composée à plus de 90% d'acides gras saturés) et l'octanoate de sodium. Ces substrats carbonés ont été utilisés seuls ou en mélange avec de l'acide 10-undécénoïque afin d'induire la production de PHA_{MCL} insaturés. L'intérêt de cette étude est la maîtrise et la connaissance des conditions de culture propre à chaque souche afin d'orienter les voies de biosynthèse vers la production de PHA_{MCL} insaturés de structures contrôlées et enclines à la réalisation des réactions de fonctionnalisation chimique qui seront réalisées, à l'ICMPE, dans la seconde partie de cette thèse.

II.2 Matériels & Méthodes

II.2.1 Création d'une collection de travail

Les souches utilisées lors de cette étude sont des bactéries marines, mésophiles et aérobies. Elles proviennent essentiellement d'échantillonnages effectués au sein de mares à « kopara », fournies par l'entreprise Pacific Biotech ou de la collection Ifremer de Nouvelle Calédonie. Lors de la mise en collection, les bactéries ont étéensemencées sur milieu Zobell (pour un litre de solution : 5 g de peptone, 1 g d'extrait de levure, 20 g de Sea Salts, pH ajusté à 7,6).

Une collection de travail est créée à partir d'un cryotube de chaque isolat bactérien conservé à -80°C en présence de glycérol. Pour cela, une préculture est réalisée dans 8 mL de milieu Zobell pendant 8h puis elle est transférée dans 50 mL de Zobell toute la nuit à 34°C sous 150 rpm. Les milieux de culture en fin de phase de croissance exponentielle sont stockés dans un cryotube 1,8 mL en présence de 20% de glycérol et conservés à -80°C. Lors de chaque étape, réalisée en conditions stériles, la viabilité cellulaire et la pureté des souches sont vérifiées par observations microscopiques et étalement sur gélose (Zobell + Agar à 15g/L).

II.2.2 Production de PHA

II.2.2.1 Enrichissement cellulaire

A partir d'un cryotube préalablement décongelé, deux tubes contenant 8 mL de milieu Zobell sontensemencés. Une goutte provenant du cryotube est conservée pour s'assurer de la pureté de la souche : une observation de l'état frais au microscope optique à contraste de phase et un étalement sur boîte de Pétri (Zobell + Agar à 15 g/L) sont réalisés. Après 8h à 34°C (ou 30°C selon les souches étudiées) sous agitation à 160 rpm dans une enceinte thermostatée, le contenu de chaque tube de 8 mL est transféré stérilement dans un Erlenmeyer contenant 200 mL de Zobell. Ces derniers sont placés dans la même enceinte à

34°C (ou 30°C), avec une agitation fixée à 160 rpm pendant 8h à une nuit selon la croissance bactérienne. De la même façon le contenu de chaque Erlenmeyer 200 mL est transféré dans un Erlenmeyer contenant 2 L de Zobell. En fin de croissance, le contenu de chaque Erlenmeyer 2 L est centrifugé stérilement (15 min à 7000 rpm) afin de séparer le culot bactérien du milieu nutritif qui sera éliminé. Le culot est ensuite repris dans 100 mL d'eau de mer stérile avant d'être transféré dans le milieu de production correspondant. A chaque étape, un suivi est réalisé par observation au microscope.

II.2.2.2 Production des PHA

Les milieux de production sont préparés à partir d'eau de mer filtrée sur 0,45 µm et d'une source de carbone variable telle que de l'huile de coprah, de l'acide octanoïque, de l'acide décanoïque, de l'acide 10-undécenoïque (Tableau II.1).

Tableau II.1 : Choix des substrats carbonés.

Substrat carboné	Formule chimique
Octanoate de sodium (C8)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COO}^-, \text{Na}^+$
Acide décanoïque (C10)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$
Huile de coprah :	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$ (57%) $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$ (19%)
Acide 10-undécènoïque (C11:1Δ10)	$\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$

Ces milieux sont dépourvus de nutriments azotés et riches en éléments carbonés afin d'induire la production de polymères. Les culots bactériens repris dans 100 mL d'eau de mer stérile sont transférés soit en Erlenmeyer 5 L soit en bioréacteur 5 L ou 30 L contenant respectivement 2 L, 3,5 L ou 18 L de volume utile (INFORS, Massy France). Pour la production en Erlenmeyer, le pH est ajusté en amont de l'inoculation à 7,6. Concernant la production en

bioréacteur, le pH est ajusté tout au long de l'expérience par ajout automatique de soude NaOH 1M et d'acide sulfurique H₂SO₄ 1M, l'oxygénation est assurée par un léger flux d'air. Pour les deux types de production, la température est de 34°C (ou 30°C) et l'agitation à 160 rpm et se poursuit pendant 2 ou 3 jours selon les expérimentations.

Un suivi qualitatif de la production est réalisé à chaque étape. Du fait de leur caractère réfringent, les granules de PHA peuvent être observés directement par microscopie optique à contraste de phase, permettant ainsi d'avoir une première évaluation de la capacité de production de la souche étudiée.

A la fin de la production, les cellules sont récoltées par centrifugation à 7000 rpm pendant 15 min, puis les culots sont congelés avant lyophilisation.

II.2.3 Extraction et purification des PHA

II.2.3.1 Extraction

Les culots bactériens lyophilisés sont broyés dans un mortier, puis l'extraction est réalisée par du chloroforme (40 mL pour 3 g de culot bactérien lyophilisé). Le mélange est chauffé à 55°C sous agitation dans un flacon fermé pendant 4 heures. Afin d'éliminer les débris cellulaires, 15 mL d'eau distillée sont ajoutés, le mélange est vortexé puis centrifugé (7500 rpm pendant 15 min). La phase organique contenant le solvant et les PHA est récupérée puis évaporée.

II.2.3.2 Purification

Le produit brut est dissout dans quelques millilitres de chloroforme, selon la masse de produit obtenu de façon à obtenir une solution visqueuse, puis celle-ci est précipitée goutte à goutte dans du méthanol froid sous agitation. Le méthanol est éliminé et le produit final

obtenu est soumis à évaporation pour éliminer les dernières traces de solvant. Le PHA est stocké, à l'abri de la lumière avant analyses. L'ensemble de ces étapes est repris sous forme de schéma en figure II.1.

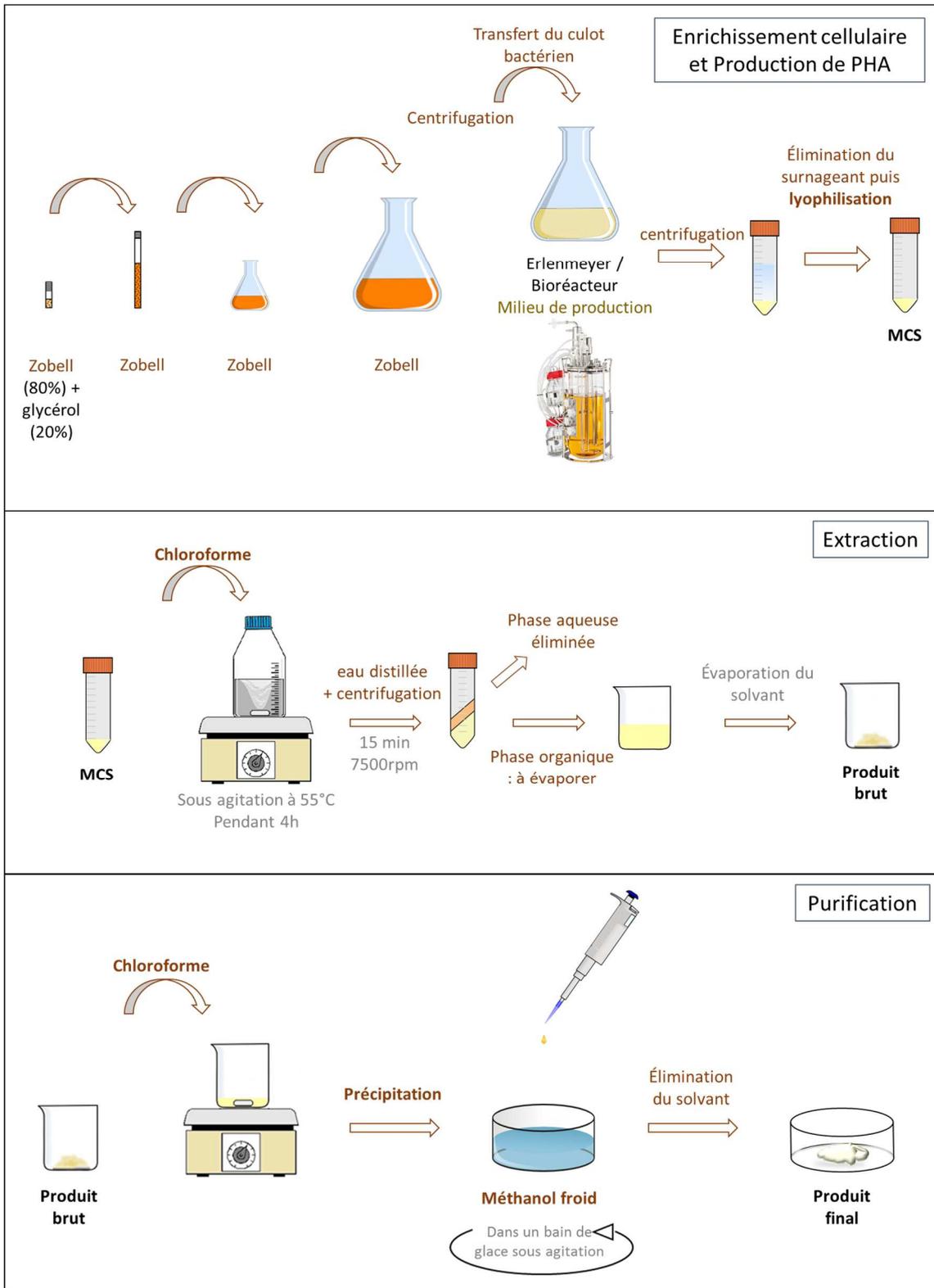


Figure II.1 : Protocoles de production, d'extraction et de purification des PHA.

(MCS : masse de cellules sèches)

II.2.4 Résonance Magnétique Nucléaire ^1H et ^{13}C

Les analyses en RMN du ^1H et du ^{13}C permettent de déterminer la structure des molécules à étudier en faisant interagir l'aimantation naturelle des noyaux d'hydrogène et de carbone présents dans la molécule avec un champ magnétique donné. Les analyses sont réalisées à 25°C sur 12 mg (analyse ^1H) ou 50 mg (analyse ^{13}C) de PHA dissous dans 600 μL de chloroforme deutéré à l'aide d'un spectromètre Bruker 400 DRX (Billerica, USA), à 400 MHz. Les déplacements chimiques sont reportés en ppm par rapport au signal du 3,3,3,4-tétraméthyl silane.

II.2.5 Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CGSM)

La technique de CGSM associe la séparation des composés d'un échantillon par chromatographie en phase gazeuse à leur détection et identification par spectrométrie de masse. Cette technique permet donc d'identifier et de quantifier précisément les unités constitutives d'un échantillon de PHA. La composition monomérique et la position des insaturations des PHA produits est déterminée par analyse CGSM des dérivés d'esters méthyliques^{9,10}.

Pour déterminer cela, 8 mg d'échantillons de polymère sont dissous dans 1,5 mL de chloroforme et soumis à une méthanolyse en présence de MeOH / HCl (17/2, v / v) à 100 °C pendant 4 h. La phase organique est lavée avec 1 mL d'eau distillée puis séchée sur MgSO_4 et évaporée sous azote. Les esters méthyliques sont ensuite triméthylsilylés en ajoutant 100 μL de pyridine et 100 μL de sylon (BSTFA-TMCS, 99:1). Le mélange réactionnel est chauffé à 70°C pendant 1 heure puis évaporé sous azote. Les dérivés triméthylsilylés ainsi obtenus sont dissouts dans 600 μL de dichlorométhane et injectés en CGSM^{10,11}.

La localisation des doubles liaisons des chaînes latérales a été réalisée d'après une méthode de dérivation en trois étapes : méthanolyse, acétylation puis thiométhylation⁹. Dans un premier temps, les échantillons ont subi une méthanolyse d'après le même protocole que

précédemment. Les esters méthyliques sont ensuite acétylés en présence de 100 μL de chlorure d'acétyle à 65°C pendant 5 min afin de masquer le groupe hydroxyle réactif ¹². Le mélange est évaporé sous azote puis 500 μL d'hexane, 100 μL de diméthylsulfide (DMDS) et 20 μL d'iode (solution de I_2 : 60 mg dans 1 mL d'éther) sont ajoutés et le tout est chauffé à 50°C pendant 48 h ¹³. Les échantillons sont repris dans 200 μL d'hexane, et l'iode en excès est réduit par l'ajout de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Après centrifugation, les dérivés d'esters méthyliques thiométhyl acétylés sont séchés sous azote et dissous dans 600 μL de dichlorométhane puis injectés en CGSM.

Les dérivés TMSi et thiométhyl acétylés des esters méthyliques sont analysés par CGSM en utilisant un chromatographe Agilent 6890N couplé à un spectromètre sélectif quadripolaire Agilent 5975 XL, équipé d'une colonne capillaire de silice fondue HP-5-MS (30 m x 0,25 mm, épaisseur du film 25 μm) avec de l'hélium comme gaz vecteur. Un échantillon de 1 μL est injecté et analysé selon le programme de température suivant : 60 °C pendant une minute, rampe de 4 °C / min à 140 °C, 15 °C / min à 280 °C et 5 min à 280 °C. L'énergie ionisante pour le fonctionnement de la MS est de 70 eV.

II.2.6 Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier – Réflectance Totale Atténuée (FTIR-ATR)

La spectroscopie d'absorption FTIR donne des informations sur les vibrations moléculaires qui sont caractéristiques des liaisons chimiques. Le principe de l'ATR consiste à faire subir au faisceau IR, des réflexions à l'interface entre un matériau transparent dans l'IR et l'échantillon. Cette méthode ne nécessite que très peu de préparation de l'échantillon, et présente l'avantage d'être non destructive. Les spectres FTIR-ATR ont été réalisés sur un spectromètre FTIR Nicolet AVATAR 370 DTGS (Nicolet ThermoScientific, Cergy Pontoise, France). Les échantillons ont été déposés sur un disque de germanium et ont été balayés entre 400 et 4000 cm^{-1} .

II.2.7 Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES)

La chromatographie d'exclusion stérique (CES), également appelée chromatographie par perméation de gel (CPG), est une technique de chromatographie liquide de caractérisation de polymères qui permet la séparation de macromolécules en solution selon leur taille et leur structure. Elle permet d'obtenir les différentes masses molaires (\overline{M}_w , \overline{M}_n) et l'indice de polydispersité égale au rapport $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ (I_p).

Les analyses CES ont été effectuées sur un système chromatographique équipé d'une pompe Shimadzu Prominence LC20-AD avec deux colonnes PLgel mixed-C 5 μ m (Polymer Laboratories) et d'un réfractomètre interférométrique Optilab Rex de Wyatt Technology. Les échantillons en solution dans du chloroforme à 5 mg.ml⁻¹, sont filtrés sur un filtre en polytétrafluoroéthylène de 0,45 μ m et 100 μ L de solutions sont injectés. Le débit est fixé à 1ml.min⁻¹ et une courbe de calibration a préalablement été réalisée à partir d'étalons de polystyrène à faible indice de polydispersité (3.10⁴ - 2.10⁶ g/mol) (Polymer Source).

II.2.8 Analyse Enthalpique Différentielle (AED)

L'analyse enthalpique différentielle est une technique utilisée pour étudier les transitions thermiques d'un polymère c'est-à-dire les changements qui interviennent au sein d'un polymère quand il est chauffé. Un polymère semi-cristallin tel qu'un PHA est constitué d'une fraction cristalline et d'une fraction amorphe. L'état cristallin est caractérisé par l'arrangement des chaînes au sein du polymère de façon compacte et ordonnée. Les propriétés thermiques sont influencées par la proportion de phase amorphe et cristalline : un taux de cristallinité élevé rend les matériaux rigides, les phases amorphes donnent aux matériaux une capacité à se déformer sans se casser. Les analyses AED sont réalisées avec un appareil DSC TA Instrument 2920. Un échantillon d'environ 8 mg est placé entre une capsule et un couvercle en aluminium et chauffé de -80°C à 100°C à une vitesse de chauffage de 10°C.min⁻¹ sous une purge d'azote de 50 ml.min⁻¹. Les données obtenues sont traitées à l'aide du logiciel TA Universal Analysis. La température de fusion (T_m) et l'enthalpie de fusion (ΔH_m)

sont mesurées à partir de l'endotherme de fusion observé lors du premier cycle et la température de transition vitreuse (T_g) est prise comme point d'inflexion du changement de capacité calorifique au deuxième cycle.

II.3 Résultats et discussion

II.3.1 Production de Polyhydroxyalcanoates : choix du couple souche bactérienne / substrat carboné

L'évaluation de la capacité de production de PHA de souches bactériennes marines à partir de différents substrats carbonés est estimée par observation au microscope optique à contraste de phase, notamment pour la visualisation d'un changement de morphologie des bactéries, et l'apparition de granules intracellulaires. Cette capacité de production est ensuite confirmée après extraction et analyse des PHA. L'efficacité de la production est évaluée d'après les rendements de production obtenus en fonction des différents paramètres tels que le choix du substrat ou la durée de la fermentation.

La capacité de production de PHA_{MCL} a donc été testée à partir de différents substrats carbonés tels que l'acide octanoïque (C8), l'acide décanoïque (C10), l'huile de coprah (huile végétale issue de la gangue de noix de coco composée à plus de 90% d'acides gras saturés) et l'octanoate de sodium. Ces substrats carbonés ont été utilisés seuls ou en mélange avec de l'acide 10-undécènoïque afin d'induire la production de PHA_{MCL} insaturés portant une double liaison en position terminale.

Cette approche a pour objectif de sélectionner le/les meilleur(s) couple(s) bactérie/substrat pour la production de PHA_{MCL} de structures contrôlées, notamment présentant un taux d'insaturation défini et reproductible, afin de pouvoir les utiliser pour la deuxième partie de la thèse axée sur la fonctionnalisation de ces polymères.

II.3.1.1 Suivi des cultures par microscopie optique à contraste de phase

II.3.1.1.a Phase d'enrichissement cellulaire

Durant la phase d'enrichissement cellulaire, le suivi des cultures par microscopie permet d'apprécier la morphologie, la mobilité et la densité cellulaire des bactéries. Ces observations permettent de surveiller les éventuels changements de morphologie ainsi que de s'assurer de l'absence de contaminations.

Le suivi de culture de la souche TE9 en phase d'enrichissement sur milieu Zobell est présenté figure II.2. Les cellules observées sont de morphologie bacille, caractéristique du genre *Pseudomonas* et l'observation à l'état frais permet d'attester une bonne mobilité cellulaire.

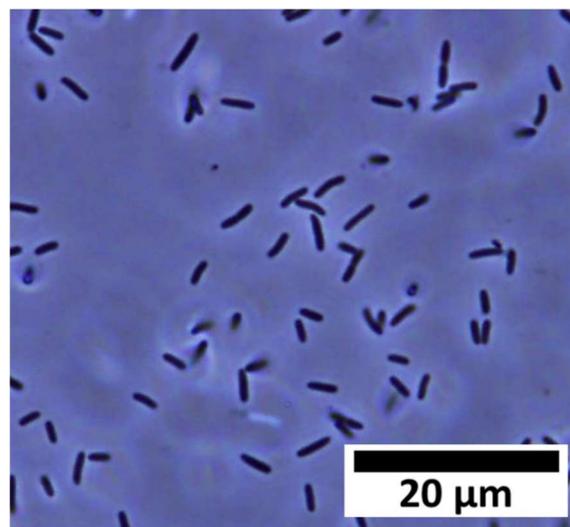


Figure II.2 : Observation par microscopie à contraste de phase de la souche TE9 en phase d'enrichissement cellulaire en milieu Zobell.

II.3.1.1.b Phase de production de PHA

Le suivi par microscopie réalisé au cours de la phase de production permet également de visualiser l'accumulation intracellulaire de PHA en raison de leur réfringence¹⁴. Toutefois les PHA_{MCL} étant moins cristallins que les PHA_{SCL}, leurs granules sont moins visibles, et

l'accumulation des PHA_{MCL} apparaît sous l'aspect d'une lumière bleutée intracellulaire. Sur la figure II.3,A, la souche NC532 est cultivée en présence d'octanoate de sodium à 3 g/L et d'acide 10-undécénoïque à 0,5 g/L et aucun granule de PHA n'est visible. Par contre, lorsque la souche TE9 est cultivée en présence d'huile de coprah à 5 g/L et d'acide 10-undécénoïque à 0,5 g/L, l'accumulation de PHA au sein de granules intracellulaires est bien visible (figure 3,B).

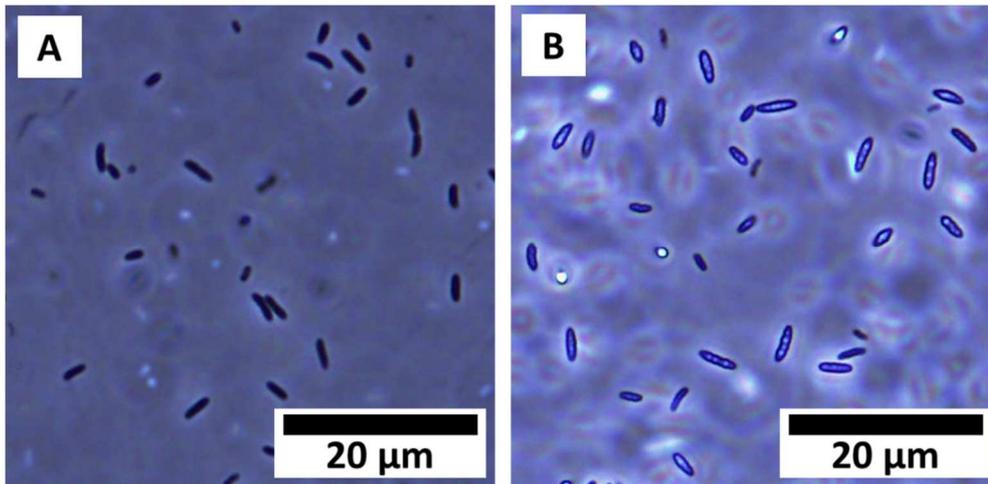


Figure II.3 : Observation par microscopie à contraste de phase des souches NC532 (A) et TE9 (B) en phase de production de PHA.

Les suivis de la phase de production de PHA avec les souches NC532, TE9 et RA26 sont présentés sur la figure II.4 et permettent ainsi une première appréciation de la capacité de production des souches bactériennes en présence de différents substrats carbonés.

Une observation de la souche RA26 cultivée en présence d'acide décanoïque (5g/L) est présentée figure 4, les cellules observées sont immobiles, la densité cellulaire est peu importante et aucun granule de PHA n'est observé au niveau intracellulaire.

Concernant la souche NC532, les cellules observées en phase de production en présence d'octanoate de sodium (3g/L) et d'acide 10-undécénoïque (0,5g/L) sont peu mobiles, la densité cellulaire est faible et aucun granule de PHA n'est observé au niveau intracellulaire.

Pour la souche TE9, les cellules observées après 48h en milieu de production composé d'huile de coprah (5g/L) et d'acide 10-undécénoïque (0,5g/L) ont conservé une bonne densité et une mobilité cellulaire importante, les granules de PHA intracellulaires sont bien visibles.

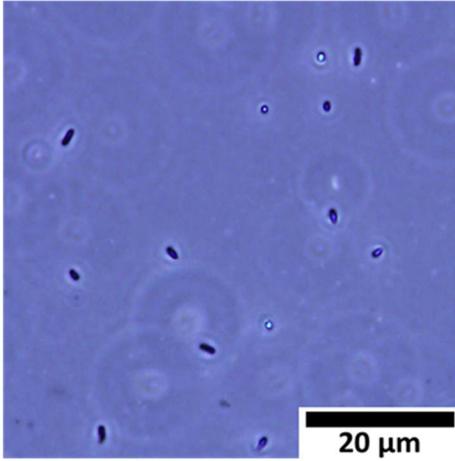
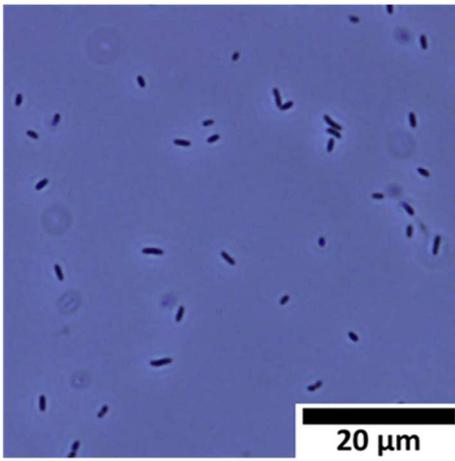
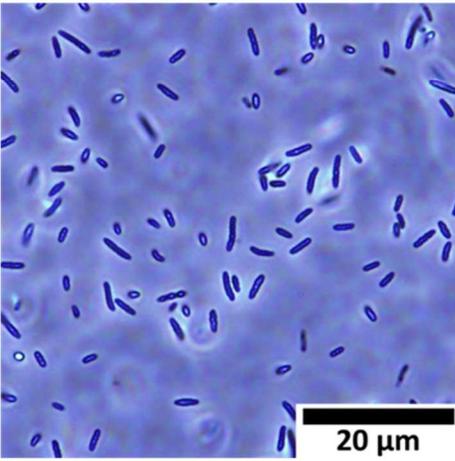
Souche bactérienne	Substrat	Après 48h en phase de production
RA26	Acide décanoïque (5 g/L)	
NC532	Octanoate de sodium (3g/L) et acide 10-undécènoïque (0,5 g/L)	
TE9	Huile de coprah (5g/L) et acide 10-undécènoïque (0,5 g/L)	

Figure II.4 : Suivi des cultures par microscopie à contraste de phase des souches RA26, NC532 et TE9 en phase de production de PHA.

Le suivi des cultures par microscopie optique à contraste de phase permet donc de mettre en évidence que la culture en présence d'acide décanoïque, utilisé seul ou en mélange avec de l'acide 10-undécénoïque, entraîne une diminution de la densité cellulaire, suggérant une certaine toxicité pour les différentes souches bactériennes utilisées pour cette étude. Les observations microscopiques des cultures réalisées en présence d'octanoate de sodium révèlent que l'utilisation de ce substrat a des impacts variables sur les cultures et dépend de la souche bactérienne considérée. D'autre part, l'huile de coprah utilisée seule ou en mélange avec de l'acide 10-undécénoïque, permet de maintenir une viabilité de la culture, et pour certaines souches, la production de PHA.

Par conséquent, pour la suite nous retiendrons l'octanoate de sodium et l'huile de coprah, utilisés seul ou en mélange avec de l'acide 10-undécénoïque, comme substrats carbonés pour la production de PHA_{MCL} insaturés.

II.3.1.2 Influence du substrat carboné et des conditions de culture sur la production de PHA

Le suivi par microscopie optique permet d'évaluer l'état de la culture et apporte une première appréciation quant à la capacité de production de PHA dans les conditions choisies. Après 48h ou 72h de culture, les bactéries sont récoltées par centrifugation et les PHA sont extraits à partir des culots lyophilisés.

Le tableau II.2 regroupe les teneurs en PHA obtenus en fonction des conditions de culture après extraction et purification des PHA, exprimés en masse de PHA obtenu par masse de cellules sèches.

Tableau II.2 : Différentes fermentations bactériennes obtenues avec de l'octanoate de sodium (Oct. Na) à 3 g/L ou de l'huile de coprah (H. coprah) à 5 g/L.

Souche	Substrat		MCS ^c (g)	PHA (g)	Teneur en PHA (%)
	Acide 10- undécénoïque (g/L)	Substrat carboné			
TIK669	0,20	Oct. Na ^a	0,93	0	0
	0,20	H. coprah ^a	0,83	0,13	15,4
	0,20	H. coprah ^a	0,52	0	0
	0,50	H. coprah ^a	0,04	0	0
	0,80	H. coprah ^a	0,02	0	0
RA16	0	H. coprah ^a	1,66	0,33	20
	0,50	Oct. Na ^a	1,63	0	0
TIK771	0,20	Oct. Na ^a	1,55	0	0
	0,50	Oct. Na ^a	2,67	0	0
	0	H. coprah ^a	2,76	0	0
	0,20	H. coprah ^a	1,80	0	0
NC532	0	Oct. Na ^b	30,20	0,78	21,5
	0,50	Oct. Na ^a	1,54	0,05	3,6
	0,50	Oct. Na ^b	2,40 ± 1,03	0,02 ± 0,01	0,5 ± 0,9
	0,20	H. coprah ^b	8,49	0,17	2
	0,35	H. coprah ^b	5,69	0,27	4,8
	0,50	H. coprah ^b	4,69 ± 1,48	0,73 ± 0,15	17,0 ± 8,6
	0,80	H. coprah ^b	2,37 ± 0,71	0,43 ± 0,07	19,4 ± 8,8
RA26	0,20	Oct. Na ^a	0,67 ± 0,10	0,07 ± 0,02	10,2 ± 1,4
	0,50	Oct. Na ^a	0,86	0	0
	0,20	H. coprah ^a	1,75 ± 0,10	0,31 ± 0,13	17,8 ± 6,4
	0,50	H. coprah ^a	1,78 ± 0,07	0,30 ± 0,14	17,2 ± 8,6
	0,80	H. coprah ^a	1,86 ± 0,07	0,55 ± 0,05	29,8 ± 1,8
	1,00	H. coprah ^a	1,97	0,43	21,9
TE9	0,50	Oct. Na ^a	1,80 ± 0,60	0	0
	0	H. coprah ^a	1,95 ± 0,16	0,68 ± 0,19	34,8 ± 7,1
	0,20	H. coprah ^a	2,65	0,72	27,3
	0,20	H. coprah ^b	5,21	1,03	19,8
	0,50	H. coprah ^a	2,53 ± 0,34	0,95 ± 0,09	38,3 ± 8,7
	0,50	H. coprah ^b	4,92 ± 0,40	1,57 ± 0,18	31,9 ± 1
	0,80	H. coprah ^a	2,39	0,71	29,8
	1,00	H. coprah ^a	1,59	0,48	30,2

a) Production en Erlen 1,8L ; b) Production en bioréacteur 3,5L ; c) MCS : Masse de cellules sèches

TIK669, TIK771 et RA16 : Les fermentations réalisées avec les souches RA16, TIK669 et TIK771 en présence d'octanoate de sodium et d'acide 10-undécénoïque n'ont pas permis la production de PHA. En présence d'huile de coprah, les résultats montrent que les 3 souches bactériennes ne sont pas capables de produire des PHA de façon reproductible dans les conditions testées ici.

NC532 : Avec la souche NC532 cultivée en présence de 3 g/L d'octanoate de sodium seul, le rendement de production est de 21,5% alors qu'utilisé en mélange avec l'acide 10-undécénoïque le rendement de production est inférieur à 5%. Avec cette souche, cultivée en présence de 5 g/L d'huile de coprah et d'acide 10-undécénoïque, les teneurs en PHA obtenus vont de 2% à 19,45%. Les teneurs les plus élevées sont obtenus lorsque l'acide 10-undécénoïque est utilisé à une concentration de 0,5 g/L et 0,8 g/L.

RA26 : La production avec la souche RA26 à partir d'octanoate de sodium et acide 10-undécénoïque donne des teneurs en PHA en moyenne de 10,2% lorsque l'acide 10-undécénoïque est utilisé à une concentration de 0,2 g/L. Avec l'huile de coprah, quelle que soit la concentration en acide 10-undécénoïque, la souche RA26 a produit du PHA à une teneur moyenne de 20%.

TE9 : Aucun PHA n'a été obtenu après fermentation de la souche TE9 en présence d'octanoate de sodium et d'acide 10-undécénoïque. En présence d'huile de coprah à 5 g/L et quelle que soit la concentration en acide 10-undécénoïque, cette souche a permis la production de PHA avec de très bonnes teneurs en PHA : jusqu'à 38,35%.

L'octanoate de sodium permet donc de produire des PHA avec des teneurs en PHA intéressantes avec les souches RA26 et NC532.

Le mélange huile de coprah et acide 10-undécénoïque permet d'obtenir des teneurs en PHA satisfaisantes et des cultures bactériennes de bonne densité cellulaire lorsqu'il est utilisé avec les souches RA26, NC532 et TE9. De plus, une meilleure reproductibilité des résultats et des teneurs plus élevées sont observées pour la souche TE9.

La comparaison avec les teneurs en PHA obtenues dans la littérature est délicate car le plus souvent, les rendements de production sont exprimés en fonction de la consommation de substrat et non en % (g/g) comme dans notre étude. Néanmoins, des travaux¹⁵ menés sur

la production de PHA_{MCL} par *Pseudomonas putida* à partir d'huile de palme saponifiée, dont la composition en acides gras est proche de celle de l'huile de coprah, ont présentés des résultats de teneurs en PHA_{MCL} également en % (g/g). Ainsi, les fermentations réalisées ont permis la production de PHA_{MCL} avec une teneur entre 19% et 37%.

Dans la suite de ce travail, nous avons donc choisi de poursuivre avec les souches RA26, TE9 et NC532 cultivées à partir d'huile de coprah, d'acide 10-undécénoïque et/ou d'octanoate de sodium pour les souches RA26 et NC532.

Ces résultats proviennent d'études menées en Erlenmeyer 1,8L et en bioréacteur 3,5L. Par la suite, la mise en œuvre de fermentations en plus gros volumes (14L et 18L) ont été réalisées afin d'assurer la production de quantités de PHA plus importantes nécessaires pour les réactions de modifications chimiques ultérieures, tout en limitant la variabilité inter-lots.

Ainsi, quatre fermentations (14L et 18L) ont été réalisées en bioréacteur de 30L au laboratoire EM3B de l'Ifremer de Nantes. L'ensemble des résultats de caractérisation physico-chimiques relatifs aux productions en 1,8L, 3,5L, 14L et 18L est présenté ci-après.

II.3.2 Caractérisation des PHA

Les PHA produits par les souches RA26, TE9 et NC532 ont été caractérisés afin de connaître leur structure chimique, et leurs propriétés thermiques. L'objectif étant l'optimisation des conditions de culture propre à chaque souche dans le but de produire des PHA_{MCL} insaturés de structures contrôlées. Plus particulièrement nous recherchons les conditions optimales permettant la production de PHA_{MCL} insaturés dont le taux d'insaturation est compris entre 20 et 30%, taux optimal pour envisager les fonctionnalisations ultérieures.

II.3.2.1 Analyse de la structure chimique des PHA par FTIR-ATR

Les groupes fonctionnels présents dans la structure des PHA ont été détectés par FTIR-ATR. Les principales bandes d'absorption infrarouge sont observées dans l'intervalle de 3500-600 cm^{-1} (Figure 5). Les spectres FTIR-ATR des PHA produits par les souches RA26, NC532 et TE9 cultivées à partir des différents substrats carbonés révèlent une structure caractéristique de polyester avec la présence d'une bande d'absorption intense correspondant à la bande d'étirement du groupe ester carbonyle ($\nu_{\text{C=O}}$) à 1727 cm^{-1} . Les bandes à 2853 et 2926 cm^{-1} sont attribuées aux étirements symétriques et anti-symétriques des groupements CH_2 et CH_3 . La bande d'absorption à 1380 cm^{-1} correspond à la vibration de déformation δ des groupements méthyles terminaux. La bande à 1166 cm^{-1} correspond à l'élongation de la fonction C-O-C.

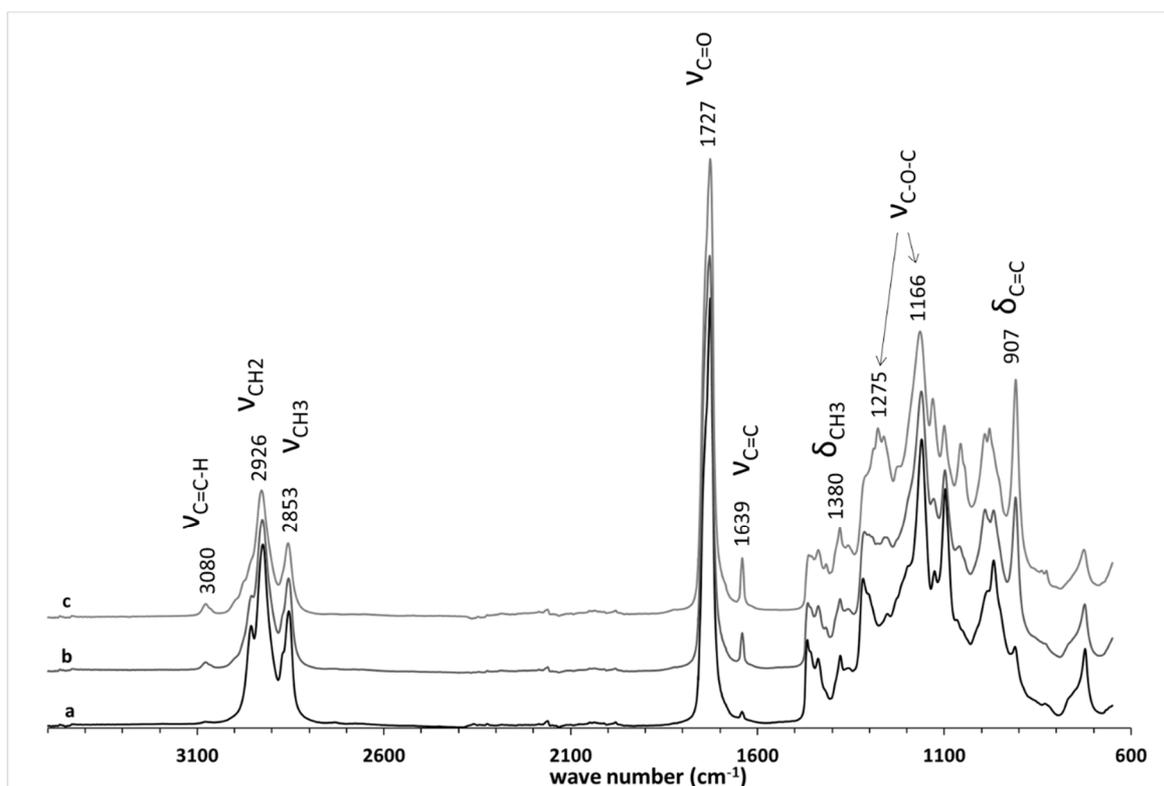


Figure II.5 : Spectres FTIR-ATR de PHA_{MCL} insaturés produits par la souche TE9 à partir d'huile de coprah à 5 g/L et d'acide 10-undécénoïque à différentes concentrations : a) 0,2 g/L ; b) 0,8 g/L ; c) 1 g/L.

Les spectres FTIR-ATR des polymères produits à partir d'un mélange de substrats carbonés comportant de l'acide 10-undécénoïque, présentent des bandes d'absorption caractéristiques des fonctions alcènes (C=C). Ainsi, les bandes d'étirement et de déformation de la double liaison (C=C) sont visibles à 1639 cm⁻¹ et à 907 cm⁻¹. La bande d'absorption à 3080 cm⁻¹ est caractéristique de la vibration d'étirement du C-H d'un alcène. L'intensité des signaux caractéristiques des liaisons alcènes tend à augmenter en fonction de la concentration en acide 10-undécénoïque dans le milieu de production des PHA, tel qu'il a déjà été observé lors de précédents travaux¹⁶⁻¹⁹.

Une mesure relative du degré de cristallinité a été obtenue en standardisant l'absorbance à 1166 cm⁻¹ à celle de 1380 cm⁻¹, qui est insensible au degré de cristallinité du polymère. Les bandes à 1166 et 1275 cm⁻¹ sont des signaux sensibles à la cristallinité, mais la bande à 1166 cm⁻¹ est plus spécifique de l'étirement du C-O et mieux résolue que les autres. Ainsi, un indice de cristallinité (IC) peut être défini comme le rapport entre les intensités des

bandes à 1166 cm^{-1} et à 1380 cm^{-1} ^{20,21}. Les valeurs d'IC observées dans la littérature pour les PHA_{SCL} tels que le PHB sont d'environ 0,9 et pour les PHA_{MCL} entre 0,4 et 0,2 (Tableau II.3).

Tableau II.3 : Valeurs d'IC observées pour différents PHA.

Polymère étudié	IC	Souche bactérienne	Référence
Copolymères PHA_{MCL}	0,23 – 0,37	RA26	²²
Copolymère PHA_{MCL}	0,48	<i>P. sp</i> PAMC 28620	²¹
PHHxHO	0,41	<i>P. sp</i> Gpo1 105816	²³
PHB	0,91	<i>B. cepacia</i> LMG 1222	²³

Les valeurs d'indice de cristallinité obtenues pour les PHA_{MCL} produits dans notre étude sont indiquées dans le Tableau II.4 (page 103). Les valeurs d'IC varient peu, entre 0,22 et 0,30 et ce, quelles que soient les souches bactériennes ou les substrats carbonés utilisés. Ces résultats laissent donc supposer que les PHA produits sont des PHA_{MCL} encore moins cristallins que le PHHxHO, comportant des chaînes latérales probablement plus longues que celles du PHO.

II.3.2.2 Caractérisation de la structure chimique par RMN ^1H et ^{13}C

Les analyses RMN ^1H et ^{13}C ont été réalisées sur les échantillons de PHA. Ce type d'analyse permet de déterminer de façon plus précise la nature des PHA (courte chaîne ou moyenne chaîne) et lorsque que le polymère contient des insaturations, le calcul du taux d'insaturations est possible à partir de l'intégration de certains signaux du spectre RMN ^1H .

L'analyse RMN ^1H d'un polymère produit par la souche TE9 à partir d'un mélange d'huile de coprah et d'acide 10-undécenoïque permet de caractériser un PHA_{MCL} insaturé (figure II.6,A). Les signaux de résonance du multiplet centré sur 2,5 ppm sont attribués aux protons méthylènes (CH_2) et le signal à 5,15 ppm correspond au proton méthine (CH) de la chaîne principale. Le signal situé à 1,5 ppm est caractéristique des protons méthylènes (CH_2) proches du carbone C4 des chaînes latérales. Le signal intense à 1,22 ppm est attribué aux autres protons méthylènes (CH_2) constitutifs des chaînes latérales des PHA. Le triplet à 0,85 ppm est attribué aux protons du groupe méthyle terminal (CH_3) des chaînes latérales. Le multiplet à 4,9 ppm est attribué aux protons méthylènes de la double liaison ($\text{H}_2\text{C}=\text{}$) et le multiplet à 5,74 ppm au proton méthine ($=\text{CH}-$) de la double liaison. Le multiplet à 2 ppm est attribué aux protons méthylènes en α du groupe insaturé.

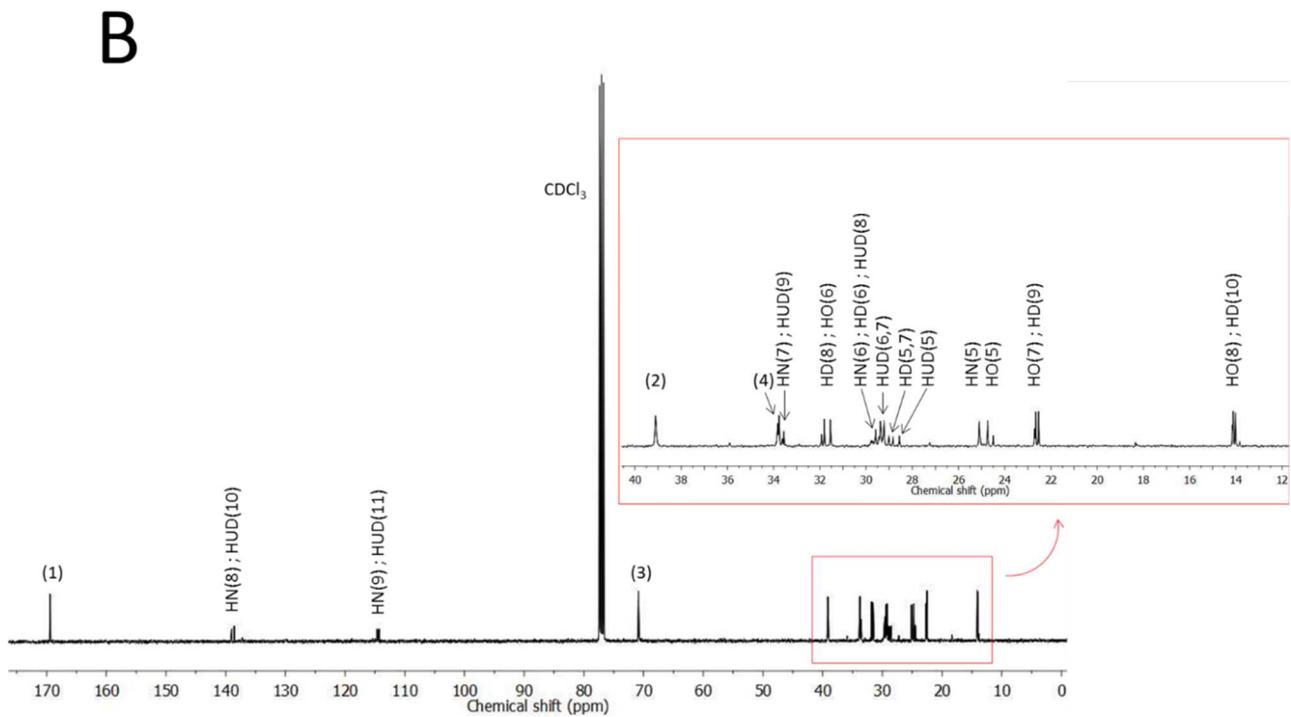
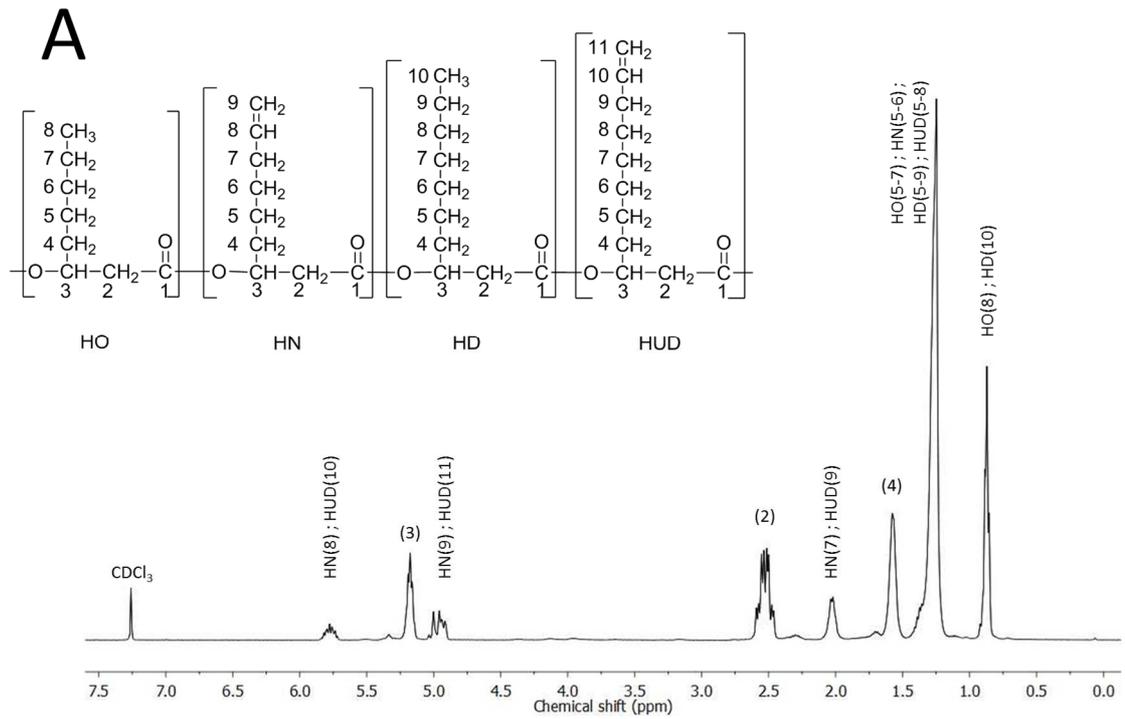


Figure II.6 : Spectres RMN ¹H (A) et ¹³C (B) du PHA_{MCL} insaturé produit par TE9 à partir d'huile de coprah (5g/L) et acide 10-undécénoïque (0,5 g/L).

Le spectre RMN ^{13}C de ce même polymère est présenté en figure II.6,B. Les carbones constitutifs de la chaîne principale présentent les mêmes signaux de déplacement chimique pour tous les monomères de PHA. Ainsi, le déplacement chimique majeur du carbone C1 (C=O) a été détecté à 169 ppm, celui du C2 à 39 ppm et du C3 à 71 ppm. Le carbone C4 des groupes méthylènes des chaînes latérales est détecté à 33 ppm. Les déplacements chimiques à 14 ppm correspondent aux carbones des groupes méthyles terminaux (CH_3) des chaînes latérales et les déplacements chimiques observés entre 22 ppm et 31 ppm correspondent aux carbones des différents groupements méthylènes (CH_2) constitutifs des chaînes latérales de PHA. La présence de double liaison est confirmée par la présence de déplacements chimiques à 114 ppm ainsi qu'à 139 ppm correspondants respectivement aux carbones des groupements méthylènes ($=\text{CH}_2$) et méthines ($=\text{CH}-$) de la double liaison. Le déplacement chimique à 34 ppm correspond aux groupes méthylènes en α de la double liaison.

Les spectres RMN ^1H permettent également de déterminer le pourcentage d'insaturation. La proportion entre les monomères saturés et insaturés peut être calculée par le rapport entre l'intégration du signal à 5,74 ppm (correspondant au proton méthine de la double liaison ($=\text{CH}-$)) et celle du signal à 5,15 ppm (correspondant aux protons méthylènes (CH_2) proches du carbone β dans les chaînes latérales) ⁹ (Equation ci-dessous).

$$\%(\text{C} = \text{C}) = \frac{I_{5,74 \text{ ppm}}}{I_{5,15 \text{ ppm}}} \times 100$$

Les taux d'insaturation déterminés pour les différents PHA_{MCL} insaturés sont regroupés dans le tableau II.4. Certaines fermentations ont été réalisées dans des conditions identiques, les résultats de caractérisation des polymères ainsi produits sont présentés avec des valeurs moyennes, exprimés par un écart-type « \pm ».

Tableau II.4 : Caractérisation physico-chimique des PHA

Souche	acide 10-undécénoïque (g/l)	Substrat carboné	Volume de production (l)	Taux d'insaturation (%)	IC ^b	M _n (g/mol)	IP	T _g (°C)	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)
	0	Oct, Na	3,5	0	nd	193 000	2,1	-37,3	46,7	9,7
	0,50	Oct, Na	1,8	33,0	0,22	220 700	2,1	-41,8	51,9	3,5
	0,50	Oct, Na	3,5	26,5	0,25	238 500	2	-40,9	52,3	1,1
	0,20	H, coprah	3,5	10,2	0,24	236 200	2,2	-48,4	48,6	7,2
	0,35	H, coprah	3,5	16,0	0,24	264 600	1,9	-44,8	49,6	9,1
NC532	0,35	H, coprah	3,5	16,0	0,24	264 600	1,9	-44,8	49,6	9,1
	0,35	H, coprah	18	14,3	0,25	149 300	2,2	-46,4	52,7	10,8
	0,50	H, coprah	3,5	37,1 ± 7,9	0,24	101 600 ± 15 300	2,5 ± 0,1	-52,0 ± 1,7	45,4 ± 2,0	4,9 ± 1,0
0,80	H, coprah	3,5	75,1 ± 7,8	0,25	158 100	2,5	-51,6 ± 1,0	54,6	0,9	
RA26	0,20	Oct, Na	1,8	12,6 ± 8,0	0,24	158 000 ± 16 600	2,0 ± 0,4	-39,2 ± 0,1	53,3 ± 1,5	9,9 ± 2,1
	0,20	H, coprah	1,8	15,8 ± 4,1	0,25	136 800 ± 13 100	1,9 ± 0,1	-45,4 ± 1,0	47,2 ± 0,5	9,0 ± 0,7
	0,50	H, coprah	1,8	35,3 ± 3,1	0,25	132 900 ± 14 800	2,0 ± 0,2	-49,3 ± 0,1	46,2 ± 1,3	5,6 ± 0,5
	0,80	H, coprah	1,8	48,6 ± 3,2	0,26	140 700 ± 13 600	1,9 ± 0,1	-49,8 ± 0,2	44,5 ± 0,4	4,9 ± 1,4
	1,00	H, coprah	1,8	54,1	0,26	122 800	1,9	-49,9	44,4	3,1
TE9	0	H, coprah	1,8	0	0,25	163 300 ± 33 800	1,9 ± 0,2	-44,3	47,7 ± 0,9	7,2 ± 0,8
	0,20	H, coprah	1,8	11,0	0,25	192 100	2,1	-44,7	48,6	10,3
	0,20	H, coprah	3,5	11,4	0,25	181 000	2,0	-44,74	47,03	7,2
	0,50	H, coprah	1,8	25,3 ± 0,4	0,25	221 900 ± 38 300	1,9 ± 0,2	-49,7 ± 0,4	47,7 ± 0,9	7,2 ± 0,8
	0,50	H, coprah	3,5	24,3 ± 7,5	0,25	145 700 ± 70 400	2,0 ± 0,1	-46,8 ± 1,4	46,0 ± 2,4	7,0 ± 4,1
	0,50	H, Coprah	14	22,0	0,26	154 000	2,0	-45,8	46,9	8,6
	0,50	H, Coprah	18	25,6	0,25	120 200	1,9	-46,1	46,3	8,0
	0,60	H, Coprah	18	28,8	0,25	123 300	1,8	-46,2	49,2	9,7
	0,80	H, coprah	1,8	45,8	0,27	220 400	2,1	-50,0	45,9	2,6
	1,00	H, coprah	1,8	69,7	0,30	173 400	2,2	-50,5	nd	nd

a) Déterminé par RMN ¹H ; b) IC : Indice de cristallinité, déterminé par FTIR-ATR

Pour les PHA produits par la souche RA26 à partir **d'octanoate de sodium** et d'acide 10-undécénoïque à 0,2 g/L, les taux d'insaturation sont limités à 12,6%. Par contre, les PHA produits par la souche NC532 en présence d'un mélange d'octanoate de sodium et d'acide 10-undécénoïque à 0,5 g/L atteignent des taux d'insaturation de 33%.

Les souches bactériennes NC532, RA26 et TE9 ont également été cultivées à partir d'un mélange **d'huile de coprah** à concentration fixe de 5 g/L et de concentrations croissantes d'acide 10-undécénoïque variant de 0,2 g/L à 1 g/L. (Figure II.7).

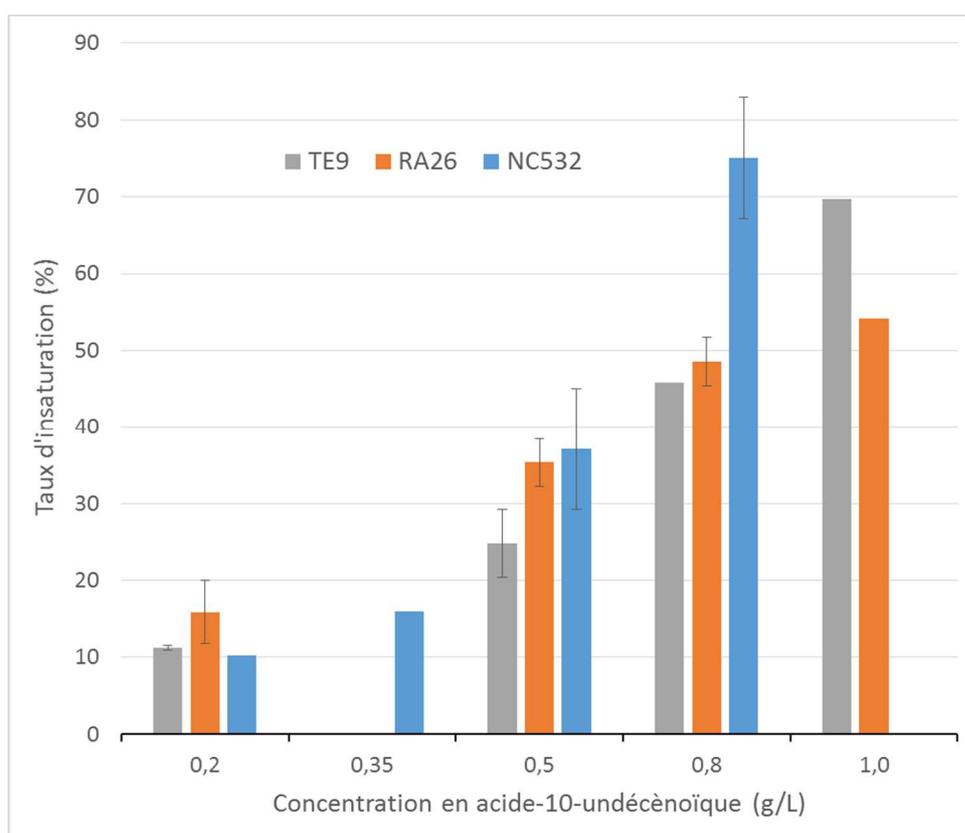


Figure II.7 : Taux d'insaturation des polymères produits par les souches TE9, RA26 et NC532 à partir d'huile de coprah à 5 g/L et d'acide 10-undécénoïque

Les PHA produits par la souche RA26 ont un taux d'insaturation de 15,8% à une concentration d'acide 10-undécénoïque de 0,2 g/L, de 35,3% pour 0,5 g/L d'acide 10-

undécénoïque, et de 48,6% pour 0,8 g/L. Le taux d'insaturation atteint au maximum 54,1% en présence d'acide 10-undécénoïque à 1 g/L.

Les PHA produits par la souche TE9 présentent un taux d'insaturation proche de 11% à une concentration en acide 10-undécénoïque de 0,2 g/L. A 0,5 g/L le taux d'insaturation est en moyenne de 25%, puis 45,8% avec 0,8 g/L d'acide 10-undécénoïque, et il atteint jusqu'à 69,7% à la concentration la plus élevée en acide 10-undécénoïque testée ici 1 g/L.

Concernant la souche NC532, les PHA produits en présence d'huile de coprah à 5 g/L et d'acide 10-undécénoïque à 0,2 g/L présentent un taux d'insaturation de 10,2%. Ce taux augmente à 37,1% d'insaturation lorsque la concentration dans le milieu de production passe à 0,5 g/L d'acide 10-undécénoïque. La concentration d'acide 10-undécénoïque la plus élevée avec laquelle a été cultivée la souche NC532 est 0,8 g/L et a permis d'obtenir des PHA dont le taux d'insaturation atteint 75,1% en moyenne, soit des taux bien supérieurs à ceux obtenus avec les souches RA26 et TE9 dans les mêmes conditions. Pour cette raison, la souche NC532 a également été cultivée en présence de 0,35 g/L d'acide 10-undécénoïque et 5 g/L d'huile de coprah, ce qui a conduit à la production d'un PHA présentant un taux d'insaturation de 16%.

L'analyse RMN ^1H des PHA produits par les trois souches RA26, TE9 et NC532 démontre sans ambiguïté que la concentration en acide 10-undécénoïque influence la proportion en monomères insaturés au sein du PHA. L'augmentation du taux d'insaturation est corrélée à l'élévation de la concentration en acide 10-undécénoïque²⁴⁻²⁶. La proportionnalité entre la concentration en acide 10-undécénoïque et le taux d'insaturation des polymères étant différente pour chaque souche bactérienne, la connaissance des conditions de culture optimales spécifiques à chaque souche est nécessaire afin de pouvoir anticiper le taux d'insaturation final du polymère et ainsi produire des PHA présentant un taux d'insaturation contrôlé et reproductible.

Sur la base de ces résultats, des fermentations en volume de 14 à 18L ont été menées afin de produire des quantités plus importantes de PHA. L'objectif étant de produire des PHA_{MCL} insaturés présentant un taux d'insaturation compris entre 20% et 30%. Les souches TE9 et NC532 ont été cultivées en présence d'huile de coprah à 5 g/L et d'acide 10-undécénoïque à 0,5 et 0,6 g/L pour la souche TE9, et 0,35 g/L pour la souche NC532. Les

résultats de caractérisation par RMN ^1H des PHA issus de ces productions sont présentés **en vert** dans le tableau II.4 (page 103).

La production réalisée avec la souche NC532 en présence de 0,35 g/L d'acide 10-undécénoïque a permis d'obtenir des PHA_{MCL} présentant 14,3% d'insaturations. La souche TE9 cultivée en présence de 0,5 g/L d'acide 10-undécénoïque produit un PHA_{MCL} insaturé à 22% et 25,6%, et 28,8% lorsqu'elle est cultivée avec 0,6 g/L d'acide 10-undécénoïque.

Les PHA issus des productions en bioréacteur 14L et 18L présentent des taux d'insaturation en adéquation avec les résultats précédemment obtenus dans des conditions de concentrations en substrats carbonés similaires en Erlen 1,8L et bioréacteur 3,5L, ce qui permet d'envisager un transfert à une échelle de production semi-industrielle.

II.3.2.3 Détermination de la composition monomérique des PHA par CGSM

L'analyse par CGSM permet de déterminer la composition monomérique des PHA. Les spectres de masse des esters méthyliques triméthylsilylés présentent les fragments caractéristiques $[(CH_3)_3SiO^+=CHCH_2CO_2CH_3]$ à m/z 175 et $[RCH=O^+Si(CH_3)_3]$ à m/z $[M-73]$ résultant du clivage en α du groupement hydroxyl triméthylsilylé. Les esters méthyliques triméthylsilylés ne présentent généralement pas d'ion moléculaire mais le fragment lié à l'ion moléculaire à m/z $[M-15]$ est assez intense et peut être utilisé pour déterminer la longueur de chaîne des monomères (Figure II.8).

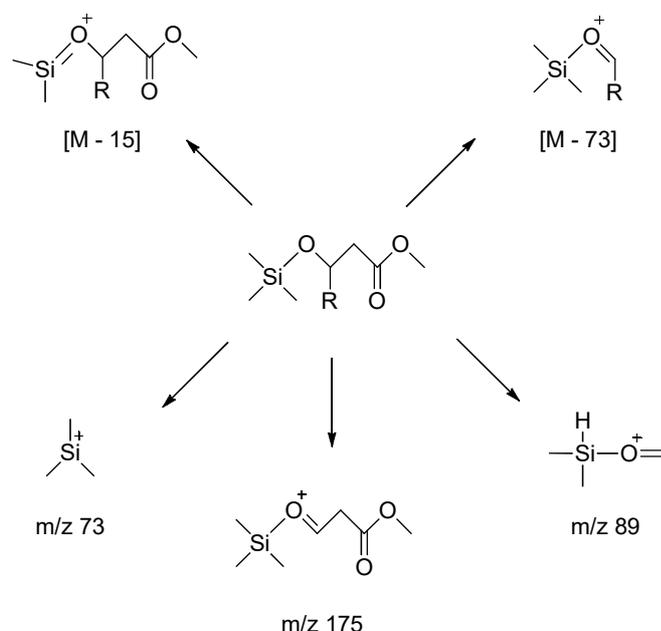


Figure II.8 : Schéma de fragmentation obtenu en CGSM à partir d'esters méthyliques triméthylsilylés de 3-hydroxyalcanoates ^{11,27}.

L'existence d'une double liaison peut être déduite de la masse molaire du fragment à m/z $[M-15]$, qui compte deux unités de masses atomiques de moins que son homologue saturé ¹¹. D'autres fragments de masses inférieures sont également caractéristiques du groupe fonctionnel 3-hydroxyle et facilement attribuables : m/z 73 $[(CH_3)_3Si^+]$, m/z 89 $[(CH_3)_3SiO^+]$, m/z 131 $(C_5H_{11}SiO_2)^+$, m/z 133 $(C_5H_{13}SiO_2)^+$ et m/z 159 $(C_6H_{11}SiO_3)^+$ ²⁷ (figure II.9).

Les temps de rétention sont référés à ceux obtenus préalablement à l'aide de monomères standards de chaîne carbonée de différentes longueurs.

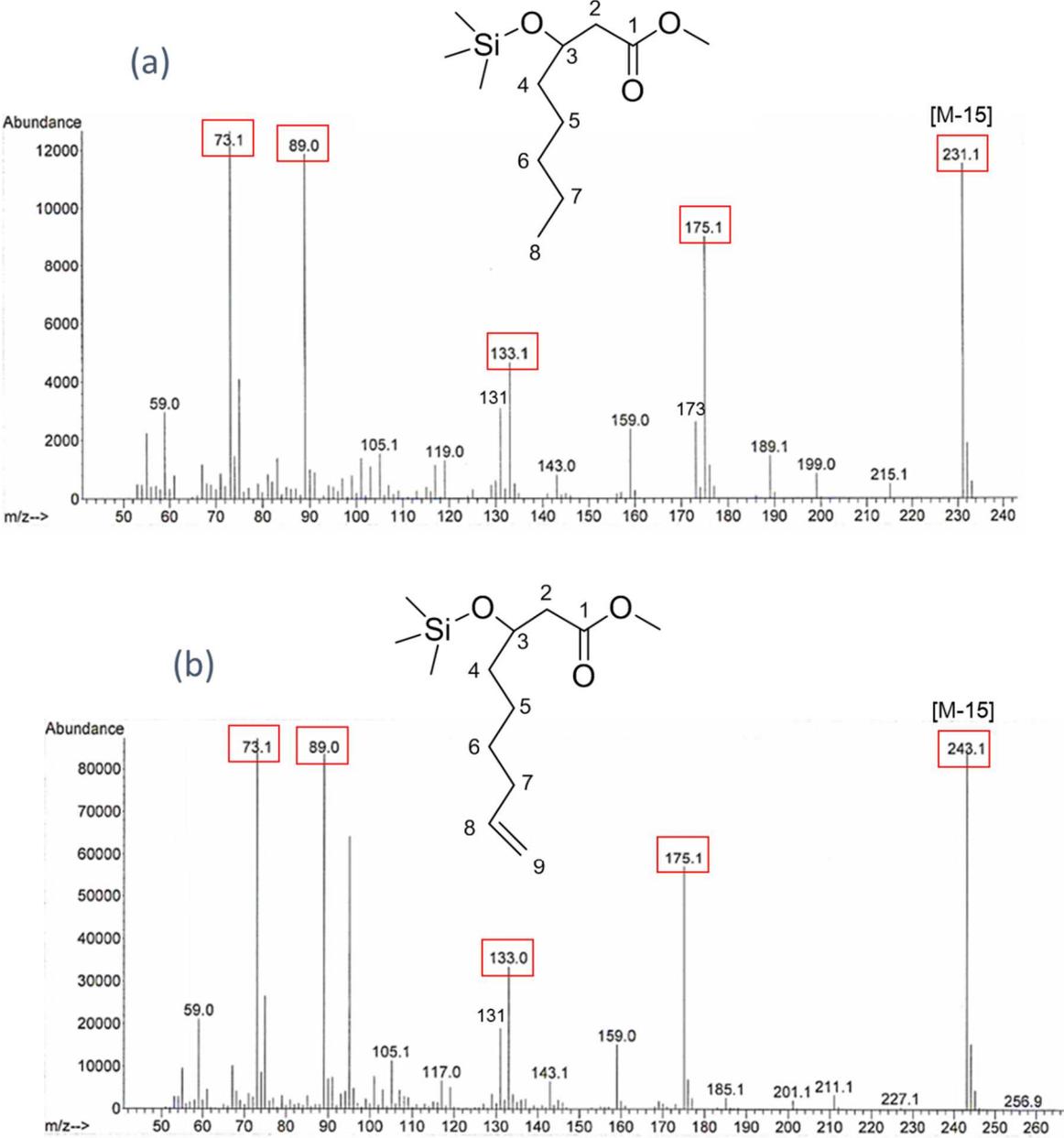


Figure II.9 : Spectres de masse des monomères de 3HO (a) et 3HN:1 (b) du PHA produit par la souche TE9 sur un mélange d'huile de coprah à 5 g/L et acide 10-undécénoïque à 1 g/L.

La composition en monomères saturés et insaturés des PHA produits par les souches

NC532, RA26 et TE9 est représentée figure II.10.

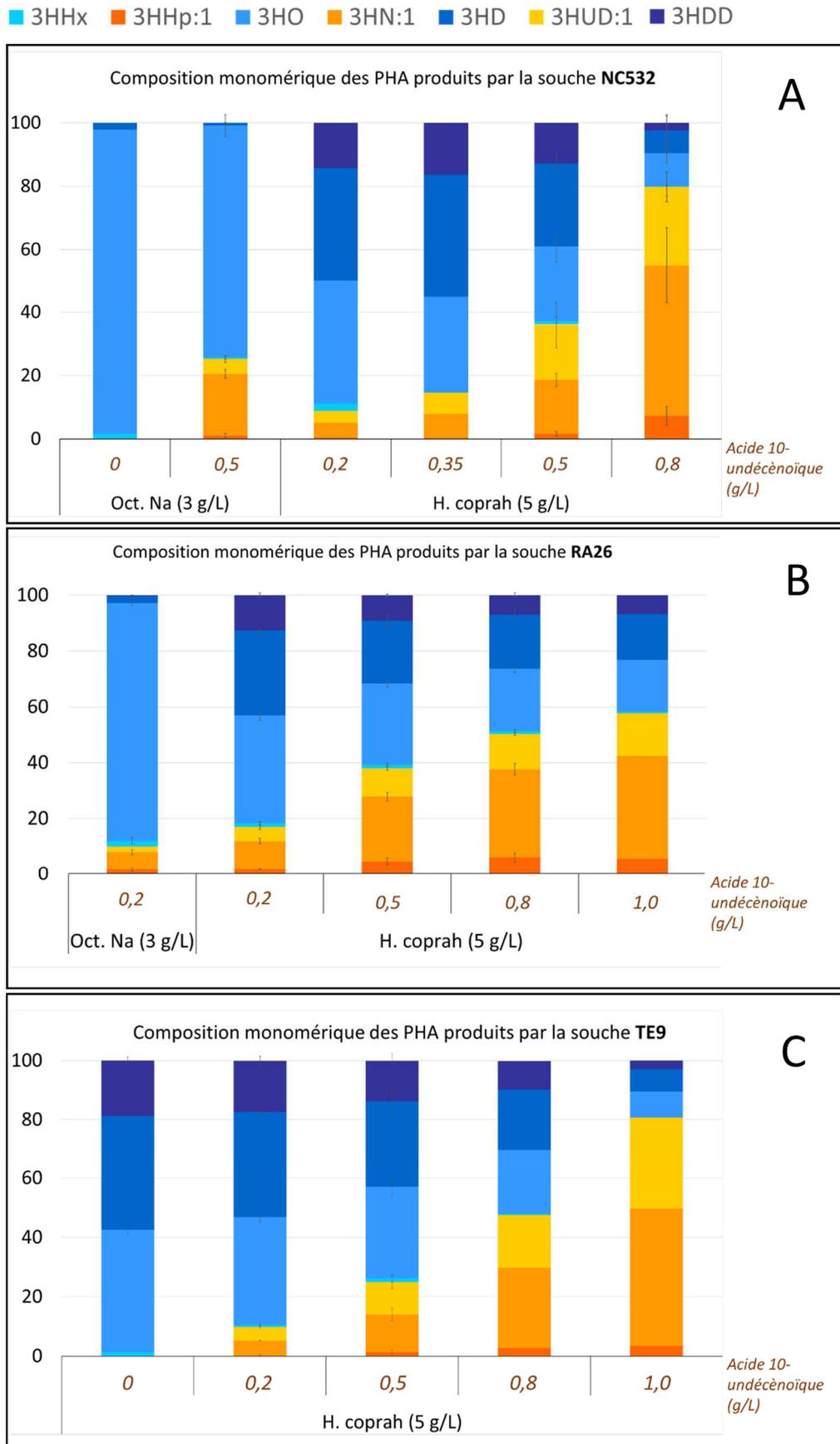


Figure II.10 : Composition monomérique (mol%) des PHA produits par les souches NC532 (A), RA26 (B) et TE9 (C) à partir d'huile de coprah (H.coprah) ou d'octanoate de sodium (Oct. Na) en mélange avec de l'acide 10-undécénoïque en concentration variable.

(3HHx : 3-Hydroxyhexanoate, 3HHp:1 : 3-Hydroxyhepténoate, 3HO : 3-Hydroxyoctanoate, 3HN:1 : 3-Hydroxynonénoate, 3HD : 3-Hydroxydécanoate, 3HUD:1 : 3-Hydroxyundécénoate, 3HDD : 3-Hydroxydodécanoate)

Pour les PHA_{MCL} insaturés produits à partir d'octanoate de sodium et d'acide 10-undécénoïque, la composition monomérique reflète la structure du substrat c'est-à-dire une chaîne carbonée en C8. En effet, le composé majoritaire est le 3-hydroxyoctanoate (3HO) qui peut représenter jusqu'à 85% pour le PHA produit par la souche RA26.

Les PHA_{MCL} saturés produits par la souche TE9 à partir d'huile de coprah seule sont composés principalement de 3HO à 42%, de 3-hydroxydécanoate (3HD) à 39% et de 3-hydroxydodécanoate (3HDD) à 18%.

En mélange avec de l'huile de coprah, l'augmentation de la concentration en acide 10-undécénoïque dans le milieu de production influence la composition finale des polymères. En effet, à des concentrations faibles en acide 10-undécénoïque, les monomères majoritaires sont le 3HO et le 3HD, les monomères insaturés tels que le 3HN:1 et le 3HUD:1 sont présents en plus petites proportions. Par exemple, un polymère produit par RA26 à partir d'huile de coprah à 5 g/L en mélange avec de l'acide 10-undécénoïque à 0,2 g/L est composé majoritairement de 3HO et de 3HD à 41,1% et 29,5% et de 2% de 3HHx, 1,5% de 3HHp:1, 9,8% de 3HN:1, 4,6% de 3HUD:1 et 11,5% de 3HDD. Lorsque la concentration en acide 10-undécénoïque augmente, la proportion de monomères saturés diminue au profit des monomères insaturés qui deviennent alors majoritaires. Ainsi, un PHA produit par la souche TE9 à partir d'huile de coprah à 5 g/L en mélange avec 1g/L d'acide 10-undécénoïque est composé majoritairement de 46,3% de 3HN:1 et de 31% de 3HUD:1 et minoritairement de 3HHp:1 (3,4%), de 3HO (8,9%), de 3HD (7,5%) et de 3HDD (2,9%).

Les analyses CGSM réalisées sur les PHA produits en volume 14L et 18L (Tableau II.5) sont comparables à celles obtenues dans les mêmes conditions de cultures en bioréacteur de 3,5L, avec des PHA composés majoritairement de 3HO et 3HD pour les monomères saturés et de 3HN:1 et 3HUD:1 pour les principaux monomères insaturés.

Tableau II.5 : Composition monomérique (en % mol) des PHA.

Souche	substrats											% C=C (CGSM)	% C=C (RMM)
	Acide 10- undécénoi que (g/L)	Substrat carboné	Volume (L)	3HNx	3HNp:1	3HO	3HN:1	3HD	3HUD:1	3HDD			
NC532	0	Oct. Na	3,5	1,6	0	96,3	0	2,1	0	0	0	0	0
	0,50	Oct. Na	1,8	0,3	0,6	75,8	18,5	0,8	4	0	23,1	33	
	0,50	Oct. Na	3,5	0,8	1,5	70,8	20,5	0,9	5,5	0	27,5	26,5	
	0,20	H. coprah	3,5	2,3	0,4	39,1	4,7	35,4	3,8	14,3	8,9	10,2	
	0,35	H. coprah	3,5	0	0,3	30,3	7,6	38,7	6,7	16,4	14,6	16	
	0,35	H. coprah	18	1,8	0,4	30,4	5,3	39,5	5,8	16,8	11,5	14,3	
	0,50	H. coprah	3,5	1,5 ± 1,1	2,1 ± 0,1	25,4 ± 2,7	17,3 ± 2,3	25,7 ± 3,6	16,1 ± 5,5	12,2 ± 0,8	35,4 ± 7,8	37,1 ± 7,9	
	0,80	H. coprah	3,5	0,2 ± 0,2	7,3 ± 2,9	10,5 ± 3,0	47,8 ± 12	7,3 ± 4,9	24,8 ± 4,7	2,4 ± 2,1	79,8 ± 10,2	75,1 ± 7,8	
	0,2	Oct. Na	1,8	2,1 ± 1,1	1,2 ± 0,7	85,2 ± 1,1	6,5 ± 0,8	2,6 ± 0,2	2	0,3 ± 0,1	10 ± 0,1	12,7 ± 8,0	
	0,2	H. coprah	1,8	1,4 ± 0,6	1,5 ± 0,1	38,6 ± 1,9	10,4 ± 1,0	30,5 ± 0,9	5,1 ± 0,9	12,6 ± 0,8	17,0 ± 2,0	15,9 ± 4,1	
RA26	0,50	H. coprah	1,8	1,3 ± 0,5	4,5 ± 1,3	29,1 ± 1,2	23,3 ± 1,5	22,5 ± 2,3	10,2 ± 0,7	9,1 ± 0,5	38,0 ± 3,5	35,3 ± 3,1	
	0,80	H. coprah	1,8	0,9 ± 0,5	5,9 ± 1,6	22,4 ± 1,4	31,7 ± 1,9	19,4 ± 2,4	12,8 ± 0,6	6,9 ± 0,8	50,4 ± 4,1	48,6 ± 3,2	
	1	H. coprah	1,8	0,5	5,5	18,6	36,9	16,4	15,3	6,8	57,7	54,1	
	0	H. coprah	1,8	1,2	0	41,4 ± 1,5	0	38,7 ± 0,1	0	18,8 ± 1,3	0	0	
TE9	0,20	H. coprah	3,5	0,6	0	37,5	4,9	35,9	4,9	16,2	9,8	11,4	
	0,20	H. coprah	1,8	1	0,4	35,1	5,1	35,6	4,3	18,5	9,8	11	
	0,50	H. coprah	3,5	1,4 ± 2,0	1,2 ± 0,9	31,1 ± 4,0	11,4 ± 2,5	29,7 ± 8,8	12,0 ± 3,0	13,4 ± 3,7	24,5 ± 6,4	24,3 ± 7,5	
	0,50	H. coprah	1,8	1,3 ± 1,2	1,3 ± 1,0	30,6 ± 3,1	13,9 ± 0,1	28,7 ± 2,3	9,9 ± 1,3	14,4 ± 1,6	25,4 ± 0,4	25,3 ± 0,4	
	0,50	H. coprah	14	0,3	0,6	30,6	10,9	36,3	7,6	13,7	19,1	22	
	0,50	H. coprah	18	0,4	0,9	24,5	12,9	34,9	12,7	13,7	26,5	25	
	0,60	H. coprah	18	0,9	1,4	26,1	14,6	30	13,7	13,3	29,7	28,8	
	0,80	H. coprah	1,8	0,6	2,7	21,7	27,1	20,5	17,7	9,7	47,5	45,8	
	1,00	H. coprah	1,8	0	3,4	8,9	46,3	7,5	31	2,9	80,7	69,7	

Les résultats de composition monomérique des PHA produits par les souches RA26, TE9 et NC532 cultivées à partir d'huile de coprah et d'acide 10-undécénoïque ont mis en évidence l'utilisation de la voie de la β -oxydation des acides gras. En effet, lors de la biosynthèse, les PHA qui s'accumulent sont constitués de monomères ayant la même longueur de chaîne que le substrat ou d'une longueur égale à un ou plusieurs motifs plus courts de 2 atomes de carbone que le substrat ^{29,30}. Les monomères majoritaires au sein des PHA produits sont le 3HO, 3HD et 3HDD, c'est-à-dire à 8, 10 et 12 carbones pour les monomères saturés et le 3HN:1 et 3HUD:1 c'est-à-dire à 9 et 11 carbones pour les monomères insaturés. Pour rappel, l'huile de coprah est majoritairement constituée d'acides gras saturés à 12 et 14 carbones, l'acide 10-undécénoïque représente quant à lui une chaîne insaturée à 11 carbones.

Lorsque la voie de la β -oxydation des acides gras est utilisée comme principale voie pour la synthèse des PHA, les acides gras sont convertis en thioesters d'acyl-Co-A correspondants et oxydés par la β -oxydation de l'acide gras via le trans-2-énoyle-Co-A et le (S)-3-hydroxyacyl-Co-A en 3-cétoacyl-Co-A. Ce dernier est ensuite clivé par une 3 cétothiolase en acétyl-Co-A et acyl-Co-A. Cette voie produit des sous-unités contenant deux atomes de carbone de moins que l'acyl-Co-A entré dans le premier cycle. Ces intermédiaires du cycle de β -oxydation sont convertis par voie enzymatique en (R)-3-hydroxyacyl-Co-A, qui sert alors de substrat pour la PHA synthase³⁰⁻³³.

II.3.2.4 Localisation des insaturations au sein des PHA par CGSM

Afin de localiser les insaturations au sein de la chaîne latérale des monomères insaturés, les PHA ont été soumis à une triple dérivation (hydrolyse-méthanolyse, acétylation, thiométhylation) ⁹ et les esters méthyliques thiométhyl acétylés ont été analysés selon le même programme en CGSM que pour les dérivés méthylés triméthylsilylés. Les spectres de masse des esters méthyliques d'acides 3-hydroxyalcénoïques thiométhyl acétylés mettent en évidence l'ion moléculaire $[M^{+\bullet}]$ ainsi que d'autres fragments caractéristiques permettant d'identifier sans ambiguïté la position de la double liaison. Les fragments $[A^+]$ et $[B^+]$ proviennent du clivage de la liaison carbone-carbone entre les deux groupes méthyle sulfide CH_3S , comme le montre le schéma de fragmentation (figure II.11).

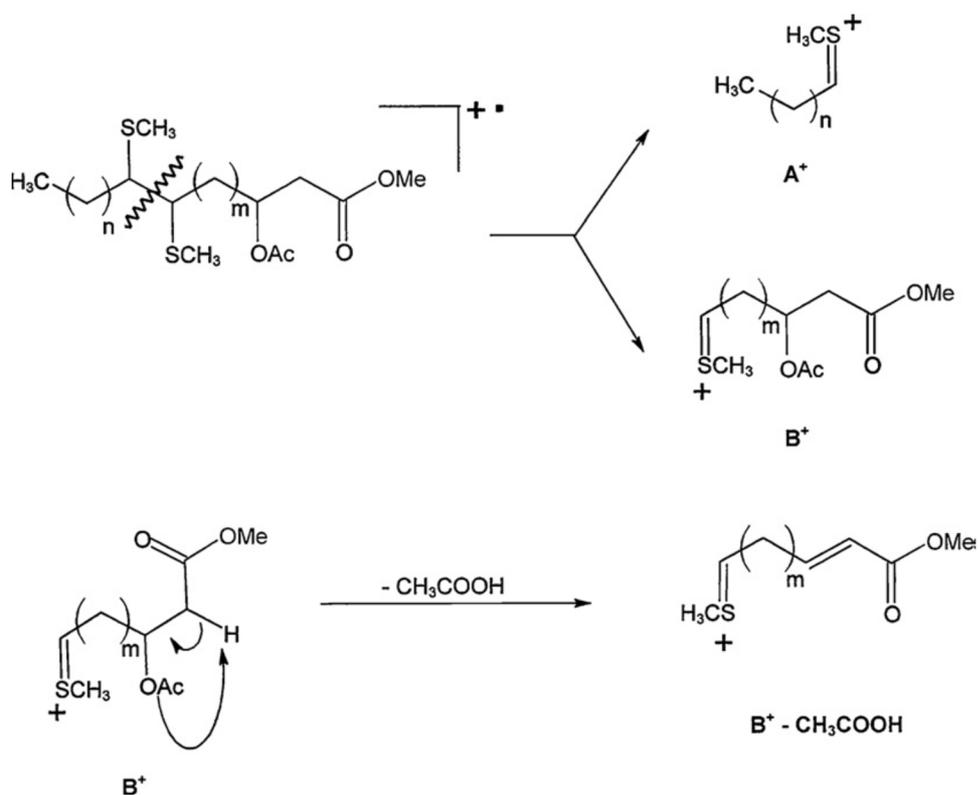


Figure II.11 : Schéma général de fragmentation des dérivés de méthyl esters thiométhyl acétylés. ⁹

Le fragment [B⁺] est souvent faiblement détecté car il se décompose rapidement pour donner le fragment [C⁺] par perte du groupement O-acétyle. En fonction de la longueur de la chaîne latérale, différents fragments caractéristiques sont aisément détectés et permettent de localiser la position de la double liaison.

L'ensemble des PHA_{MCL} produits par les souches RA26, TE9 et NC532 pour lesquels la présence d'insaturation a été mise en évidence par RMN ¹H ou l'analyse GCMS (esters méthyliques triméthylsilylés) a été soumis à l'analyse CGSM des dérivés esters méthyliques thiométhyl acétylés afin d'étudier la position de la double liaison.

Les masses des fragments caractéristiques correspondant aux monomères mono-insaturés au sein des PHA_{MCL} étudiés sont rassemblés dans le tableau II.6 et permettent de localiser sans ambiguïté la double liaison en position terminale au sein des PHA_{MCL} insaturés. Le symbole Δ indique la position de l'insaturation.

Tableau II.6 : Fragments caractéristiques des dérivés esters méthyliques thiométhyl acétylés obtenus pour quelques monomères mono-insaturés constitutifs des PHA_{MCL} insaturés.

Monomère	[A ⁺]	[B ⁺]	[C ⁺]	[M ^{•+}]
3HHp:1Δ6	61	233	173	294
3HN:1Δ8	61	261	201	322
3HUD:1Δ10	61	289	229	350
3HDD:1Δ11	61	303	243	364

Ainsi, le spectre de fragmentation présenté en figure II.12 montre plusieurs fragments caractéristiques qui permettent d'identifier le monomère 3HUD:1Δ10 : l'ion moléculaire [M^{•+}] est détecté à m/z 350 qui correspond à un monomère à 11 carbones. De plus, le fragment [A⁺] à m/z 61 (CH₂=S⁺CH₃) et le fragment [B⁺] à m/z 289 résultent du clivage de la liaison entre les deux groupes SH-CH₃ indiquant la position terminale de la double liaison.

Par ailleurs, le fragment [C⁺] à m/z 229 qui est issu de la décomposition rapide du [B⁺-HOAc] est également visible et permet de confirmer l'identification du 3HUD:1Δ10.

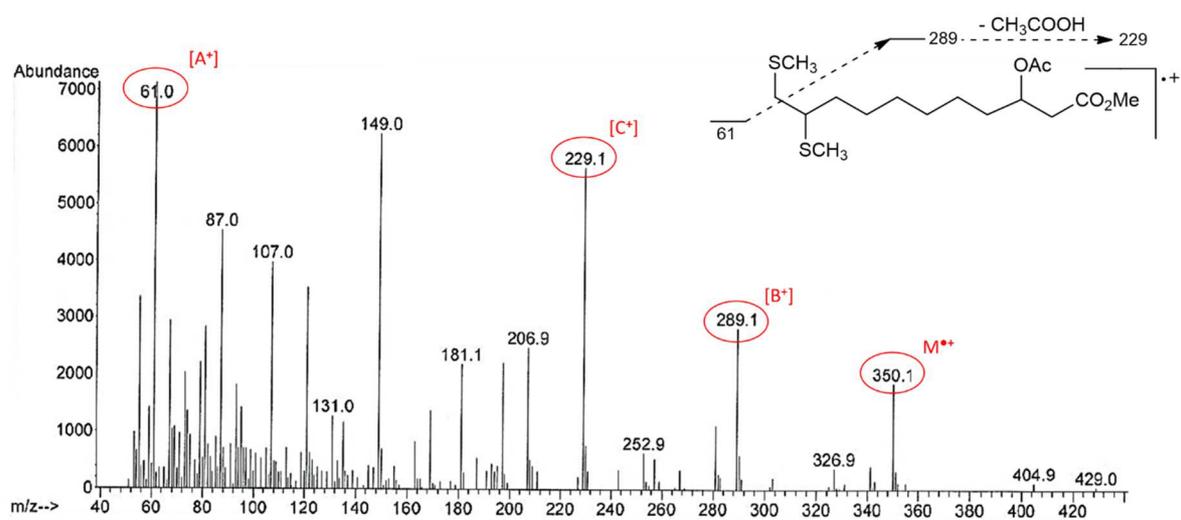


Figure II.12 : Spectre de masse du dérivé d'ester méthylique thiométhyl acétylé de 3HUD:1 Δ 10 constitutif du PHA produit par la souche RA26 cultivée en présence d'huile de coprah (5 g/L) et d'acide 10-undécénoïque (0,8 g/L).

Les spectres de masse des dérivés d'esters méthyliques thiométhyl acétylés de PHA_{MCL} produits par les souches bactériennes RA26, TE9 et NC532 en présence d'huile de coprah et d'octanoate de sodium en mélange avec de l'acide 10-undécénoïque ont donc permis **de confirmer la localisation de l'insaturation en position terminale de la chaîne latérale**. Cette position terminale rend la double liaison très accessible et donc particulièrement intéressante pour les réactions de modifications chimiques envisagées dans la suite de cette étude.

II.3.2.5 Détermination de la masse molaire par CES

L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique permet de déterminer la masse molaire moyenne d'un polymère, caractérisée principalement par deux valeurs : la masse molaire en poids (\overline{M}_w) et la masse molaire en nombre (\overline{M}_n), et son indice de polydispersité (IP = $\overline{M}_w/\overline{M}_n$). Les valeurs de \overline{M}_n et d'IP sont indiquées dans le tableau II.4 (page 103).

Pour les polymères produits par la souche RA26 à partir d'huile de coprah et d'acide 10-undécénoïque, les valeurs moyennes de \overline{M}_n observées se situent entre 122 800 g/mol et 140 700 g/mol avec un indice de polydispersité d'environ 2, ce qui est classiquement observé pour les PHA^{34,35}. Ceux produits à partir d'octanoate de sodium présentent une \overline{M}_n de 158 050 g/mol. Les PHA biosynthétisés par la souche TE9 sont caractérisés par des \overline{M}_n variant de 145 700 g/mol à 221 900 g/mol. Enfin, les PHA produits par la souche NC532 à partir d'octanoate de sodium possèdent des \overline{M}_n entre 193 000 g/mol et 238 500 g/mol. Pour ceux produits à partir d'huile de coprah, les valeurs moyennes de \overline{M}_n observées se situent entre 101 500 g/mol et 264 600 g/mol.

Les différents paramètres utilisés lors de la fermentation bactérienne tels que le volume de culture, la durée de fermentation ou la concentration en substrat carboné ne semblent pas influencer la masse molaire des PHA biosynthétisés. De plus, les masses molaires observées pour ces polymères se situent dans la gamme de valeurs classiquement observées pour les PHA_{MCL}³⁶ et les valeurs obtenues sont cohérentes avec celles obtenues pour les PHA_{MCL} produits par la souche RA26 cultivée sur d'autres substrats carbonés lors de précédents travaux^{10,22}.

Les PHA produits en bioréacteur en volume de 14L et 18L (**en vert** dans le tableau II.4 page 103) présentent des masses molaires comparables à celles obtenues dans les mêmes conditions en Erlen 1,8L ou en bioréacteur 3,5L. Ainsi la production réalisée avec la souche NC532 en présence de 0,35 g/L d'acide 10-undécénoïque a permis d'obtenir des PHA_{MCL} de 149 300 g/mol avec un indice de polydispersité de 2,2. La culture de la souche TE9 en volume de 14L et 18L a permis la production de PHA_{MCL} de 120 000 g/mol à 154 000 g/mol avec un IP entre 1,8 et 2,0.

II.3.2.6 Détermination des propriétés thermiques par AED

L'étude des courbes obtenues par AED permet de déterminer la température de transition vitreuse (T_g pour « glass temperature), la température de fusion (T_m pour « melting temperature) et l'enthalpie de fusion (ΔH_m) des polymères. Les différentes valeurs de T_g , T_m et ΔH_m obtenues pour les PHA produits à partir des souches NC532, RA26 et TE9 sont regroupées dans le tableau 4 (page 103).

Concernant les PHA produits par les souches NC532, RA26 et TE9 à partir d'un mélange d'huile de coprah et d'acide 10-undécénoïque, les analyses AED montrent que la T_g a tendance à diminuer lorsque le taux d'insaturation augmente. Par exemple, la T_g varie de -45°C pour 10,6% d'insaturation jusqu'à se stabiliser aux alentours de -50°C à partir de 45% d'insaturation pour des PHA produits par la souche RA26. La température de fusion de ces polymères oscille sur une amplitude assez restreinte de 48,6°C à 44°C sans présenter de tendance franche liée au taux d'insaturation. L'enthalpie de fusion varie de façon plus significative passant de 10 J/g à 3 J/g pour les PHA produits par la souche TE9 comportant 11% et 45,8% d'insaturation respectivement (figure II.13), ce qui montre qu'il y a très peu de zones cristallines quand les chaînes latérales sont longues.

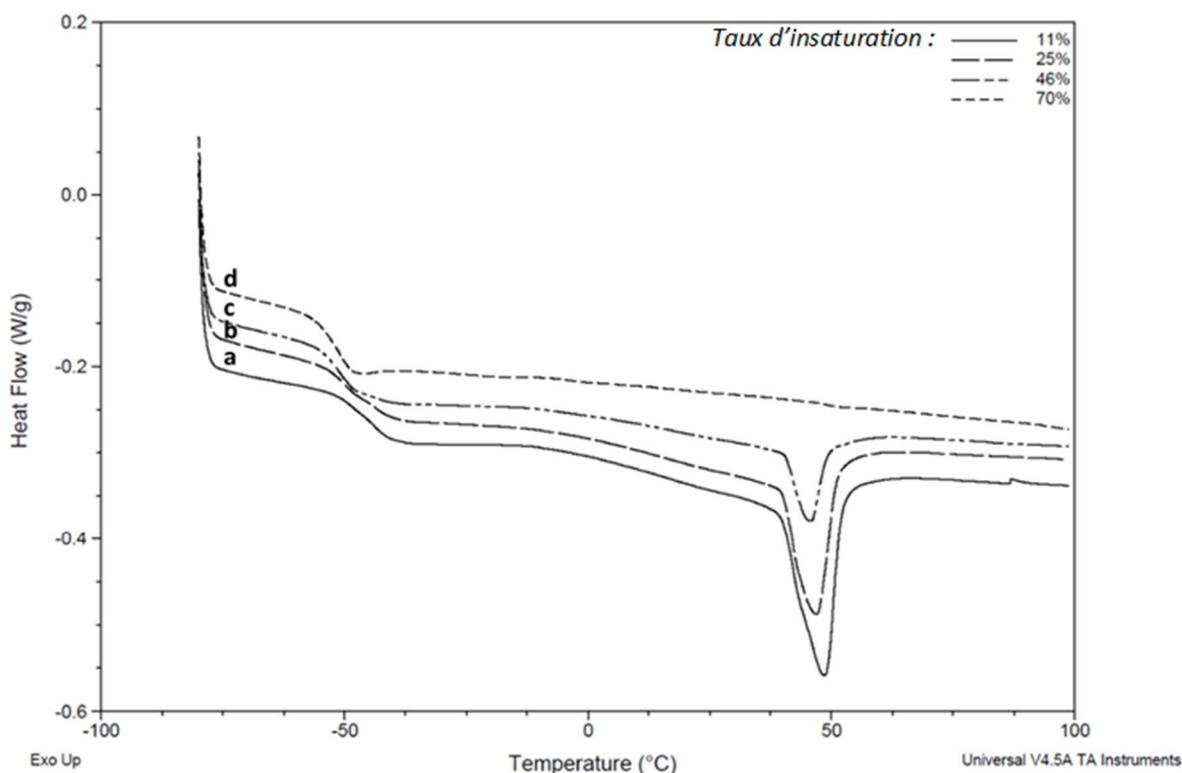


Figure II.13 : Courbes AED de PHA_{MCL} insaturés produits par la souche TE9 à partir d'un mélange d'huile de coprah (5 g.L⁻¹) et différentes concentrations d'acide 10-undécénoïque (0,2 g/L : a), (0,5 g/L : b), (0,8 g/L : c), (1 g/L : d).

Concernant les PHA produits à partir d'un mélange **d'octanoate de sodium** et d'acide 10-undécénoïque, les valeurs de Tg sont nettement supérieures à celles obtenues à partir de coprah dans les mêmes conditions de concentration d'acide 10-undécénoïque : la Tg est de -39°C pour un PHA produit à partir de la souche RA26 sur octanoate de sodium contre -45°C pour un polymère produit à partir d'huile de coprah à des taux d'insaturation proches de 12,6% et 15,8%. Les valeurs de Tm sont par contre un peu plus élevées : 53,3°C en moyenne pour les polymères produits à partir d'octanoate de sodium.

Pour certains PHA dont le taux d'insaturation est élevé (70%), il n'a pas pu être déterminé de température de fusion ni d'enthalpie de fusion qui peut s'expliquer par un caractère très amorphe du polymère à température ambiante.

Les PHA produits en bioréacteur de volume 14L et 18L (en vert dans le tableau II.4 page 103) présentent des propriétés thermiques du même ordre que ceux précédemment obtenus

dans des conditions de cultures similaires en volumes plus faibles. Ainsi, les productions en bioréacteur de 14L et 18L réalisées avec la souche TE9 ont donné des PHA_{MCL} aux Tg comprises entre -45,8°C et -46,2°C, des Tm comprises entre 46,3°C et 49,2°C et des enthalpies de fusion de 8 J/g à 9,7 J/g. La production réalisée avec la souche NC532 en présence de 0,35 g/L d'acide 10-undécénoïque a permis d'obtenir un PHA_{MCL} dont la Tg est -46,4°C, la Tm 52,7°C et une enthalpie de fusion de 10,8 J/g.

Dans la littérature³⁷, une tendance similaire a été observée pour des polymères de PHOU au taux d'insaturation variable de 5% à 94%. Le PHOU le plus faiblement insaturé (5%) a présenté une Tg de -35°C, une Tm de 59°C et une enthalpie de fusion de 20J/g. une diminution de ces valeurs concomitante avec l'augmentation du taux d'insaturation. Ainsi, le PHOU le plus fortement insaturé (94%) présentait une Tg plus faible à -50°C, une Tm ainsi qu'une enthalpie de fusion non détectable.

Le taux d'insaturation des PHA a donc une influence sur leurs propriétés thermiques, en particulier sur l'enthalpie de fusion qui décroît fortement voire devient non détectable lorsque le taux d'insaturation atteint 70%, permettant de caractériser une forme totalement amorphe du polymère.

II.4 Conclusion

Ce deuxième chapitre rend compte de la mise en culture de souches bactériennes issues de la biodiversité bactérienne marine de Polynésie Française et de Nouvelle Calédonie (Collection Ifremer / IPNC) pour la production de PHA_{MCL} aptes à la post-fonctionnalisation. Pour cela, les bactéries ont été placées en culture en milieu liquide en présence de différents substrats carbonés, seuls ou en mélange, en concentrations variables afin d'optimiser les rendements de production. Il s'est avéré que les souches RA26 (*Pseudomonas guezennei*), TE9 (*Pseudomonas ragueensis*) et NC532 sont des candidates intéressantes pour la production de PHA_{MCL} insaturés notamment à partir d'un mélange d'huile de coprah et d'acide 10-undécènoïque. Ainsi, des rendements de production de PHA allant jusqu'à 38% ont pu être obtenus avec la souche TE9. Les PHA ont été caractérisés par RMN et FTIR-ATR pour la structure chimique, par CGSM pour la composition monomérique et la localisation des doubles liaisons, par AED pour l'analyse des propriétés thermiques et par SEC pour la détermination de la masse molaire. L'ensemble de ce travail de caractérisation a mis en évidence la nature des PHA à moyennes chaînes et a révélé que la concentration en acide 10-undécènoïque dans le milieu de production influence directement le taux d'insaturation du polymère, permettant ainsi d'anticiper sa structure par l'ajustement des conditions de fermentation. Il a ainsi été montré que les PHA présentent des poids moléculaires élevés (en moyenne 150 000 g/mol), sont composés majoritairement de monomères saturés de 3HO et 3HD et de monomères insaturés de 3HN:1Δ8 et 3HUD:1Δ10 et présentent un caractère faiblement cristallin ($T_g \approx -46^\circ\text{C}$ et $T_m \approx 46^\circ\text{C}$).

L'ensemble des expériences d'optimisation en bioréacteur 3,5L nous a permis de transférer la production des PHA_{MCL} à l'échelle supérieure (14L et 18L) en conservant le taux d'insaturation et la composition monomérique du PHA. Ce travail d'optimisation constitue donc une première étape et devrait permettre le transfert à une échelle de production semi-industrielle.

A l'issue de cette première partie de thèse, deux échantillons de PHA_{MCL} présentant un taux d'insaturation de 25,6% et 28,8% ont été produits avec la souche TE9 en quantité suffisante et retenus pour la réalisation des expériences de fonctionnalisation visant à

élaborer de nouveaux biomatériaux visibles en IRM qui seront présentés dans les chapitres suivants.

II.5 Références bibliographiques

1. Meng, D.-C., Shen, R., Yao, H., Chen, J.-C., Wu, Q., Chen, G.-Q. Engineering the diversity of polyesters. *Curr. Opin. Biotechnol.* **29**, 24–33 (2014).
2. Levine, A. C., Heberlig, G. W. & Nomura, C. T. Use of thiol-ene click chemistry to modify mechanical and thermal properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Int. J. Biol. Macromol.* **83**, 358–365 (2016).
3. Bian, Y.-Z., Wang, Y., Aibaidoula, G., Chen, G.-Q. & Wu, Q. Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* **30**, 217–225 (2009).
4. Tortajada, M., da Silva, L. F. & Prieto, M. A. Second-generation functionalized medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: the gateway to high-value bioplastic applications. *Int Microbiol* **16**, 1–15 (2013).
5. Le Fer, G., Babinot, J., Versace, D.-L., Langlois, V. & Renard, E. An Efficient Thiol-Ene Chemistry for the Preparation of Amphiphilic PHA-Based Graft Copolymers. *Macromol. Rapid Commun.* **33**, 2041–2045 (2012).
6. Chanprateep, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 621–632 (2010).
7. Simon-Colin, C., Alain, K., Colin, S., Cozien, J., Costa, B., Guezennec, J.G., Raguénès, G. A novel mcl PHA-producing bacterium, *Pseudomonas guezenei* sp. nov., isolated from a ‘kopara’ mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. *J. Appl. Microbiol.* **0**, 581–586 (2007).
8. Simon-Colin, C., Alain, K., Raguénès, G., Schmitt, S., Kervarec, N., Gouin, C., Crassous, P., Costa, B., Guezennec, J.G. Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl PHAs) from cosmetic co-products by *Pseudomonas raguenesii* sp. nov., isolated from Tetiaroa, French Polynesia. *Bioresour. Technol.* **100**, 6033–6039 (2009).
9. Simon-Colin, C., Gouin, C., Lemeckko, P., Kervarec, N. & Guezennec, J. Development of a three-steps derivatization assay for the localization of double bond in monounsaturated monomers of poly-beta-hydroxyalkanoates by GC–MS. *J. Chromatogr. B* **900**, 64–70 (2012).
10. Simon-Colin, C., Gouin, C., Lemeckko, P., Schmitt, S., Senant, A., Kervarec, N., Guezennec, J. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenei* from alkanooates and glucose. *Int. J. Biol. Macromol.* **51**, 1063–1069 (2012).
11. Lee, E. Y. & Choi, C. Y. Gas chromatography-mass spectrometric analysis and its application to a screening procedure for novel bacterial polyhydroxyalkanoic acids containing long chain saturated and unsaturated monomers. *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 408–414 (1995).
12. Johnson, D. W. & Trinh, M.-U. Analysis of isomeric long-chain hydroxy fatty acids by tandem mass spectrometry: application to the diagnosis of long-chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase deficiency. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 171–175 (2003).
13. Scribe, Pierre., Guezennec, Jean., Dagaut, Jacques., Pepe, Claude. & Saliot, Alain. Identification of the position and the stereochemistry of the double bond in monounsaturated fatty acid methyl esters by gas chromatography/mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.* **60**, 928–931 (1988).
14. Grage, K., Jahns, A.C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A. & Rehm, B.H.A. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-

- /Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **10**, 660–669 (2009).
15. Tan, I. K. P.; Kumar, K. S.; Theanmalar, M.; Gan, S. N.; Gordon III., B. Saponified Palm Kernel Oil and Its Major Free Fatty Acids as Carbon Substrates for the Production of Polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas Putida* PGA1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997, **47** (3), 207–211.
 16. Hazer, B., Hazer, D. B. & Çoban, B. Synthesis of microbial elastomers based on soybean oil. Autoxidation kinetics, thermal and mechanical properties. *J. Polym. Res.* **17**, 567–577 (2010).
 17. Ishak, K. A. & Annuar, M. S. M. Facile Formation of Medium-Chain-Length Poly-3-Hydroxyalkanoates (mcl-PHA)-Incorporated Nanoparticle Using Combination of Non-Ionic Surfactants. *J. Surfactants Deterg.* **20**, 341–353 (2017).
 18. Chan Sin, M., Gan, S. N., Mohd Annuar, M. S. & Ping Tan, I. K. Thermodegradation of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from oleic acid. *Polym. Degrad. Stab.* **95**, 2334–2342 (2010).
 19. Bassas, M., Diaz, J., Rodriguez, E., Espuny, M.J., Prieto, M.J. & Manresa, A. Microscopic examination in vivo and in vitro of natural and cross-linked polyunsaturated mclPHA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 587–596 (2008).
 20. Galego, N., Rozsa, C., Sanchez, R., Fung, J., Vazquez, A., Tomas, J.S. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. *Polym. Test.* **19**, 485–492 (2000).
 21. Sathiyarayanan, G., Bhatia, S.K., Song, H-S., Jeon, J-M., Kim, J., Lee, Y.K., Kim, Y-G. & Yang, Y-H. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer from Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. PAMC 28620. *Int. J. Biol. Macromol.* **97**, 710–720 (2017).
 22. Simon-Colin, C., Raguénès, G., Costa, B. & Guezennec, J. Biosynthesis of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenneci* from various carbon sources. *React. Funct. Polym.* **68**, 1534–1541 (2008).
 23. Randriamahefa, S., Renard, E., Guérin, P. & Langlois, V. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Screening and Quantifying Production of PHAs by *Pseudomonas* Grown on Sodium Octanoate. *Biomacromolecules* **4**, 1092–1097 (2003).
 24. Kim, Y. B., Rhee, Y.-H., Lenz, R. W. & Fuller, R. C. Poly(3-hydroxyalkanoate)s Produced by *Pseudomonas oleovorans* Grown by Feeding Nonanoic and 10-Undecenoic Acids in Sequence. *Polym. J.* **29**, 894–898 (1997).
 25. Sun, Z., Ramsay, J. A., Guay, M. & Ramsay, B. A. Fed-batch production of unsaturated medium-chain-length polyhydroxyalkanoates with controlled composition by *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 657–662 (2009).
 26. Sun, Z., Ramsay, J. A., Guay, M. & Ramsay, B. A. Fed-batch production of unsaturated medium-chain-length polyhydroxyalkanoates with controlled composition by *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 657–662 (2009).
 27. Ashby, R. D., Solaiman, D. K. Y. & Foglia, T. A. Synthesis of Short-/Medium-Chain-Length Poly(hydroxyalkanoate) Blends by Mixed Culture Fermentation of Glycerol[†]. *Biomacromolecules* **6**, 2106–2112 (2005).

28. Ashby, R., Solaiman, D. & Foglia, T. The synthesis of short- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose- or alkanolic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 147–153 (2002).
29. Lageveen, R. G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., Witholt, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2924–2932 (1988).
30. Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. & Fuller', R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(P-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *APPL Env. MICROBIOL* **54**, 6 (1988).
31. Steinbüchel, A. & Lütke-Eversloh, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem. Eng. J.* **16**, 81–96 (2003).
32. Lageveen, R. G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., Witholt, B. Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2924–2932 (1988).
33. Dawes, E. A. *Novel Biodegradable Microbial Polymers*. (1990).
34. Sudesh, K., Abe, H. & Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **10**, 1503–1555 (2000).
35. Martínez, V., Herencias, C., Jurkevitch, E. & Prieto, M. A. Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: The case of the polyhydroxyalkanoates. *Sci. Rep.* **6**, 24381 (2016).
36. Witholt, B. & Kessler, B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 279–285 (1999).
37. Park, W. H.; Lenz, R. W.; Goodwin, S. Epoxidation of Bacterial Polyesters with Unsaturated Side Chains. I. Production and Epoxidation of Polyesters from 10-Undecenoic Acid. *Macromolecules* **1998**, 31 (5), 1480–1486..

CHAPITRE III :

NANOCAPSULES DE POLY(3-HYDROXYALCANOATE) AMPHIPHILES ET PERFLUOREES POUR L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE ^{19}F

Présentation de l'article

Dans le chapitre précédent, nous avons produit un PHA_{MCL} insaturé à partir d'une bactérie marine, *Pseudomonas ragenesii*, cultivée sur un mélange d'huile de coprah et d'acide 10-undécénoïque. La présence de fonctions alcènes en position terminale des chaînes latérales de PHA permet donc d'envisager une fonctionnalisation finement contrôlée grâce à l'efficacité de l'addition thiol-ène.

Dans cet article, nous cherchons à élaborer des nanoparticules visibles par IRM ¹⁹F. Pour cela, des nanocapsules fluorées et PEGylées à base de PHA contenant un noyau liquide de bromure de perfluorooctyle (PFOB) ont été formulées par un processus d'émulsion-évaporation. Les groupements perfluorés permettent de favoriser les interactions avec le PFOB, et d'autre part, Le poly(éthylène glycol) (PEG) permet d'améliorer l'hydrophilie et d'échapper aux cellules phagocytaires du système immunitaire. Le PHA fluoré amphiphile, PHA-g-(F ; PEG), a été préparé par deux réactions d'addition thiol-ène contrôlées successives. Trois thiols ayant des longueurs de chaînes fluorées variables ont été greffées : le trifluoropropanethiol (CF₃), le perfluorooctanethiol (C₆F₁₃) et le perfluorodécaneethiol (C₈F₁₇). Le PEG-SH d'une masse molaire de 550 g/mol a d'abord été synthétisé puis greffé sur le PHA fluoré. Les nanocapsules PFOB à base de PHA-g-(F ; PEG) ainsi produites, d'un diamètre proche de 250-300 nm s'avèrent visibles en imagerie par résonance magnétique du fluor ¹⁹F avec un temps d'acquisition de 15 min, ce qui est prometteur pour envisager une application clinique ultérieure. Ces nanocapsules à base de PHA-g-(F ; PEG) constituent une nouvelle génération de nanovecteurs thérapeutiques biocompatibles très prometteuses pour des applications comme agents de contraste innovants pour l'IRM.

Amphiphilic and Perfluorinated Poly(3-Hydroxyalkanoate) Nanocapsules for ^{19}F Magnetic Resonance Imaging

Bioengineering 2021, 8, 121.

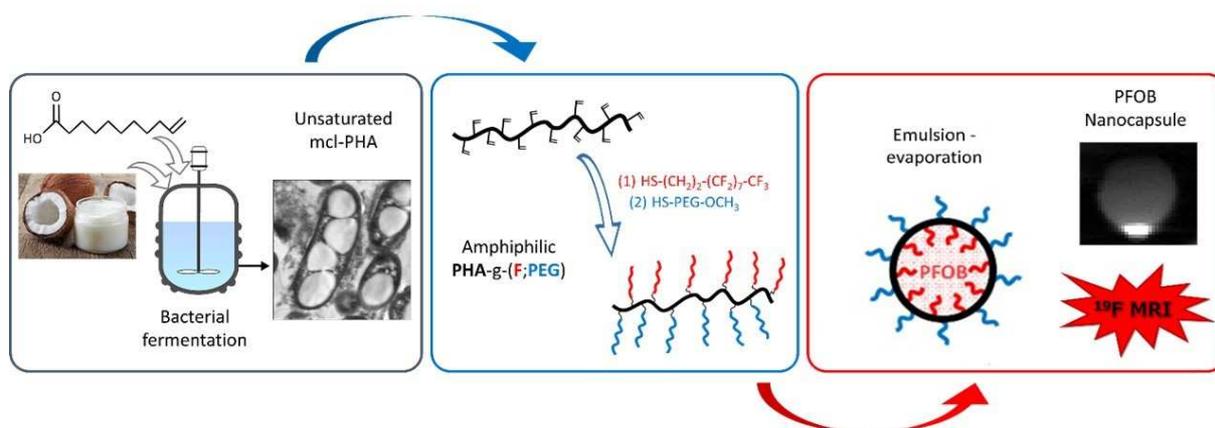
DOI : 10.3390/bioengineering8090121

Marion LE GAL,^{1,2} Estelle RENARD¹, Christelle SIMON-COLIN,² Benoit LARRAT,³ Valérie LANGLOIS¹

¹ Univ Paris Est Creteil, CNRS, ICMPE, F-94010 Creteil, France

² Univ Brest, CNRS, IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes
29280 Plouzané, France

³ Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, NeuroSpin, Gif-sur-Yvette, 91191, France



III.1 Abstract

Nanoparticles have recently emerged as valuable tools in biomedical imaging techniques. Here PEGylated and fluorinated nanocapsules based on poly(3-hydroxyalkanoate) containing a liquid core of perfluorooctyl bromide PFOB were formulated by an emulsion-evaporation process as potential ^{19}F MRI imaging agents. Unsaturated poly(hydroxyalkanoate), PHAU, was produced by marine bacteria using coprah oil and undecenoic acid as substrates. PHA-g-(F; PEG) was prepared by two successive controlled thiol-ene reactions from PHAU with firstly three fluorinated thiols having from 3 up to 17 fluorine atoms and secondly with PEG-SH. The resulting PHA-g-(F; PEG)-based PFOB nanocapsules, with a diameter close to 250–300 nm, are shown to be visible in ^{19}F MRI with an acquisition time of 15 min. The results showed that PFOB-nanocapsules based on PHA-g-(F; PEG) have the potential to be used as novel contrast agents for ^{19}F MRI.

III.2 Introduction

^{19}F magnetic resonance imaging (MRI) has considerably developed since recent years in clinical practice^{1–4}. The most frequently used contrast agents are liquid perfluorocarbons, such as perfluoro-15-crown-5-ether, perfluorooctyl bromide (PFOB) (17 fluorine atoms) and perfluoropolyethers (PFPE)^{5–7}. These molecules have intrinsic physico-chemical and biological properties that are particularly well suited for *in vivo* applications, such as non-toxicity and biological and chemical inertness^{8–11}. Due to their hydrophobic and lipophobic character, they are formulated with surfactants or encapsulated into polymer particles^{12,13}. Thus, several surfactants have been studied to ensure capsule formation with a PLGA polymer shell and a PFOB liquid core such as polyvinyl alcohol and sodium cholate¹⁴. Systemic administration of these systems requires coatings to prevent uptake by macrophages. For this, different strategies have been developed including surface coating with polysaccharides or polyethylene glycol PEG chains¹⁵. PEGylated polyester nanocapsules have been shown to be of interest for MRI and their long circulating properties and capacity to diagnose tumors have been demonstrated *in vivo*^{15,16}. Fluorinated copolymers containing fluorinated units based on

acrylic acid derivatives as 2,2,2-trifluoroethylacrylate²⁰, 2,2,2-trifluoroethyl methacrylate^{21,22}, poly[N-(2,2-difluoroethyl) acrylamide]²³ or octafluoropentyl methacrylate²⁴ were synthesized. Although a high density of fluorine atoms is required to be MRI visible²⁵⁻²⁷, it may lead to an aggregation in aqueous medium because of the hydrophobic character of the fluorinated groups. Moreover, Houvenagel et al. showed that the presence of fluorinated groups into the polymer itself considerably improves the encapsulation rate of PFOB inside the nanoparticles compared to the native polymer²⁸. In order to increase their solubility in water, hydrophilic blocks were added. Fluoro-copolymers exhibit self-assembly properties²⁸⁻³¹, which rely on the ability of fluorinated molecules to assemble into a fluorinated phase that is both hydrophobic and lipophobic³²⁻³⁴.

In this context, we propose to design a novel polymeric amphiphilic probe suitable for ¹⁹F MRI that possesses both high fluorine atom content, adequate water solubility and reliable biodegradability property. Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) are natural polyesters produced and accumulated by many bacteria as carbon and energy supply when essential nutrients are limited³⁵⁻³⁷. Biomaterials based on PHAs have been recently developed for medical or pharmaceutical applications such as tissue engineering, implants or drug delivery carriers due to their proven biodegradability, biocompatibility and lack of toxicity³⁸⁻⁴¹. The combinations of the hydrophobic character of PHA and hydrophilic PEG were used to prepare amphiphilic block and grafted copolymers⁴². The grafting reactions are mainly realized on unsaturated PHAs. The most common unsaturated PHA obtained by fermentation⁴³ in presence of undecenoic acid is the poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyundecenoate) which contains terminal alkene groups in the side chains. Water soluble poly(3-hydroxyalkanoate) containing ionic groups was recently designed by two successive photo-activated thiol-ene reactions in presence of sodium-3-mercapto-1-ethanesulfonate and PEG methyl ether thiol to both introduce ionic groups and hydrophilic blocks⁴⁴. Babinot previously developed multicompartiment micelles (MCMs) based on grafted PHAs. Thiol-ene addition is used to graft sequentially perfluorooctyl chains and PEG oligomers onto poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyundecenoate) oligomers⁴⁵.

Herein, we report on the design of amphiphilic fluorinated PHA using a straightforward methodology starting from a novel unsaturated mcl-PHA, (PHAU). PHAU, produced by marine bacteria *Pseudomonas ruginosa*, is a statistical copolymer bearing pendant hydrophobic

unsaturated chains. Our strategy relies on a stepwise use of the thiol-ene addition to graft perfluorinated chains containing from 3 to 17 fluorine atoms and hydrophilic poly(ethylene glycol) (PEG) chains onto PHAU unsaturated side chains. Nanocapsules containing a liquid core of perfluorooctyl bromide (PFOB) were prepared by an emulsion-evaporation process and designed as contrast agents for ^{19}F MRI.

III.3 Materials and methods

III.3.1 Materials

Chloroform (CHCl_3), methanol (MeOH) and dichloromethane (CH_2Cl_2) were obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Dialysis membranes (MWCO 1 and 6–8 kDa) were procured from Spectrumlabs. Polyethylene glycol 550 monomethyl ether and 4-toluenesulfonyl chloride (TsCl) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland), potassium thioacetate and 4-dimethylamino pyridine (DMAP) were purchased from Sigma Aldrich (Burlington, MA, United States). Perfluorodecan-1-thiol was purchased from ELF-Atochem (Colombes, France), perfluorooctan-1-thiol and perfluorooctyl bromide from Sigma Aldrich (Burlington, MA, United States) and trifluoropropan-1-thiol from Fluorochem (Glossop, United Kingdom).

III.3.2 PHA₍₇₂₎U₍₂₈₎ biosynthesis

Pseudomonas raguesii sp. nov. (strain CNCM I-4063 in the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, Paris, France)⁴⁶ was cultivated in a two-steps batch cultivation process. In the first step, the cells were inoculated at 10% (v/v) with a suspension of cells in exponential phase and grown in 5L Erlenmeyer flasks containing 2 L of marine broth medium (for 1 liter : 5g peptone, 1g yeast extract, 20g Sea Salts, pH 7.6) in an incubator at 34°C, 160 rpm. After the cultivation for 8 h, cells were harvested by centrifugation (7000 rpm, 15min), and transferred into 30 L fermenter containing 18 L nitrogen free medium (15 g.L⁻¹ sea salts) enriched with a mixture of coprah oil (5 g.L⁻¹) and 10-undecenoic acid (0.6

g.L⁻¹). Culture was incubated at 34°C, pH is adjusted at 7.6 throughout the fermentation process by automatic addition of 1M NaOH or 1M H₂SO₄ and the oxygenation is ensured by a light air flow. Following cultivation for 72 h, cells were harvested by centrifugation (7000 rpm for 15 min), and the pellets lyophilized prior to PHA extraction. Pellets of freeze-dried cells were ground with a mortar and pestle, the resulting powder was extracted with chloroform for 4 h at 50 °C. The PHA-containing chloroform phase was washed once with water and concentrated. The organic phase was evaporated to dryness, and purified PHA were obtained by repeated precipitations in 10 volumes of cold methanol.

III.3.3 PEG-SH synthesis

PEG-SH was synthesized according to a method described elsewhere⁴¹ carried out in three steps. Tosylation of PEG₅₅₀ was carried out by mixing 30 g of MeO-PEG₅₅₀ (54.5 mmol) and 33 mg of 4-dimethylamino pyridine (DMAP) (2.7 mmol) dissolved in 160 mL of CH₂Cl₂ / pyridine (1: 1) solution at 0°C under argon atmosphere. 18.7 g of 4-toluenesulfonyl chloride (TsCl) (98.1 mmol) are dissolved in 50 mL of CH₂Cl₂ and added dropwise and the solution is stirred overnight until brought back at RT. 200 mL of cold water are added and the aqueous phase is extracted 3 times with 150 mL of CH₂Cl₂. The accumulated organic phases are washed successively with 3 x 250 mL of a 1M HCl solution and 3 x 250 mL of a saturated NaCl solution. The solution obtained is dried over MgSO₄ and then concentrated under reduced pressure to obtain 37.2 g of product (PEG₅₅₀-OTs). To carry out the synthesis of PEG₅₅₀-thioacetate, 37.2 g of PEG₅₅₀-OTs (53 mmol) is dissolved in 200 mL of THF under argon. 11.6 g of potassium thioacetate (102 mmol) is added and the solution is refluxed for 20 h, inducing the formation of a white precipitate. After returning to RT, 400mL of water are added. Contents of the flask are extracted with 3 x 150 mL of CH₂Cl₂ and the organic phase is washed with 3 x 200 mL of water, treated with activated carbon, filtered and evaporated until an oil is obtained (15.3 g, yield 36%).

To obtain the final PEG₅₅₀-SH, 15.3 g of PEG₅₅₀-thioacetate (25 mmol) is dissolved in 200 mL of anhydrous MeOH under argon. 15 mL of 37% HCl are added and the resulting solution is refluxed for 2 h. 200 mL of water are added and the solution is extracted with 3 x

150 mL of CH₂Cl₂. The combined organic phases are washed with 3 x 200 of water and 3 x 250 mL of NaCl solution, dried over MgSO₄ and filtered. The solution is evaporated until a PEG₅₅₀-SH oil is obtained (11 g, yield 77%).

III.3.4 Synthesis of PHAU-g-(F)

Then 200 mg of PHA₍₇₂₎U₍₂₈₎ ($1233 \times 105 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $3.54 \times 10^{-4} \text{ mol C=C}$), 29 mg of AIBN (0.5 neq, $1.77 \times 10^{-4} \text{ mol}$) and the necessary quantity of fluorinated thiol to obtain 0.8 neq corresponding to 135.8 mg of perfluorodecan-1-thiol ($480 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), 107.6 mg of perfluorooctyl mercaptan ($380 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), 37 mg of trifluoropropyl mercaptan ($130 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) were dissolved in 6 mL of anhydrous toluene under argon, and solutions were heated at 80 °C for 20 h. Toluene was rotary evaporated and ¹H NMR was conducted to determine the amount of fluorinated compounds grafted.

III.3.5 Synthesis of PHA-g-(F ; PEG)

Next, 200 mg of PHA previously grafted with fluorinated molecule, AIBN and PEG-SH were dissolved in 6 mL of anhydrous toluene under argon in the following proportions: for PHA₍₇₂₎C₈F₁₇₍₁₂₎PEG₍₁₆₎ 170 mg of PEG-SH, for PHA₍₇₂₎U₍₂₀₎C₆F₁₃₍₈₎ 230 mg of PEG-SH, and for PHA₍₇₂₎U₍₂₀₎CF₃₍₈₎ 242 mg of PEG-SH were added. Solutions was heated at 80°C for 20h. Toluene was rotary evaporated and grafted polymers were dissolved in 30 mL of acetone. Solutions were poured in 30 mL of water and resulting colloidal suspensions were transferred into dialysis tube (molecular weight cut off, 6-8 000 Da) and dialyzed against water for 3 days prior to lyophilization.

III.3.6 Polymer characterization

¹H, ¹⁹F and ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ or H₂O-D₂O (9:1) on a Bruker AV400 MHz. Size exclusion chromatography (SEC) experiments were determined in chloroform us-

ing Shimadzu (Kyoto, Japon) LC-10AD pump with two Shodex GPC K-805 L columns (5 μm Mixte-C) using two PL aquagel-OH 40–30 columns (8 μm Mixte-C), at a concentration of 10 mg/mL. A Wyatt Technology (Santa Barbara, United States) Optilab Rex interferometric refractometer was used as detector, and low polydispersity index polystyrene standards ($3 \times 10^4 \times 10^6$ g/mol) were used to calibrate the system. Graft-ing of fluorinated compounds was assessed by Raman spectroscopy using a Raman microscope LabRAMHR from Horiba Jobin Yvon (Longjumeau, France) equipped with a laser emitting at 633 nm. Water contact angle measurements were performed using the Drop Shape Analysis system on a Krüss goniometer (Villebon-sur-Yvette, France).

III.3.7 Preparation of nanoparticles

Nanoparticles of perfluorobromide (PFOB) were prepared by an emulsion evaporation process adapted from ¹³. Then, 30 mg of PHA-F-PEG were dissolved into 2 mL of methylene chloride with 30 μL of PFOB. Organic phases were vortexed in 10 mL of 1.5% sodium cholate (w/v) aqueous solution for 1min and then emulsified 1 min by sonication (Ultrasonic processor) at 20% of maximal power, over ice. Solvent was evaporated by magnetic stirring at room temperature for 3 h, at 300 rpm. Suspensions were purified to remove sodium cholate and putative non-encapsulated PFOB by ultracentrifugation for 45 min at 18 000 g at 4°C. Pellets were resuspended in distilled water at the desired concentration and supernatants were analyzed by ¹⁹F NMR to ensure absence of residual PFOB.

III.3.8 Nanoparticles characterization

Nanoparticles size and surface charge were measured by dynamic light scattering (DLS) and zeta potential (ZP) on a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, United Kingdom). Measurements were performed at 20 °C, at an angle of 173°. PHA-F-PEG nanoparticles morphology was investigated by transmission electron microscopy (Tecnai F20 microscope, FEI Company, Hillsboro, OR, USA). Samples were deposited on copper grids, dried at room temperature and then were colored with uracyl acetate (1 wt.%).

III.3.9 $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ MRI Imaging

Images of phantoms containing nanoparticles solutions were acquired on a 7-T small animal MRI scanner (Bruker, Ettlingen, Germany) using a double tuned, $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ coil at Neurospin (CEA, Saclay, France). Sample solutions (at $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were placed in 1 mL syringes, water and commercial PFOB were used as reference. Images were acquired by cross sections of the syringes containing solutions to be analyzed. ^1H MRI images were acquired for localisation of the samples and ^{19}F MRI images were acquired using a turbo sequence, (RARE factor = 64, TE = 23.3 ms, TR = 4550 ms, number of average = 100, FOV = 0.2×0.2 mm, slice thickness = 8 mm, measurement time = 15 min 10 s).

III.4 Results and discussion

III.4.1 PHAU production

The ability of *Pseudomonas ragenesii* to produce unsaturated PHA (PHAU) was tested using coprah oil ($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) that is a vegetable oil from coconut composed of more than 90% of saturated fatty acids, in mixture with 10-undecenoic acid ($0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) to induce PHAU production. After 72h of culture, cells are harvested by centrifugation and PHAU is extracted from these freeze-dried pellets. After extraction and purification, PHAU production has a yield of 17% (w/w). The molar mass is $123\ 000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ with polydispersity index of 1.8. The ^{13}C NMR spectrum of the polymer is shown in Figure III.1. (HSQC spectrum is provided in the Supplementary Material, Figure S1). Chemical shifts of the **C1** carbon (C=O) was detected at 169 ppm, that of **C2** at 39 ppm and **C3** at 71 ppm. **C4** carbon of the side chain methylene groups is detected at 33 ppm. The chemical shifts at 14 ppm correspond to the terminal methyl groups (CH_3) of the side chains and the chemical shifts observed between 22 ppm and 31 ppm correspond to the different methylene groups (CH_2) of the side chains. The presence of a double bond is confirmed by the presence of peaks at 114 ppm and 139 ppm corresponding respectively to the methylene ($=\text{CH}_2$) and methine ($=\text{CH}$ -) groups of the double

bond. The chemical shift at 34 ppm corresponds to the α -methylene groups of the double bond.

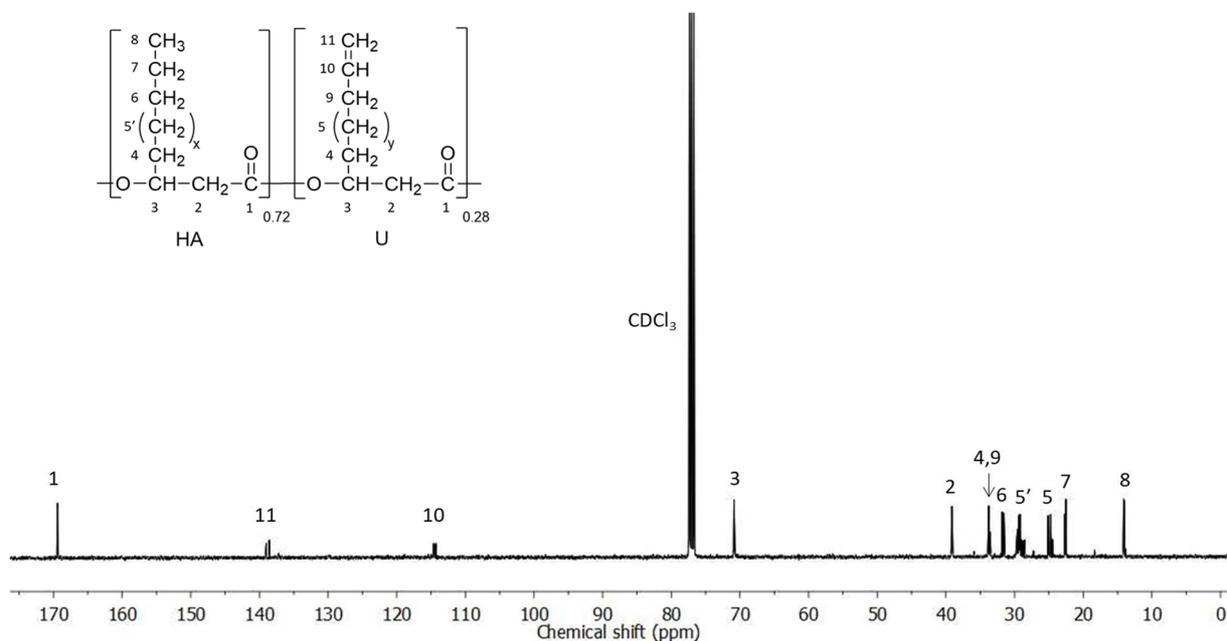


Figure III.1: ^{13}C NMR spectra of PHAU. ($x = 1$ or 3 or 5 ; $y = 2$ or 4)

III.4.2 PHA-*g*-(F; PEG) synthesis from PHAU

Our strategy is to incorporate perfluoroalkyl side chains in the PHAU to enhance its tendency to self-assemble through the formation of fluorophilic interactions between perfluorinated side chains. Moreover, PEG grafting onto PHAU was performed to generate stealth material against the immune systems. The interest in preparing these amphiphilic copolymers that are both covalently grafted by PEG and fluorinated groups is 2-fold. It allows both to increase the PFOB encapsulation and to avoid aggregation of the nanoparticles. The synthetic route to PHA-*g*-(F; PEG) is given in Figure III.2. Different fluorinated thiols were grafted on PHAU (Table III.1) in order to evaluate the importance of the length of the grafted moiety on the signal detected by MRI. The molar ratio of thiol was adjusted so as to functionalize only a part of the available double bonds because the other part will be further used to graft PEG on the side chains of PHAU.

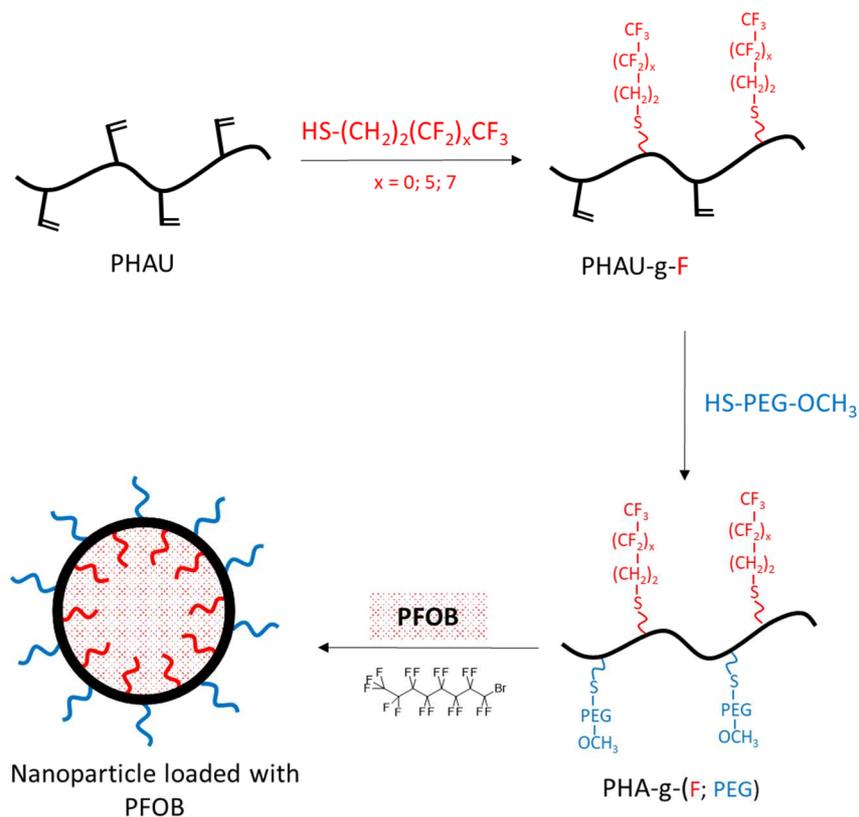


Figure III.2: The synthetic route for the production of PFOB loaded nanocapsules

Fluorinated thiol	Chemical structure	Abbreviation
Trifluoropropane-1-thiol		CF ₃
Perfluorooctane-1-thiol		C ₆ F ₁₃
Perfluorodecane-1-thiol		C ₈ F ₁₇

Table III.1: Chemical structures of the different perfluorinated thiols.

Raman spectrum (Figure III.3) of PHAU-*g*-(C₈F₁₇) clearly showed the presence of fluorinated groups by the appearance of characteristic bands at 735 et 765 cm⁻¹ assigned to symmetric CF₂ stretching and symmetrical vibration involving the trifluoromethyl group CF₃ respectively. The total disappearance of the band at 2580 cm⁻¹ assigned to the SH group of the

perfluorodecane-1-thiol showed that the thiol-ene reaction is quantitative. Moreover, the absence of the characteristic disulfide bond signal, usually observed around 500-550 cm^{-1} , confirms the correct grafting. The A value equal to the ratio of integration of the ester absorption band at 1749 cm^{-1} , characteristic of the ester in the PHAU backbone, and the double bond at 1644 cm^{-1} assigned to the unsaturated group was determined before and after the thiol-ene reaction. The results showed that 41% of the initial double bonds were involved during the thiol grafting that was in agreement with the results obtained by ^1H NMR.

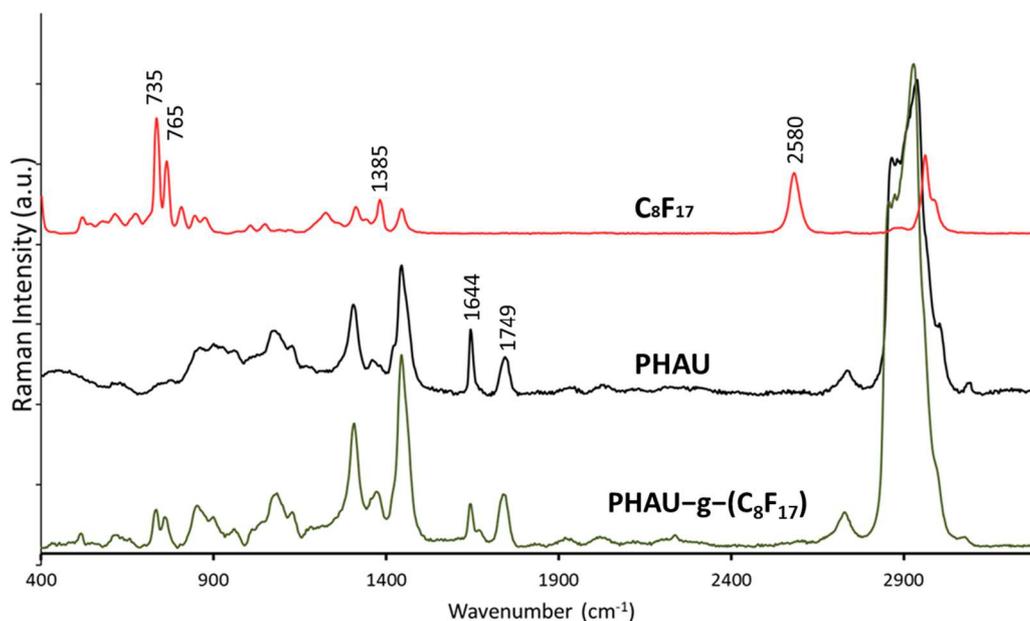


Figure III.3: Raman spectrum of C_8F_{17} , PHAU and PHAU-g- C_8F_{17}

Initial PHAU was characterized by ^1H NMR (Figure III.4) to determine the percentage of double bonds by integrating protons corresponding to the methine peak (**3**) at 5.2 ppm, and the signal relating to the terminal unsaturation group of side chain (**10**) at 5.7 ppm. PHAU is a statistical copolymer containing saturated and unsaturated side chains in the proportion 0.72/0.28 respectively. Perfluorodecane-1-thiol was grafted and the PHAU-g-(C_8F_{17}) was analyzed by ^1H NMR (^1H and ^{19}F spectra of copolymers are provided in the supplementary materials). Signals relating to the CH_2 methylene (**15**), characteristic of fluorinated groups, appeared at 2.8 ppm indicated the success of the grafting. The conversion percentages of the double bonds after grafting were calculated by comparing the integrations of the protons corresponding to the CH peak (**3**) of the PHAU at 5.2 ppm, with respect to the signal of terminal unsaturation side chain (**10**) at 5.7 ppm.

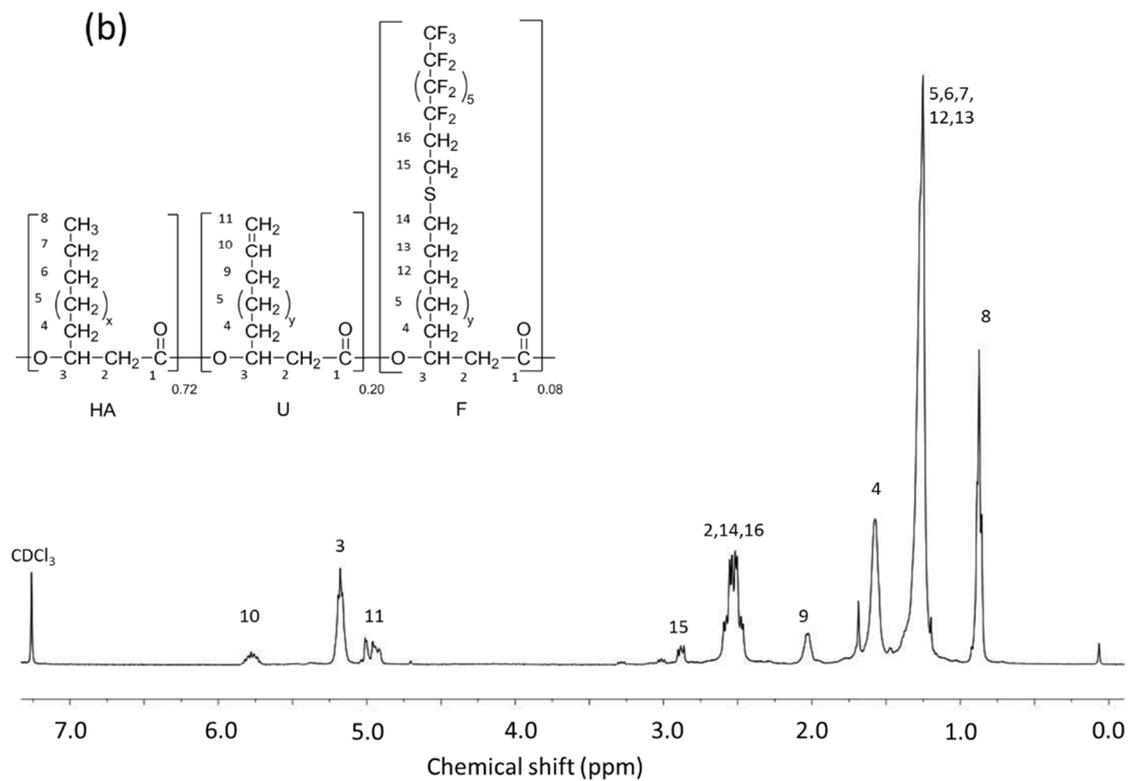
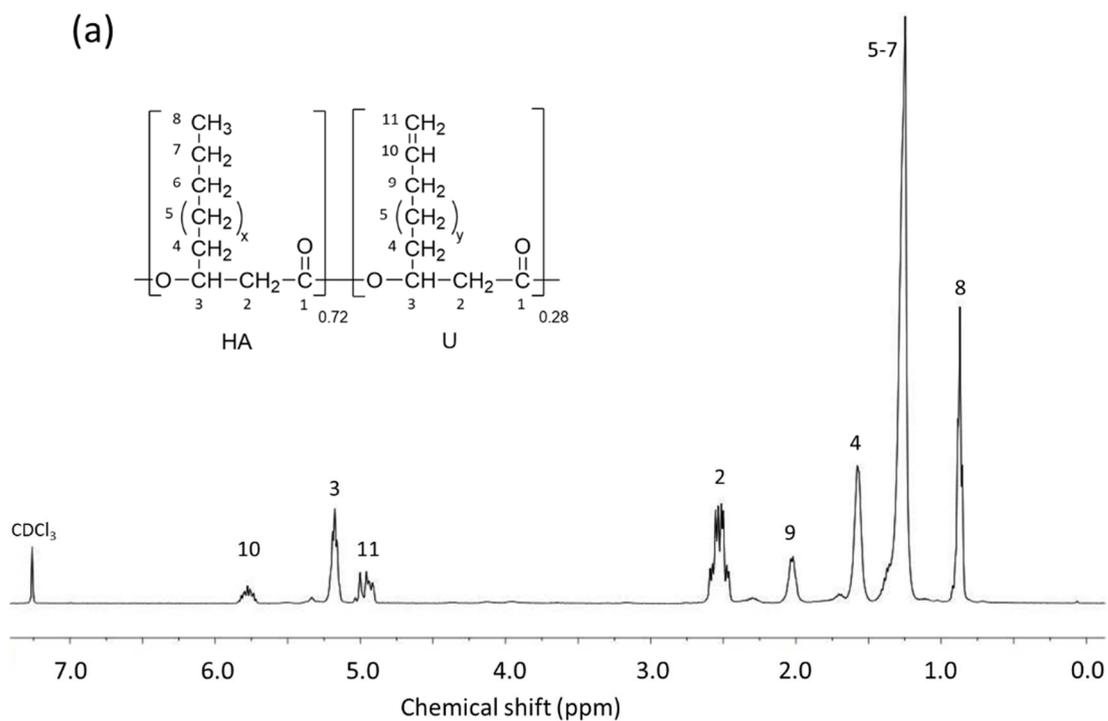


Figure III.4: ¹H NMR spectra in CDCl₃. (a) PHAU ; (b) PHAU-g-C₈F₁₇. (x: 1,3,5; y: 2,4)

PEG₅₅₀-SH was prepared in three steps according to a method described elsewhere⁴⁶ (Figure III.5). Thiolated PEG was characterized by ¹H NMR (Figure III.6a) and the presence of signals at 2.60 and 1.55 ppm attested that the reaction is quantitative. In a second step PEG methyl ether thiol was grafted using the thiol-ene reaction to prepare PHA-*g*-(C₈F₁₇; PEG). Two peaks are observed at 3.6 and 3.3 ppm that are assigned to the CH₂ (**19**, **20**) and CH₃ (**21**) methyl terminal groups of the PEG confirming the success of the grafting (Figure III.6.b). The total disappearance of the peaks at 5.7 ppm (**10**) and 4.9 ppm (**11**) showed that there is no more unsaturated groups in the PHA. The compositions of the different copolymers determined by NMR are listed in Table III.2.

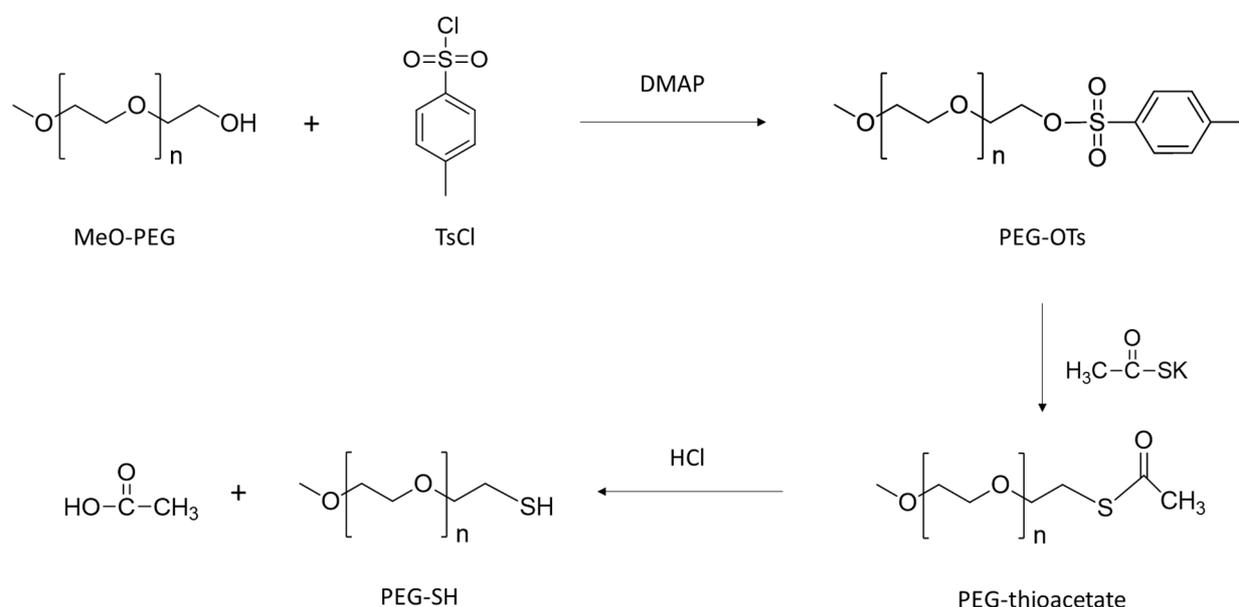


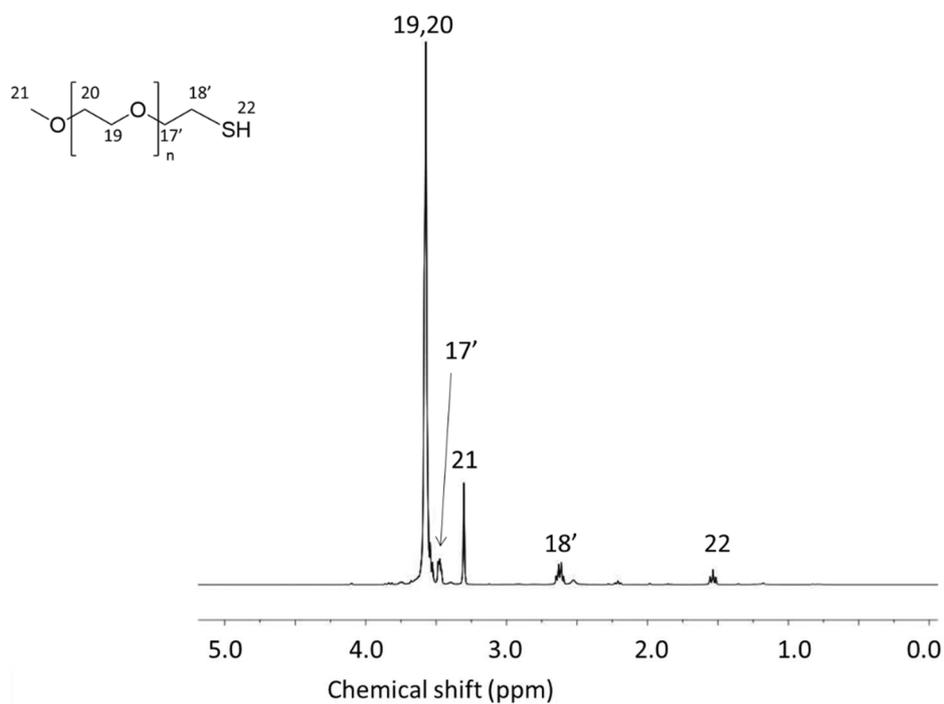
Figure III.5: Synthesis of PEG-SH

Table III.2: Water contact angles of the different copolymers

Copolymers	PEG (%) ¹	C8F17 (%) ¹	Contact angle (°)
PHAU	-	-	96.2
PHAU- <i>g</i> -(C ₈ F ₁₇)	-	8	132.5
PHA- <i>g</i> -(C ₈ F ₁₇ ; PEG)	20	8	106.3

1: determined by ¹H NMR

(a)



(b)

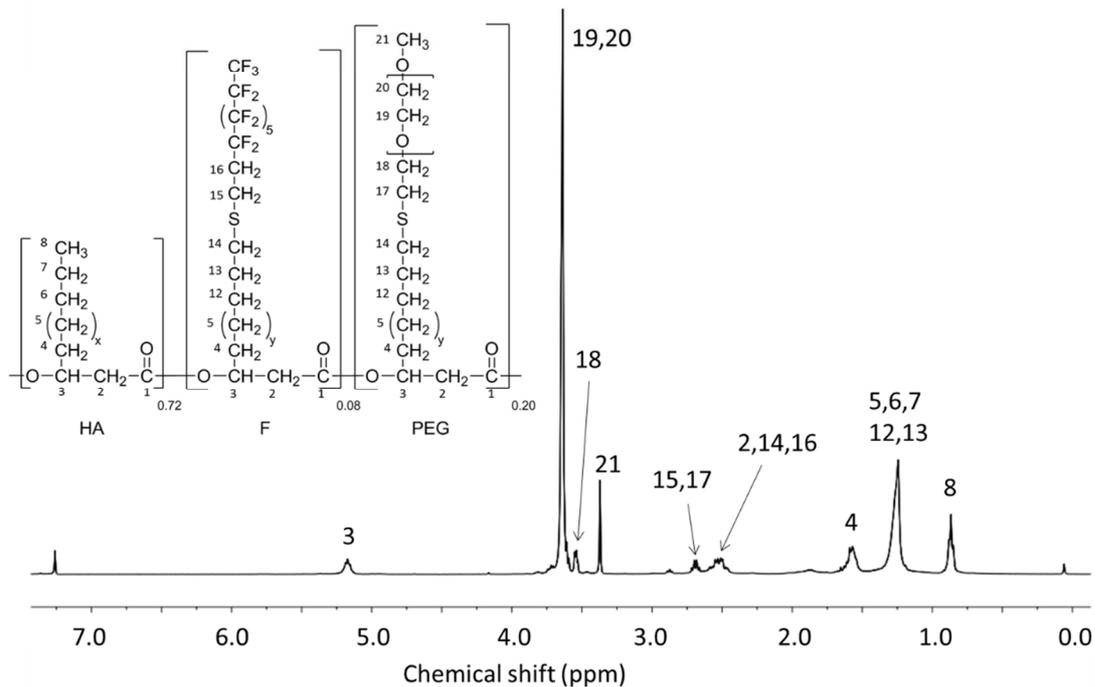


Figure III.6: ¹H NMR spectra in CDCl₃. (a) PEG₅₅₀-SH ; (b) PHA-g-(C₈F₁₇; PEG)

The water contact angle of solvent cast PHAU film was found to be 96.2° which was in agreement with literature, whereas the contact angle was about 132.5° for PHA₇₂U₂₀-g-(C₈F₁₇)₈. This difference can be explained by the presence of very hydrophobic fluorinated groups. The water contact angle decreased to 106.3° after PEG grafting but it remained higher than the value of the initial PHA, attesting to the global hydrophobic character of the copolymer.

III.4.3 Synthesis and characterization of the nanoparticles

PHAU-*g*-(F; PEG) nanoparticles with PFOB core were prepared by an emulsion evaporation method. In these conditions, the grafted copolymers will adopt a specific conformation in the aqueous medium. The perfluorinated side chains may orientate towards the PFOB core whereas the hydrophilic PEG grafts may orientate towards the aqueous medium. The ¹⁹F NMR spectrum of the nanocapsules reveals peaks consistent with the presence of three different containing sites in the fluorinated moieties. The peak at -65 ppm originates from CF₂ near the bromide atom, the one at -84 ppm from CF₃ fluorine and the peaks between -118 and -127 ppm from CF₂ fluorine of the PFOB. Although, the characteristic peaks of the PHAU-*g*-(F; PEG) were clearly distinguished on the spectrum of the copolymer alone, they were hidden by the PFOB ones (Figure III.7).

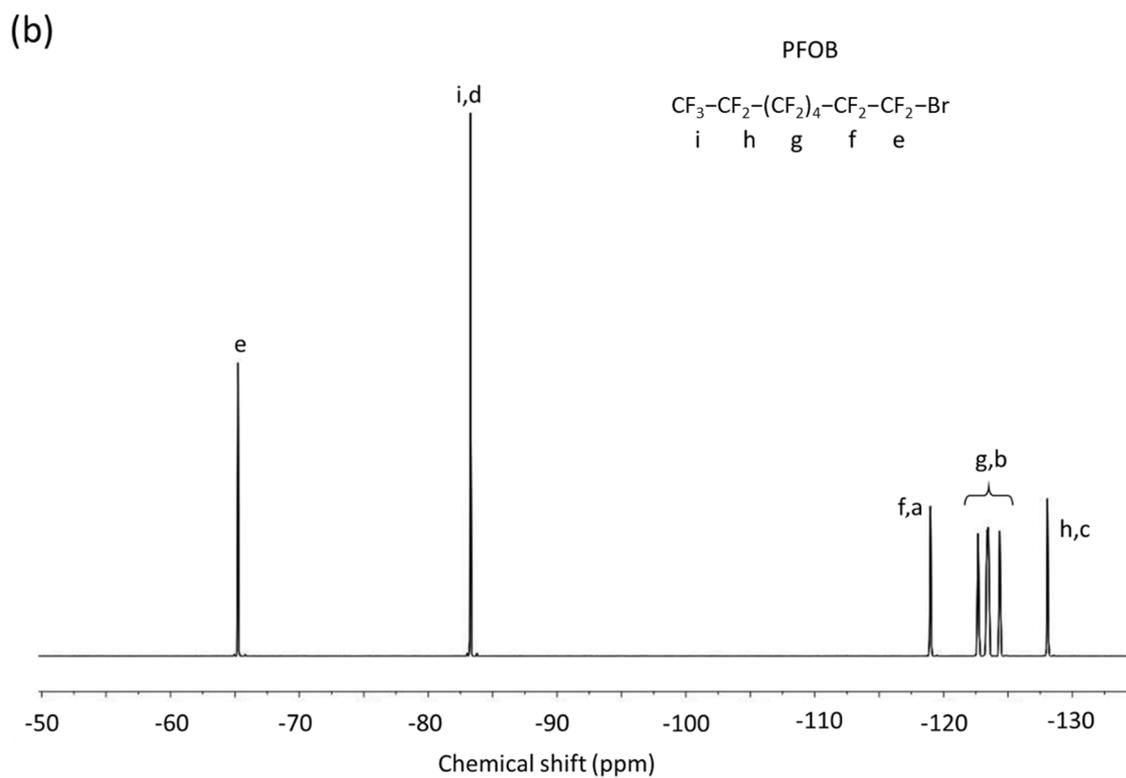
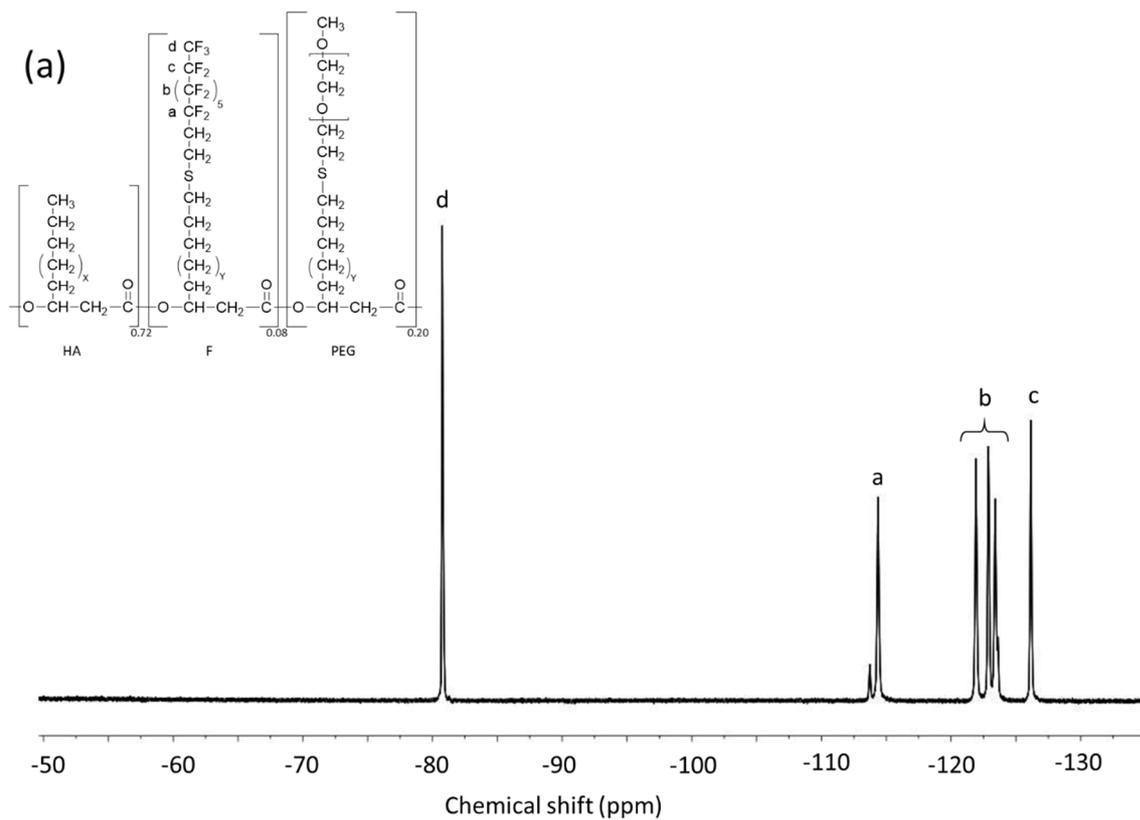
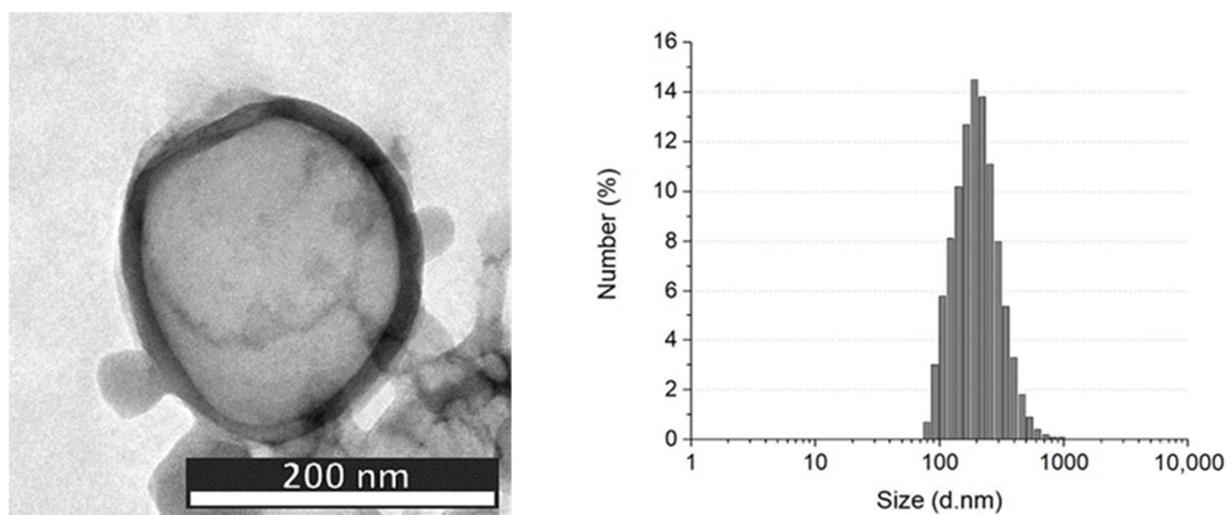


Figure III.7: ¹⁹F NMR spectra. (a) PHA-g-(C₈F₁₇; PEG) in CDCl₃; (b) Nanocapsules containing PFOB in H₂O-D₂O (9:1).

Negative staining improved the TEM image contrast and allowed the visualization of the inner core of PFOB in light gray whereas the polymeric shell seems darker, which confirms the core-shell structure (Figure III.8). Images show spherical objects with size in good agreement with the diameter measured by dynamic light scattering DLS. Smooth surfaces are observed for all particles. DLS measurements showed that the average size of PHA-*g*-(F; PEG) PFOB nanoparticles increased from 246 nm for the perfluorodecane graft to 294 nm for the trifluoropropane graft. The increase of the length of the fluorinated side chains certainly improves the interactions between these hydrophobic moieties. A wider distribution of sizes was also observed. All samples present very negative zeta potential regardless of the length of the perfluorinated groups, resulting in a very good stability in aqueous medium with a low tendency to aggregation⁴⁸.



Sample	Size (d. nm)	PDI	Zeta potential (mV)
PHA- <i>g</i> -(CF ₃ ;PEG)	294	0.22	-64 ± 8
PHA- <i>g</i> -(C ₆ F ₁₃ ;PEG)	260	0.15	-79 ± 10
PHA- <i>g</i> -(C ₈ F ₁₇ ;PEG)	246	0.16	-81 ± 9

Figure III.8: Characterization of nanocapsules by TEM and DLS

III.4.4 *In vitro* ^{19}F NMR

Phantom MRI studies were performed to evaluate *in vitro* the contrast properties of PFOB nanocapsules from different PHA-g-(F; PEG). These nanocapsules were dissolved in distilled water and different acquisition times were evaluated: 1 min 31 s, 15 min 10 s, 1 h 16 min and 10 h. It turns out that from 15 min 10 s, nanocapsules solutions are distinctly visible and as detectable as after 10 h of acquisition. This relatively short analysis time is very encouraging to consider a further clinical application even though fluorine concentration would probably be lower after an injection *in vivo*. The ^1H MRI and ^{19}F MRI images thus acquired in 15 min were presented in Figure III.9. A more intense signal is observed at the bottom of the images due to the nanocapsules sedimentation during the different acquisitions. One of the simple solutions to increase the visibility in MRI could be to increase the number of fluorine atoms per nanocapsule. Here, the number of F atoms varied from 3 to 17 per grafted fluorinated segment for the three imaged nanocapsules. The results obtained show that this is not a determining parameter because the particles are visible whatever the length of the grafted fluorinated segment. The CF_3 is volatile, which can appear as a disadvantage during the grafting reactions and therefore it would be preferable to use C_6F_{13} or C_8F_{17} . The preliminary results showed that these PFOB nanocapsules could be used as contrast agents for MRI.

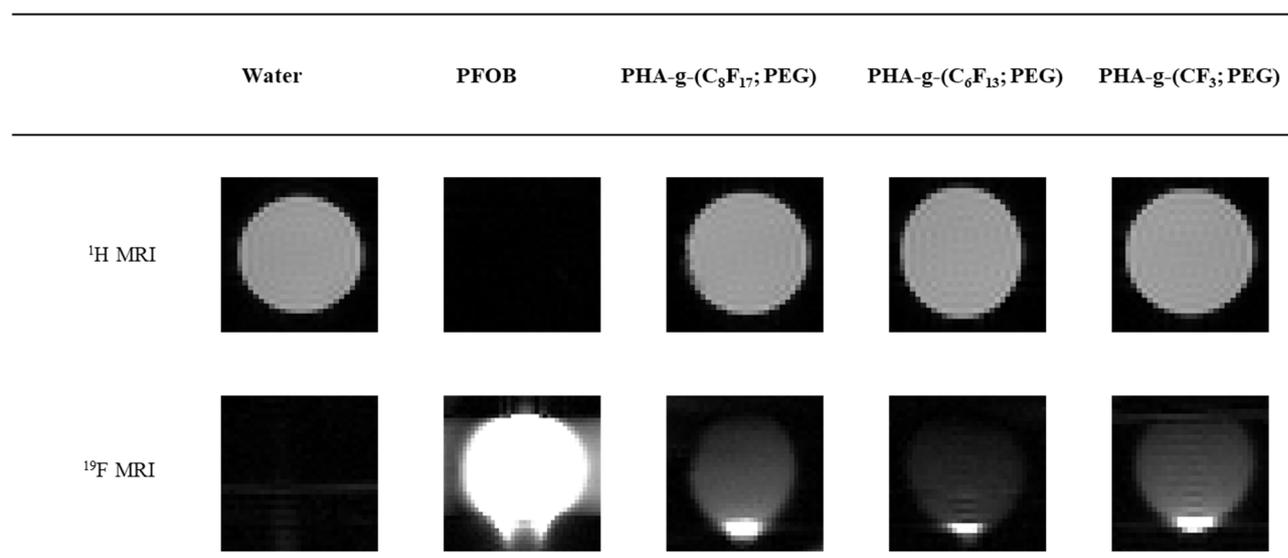


Figure III.9: *In vitro* ^1H MRI and ^{19}F MRI phantom images of the different nanocapsules containing PFOB (RARE factor = 64; TE=23.3ms, TR=4550ms; scan time= 15min10s)

III.5 Conclusion

An efficient and reproducible method for the synthesis of copolymers of amphiphilic PHA-g-(F;PEG) has been developed by two successive thiol-ene reactions. These copolymers will be used for the encapsulation of PFOB known to be a contrast agent for MRI. The graft copolymers based on unsaturated PHAs produced by marine bacteria have been functionalized with on one hand perfluorinated groups to promote interactions with PFOB and on the other hand with PEG to improve hydrophilicity and escape the phagocytic cells of the immune system. The molar composition of the copolymer is strictly controlled due to the efficiency of the thiol-ene addition. These nanocapsules based on PHAg-(F;PEG) would constitute a new generation of biocompatible therapeutic nanovectors that can be tracked by MRI thanks to their contrast agents capabilities.

Funding

We are grateful to the financial support of IFREMER and Region Bretagne, France. Financial support from ANR PRCI (SeaBioP Project, France) is sincerely acknowledged.

Acknowledgments

We thank Bernard Costa (Pacific Biotech, Tahiti) for providing bacteria strain. A great thanks is addressed to Eric Leroy (ICMPE, CNRS) for the TEM images.

III.6 References

1. Bartusik, D.; Aebisher, D. ^{19}F applications in drug development and imaging—A review. *Biomed. Pharmacother.* **2014**, *68*, 813–817
2. Couch, M.J.; Ball, I.K.; Li, T.; Fox, M.S.; Biman, B.; Albert, M.S. ^{19}F MRI of the Lungs Using Inert Fluorinated Gases: Challenges and New Developments. *J. Magn. Reson. Imaging.* **2019**, *49*, 343–354,
3. Ahrens, E.T.; Helfer, B.M.; O’Hanlon, C.F.; Schirda, C. Clinical cell therapy imaging using a perfluorocarbon tracer and fluorine- ^{19}F MRI. *Magn. Reson. Med.* **2014**, *72*, 1696–1701,
4. Gutberlet, M.; Kaireit, T.F.; Voskrebenezv, A.; Lasch, F.; Freise, J.; Welte, T.; Wacker, F.; Hohlfeld, J.M.; Vogel-Claussen, J. Freebreathing Dynamic ^{19}F Gas MR Imaging for Mapping of Regional Lung Ventilation in Patients with COPD. *Radiology.* **2017**, *286*, 1040–1051,
5. Cosco, D.; Fattal, E.; Fresta, M.; Tsapis, N. Perfluorocarbon-loaded micro and nanosystems for medical imaging: A state of the art. *J. Fluor. Chem.* **2015**, *171*, 18–26,
6. Giraudeau, C.; Flament, J.; Marty, B.; Boumezbeur, F.; Mériaux, S.; Robic, C.; Port, M.; Tsapis, N.; Fattal, E.; Giacomini, E.; et al. A new paradigm for high-sensitivity ^{19}F magnetic resonance imaging of perfluorooctylbromide. *Magn. Reson. Med.* **2010**, *63*, 1119–1124,
7. Jirak, D.; Galisova, A.; Kolouchova, K.; Babuka, D.; Hruby, M. Fluorine polymer probes for magnetic resonance imaging: Quo vadis? *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **2019**, *32*, 173–185,
8. Riess, J.G. Blood substitutes and other potential biomedical applications of Fluorinated colloids. *J. Fluor. Chem.* **2002**, *114*, 119–126.
9. Liu, M.-S.; Long, D.M. Perfluorooctylbromide as a Diagnostic Contrast Medium in Gastroenterography. *Radiology.* **1977**, *122*, 71–76.
10. Lowe, K.C. Engineering blood: Synthetic substitutes from fluorinated compounds. *Tissue Eng.* **2003**, *9*, 389–399,
11. Lozano, J.A.; Castro, J.A.; Rodrigo, I. Partial liquid ventilation with perfluorocarbons for treatment of ARDS in burns. *Burns.* **2001**, *27*, 635–642.
12. Wickline, S.A.; Hughes, M.; Ngo, F.C.; Hall, C.S.; Marsh, J.N.; Brown, P.A.; Allen, J.S.; McLean, M.D.; Scott, M.J.; Fuhrhop, R.W.; et al. Blood contrast enhancement with a novel, non-gaseous nanoparticle contrast agent, *Acad. Radiol.* **2002**, *9* (Suppl. 2), S290–S293.
13. Barnett, B.P.; Ruiz-Cabello, J.; Hota, P.; Liddell, R.; Walczak, P.; Howland, V.; Chacko, V.P.; Kraitchman, D.L.; Arepally, A.; Bulte, J.W.M. Fluorocapsules for Improved Function, Immunoprotection, and Visualization of Cellular Therapeutics with MR, US, and CT Imaging. *Radiology.* **2011**, *258*, 182–191,
14. Pisani, E.; Fattal, E.; Paris, J.; Ringard, C.; Rosilio, V.; Tsapis, N. Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide: Influence of polymer adsorption at the dichloromethane–water interface. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *326*, 66–71.
15. Giraudeau, C.; Geffroy, F.; Mériaux, S.; Boumezbeur, F.; Robert, P.; Port, M.; Robic, C.; le Bihan, D.; Lethimonnier, F.; Valette, J. ^{19}F molecular MR imaging for detection of brain tumor angiogenesis: In vivo validation using targeted PFOB nanoparticles. *Angiogenesis* **2013**, *16*, 171–179.

16. Diou, O.; Tsapis, N.; Giraudeau, C.; Valette, J.; Gueutin, C.; Bourasset, F.; Zanna, S.; Vauthier, C.; Fattal, E. Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by ¹⁹F MRI. *Biomaterials* **2012**, *33*, 5593–5602.
17. Boissenot, T.; Fattal, E.; Bordat, A.; Houvenagel, S.; Valette, J.; Chacun, H.; Gueutin, C.; Tsapis, N. Paclitaxel-loaded PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as theranostic agents. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2016**, *108*, 136–144.
18. Boissenot, T.; Bordat, A.; Larrat, B.; Varna, M.; Chacun, H.; Paci, A.; Poinsignon, V.; Fattal, E.; Tsapis, N. Ultrasound-induced mild hyperthermia improves the anticancer efficacy of both Taxol® and paclitaxel-loaded nanocapsules. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2017**, *264*, 219–227.
19. Rifai, N.A.; Desgranges, S.; Guillou-Buffello, D.L.; Giron, A.; Urbach, W.; Nassereddine, M.; Charara, J.; Contino-Pépin, C.; Taulier, N. Ultrasound-triggered delivery of paclitaxel encapsulated in an emulsion at low acoustic pressures. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 1640–1648.
20. Cheng, C.; Powell, K.T.; Khoshdel, E.; Wooley, K.L. Polydimethylsiloxane- (PDMS-) Grafted Fluorocopolymers by a “Grafting through” Strategy Based on Atom Transfer Radical (Co)polymerization. *Macromolecules* **2007**, *40*, 7195–7207.
21. Peng, H.; Thurecht, K.J.; Blakey, I.; Taran, E.; Whittaker, A.K. Effect of Solvent Quality on the Solution Properties of Assemblies of Partially Fluorinated Amphiphilic Diblock Copolymers. *Macromolecules* **2012**, *45*, 8681–8690.
22. Peng, H.; Blakey, I.; Dargaville, B.; Rasoul, F.; Rose, S.; Whittaker, A.K. Synthesis and Evaluation of Partly Fluorinated Block Copolymers as MRI Imaging Agents. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 374–381.
23. Kolouchova, K.; Sedlacek, O.; Jirak, D.; Babuka, D.; Blahut, J.; Kotek, J.; Vit, M.; Trousil, J.; Konefał, R.; Janouskova, O.; et al. Self-Assembled Thermoresponsive Polymeric Nanogels for ¹⁹F MR Imaging. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 3515–3524.
24. Mao, J.; Ni, P.; Mai, Y.; Yan, D. Multicompartment Micelles from Hyperbranched Star-Block Copolymers Containing Polycations and Fluoropolymer Segment. *Langmuir* **2007**, *23*, 5127–5134.
25. Srinivas, M.; Morel, P.A.; Ernst, L.A.; Laidlaw, D.H.; Ahrens, E.T. Fluorine-19 MRI for visualization and quantification of cell migration in a diabetes model. *Magn. Reson. Med.* **2007**, *58*, 725–734.
26. Ahrens, E.T.; Flores, R.; Xu, H.; Morel, P.A. In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 983–987.
27. Jamgotchian, L.; Vaillant, S.; Selingue, E.; Doerflinger, A.; Belime, A.; Vandamme, M.; Pinna, G.; Ling, W.L.; Gravel, E.; Mériaux, S.; et al. Tumor-targeted superfluorinated micellar probe for sensitive in vivo ¹⁹F-MRI. *Nanoscale* **2021**, *13*, 2373–2377.
28. Houvenagel, S.; Picheth, G.; Dejean, C.; Brûlet, A.; Chennevière, A.; Couture, O.; Huang, N.; Moine, L.; Tsapis, N. End-chain fluorination of polyesters favors perfluorooctyl bromide encapsulation into echogenic PEGylated nanocapsules. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 2559–2570.
29. Sawada, H. Novel self-assembled molecular aggregates formed by fluoroalkyl end-capped oligomers and their application. *J. Fluor. Chem.* **2003**, *121*, 111–130.

30. Samanta, B.; Ofir, Y.; Patra, D.; Rotello, V.M. Self-assembly of fluorocarbon-coated FePt nanoparticles for controlling structure and wettability of surfaces. *Soft Matter*. **2009**, *5*, 1247–1250.
31. Astafyeva, K.; Somaglino, L.; Desgranges, S.; Berti, R.; Patinote, C.; Langevin, D.; Lazeyras, F.; Salomir, R.; Polidori, A.; Contino-Pépin, C.; et al. Perfluorocarbon nanodroplets stabilized by fluorinated surfactants: Characterization and potentiality as theranostic agents. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 2892–2907.
32. Berger, R.; Resnati, G.; Metrangolo, P.; Weber, E.; Hulliger, J. Organic fluorine compounds: A great opportunity for enhanced materials properties. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3496–3508,
33. Cametti, M.; Crousse, B.; Metrangolo, P.; Milani, R.; Resnati, G. The fluorous effect in biomolecular applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *41*, 31–42.
34. Krafft, M.P.; Riess, J.G. Chemistry, Physical Chemistry, and Uses of Molecular Fluorocarbon–Hydrocarbon Diblocks, Triblocks, and Related Compounds—Unique “Apolar” Components for Self-Assembled Colloid and Interface Engineering. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1714–1792.
35. Steinbüchel, A.; Valentin, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *128*, 219–228.
36. Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *10*, 1503–1555.
37. Lenz, R.W.; Marchessault, R.H. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1–8.
38. Zhang, J.; Shishatskaya, E.I.; Volova, T.G.; da Silva, L.F.; Chen, G.-Q. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Mater. Sci. Eng. C*. **2018**, *86*, 144–150.
39. Rai, R.; Keshavarz, T.; Roether, J.A.; Boccaccini, A.R.; Roy, I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2011**, *72*, 29–47.
40. Koller, M. Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious Microbial Macromolecules for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Molecules* **2018**, *23*, 362.
41. Williams, S.F.; Martin, D.P. Applications of polyhydroxyalkanoates (PHA) in medicine and pharmacy. *Biopolym. Online* **2005**.
42. Hazer, B. Amphiphiles from Poly(3-hydroxyalkanoates). In *Handbook Polyhydroxyalkanoates*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, **2020**.
43. Bear, M.-M.; Renard, E.; Randriamahefa, S.; Langlois, V.; Guérin, P. Preparation of a bacterial polyester with carboxy groups in side chains. *Comptes Rendus Académie Sci.-Ser. IIC-Chem.* **2001**, *4*, 289–293.
44. Jain-Beuguel, C.; Li, X.; Houel-Renault, L.; Modjinou, T.; Simon-Colin, C.; Gref, R.; Renard, E.; Langlois, V. Water-Soluble Poly(3-hydroxyalkanoate) Sulfonate: Versatile Biomaterials Used as Coatings for Highly Porous Nano-Metal Organic Framework. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 3324–3332.
45. Babinot, J.; Renard, E.; le Droumaguet, B.; Guigner, J.-M.; Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P.; Langlois, V. Facile Synthesis of Multicompartment Micelles Based on Biocompatible Poly(3-hydroxyalkanoate). *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 362–368,

46. Simon-Colin, C.; Alain, K.; Raguénès, G.; Schmitt, S.; Kervarec, N.; Guin, C.; Crassous, P.; Costa, B.; Guezennec, J.G. Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl PHAs) from cosmetic co-products by *Pseudomonas ragnenesii* sp. nov., isolated from Tetiaroa, French Polynesia. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 6033–6039.
47. Lee, D.; Donkers, R.L.; DeSimone, J.M.; Murray, R.W. Voltammetry and Electron-Transfer Dynamics in a Molecular Melt of a 1.2 nm Metal Quantum Dot. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1182–1183.
48. Haggag, Y.A.; Osman, M.A.; El-Gizawy, S.A.; Goda, A.E.; Shamloula, M.M.; Faheem, A.M.; McCarron, P.A. Polymeric nanoencapsulation of 5-fluorouracil enhances anti-cancer activity and ameliorates side effects in solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 215–224.

CHAPITRE IV :

SYNTHESE DE POLYHYDROXYALCANOATE
FLUORE A PARTIR DE BIORESOURCES
MARINES POUR LE REVETEMENT DE
BIOMATERIAU

Présentation de l'article

Dans le chapitre précédent, nous avons fonctionnalisé les PHA_{MCL} insaturés avec des molécules fluorées et du poly(éthylène glycol). Les copolymères fluorés amphiphiles ainsi synthétisés par réactions thiol-ène nous ont permis de concevoir des nanocapsules visibles en IRM ¹⁹F.

Les dispositifs implantables à base de biopolymères n'étant pas visibles par les techniques d'imagerie, l'objectif est de les rendre visualisables afin d'assurer la localisation et l'implantation du biomatériau. Dans cet article, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation des PHA_{MCL} insaturés par du perfluorodécane-thiol dans l'objectif d'élaborer un revêtement de biomatériaux visibles en IRM ¹⁹F. Pour cela, le copolymère PHA-g-(C₈F₁₇) a été préparé par greffage du perfluorodécane-thiol (C₈F₁₇) sur le PHA_{MCL} insaturé selon deux voies de fonctionnalisation. Le greffage hétérogène en surface d'un film de PHA et le greffage homogène en solution ont été étudiés. Leur efficacité a été évalué par spectroscopie Raman et par RMN. La caractérisation de la microstructure par MEB-EDX et DSC (modulée et conventionnelle) a montré la formation de microdomaines fluorés. Les expériences d'Echo de Hahn ont démontré un temps de relaxation transversal (T₂) de l'ordre de 1,2 ms, ce qui est approprié pour des séquences de détection spécifiques aux T₂ courts. Des biomatériaux ont été préparés par impression 3D puis recouverts de PHA-g-(C₈F₁₇). Les résultats ont montré que ce revêtement pourrait être utilisé comme nouveaux agents de contraste pour la visualisation de biomatériaux implantables par IRM ¹⁹F.

Synthesis of Fluorinated Polyhydroxyalkanoate from Marine Bioresources as Promising Biomaterial Coating

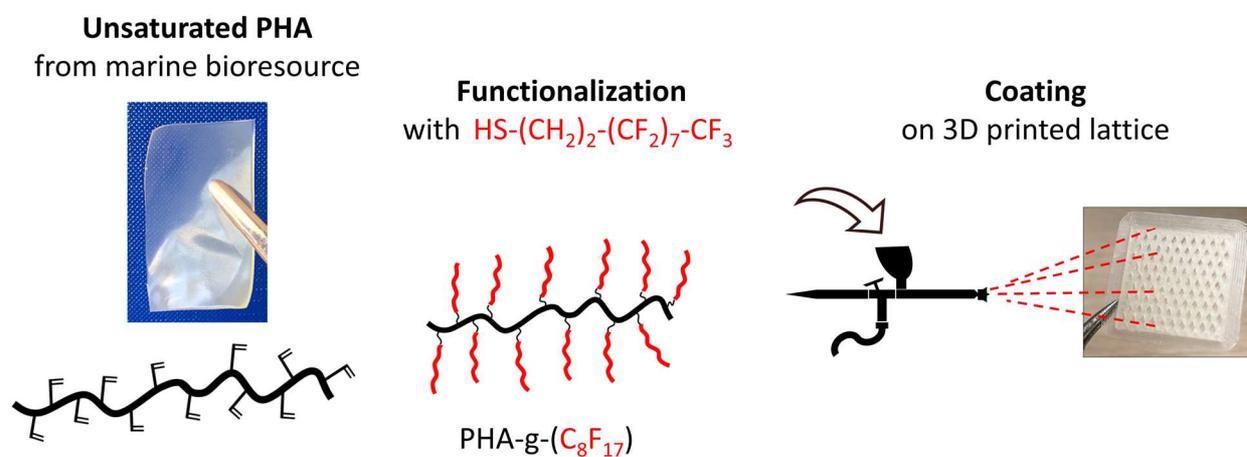
Biomacromolecules 2021, 22, 4510-4520

DOI : 10.1021/acs.biomac.1c00770

Marion LE GAL^{1,2}, Agustin RIOS DE ANDA¹, Laurent MICHELY¹, Christelle SIMON-COLIN²,
Estelle RENARD¹, Valérie LANGLOIS¹

¹ Univ Paris Est Creteil, CNRS, ICMPE, F-94010 Creteil, France

² Univ Brest, CNRS, Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes,
UMR6197, F-29280 Plouzané, France



IV.1 Abstract

By successive enzymatic and chemical modifications novel fluorinated poly(hydroxyalkanoate)s were synthesized and characterized. Unsaturated poly(hydroxyalkanoate), PHAU, was first produced by fermentation using marine bacteria *Pseudomonas raguenesii* and graft copolymer PHAU-g-C₈F₁₇ was further prepared by controlled thiol-ene reaction in presence of perfluorodecanethiol (PFDT). The PFDT grafting is realized by two different processes. In the first method, PHAU was previously solubilized in toluene. The grafting in solution is more efficient than the direct heterogeneous grafting onto the PHAU film. The degrees of grafting were determined by ¹H NMR. The characterization of the microstructure by SEM-EDX and modulated and conventional DSC showed the formation of microdomains due to the organization of the hydrophobic segments of graft PFDT. Biomaterials prepared by 3D-printing and coated by PHAU-g-C₈F₁₇ have the potential to be used as novel contrast agents as it was showed by Hahn Echo experiments.

IV.2 Introduction

Implantable medical devices are intended to mimic a body part and are used to replace or support a diseased organ or a damaged structure to maintain healthy body functions. Metals, ceramics and synthetic polymers are among the materials traditionally used, but they have certain drawbacks, such as immunological rejection by the immune system of patients. In addition, synthetic polymers may cause problems due to their biodegradation products in the body, which can lead to an undesirable immunogenic response¹⁻³. Biopolymers are polymers derived from biomass and thus produced by living organisms such as plants or microorganisms or chemically synthesized from monomers derived from biological systems⁴. Their well-defined and complex structure, degradability, and biobased characteristics are significant advantages over synthetic polymers⁵⁻⁷. As the degradation products of biopolymer metabolism are not immunogenic, they have great potential for applications in the biomedical field. Among the most common examples of biopolymer-based medical devices are temporary prostheses such as three-dimensional porous structures, scaffolds for tissue engineering and

vehicles for controlled/sustained release drug delivery ^{8,9}. Because of these particularly favorable characteristics, biodegradable polymers are widely studied for their application as implantable medical devices ¹⁰. A biodegradable device should gradually resorb along with tissue regeneration and be completely absorbed without any negative effect on the formed tissue. After incorporation, it has been shown that the degradation of the biopolymer does not occur homogeneously throughout the medical device¹¹. In addition, deformable implantable devices such as meshes can be subjected to contraction, shrinkage and deformation and thus cause complications such as migration and penetration into organs, fistula formation and chronic pain ¹²⁻¹⁴. For a better understanding of the degradation mechanisms of implantable biomaterials, and also to ensure proper integration within the tissues, their visualization is particularly useful. Unfortunately, most of these polymeric biomaterials are inherently transparent to most imaging techniques. The development of imaging methods capable of accurately locating implantation and observing morphological changes in bioabsorbable implants will contribute to a better understanding of degradation mechanisms and improved design of polymeric biomaterials.

Magnetic resonance imaging (MRI) is a non-invasive, radiation-free, high-resolution imaging technique widely used for clinical diagnosis and research. The use of contrast agents has allowed direct visualization of polymer implants using MRI provides insights into the position, functionality, resorption and remodeling of the biomaterial ¹⁵⁻¹⁸. Heteronuclear MRI, such as ¹⁹F MRI, has become particularly attractive in recent years ^{19,20}. Indeed, the absence of endogenous fluorine in the body results in a lack of background, allowing high contrast and efficient quantification of the embedded fluorinated probe. Lately, the development and suitability of ¹⁹F MRI for use in clinical practice has increased ²¹. A wide range of fluorinated probes available for experimental and even clinical applications have been developed ²². They have been listed in several studies^{20,23,24} and the applications include the implementation of ¹⁹F MRI probes, cell targeting²⁵⁻²⁷, in vivo monitoring of labeled cells²⁸⁻³¹ and also cancer diagnosis³²⁻³⁴. Consequently, fluorinated biomaterials are interesting new materials for developing MRI-visible tissue therapeutics products.

In this context, we propose to design a novel functionalized biomaterial that can be visible by ¹⁹F MRI without adding inorganic contrast agents. Among the biocompatible

polymers, polyhydroxyalkanoates (PHAs) are considered interesting candidates for biomedical and pharmaceutical applications. PHAs are polyesters synthesized by bacteria from different substrates³⁵⁻³⁷. To enhance the mechanical and/or biological properties of PHAs, copolymers synthesis and chemical modifications were extensively studied³⁸⁻⁴³. Chemical modifications are also very useful to introduce specific functions^{44,45}. For this, the grafting reactions are mainly realized on unsaturated PHA bearing unsaturated groups on the side chains. The most common unsaturated PHA⁴⁶ is poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyundecenoate), which contains terminal alkene groups in the side chains. Here, a novel unsaturated polyhydroxyalkanoate, noted PHAU, was biosynthesized by a marine bacterium⁴⁷ cultivated using a mixture of coprah oil and 10-undecenoic acid. The unsaturated groups were further functionalized with perfluorodecanethiol (PFDT). Two functionalization ways were studied to compare the efficiency of the thiol-ene reactions : on the one hand *via* grafting in solution and on the other hand by direct surface functionalization of the polymer. The copolymer PHAU-g-C₈F₁₇ was characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) and Raman spectroscopies to evaluate the degree of grafting. The microstructure was studied in detail by scanning electron microscopy-energy-dispersive X-ray (SEM-EDX) and differential scanning calorimetry (DSC). Finally, the potential of these functionalized biopolymers for the development of MRI visible medical devices has been studied. For this, a biomaterial was obtained by 3D printing and then coated with PHAU-g-C₈F₁₇.

IV.3 Materials and methods

IV.3.1 PHA₍₇₂₎U₍₂₈₎ biosynthesis

Pseudomonas raguensis sp. nov. (strain CNCM I-4063 in the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, Paris, France)⁴⁷ was cultivated in a two-steps batch cultivation process. In the first step, the cells were inoculated at 10 % (v/v) with a suspension of cells in exponential phase and grown in 5 L Erlenmeyer flasks containing 2 L of marine broth medium (for 1 liter : 5 g peptone, 1 g yeast extract, 20 g Sea Salts, pH 7.6) in an incubator at 34°C, 160 rpm. After the cultivation for 8 h, cells were harvested by centrifugation

(7000 rpm, 15min), and transferred into 30 L fermenter containing 18 L nitrogen free medium (15 g.L⁻¹ sea salts) enriched with a mixture of coprah oil (5 g.L⁻¹) and 10-undecenoic acid (0,6 g.L⁻¹). Culture was incubated at 34°C, pH is adjusted at 7,6 throughout the fermentation process by automatic addition of 1M NaOH or 1M H₂SO₄ and the oxygenation is ensured by a light air flow. Following cultivation for 72 h, cells were harvested by centrifugation (7000 rpm for 15 min), and the pellets lyophilized prior to PHA extraction. Pellets of freeze-dried cells were ground with a mortar and pestle, the resulting powder was extracted with chloroform for 4 h at 50 °C. The PHA-containing chloroform phase was washed once with water and concentrated. The organic phase was evaporated to dryness, and purified PHA were obtained by repeated precipitations in 10 volumes of cold methanol.

IV.3.2 Synthesis of PHAU-g-C₈F₁₇

Grafting in solution: PHA₍₇₂₎U₍₂₈₎ (100 mg, 1233×10⁵ g.mol⁻¹, 1.8×10⁻⁴ mol C=C), AIBN (8 mg) and PFDT (86.4 mg, 480 g.mol⁻¹) corresponding to an equimolar ratio, were dissolved in 3 mL of anhydrous toluene under argon, and solutions were heated at 80 °C for 20h. Toluene was rotary evaporated and ¹H NMR was conducted to determine the amount of fluorinated compounds grafted.

Surface grafting: A 2 mg film of PHAU ($n_{C=C} = 3.68 \times 10^{-6}$ mol) was obtained by solvent evaporation of a PHAU solution in CHCl₃ on a glass slide. A volume of 400 mL of a solution containing 1.5 eq of PFDT/C=C ($n_{SH} = 5.52 \times 10^{-6}$ mol) and 3% DMPA (2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone) in ethanol were deposited on its surface. The device was irradiated under UV light for 300 s. The sample was placed at 11 cm under Hamamatsu Lightning Cure LC8 (L8251) equipped with mercury-xenon lamp (200W). The slide was immersed 2 h in 5 mL of ethanol in a closed container under agitation to rinse it. Ethanol was removed and the polymer film surface was analyzed by Raman spectroscopy.

IV.3.3 Polymer characterization

^1H , ^{19}F and ^{13}C NMR spectra were recorded in CDCl_3 or $\text{H}_2\text{O-D}_2\text{O}$ (9:1) on a Bruker AV400 MHz. Grafting of fluorinated compound was assessed by Raman spectroscopy using a Raman microscope LabRAMHR from Horiba Jobin Yvon (Longjumeau, France) equipped with a laser emitting at 633 nm. Water contact angle measurements were performed using the drop shape analysis system on a Krüss goniometer. For the observation of thermal decomposition effects, a LABSYS Evo Setaram was used. The thermogravimetric analyses (TGA) were performed under air with a temperature sweep from 30 to 600°C and a heating rate of 10°C/min.

IV.3.4 Differential Scanning Calorimetry

DSC were conducted on a TA Instruments Q25 DSC on both the conventional and modulated modes. This was done so as to differentiate different thermal-activated phenomena such as melting, glass transition, and molecular reorientation processes, within the studied samples⁴⁸⁻⁵⁰. Indeed, while the conventional DSC mode applies a constant temperature ramp, the modulated DSC mode applies an instantaneous sinusoidal temperature variation on the sample with a constant temperature ramp. This means that the instantaneous temperature in the DSC varies quickly. While the conventional DSC only gives the total heat flow signal encompassing all of the thermal phenomena, the instantaneous temperature variation applied by the modulated DSC permits the separation of thermal phenomena that are in phase with the sinusoidal temperature variation (i.e. glass transition, molecular reorganizations, molecular movements during melting or crystallization), which appear in the so-called reversing heat flow, from the lagged thermal phenomena (i.e. reaction kinetics, solvent evaporation, kinetic exchanges during melting or crystallization) which are visible in the nonreversing heat flow⁴⁸⁻⁵¹. The sum of these two signals thus corresponds to the total heat flow obtained by the conventional DSC as detailed in Equation 1.

Equation 1
$$\frac{dH}{dt} = C_p \frac{dT}{dt} + f(T, t)$$

where dH/dt corresponds to the total heat flow signal, $C_p dT/dt$ corresponds to the reversing heat flow signal and $f(T,t)$ to the nonreversing heat flow. Furthermore, dT/dt corresponds to the heating rate and C_p to the heat capacity, which is the amount of heat needed to increase the temperature of 1 g of matter by 1°C. By analyzing these signals, different thermal phenomena can be attributed to the studied materials. A total of 10 - 25 mg of sample mass were introduced in T-Zero™. Non-Hermetic capsules were heated from -80°C to 100°C under a nitrogen flow of 50 mL/min with a 10°C/min ramp for the conventional mode and with a 3°C/min ramp and a temperature modulation of $\pm 0.48^\circ\text{C}$ every 60 seconds for the heat-only modulated mode. Data treatment was carried out on the TA Instruments TRIOS software.

IV.3.5 Hahn echo measurements

The transverse relaxation time (T_2) ^{19}F was obtained via Hahn echo measurements using a Bruker Advance III 400 NMR equipped with a MAS solid-state 4 mm DVT $^1\text{H}/^{19}\text{F}/\text{X}$ probe and a MAS II module. The ^{19}F Larmor frequency was set to 376.498 MHz. For the Hahn echo pulses, an echo delay of 300 μs between the 90° and 180° pulses was set and echo delays from 50 μs to 2.5 ms with 50 μs increasing steps were set between the 180° pulse and the signal acquisition. Samples were introduced in ZrO_2 4 mm rotors and were left static in the probe. Experiments were carried out at 20°C and 37°C for which the temperature was left to stabilize for 1 h prior to measurement. FT signals were analyzed by Mestrenova and their maxima were plotted in a logarithmic scale as a function of the Hahn echo delay time to obtain the T_2 ^{19}F values.

IV.3.6 3D printing

The 3D printing of a lattice of dimension 20 mm x 20 mm x 0.7 mm (L x W x D) was conducted using a PLA / PHA printing filament from ColorFabb. The 3D printer used is the Ultimaker 3 Extended with following settings: printhead diameter of 0.4 mm, thickness of printing layers of 0.2 mm, printing temperature of 205°C, plate temperature of 60°C, printing

speed of 70mm/s, printing time of 8 min, and printing with brim to avoid adhesion problems to the base. The printing model was made with Tinkercad CAD online software from Autodesk. The grafted polymer is dissolved in chloroform (20mg/mL) and then deposited on the surface of the lattice support using an RM 250 airbrush (MLD products) at 10 cm from the 3D lattice support.

IV.3.7 SEM-EDX characterization

A PHBV/PHA-F film (80/20) was formed by solvent evaporation in order to be analyzed in SEM-EDX. Measurements were carried out using a Merlin scanning electron microscope (SEM) from Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) with an acceleration voltage of 10 kV coupled to an energy dispersive X-ray detector (EDX) SDD X- Max from Oxford Instruments (Abingdon-on-Thames, United Kingdom) operating at 5 kV. Samples were previously covered with a 4.5nm conductive layer of palladium.

IV.4 Results and discussion

IV.4.1 PHAU production

The ability of *Pseudomonas raguesii* to produce unsaturated PHA (PHAU) was tested using a mixture of coprah oil (5 g.L⁻¹) that is, a coconut vegetable oil composed of more than 90% saturated fatty acids and 10-undecenoic acid (0.6 g.L⁻¹). The unsaturated substrate is chosen to induce the incorporation of unsaturated monomeric units into PHAU. After 72h of culture, the cells were harvested by centrifugation and freeze-dried and the PHAU was extracted with a production yield of 17% (mass of PHAU / mass of cells). The molar mass (123,000 g.mol⁻¹) and polydispersity index (1.8) were determined by SEC. The ¹³C NMR spectrum of PHAU is shown in Figure IV.1. The constituent carbons of the main chain show the same chemical shift signals for all units. Thus, the main chemical shift of carbon C1 (C=O) was detected at 169 ppm, C2 at 39 ppm and C3 at 71 ppm. The chemical shift of the C4 carbon

of the side chain methylene groups is detected at 33 ppm. The chemical shifts at 14 ppm correspond to the carbons of the terminal methyl groups (CH₃) of the side chains, and the chemical shifts observed between 22 and 31 ppm correspond to the carbons of the different methylene groups (CH₂) constituting the side chains of PHAU. The presence of a double bond is confirmed by the presence of chemical shifts at 114 and 139 ppm corresponding to the (=CH₂) and methine (=CH-) groups, respectively. The chemical shift at 34 ppm is attributed to the α-methylene groups of the double bond PHAU, which is a random copolymer containing saturated and unsaturated side chains in the proportion of 0.72 :0.28, respectively.

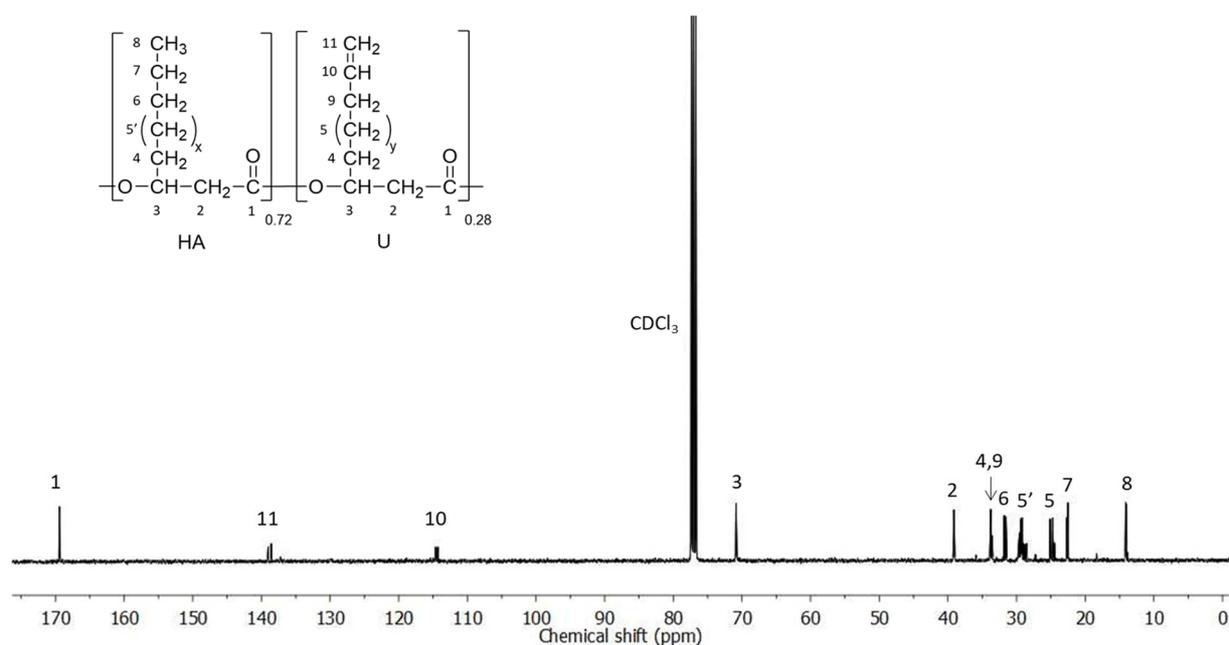


Figure IV.1. ¹³C NMR spectrum of PHAU. (x: 1,3 and 5; y: 2 and 4)

IV.4.2 Synthesis of PHAU-g-C₈F₁₇ and characterization

In order to covalently graft PFDT onto PHAU, two ways were compared: on the one hand, a heterogeneous photoactivated process on the surface in the presence of DMPA and on the other hand, homogeneous grafting in solution in the presence of a thermal initiator. These two approaches to prepare PHAU-g-(C₈F₁₇) by thiol-ene reactions are shown in Figure IV.2. The biocompatibility of unsaturated PHA grafted by PFDT was previously showed in our

previous study⁵². Any cytotoxicity was detected on mouse fibroblast cells (NIH/3T3) and murine macrophage cells (J774.A1).

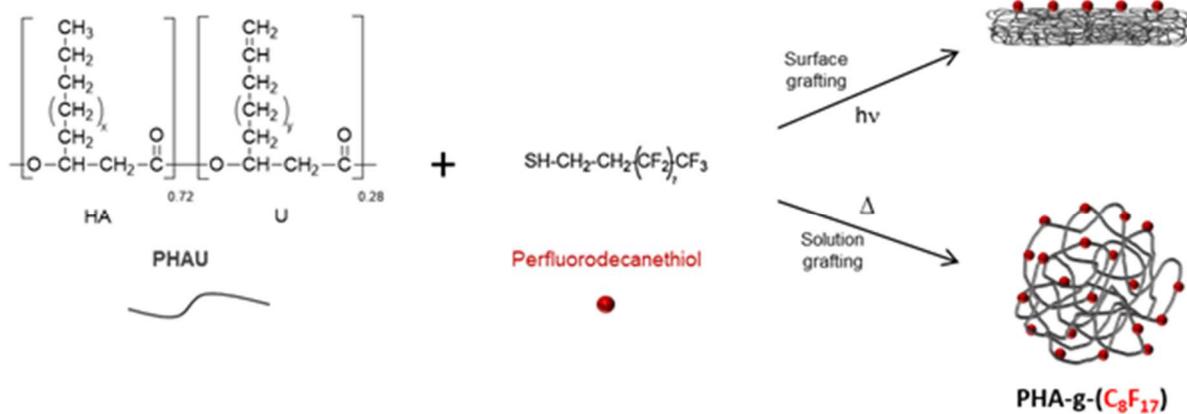


Figure IV.2: Synthesis of PHA-g-(C₈F₁₇) by thiol-ene reactions.

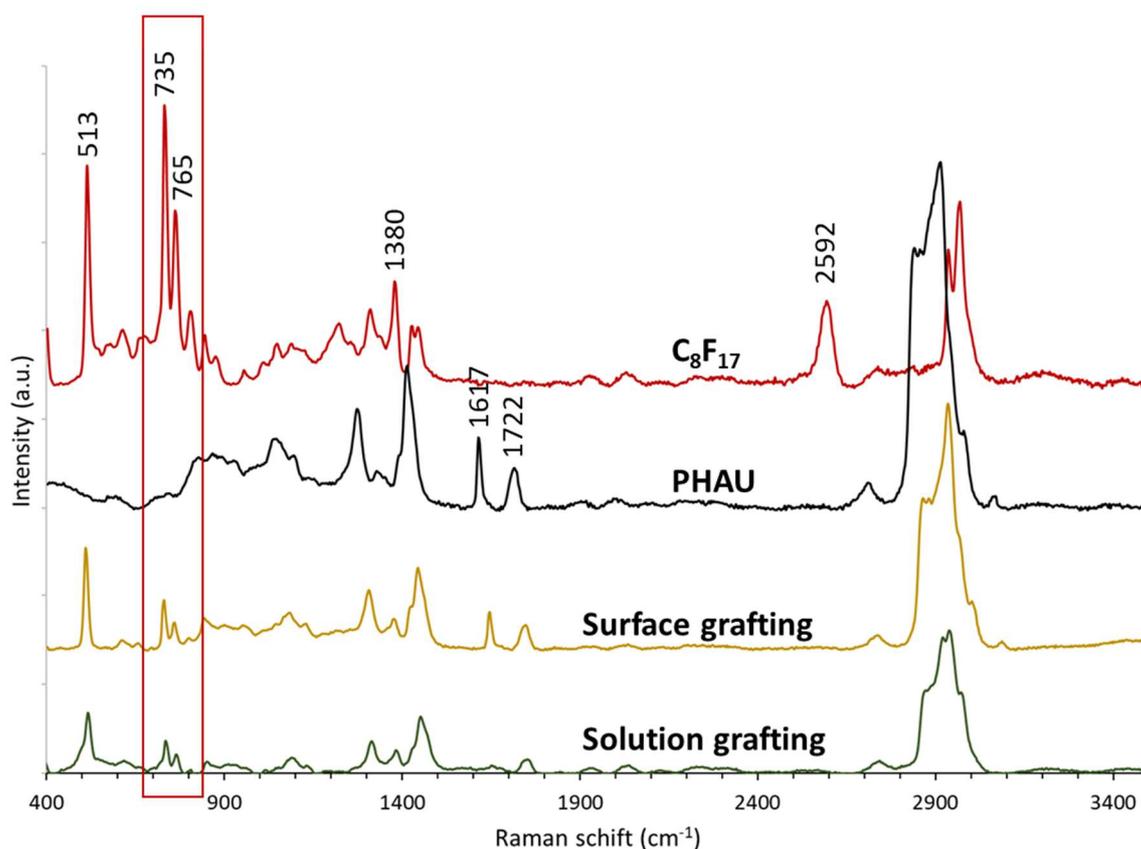


Figure IV.3: Raman spectrum of PHAU-g-(C₈F₁₇) by surface grafting (yellow) and solution grafting (green).

The Raman spectra (Figure IV.3) of PHAU-g-(C₈F₁₇) grafted according to the two grafting methods tested here clearly showed the presence of fluorinated groups by the appearance of characteristic bands at 735 and 765 cm⁻¹ attributed to the symmetric stretching of CF₂ and the symmetric vibration of the trifluoromethyl group CF₃, respectively. The disappearance of the band at 2592 cm⁻¹ assigned to the SH group of the PFDT showed that the thiol-ene reaction is quantitative. The grafting efficiency was evaluated by the integration ratio of the absorption band of ester (C=O) in the PHAU skeleton at 1722 cm⁻¹, and the absorption band at 1617 cm⁻¹ attributed to the unsaturated group (C=C). Indeed, the band of the alkene function (1617 cm⁻¹) is sensitive to grafting while that of the ester function (1722 cm⁻¹) remains unchanged. The results showed that heterogeneous grafting on the surface gave a grafting rate of 13.1% and homogeneous grafting in solution gave higher rate of 78% (Table IV.1). This result is explained by the accessibility of the double bonds, which is facilitated during grafting in solution than on the surface. This high functionalization rate obtained by

grafting in solution agrees with the results obtained by ^1H NMR analyses. As a consequence, further, PHAU-g-(C_8F_{17}) used as coating is the one obtained by the grafting in solution.

Table IV.1: Grafting Efficiency of PFDT according to the Two Methods Used.

	Grafting rate (%)
Surface grafting	13.1
Solution grafting	78.0

PFDT, virgin PHAU and the copolymer PHAU-g-(C_8F_{17}) were characterized by ^1H NMR (Figure IV.4). The ^1H NMR spectrum of PFDT shows the characteristic peaks of methylene (CH_2) at 2.4 and 2.7 ppm. The peak at 1.6 ppm is attributed to the proton of the thiol function. The percentage of double bonds within the initial PHAU was determined by integrating the peak corresponding to the methine protons (3) at 5.2 ppm and the signal related to the terminal unsaturation group of the side chain (10) at 5.7 ppm.

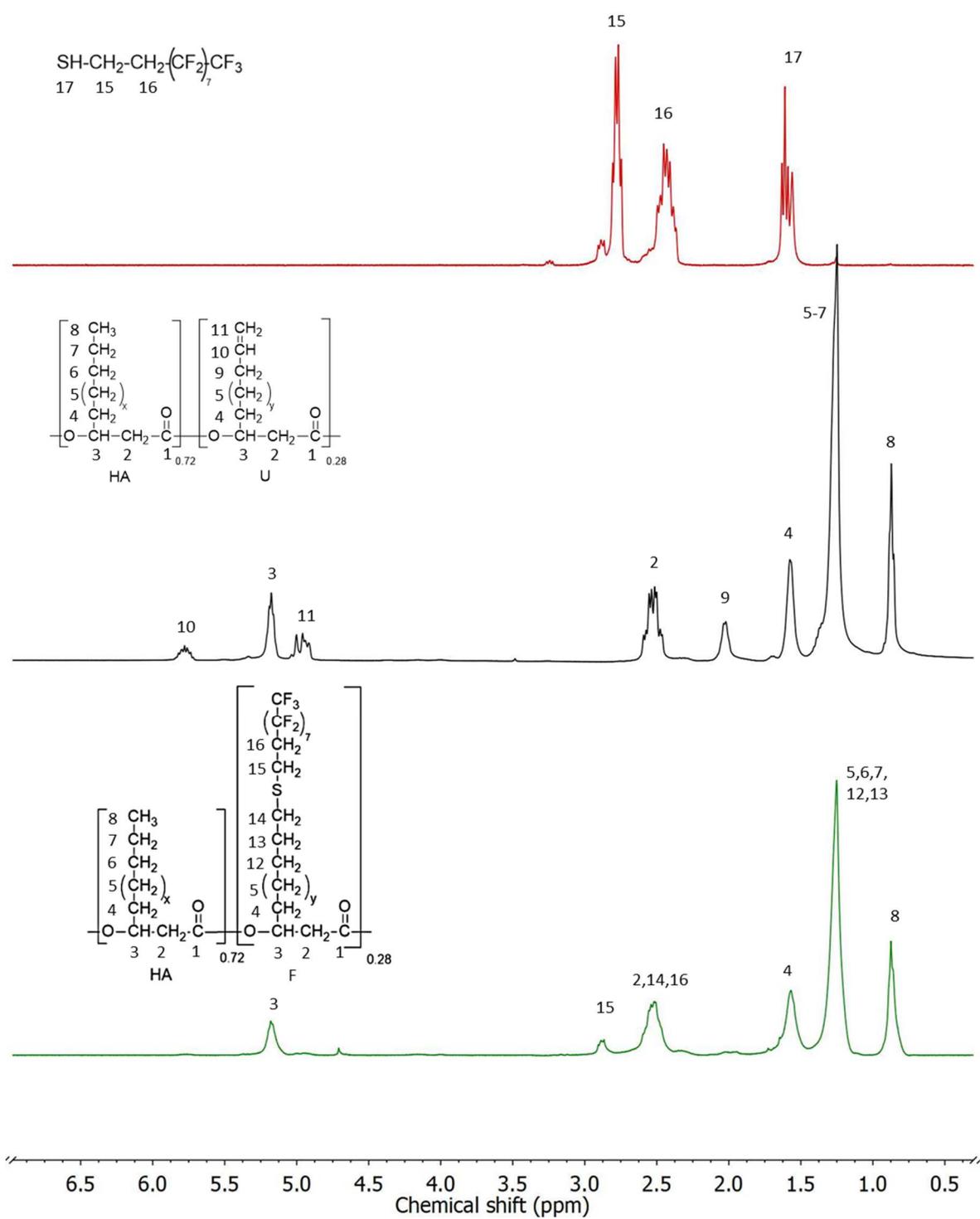


Figure IV.4: ^1H NMR spectra of PFDT (red), PHAU (black) and PHAU-g-(C₈F₁₇) grafted in solution (green). (x: 1,3 and 5; y: 2 and 4).

The copolymer PHAU-g-(C₈F₁₇) was also characterized by ¹H NMR. Signals related to methylene CH₂ (15), characteristic of fluorinated groups, appeared at 2.8 ppm indicating successful grafting. Moreover, the disappearance of characteristic peaks at 2, 4.9 and 5.74 ppm corresponding to the methylene protons in α of the double bond and methylene protons and methine proton of the double bond, respectively, attests to the absence of double bond and thus to a grafting close to completion.

The ¹⁹F NMR spectrum of PHAU-g-(C₈F₁₇) reveals peaks consistent with the presence of fluorinated moieties, as seen in PFDT (Figure IV.5). The peak at -80 ppm comes from the fluorine CF₃ at the end of the fluorinated chain. The peak at -114 ppm corresponds to the fluorine CF₂ located near the methylene groups and the peak at -126 ppm is attributed to the CF₂ in alpha position of CF₃. Finally, the remaining CF₂ correspond to the different peaks located between -123 and -121 ppm.

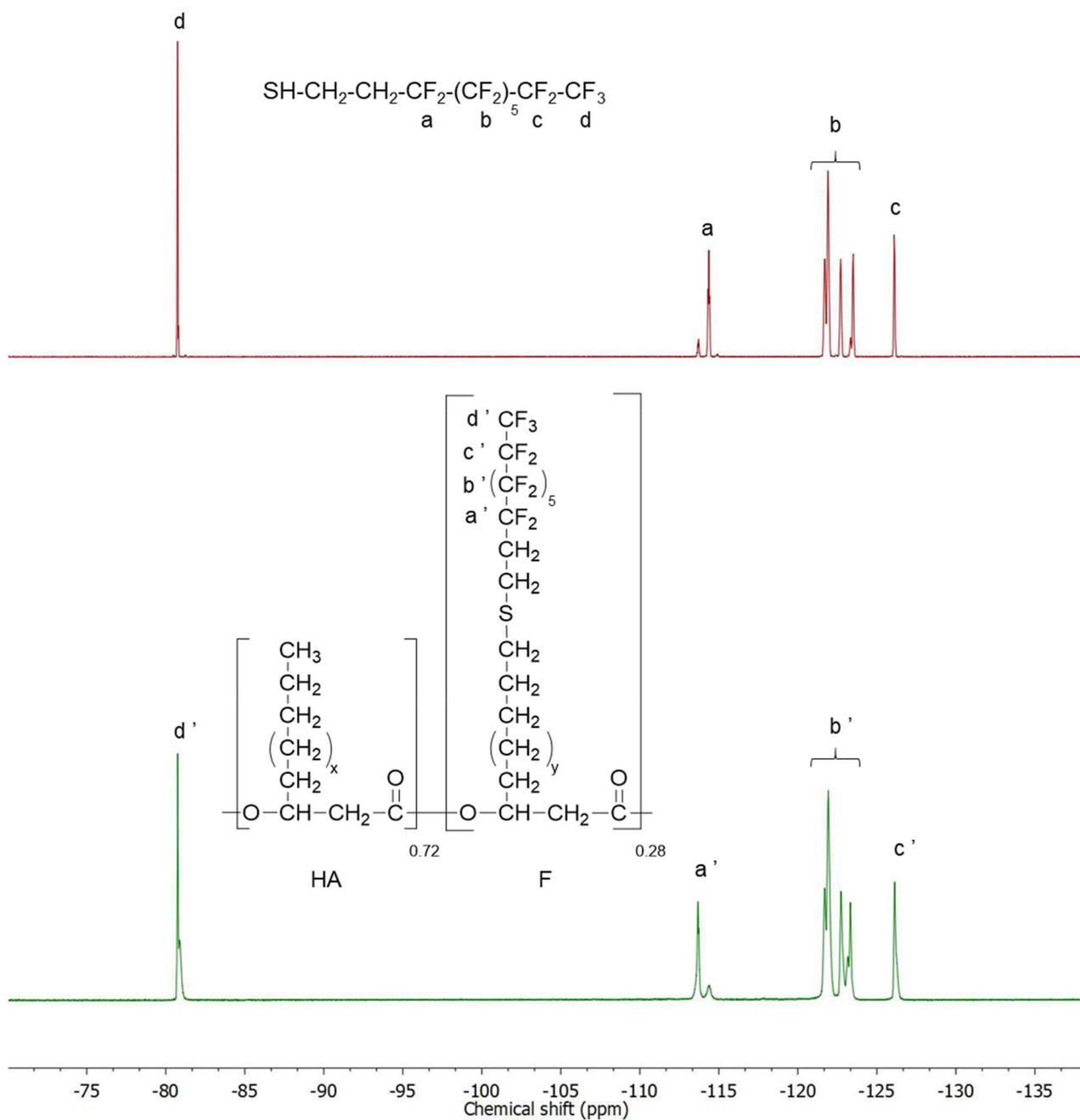


Figure IV.5: ^{19}F NMR spectra of PFDT (red) and PHAU-g-(C_8F_{17}) grafted in solution (green). (x: 1,3 and 5; y: 2 and 4).

The contact angle of the PHAU film with water obtained by solvent evaporation was found to be 96.8° , which is in agreement with the literature ^{53,54}, whereas the contact angle after grafting in solution was about 131.8° for PHA-g-(C₈F₁₇) (Table IV.2 and Figure IV.6). This difference can be explained by the presence of fluorinated groups known for their highly hydrophobic properties.

Table IV.2: Water Contact Angles of PHA before and after Grafting

polymer	contact angle (°)
PHAU	96.8 ± 2.6
PHAU-g-(C ₈ F ₁₇)	131.8 ± 1.5

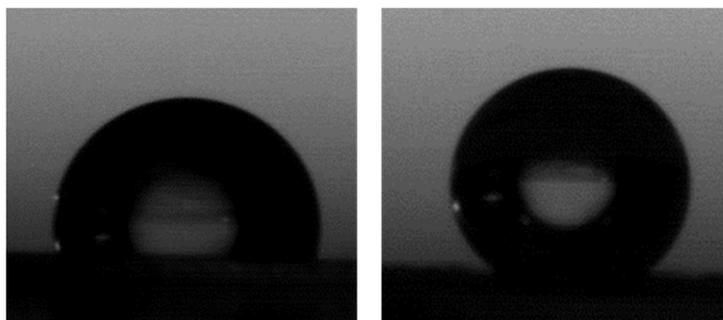


Figure IV.6: Contact angle measurement of PHAU (left) and PHAU-g-(C₈F₁₇) grafted in solution (right).

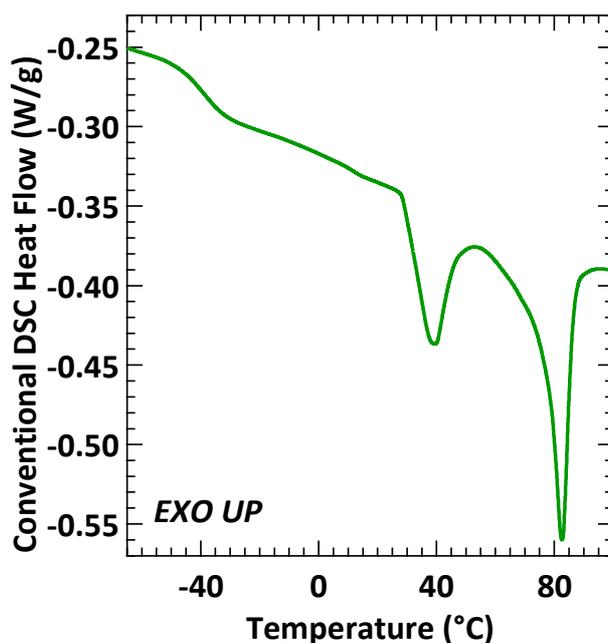


Figure IV.7: Conventional DSC total heat flow as a function of temperature for PHAU-g-(C₈F₁₇).

Figure IV.7 shows the thermogram obtained by conventional DSC measurements for the grafted polymer. From this thermogram, the glass transition temperature T_g of PHA-(C₈F₁₇) was determined to have a value of -38.3°C. A first endothermic phenomenon with a temperature of +38.5°C is also observed. This temperature corresponds to the melting point of PHAU crystalline phase (Table IV.3). The melting enthalpy of the copolymer is lower than that of the virgin PHAU attesting that the presence of fluorinated moieties within the lateral side chains hindered the crystallization of PHAU. A second endothermic phenomenon is observed at 82.5°C and at first glance this temperature does not correspond to a further melting process within PHAU. To elucidate this observation, conventional and modulated DSC analyses were performed on pure PFDT. These results are shown in Figure IV.8.

Table IV.3: Thermal Properties of PHAU and PHAU-g-(C₈F₁₇) Determined by DSC Analysis.

polymer	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J.g ⁻¹)
PHAU	-46.2	49.2	9.7
PHAU-g-(C ₈ F ₁₇)	-38.3	38.5	5.4

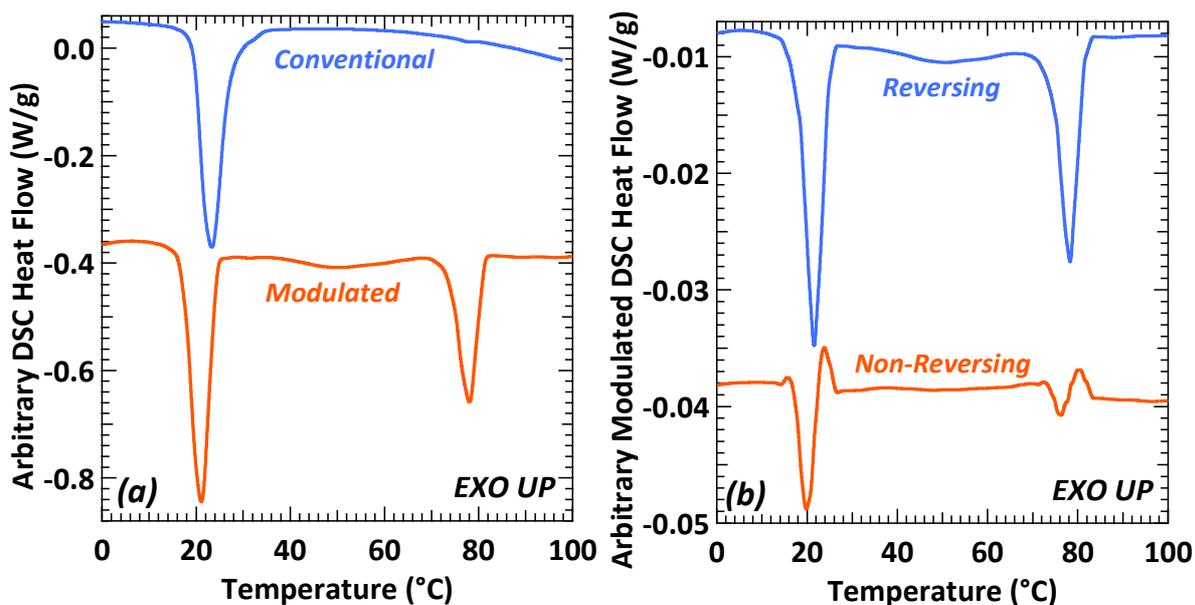


Figure IV.8: (a) Conventional and modulated DSC total heat flow signals and (b) modulated DSC reversing and nonreversing heat flow signals as a function of temperature for PFDT.

Figure IV.8a shows the plot of the total heat flow obtained by both conventional and modulated DSC experiments. It is observed that an endothermic peak between 21.1°C (modulated DSC) and 23.7°C (conventional DSC) is observed in both signals. As expected from the literature and the product datasheet, this peak corresponds to PFDT melting phenomenon. Moreover a second endothermic peak at 78.1°C is only observed for the modulated heat flow signal. The position of this peak is similar to that observed for PHAU-g-(C₈F₁₇) as shown in Figure IV.7 (i.e., 82.5°C). It is also important to note that in this same Figure IV.7, the melting processing of PFDT is not observed in PHAU-g-(C₈F₁₇), attesting the absence of free PFDT within PHAU-g-(C₈F₁₇). Thus, the reversing and nonreversing heat flow signals were further analyzed and are plotted in Figure IV.8b. It is seen that the melting phenomenon appears in both the reversing and nonreversing heat flow signals, which was expected. More interestingly, the peak at 78.1°C is mainly observed in the reversing heat flow signal, with a relatively small contribution in the nonreversing heat flow signal. This would mean that this thermal phenomenon is in phase with the applied sinusoidal temperature variation, meaning that it does not correspond to a kinetic phenomenon. It can be deduced then that this endothermic peak would then correspond to the rearrangement or reorganization of PFDT molecules both in the pure product and in PHAU-g-(C₈F₁₇). Indeed, as this molecule bears

fluorinated groups, it might be possible that strong dipoles form within the molecules, leading to a spatial organization between molecules due to strong intermolecular dipolar interactions, found even in the liquid state. This organization seems to be found in the pure PFDT and in PHAU-g-(C₈F₁₇). Once the temperature increases, these interactions, and thus the molecular organization between molecules will be broken. This will prompt the appearance of a thermal phenomenon observable via DSC experiments.

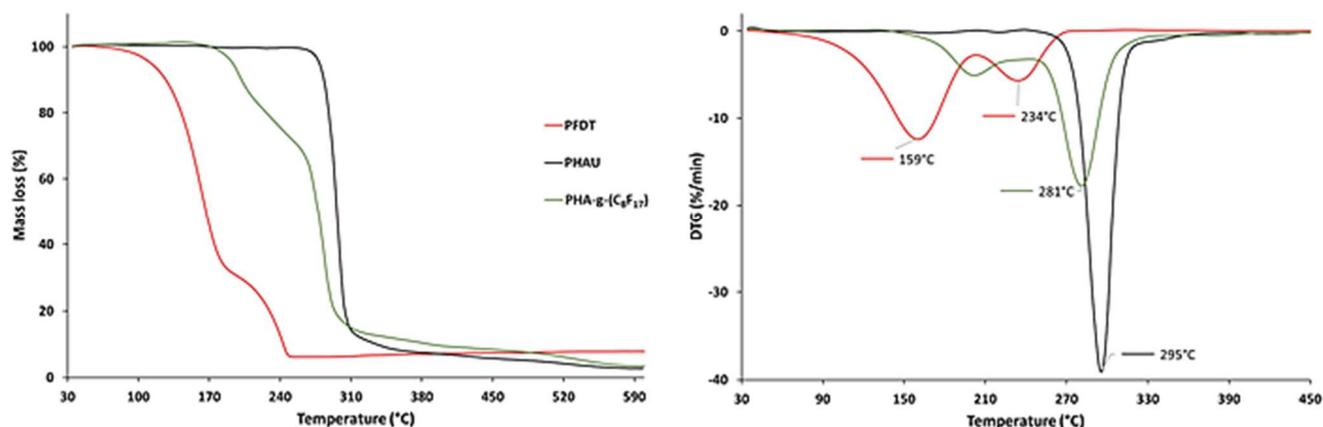


Figure IV.9: TGA of PFDT (red), PHAU (black) and PHA-g-(C₈F₁₇) (green)

Finally, the thermal degradation of the studied copolymer was assessed. It is observed in Figure IV.9 that the thermal degradation of neat PHAU took place in a single weight loss step with a maximum degradation at 310 °C. The thermal degradation of PHA-g-(C₈F₁₇) occurred in two steps as can be clearly identified. The first step degradation is observed at about 190 °C attributed to the degradation of fluorinated groups, and the second step found in the range of temperature from 210 to 300 °C is due to the degradation of the polymer chains. The TGA measurements show that the grafting of the fluorinated compound induced a slight decrease of the resistance to thermal decomposition. Nevertheless, the thermal resistance remains higher than that of PFDT.

IV.4.3 Fluorinated polyhydroxyalkanoate PHA-g-(C₈F₁₇) as a promising biomaterial coating.

The objective here is to use the graft copolymer PHA-g-(C₈F₁₇) as a coating film for biomaterials to induce visualization by imaging. The T_g of PHA-g-(C₈F₁₇) is very low, so it is difficult to use this polymer alone for analysis such as SEM-EDX. We have therefore decided to blend it with PHBHV, which has remarkable modulus properties but is still brittle⁵⁵. This certainly explains the slight fracture observed after the film was dried. By SEM-EDX analysis, we clearly distinguished the presence of fluorinated groups at the surface of the films that appeared clearly as shown in Figure IV.10. It seems that the areas appearing brighter on the SEM images are areas with a high fluorine content. Mass compositions were determined by EDX analysis (Table IV.4). The light area analyzed (area A) contains 48.46% mass of fluorine, while the darker area (area B) contains only 8.5% mass of fluorine. This is representative of a reorganization phenomenon of the fluorinated chains in the form of a self-assembly frequently observed for the fluorinated chains of PFDT because of their strong hydrophobicity and their strong dipolar interaction. Moreover, this observation is in agreement with the results obtained in DSC, which revealed a particular reorganization of the fluorinated chains within PHA-g-(C₈F₁₇).

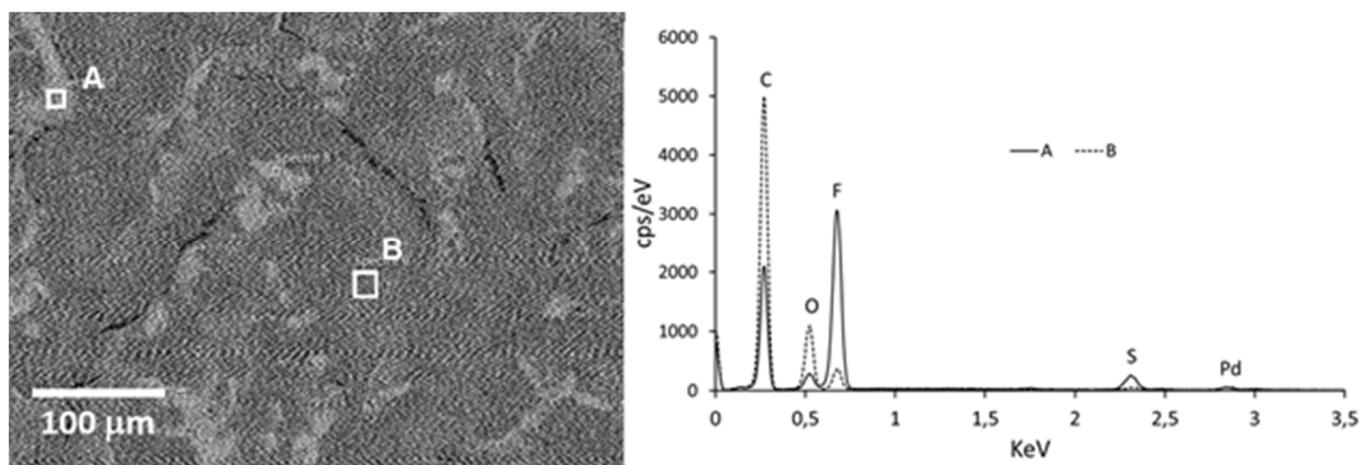


Figure IV.10: SEM image of PHBHB/PHA-g-(C₈F₁₇) and EDX spectra of the corresponding analyzed areas.

Table IV.4: Mass Composition of the Analyzed Areas of Interest by EDX.

sample	mass composition (%)			
	C	O	F	S
total film	54.52	25.49	18.49	1.5
area A	40.64	5.07	48.46	5.84
area B	63.91	26.75	8.5	0.84

In order to maintain the biocompatible nature of the device, commercial PLA-PHBHV: 92/8 filament was used for the 3D printing of a support. The choice of the support was a lattice pattern, a three-dimensional porous biomaterial. Thus, a lattice pattern support of 2 cm x 2 cm was designed by 3D printing, presented in figure IV.11.



Figure IV.11: Lattice support designed by 3D-printing.

The pattern made by 3D printing was used as a support to be covered by the PHA-g-(C₈F₁₇). This is a proof of concept that needs to be optimized according to the future applications, allowing us to consider other types of scaffolds. The 3D-printed support was covered previously with the PHA-g-(C₈F₁₇) polymer using an airbrush process. The presence of PHA-g-(C₈F₁₇) on the surface of the device was assessed by Raman spectroscopy (Figure IV.12).

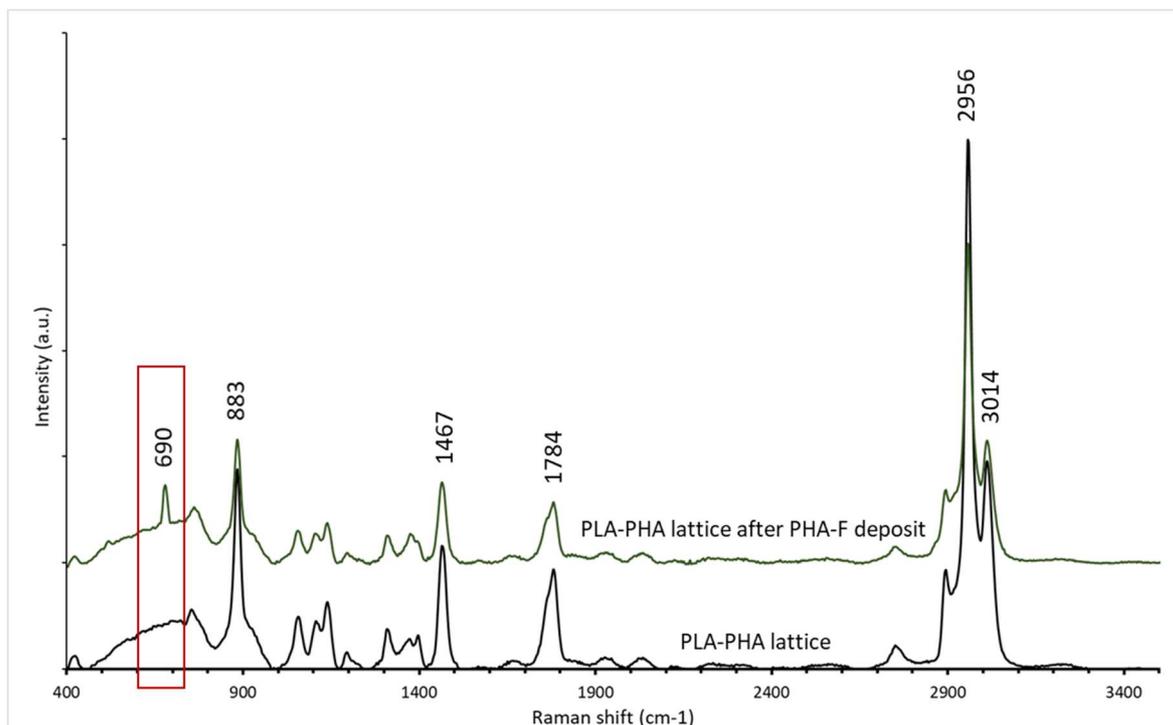


Figure IV.12: Raman spectra of the surface of the 3D-print lattice support before (black) and after PHA-g-(C₈F₁₇) deposition (green).

Both spectra show characteristic bands at 3014 and 2956 cm⁻¹, which can be attributed to asymmetrical and symmetrical stretching vibrations of the C-H bond (ν CH₃) of the PLA chain. The 1784 cm⁻¹ band can be attributed to the stretching vibration of the C=O bond (ν C=O); the 1467 cm⁻¹ band can be attributed to the asymmetrical deformation vibration of the CH₃ bond (δ CH₃) and the 883 cm⁻¹ band corresponds to the stretching vibration of the C-COO bond (ν C-COO)⁵⁶. The C-F bond characteristic signal was observed around 690 cm⁻¹ attesting the presence of PHA-g-(C₈F₁₇) at the lattice surface. In our recent study, we showed that PFOB-nanocapsules based on PHA-g-(F; PEG) have the potential to be used as novel contrast agents for ¹⁹F MRI⁵⁷. In PFOB, since the fluorine atoms are mobile in a liquid environment, the relaxation times allow visualization in ¹⁹F MRI. In this study, the solid matrix may affect the relaxation time. In MRI, relaxation times will influence signal detection, especially the transverse relaxation time (T₂), which is most often limiting. Hahn Echo experiments were performed to determine T₂ of the polymer functionalized by homogeneous grafting (Figure IV.13). These measurements were performed at room temperature as well as

at human body temperature to evaluate the effect of temperature on the transverse relaxation times.

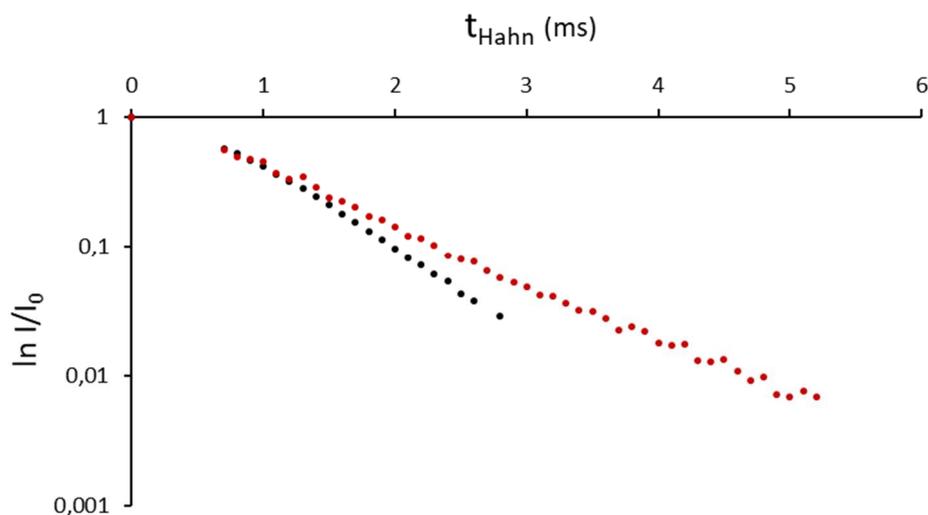


Figure IV.13: Hahn echo measurement of PHA-g-(C₈F₁₇) at 19°C (black dots) and 37°C (red dots).

T₂ of the fluorine atoms within PHA-g-(C₈F₁₇) was calculated according to the equation 2:

$$I = I_0 \exp(-t/T_2) \tag{2}$$

where I is the intensity of the t interval; I₀ is the extrapolation of I at t=0s and t is the time interval between each measurement (previously optimized). The obtained transverse relaxation times are presented in Table IV.5.

Table IV.5: Transversal Relaxation Time of PHA-g-(C₈F₁₇) Measured at Room Temperature and Body Temperature.

temperature (°C)	T ₂ (ms)
19	1.18
37	1.20

At both temperatures, the T₂ measured remain similar at 1.18 and 1.20 ms. However, more signal is obtained at 37°C, which allows us to say that the material becomes more sensitive to

the human body temperature, suggesting that this increase in sensitivity may allow to the characterization of PHA-g-(C₈F₁₇) with MRI sequences adapted to very short relaxation times called ultrashort time echo (UTE) and zero time echo (ZTE). Indeed, tissues or materials with T₂ relaxation times below 2 ms cannot be reliably detected by conventional MRI pulse sequences. ZTE and UTE pulse sequences use specialized acquisition parameters to allow the detection of components with very short T₂⁵⁸⁻⁶⁰. Moreover, previous studies have developed UTE sequences specific to the fluorine atom, which have allowed the visualization of fluorinated materials despite very short T₂ in the order of a millisecond^{61,62}.

IV.5 Conclusion

The graft copolymer PHA-g-(C₈F₁₇) has been synthesized by a thiol-ene reaction from PHAU containing 28% of unsaturated groups in the lateral side chains. The degree of grafting determined by ¹H NMR showed that the grafting realized in solution is quantitative, whereas the heterogeneous grafting onto the surface is less efficient. The presence of fluorinated moieties within the lateral side chains of PHA-g-(C₈F₁₇) has the tendency to form aggregates with a high content of fluorine. PHA-g-(C₈F₁₇) was used as a coating for the scaffold obtained by 3D-printing, and the Hahn echo measurements showed that it is a promising biomaterial coating for imaging detection by ¹⁹F MRI with the UTE and ZTE sequences that are not today's standard acquisition sequences. These sequences will certainly be developed in a more extensive way in the future, thanks to the recent development of fluorine MRI. The objective of our study here is mainly to highlight the potential of the natural unsaturated PHAU, which can be functionalized for applications in the biomedical field. We have thus produced, functionalized and characterized novel PHA-g-C₈F₁₇ in a very precise approach.

Acknowledgments

We are grateful to the financial support of IFREMER and Region Bretagne, France. Financial support from ANR PRCI (SeaBioP Project, France) is sincerely acknowledged. We thank Dr

Bernard COSTA (Pacific Biotech, Tahiti) for providing bacteria strains. We acknowledge Remi PIRES (ICMPE, CNRS, France) for the SEM-EDX analysis and Julien Babinot for helpful discussion (ICMPE, CNRS, France).

IV.6 References

- 1 Merritt, K.; Rodrigo, J. J. Immune Response to Synthetic Materials: Sensitization of Patients Receiving Orthopaedic Implants. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1976-2007 **1996**, 326, 71–79.
- 2 Hallab, N.; Merritt, K.; Jacobs, J. J. Metal Sensitivity in Patients with Orthopaedic Implants. *JBJS* **2001**, 83 (3), 428.
- 3 Oh, S. H.; Kang, S. G.; Kim, E. S.; Cho, S. H.; Lee, J. H. Fabrication and Characterization of Hydrophilic Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)/Poly(Vinyl Alcohol) Blend Cell Scaffolds by Melt-Molding Particulate-Leaching Method. *Biomaterials* **2003**, 24 (22), 4011–4021.
- 4 Chinga-Carrasco, G. Novel Biocomposite Engineering and Bio-Applications. *Bioeng. Basel Switz.* **2018**, 5 (4), 80.
- 5 Cziple, F. A.; Marques, A. J. V. Biopolymers Versus Synthetic Polymers. *Anul XV, NR. 1*, **2008**, ISSN 1453-7397.
- 6 Rebelo, R.; Fernandes, M.; Fangueiro, R. Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. *Procedia Eng.* **2017**, 200, 236–243.
- 7 Augustine, R.; Rajendran, R.; Cvelbar, U.; Mozetič, M.; George, A. Biopolymers for Health, Food, and Cosmetic Applications. In *Handbook of Biopolymer-Based Materials*; John Wiley & Sons, Ltd; pp 801–849.
- 8 Wu, S.; Liu, X.; Yeung, K.; Liu, C.; Yang, X. Biomimetic Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2014**, (80), 1-36.
- 9 Reddy, N.; Reddy, R.; Jiang, Q. Crosslinking Biopolymers for Biomedical Applications. *Trends Biotechnol.* **2015**, 33 (6), 362–369.
- 10 Langer, R.; Tirrell, D. A. Designing Materials for Biology and Medicine. *Nature* **2004**, 428 (6982), 487–492.
- 11 Lu, L.; Peter, S. J.; Lyman, M. D.; Lai, H. L.; Leite, S. M.; Tamada, J. A.; Uyama, S.; Vacanti, J. P.; Langer, R.; Mikos, A. G. In Vitro and in Vivo Degradation of Porous Poly(DL-Lactic-Co-Glycolic Acid) Foams. *Biomaterials* **2000**, 21 (18), 1837–1845.
- 12 Massaron, S.; Bona, S.; Fumagalli, U.; Valente, P.; Rosati, R. Long-Term Sequelae after 1,311 Primary Inguinal Hernia Repairs. *Hernia J. Hernias Abdom. Wall Surg.* **2008**, 12 (1), 57–63.
- 13 Leber, G. E.; Garb, J. L.; Alexander, A. I.; Reed, W. P. Long-Term Complications Associated with Prosthetic Repair of Incisional Hernias. *Arch. Surg. Chic. Ill* **1960** 1998, 133 (4), 378–382.
- 14 Aasvang, E. K.; Bay-Nielsen, M.; Kehlet, H. Pain and Functional Impairment 6 Years after Inguinal Herniorrhaphy. *Hernia J. Hernias Abdom. Wall Surg.* **2006**, 10 (4), 316–321.
- 15 Hansen, N. L.; Barabasch, A.; Distelmaier, M.; Ciritsis, A.; Kuehnert, N.; Otto, J.; Conze, J.; Klinge, U.; Hilgers, R.-D.; Kuhl, C. K.; Kraemer, N. A. First In-Human Magnetic Resonance Visualization of Surgical Mesh Implants for Inguinal Hernia Treatment: Invest. *Radiol.* **2013**, 48 (11), 770–778.
- 16 Habnoui, S. E.; Nottelet, B.; Darcos, V.; Porsio, B.; Lemaire, L.; Franconi, F.; Garric, X.; Coudane, J. MRI-Visible Poly(ϵ -Caprolactone) with Controlled Contrast Agent Ratios for Enhanced Visualization in Temporary Imaging Applications. *Biomacromolecules* **2013**, 14 (10), 3626–3634.
- 17 Letouzey, V.; Huberlant, S.; Cornille, A.; Blanquer, S.; Guillaume, O.; Lemaire, L.; Garric, X.; de Teyrac, R. Tolerance and Long-Term MRI Imaging of Gadolinium-Modified Meshes Used in Soft Organ Repair. *PLOS ONE* **2015**, 10 (3), e0120218.

- 18 Blanquer, S.; Guillaume, O.; Letouzey, V.; Lemaire, L.; Franconi, F.; Paniagua, C.; Coudane, J.; Garric, X. New Magnetic-Resonance-Imaging-Visible Poly(e-Caprolactone)-Based Polyester for Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2012** Mar; 8 (3): 1339-47.
- 19 Morawski, A. M.; Winter, P. M.; Yu, X.; Fuhrhop, R. W.; Scott, M. J.; Hockett, F.; Robertson, J. D.; Gaffney, P. J.; Lanza, G. M.; Wickline, S. A. Quantitative "Magnetic Resonance Immunohistochemistry" with Ligand-Targeted ¹⁹F Nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* **2004**, 52 (6), 1255–1262.
- 20 Srinivas, M.; Heerschap, A.; Ahrens, E. T.; Figdor, C. G.; Vries, I. J. M. de. ¹⁹F MRI for Quantitative in Vivo Cell Tracking. *Trends Biotechnol.* **2010**, 28 (7), 363–370.
- 21 Staal, X.; Koshkina, O.; Srinivas, M. In Vivo ¹⁹-Fluorine Magnetic Resonance Imaging. In *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals*; Elsevier, **2019**; pp 397–424.
- 22 Jirak, D.; Galisova, A.; Kolouchova, K.; Babuka, D.; Hruby, M. Fluorine Polymer Probes for Magnetic Resonance Imaging: Quo Vadis? *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **2019**, 32 (1), 173–185.
- 23 Ruiz-Cabello, J.; Barnett, B. P.; Bottomley, P. A.; Bulte, J. W. M. Fluorine (¹⁹F) MRS and MRI in Biomedicine. *NMR Biomed.* **2011**, 24 (2), 114–129.
- 24 Yu, J.-X.; Hallac, R. R.; Chiguru, S.; Mason, R. P. New Frontiers and Developing Applications in ¹⁹F NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, 70, 25–49.
- 25 Bulte, J. W. M. Hot Spot MRI Emerges from the Background. *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23 (8), 945–946.
- 26 Blahut, J.; Bernášek, K.; Gálisová, A.; Herynek, V.; Císařová, I.; Kotek, J.; Lang, J.; Matějková, S.; Hermann, P. Paramagnetic ¹⁹F Relaxation Enhancement in Nickel(II) Complexes of N-Trifluoroethyl Cyclam Derivatives and Cell Labeling for ¹⁹F MRI. *Inorg. Chem.* **2017**, 56 (21), 13337–13348.
- 27 Knight, J. C.; Edwards, P. G.; Paisey, S. J. Fluorinated Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging; a Review of Recent Developments. *RSC Adv.* **2011**, 1 (8), 1415.
- 28 Fink, C.; Gaudet, J. M.; Fox, M. S.; Bhatt, S.; Viswanathan, S.; Smith, M.; Chin, J.; Foster, P. J.; Dekaban, G. A. ¹⁹F-Perfluorocarbon-Labeled Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Can Be Detected in Vivo Using Clinical MRI Parameters in a Therapeutic Cell Setting. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 590.
- 29 Gaudet, J. M.; Ribot, E. J.; Chen, Y.; Gilbert, K. M.; Foster, P. J. Tracking the Fate of Stem Cell Implants with Fluorine-¹⁹ MRI. *PLOS ONE* **2015**, 10 (3), e0118544.
- 30 Constantinides, C.; Maguire, M.; McNeill, E.; Carnicer, R.; Swider, E.; Srinivas, M.; Carr, C. A.; Schneider, J. E. Fast, Quantitative, Murine Cardiac ¹⁹F MRI/MRS of PFCE-Labeled Progenitor Stem Cells and Macrophages at 9.4T. *PLOS ONE* **2018**, 13 (1), e0190558.
- 31 Liang, S.; Louchami, K.; Holvoet, B.; Verbeke, R.; Deroose, C. M.; Manshian, B.; Soenen, S. J.; Lentacker, I.; Himmelreich, U. Tri-Modal In Vivo Imaging of Pancreatic Islets Transplanted Subcutaneously in Mice. *Mol. Imaging Biol.* **2018**, 20 (6), 940–951.
- 32 Rolfe, B. E.; Blakey, I.; Squires, O.; Peng, H.; Boase, N. R. B.; Alexander, C.; Parsons, P. G.; Boyle, G. M.; Whittaker, A. K.; Thurecht, K. J. Multimodal Polymer Nanoparticles with Combined ¹⁹F Magnetic Resonance and Optical Detection for Tunable, Targeted, Multimodal Imaging in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (6), 2413–2419.

- 33 Oishi, M.; Sumitani, S.; Nagasaki, Y. On-Off Regulation of ^{19}F Magnetic Resonance Signals Based on PH-Sensitive PEGylated Nanogels for Potential Tumor-Specific Smart ^{19}F MRI Probes. *Bioconjug. Chem.* **2007**, 18 (5), 1379–1382.
- 34 Zhang, C.; Moonshi, S. S.; Wang, W.; Ta, H. T.; Han, Y.; Han, F. Y.; Peng, H.; Král, P.; Rolfe, B. E.; Gooding, J. J.; Gaus, K.; Whittaker, A. K. High F-Content Perfluoropolyether-Based Nanoparticles for Targeted Detection of Breast Cancer by ^{19}F Magnetic Resonance and Optical Imaging. *ACS Nano* **2018**, 12 (9), 9162–9176.
- 35 Steinbüchel, A.; Valentin, H. E. Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 128 (3), 219–228.
- 36 Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, 10 (25), 1503–1555.
- 37 Lenz, R. W.; Marchessault, R. H. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules* **2005**, 6 (1), 1–8.
- 38 Timbart, L.; Renard, E.; Tessier, M.; Langlois, V. Monohydroxylated Poly(3-Hydroxyoctanoate) Oligomers and Its Functionalized Derivatives Used as Macroinitiators in the Synthesis of Degradable Diblock Copolyesters. *Biomacromolecules* **2007**, 8 (4), 1255–1265.
- 39 Yu, L.-P.; Zhang, X.; Wei, D.-X.; Wu, Q.; Jiang, X.-R.; Chen, G.-Q. Highly Efficient Fluorescent Material Based on Rare-Earth-Modified Polyhydroxyalkanoates. *Biomacromolecules* **2019**, 20 (9), 3233–3241.
- 40 Sparks, J.; Scholz, C. Synthesis and Characterization of a Cationic Poly(β -Hydroxyalkanoate). *Biomacromolecules* **2008**, 9 (8), 2091–2096.
- 41 Wang, S.; Chen, W.; Xiang, H.; Yang, J.; Zhou, Z.; Zhu, M. Modification and Potential Application of Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate (SCL-PHA). *Polymers* **2016**, 8 (8), 273.
- 42 Loh, X. J.; Zhang, Z.-X.; Wu, Y.-L.; Lee, T. S.; Li, J. Synthesis of Novel Biodegradable Thermoresponsive Triblock Copolymers Based on Poly[(R)-3-Hydroxybutyrate] and Poly(N-Isopropylacrylamide) and Their Formation of Thermoresponsive Micelles. *Macromolecules* **2009**, 42 (1), 194–202.
- 43 Andrade, A. P.; Neuenschwander, P.; Hany, R.; Egli, T.; Witholt, B.; Li, Z. Synthesis and Characterization of Novel Copoly(Ester-urethane) Containing Blocks of Poly-[(R)-3-Hydroxyoctanoate] and Poly-[(R)-3-Hydroxybutyrate]. *Macromolecules* **2002**, 35 (13), 4946–4950.
- 44 Renard, E.; Rios, A.; Versace, D.-L.; Langlois, V. The Design of Functionalized PHA-Based Polymeric Materials by Chemical Modifications. In *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*; CRC Press, **2020**.
- 45 Hazer, B. Amphiphiles from Poly(3-Hydroxyalkanoates). In *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*; CRC Press, **2020**.
- 46 Jain-Beuguel, C.; Li, X.; Houel-Renault, L.; Modjinou, T.; Simon-Colin, C.; Gref, R.; Renard, E.; Langlois, V. Water-Soluble Poly(3-Hydroxyalkanoate) Sulfonate: Versatile Biomaterials Used as Coatings for Highly Porous Nano-Metal Organic Framework. *Biomacromolecules* **2019**, 20 (9), 3324–3332.
- 47 Simon-Colin, C.; Alain, K.; Raguénès, G.; Schmitt, S.; Kervarec, N.; Gouin, C.; Crassous, P.; Costa, B.; Guezennec, J. G. Biosynthesis of Medium Chain Length Poly(3-Hydroxyalkanoates) (Mcl PHAs) from Cosmetic Co-Products by *Pseudomonas Raguensis* Sp. Nov., Isolated from Tetiaroa, French Polynesia. *Bioresour. Technol.* **2009**, 100 (23), 6033–6039.

- 48 Anda, A. R. D.; Fillot, L. A.; Rossi, S.; Long, D.; Sotta, P. Influence of the Sorption of Polar and Non-Polar Solvents on the Glass Transition Temperature of Polyamide 6,6 Amorphous Phase. *Polym. Eng. Sci.* **2011**, 51 (11), 2129–2135.
- 49 Rios De Anda, A.; Fillot, L. A.; Preda, F. M.; Rossi, S.; Long, D. R.; Sotta, P. Sorption and Plasticization Effects of Ethanol–Toluene–Isooctane Ternary Mixtures in Polyamide 6,6 and Induced Plasticization Effects. *Eur. Polym. J.* **2014**, 55, 199–209.
- 50 Anda, A. R. de; Fillot, L.-A.; Long, D. R.; Sotta, P. Influence of the Amorphous Phase Molecular Mobility on Impact and Tensile Properties of Polyamide 6,6. *J. Appl. Polym. Sci.* **2016**, 133 (21).
- 51 de Anda, A. R. Influence of the Solvent Sorption, Additivation, and Chemical Modification on the Molecular Mobility Dynamics of Polyamide 6,6 Amorphous Phase and Its Consequences on the Tensile and Impact Strength Properties of This Polymer, **2012**, Thesis.
- 52 Babinot, J.; Renard, E.; Le Droumaguet, B.; Guigner, J.-M.; Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P.; Langlois, V. Facile Synthesis of Multicompartment Micelles Based on Biocompatible Poly(3-Hydroxyalkanoate). *Macromolecular Rapid Communications* **2013**, 34 (4), 362–368..
- 53 Renard, E.; Timbart, L.; Vergnol, G.; Langlois, V. Role of Carboxyl Pendant Groups of Medium Chain Length Poly(3-Hydroxyalkanoate)s in Biomedical Temporary Applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, 117 (4), 1888–1896.
- 54 Basnett, P.; Marcello, E.; Lukaszewicz, B.; Panchal, B.; Nigmatullin, R.; Knowles, J. C.; Roy, I. Biosynthesis and Characterization of a Novel, Biocompatible Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate by *Pseudomonas Mendocina* CH50 Using Coconut Oil as the Carbon Source. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2018**, 29 (12), 179.
- 55 Noel, G. R. J.; Joel, A. F.; Fermín, P.-G.; Judith, C. M. Synthesis and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) (PHBHV) Copolymer Produced in Sequential Feeding Fed Batch Cultures of *Ralstonia Eutropha*. *Int. J. Polym. Mater.* **2002**, 51 (7), 607–617.
- 56 Gong, M.; Zhao, Q.; Dai, L.; Li, Y.; Jiang, T. Fabrication of Poly(lactic Acid/Hydroxyapatite/Graphene Oxide Composite and Their Thermal Stability, Hydrophobic and Mechanical Properties. *J. Asian Ceram. Soc.* **2017**, 5 (2), 160–168.
- 57 Le Gal, M.; Renard, E.; Simon-Colin, C.; Larrat, B.; Langlois, V. Amphiphilic and Perfluorinated Poly(3-Hydroxyalkanoate) Nanocapsules for ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging. *Bioengineering* **2021**, 8 (9), 121.
- 58 Weiger, M.; Pruessmann, K. P. Short-T2 MRI: Principles and Recent Advances. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2019**, 114–115, 237–270.
- 59 Mastrogiacomo, S.; Dou, W.; Jansen, J. A.; Walboomers, X. F. Magnetic Resonance Imaging of Hard Tissues and Hard Tissue Engineered Bio-Substitutes. *Mol. Imaging Biol.* **2019**, 21 (6), 1003–1019.
- 60 Larson, P. E. Z.; Han, M.; Krug, R.; Jakary, A.; Nelson, S. J.; Vigneron, D. B.; Henry, R. G.; McKinnon, G.; Kelley, D. A. C. Ultrashort Echo Time and Zero Echo Time MRI at 7T. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **2016**, 29 (3), 359–370.
- 61 Lammers, T.; Mertens, M. E.; Schuster, P.; Rahimi, K.; Shi, Y.; Schulz, V.; Kuehne, A. J. C.; Jockenhoevel, S.; Kiessling, F. Fluorinated Polyurethane Scaffolds for ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging. *Chem. Mater.* **2017**, 29 (7), 2669–2671.
- 62 Łopuszyńska, N.; Szczepanowicz, K.; Jasiński, K.; Warszyński, P.; Węglarz, W. P. Effective Detection of Nafion-Based Theranostic Nanocapsules through ¹⁹F Ultra-Short Echo Time MRI. *Nanomater. Basel Switz.* **2020**, 10 (11), 2127.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au sein de la famille des polyhydroxyalcanoates (PHA), les PHA à longueur de chaîne moyenne (PHA_{MCL}) s'avèrent particulièrement intéressants en raison de leur grande diversité structurale, pouvant notamment comporter des groupements fonctionnalisables. Ceci permet d'envisager des modifications de leur structure chimique, conduisant au développement de produits aux propriétés mécaniques et physico-chimiques très spécifiques. Alors que les PHA à chaîne courte (PHA_{SCL}) sont facilement disponibles sur le marché, la commercialisation à grande échelle des PHA_{MCL} reste encore peu développée, principalement en raison des coûts élevés associés à leur production et à leur extraction. Pour surmonter ces problèmes, plusieurs approches sont mises en œuvre : la recherche de souches à rendement plus élevé, qu'il s'agisse de bactéries de type sauvage ou de bactéries modifiées et le recours à des matières premières à faible coût.

Au cours de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à la biodiversité bactérienne marine pour produire des PHA_{MCL}. Les souches bactériennes testées proviennent des atolls de Polynésie Française (*Pseudomonas guezennei*, *Pseudomonas ragenesii*, *Pseudomonas guezennei biovar. Tikehau*, TIK771, RA16) ou de Nouvelle Calédonie (NC532). Ce sont des bactéries marines mésophiles, c'est-à-dire, qu'elles se développent à des températures modérées dans un milieu liquide à base d'eau de mer. Ces souches bactériennes ont été cultivées en présence d'huile de coprah, extraite à partir de la pulpe séchée de noix de coco. Il s'agit d'un substrat naturel, renouvelable et peu coûteux. Contrairement à l'huile de coco qui trouve une application en cosmétique ou en alimentation, l'huile de coprah est extraite par solvant puis raffinée et désodorisée, elle ne présente donc pas d'intérêt cosmétique. Etant composée majoritairement d'acides gras saturés, son utilisation se limite à la friture ou à la saponification. Ainsi l'huile de coprah représente une ressource renouvelable peu coûteuse encore faiblement valorisée. De telles conditions de culture permettent d'envisager une réduction du coût de production des PHA, étant donné l'absence de besoin en eau douce et la source de carbone peu coûteuse.

La structure du PHA dépendant à la fois de la souche bactérienne et de la source de carbone fournie, il est donc possible d'influencer la biosynthèse des PHA. Ici nous avons choisi d'utiliser de l'acide 10-undécénoïque en mélange avec l'huile de coprah afin d'induire l'incorporation d'insaturations au sein du polymère et ainsi, produire des PHA_{MCL} insaturés, comportant une double liaison en position terminale des chaînes latérales. L'ajustement des paramètres de culture, notamment la concentration en acide 10-undécénoïque permet de maîtriser le taux d'insaturation au sein des PHA. Un panel de PHA_{MCL} insaturés dont le taux d'insaturation varie de 10% à 75% a pu être produit, induisant des PHA aux propriétés physico-chimiques et mécaniques très étendues. Cela laisse envisager des possibilités d'applications très vastes pour les PHA aux taux d'insaturations les plus élevés affichant des températures de fusion non détectables, pouvant couvrir des domaines d'applications variés tels que les gommes ou les colles.

Le faible rendement habituellement observé pour les productions de PHA_{MCL} incite de plus en plus les chercheurs à avoir recours à des modifications génétiques des bactéries. Dans cette étude, nous avons pu obtenir des rendements de production de PHA_{MCL} insaturés jusqu'à 38%, ce qui s'avère être relativement élevé étant donné que nous travaillons uniquement avec des souches bactériennes natives, c'est-à-dire non modifiées. La fermentation bactérienne a été réalisée dans un premier temps à une échelle laboratoire en erlenmeyer, puis en bioréacteur. La maîtrise des paramètres de fermentation en bioréacteur associée à la caractérisation précise des PHA produits tout au long de la phase d'optimisation nous a permis d'augmenter le volume de production tout en assurant le contrôle de la structure des PHA jusqu'à un volume de 18 L, laissant envisager la possibilité d'une production semi-industrielle. Toutefois, une amélioration pourrait être apportée au niveau de la phase d'extraction des PHA, qui est actuellement réalisée à l'aide de solvants organiques.

L'ensemble de ces expériences nous a donc permis de produire à façon des PHA_{MCL} insaturés à un taux d'insaturation fixé à 28%. Ces polymères faiblement cristallins possèdent une température de transition vitreuse de -46°C et une température de fusion de 46°C.

La présence des insaturations permet de moduler les propriétés des PHA et donc d'élargir leurs champs d'application. Pour fonctionnaliser les polymères, la chimie-click s'avère très bien adaptée. Ce concept qualifie un ensemble de réactions très spécifiques, à haut

rendement et sans produit secondaire. Parmi elles, la réaction thiol-ène permet des réactions rapides et sélectives entre un groupement thiol et un groupement alcène. Ainsi, par l'action de la chaleur ou de la lumière, nous avons greffé de façon précise des molécules possédant un groupement thiol sur les doubles liaisons des PHA_{MCL} insaturés. Ces greffages peuvent être réalisés de façon homogène en solution ou hétérogène lors d'un greffage en surface d'un film polymère. Les PHA ont donc été fonctionnalisés avec d'autres polymères comme le poly(éthylène glycol) (PEG) apportant un caractère hydrophile, et des molécules fluorées, pour permettre une visualisation par IRM ¹⁹F.

Nous avons ainsi synthétisé un copolymère fluoré amphiphile, PHA-g-(F ; PEG) afin d'élaborer des nanoparticules furtives. D'une part, l'ajout de PEG à la surface d'une nanoparticule lui apporte un caractère furtif, c'est-à-dire qu'il entraîne une répulsion stérique empêchant les interactions avec les opsonines du système immunitaire, évitant ainsi une internalisation par les macrophages. Ainsi, ces vecteurs peuvent circuler plus longtemps dans le système sanguin et être acheminés jusqu'au site tumoral par adressage passif ou actif. Dans le cas d'un adressage actif, des molécules de type ligands sont ajoutés à la surface de la particule et vont interagir avec des récepteurs au niveau des cellules cibles, comme l'acide folique dont le récepteur est surexprimé à la surface des cellules cancéreuses. Dans le cas d'un adressage passif, les nanoparticules vont être acheminées et accumulées au niveau du site tumoral par effet EPR (enhanced permeation and retention). En effet, les cellules tumorales surexpriment le VEGF (Vascular endothelial growth factor) qui induit une croissance rapide mais désorganisée de la paroi des vaisseaux sanguins dans l'environnement proche de la tumeur. Ainsi, en raison de la perméabilité de ces vaisseaux néo-formés, les nanoparticules PEGylées vont s'accumuler au niveau d'une tumeur par diffusion.

D'autre part, l'ajout d'un agent de contraste au système vecteur permet de visualiser l'adressage des nanoparticules au niveau du site actif. Ici, nous avons choisi d'encapsuler du bromure de perfluorooctyle (PFOB), une molécule de la famille des perfluorocarbures (PFC). Les PFC sont des agents fluorés utilisés pour l'IRM ¹⁹F in vivo et in vitro. Les PFC sont des molécules organiques où tous les atomes d'hydrogène ont été remplacés par des atomes de fluor. Ils ont la particularité d'être non toxiques ainsi qu'inertes biologiquement et chimiquement. Nous avons ainsi élaboré des nanocapsules, d'un diamètre compris entre 250

nm et 300 nm, à base de PHA-g-(F ; PEG) visibles par IRM ¹⁹F. Toutefois, certaines optimisations sont à envisager afin d'améliorer le potentiel de ces nanoparticules notamment au niveau de leur taille. Le procédé d'élaboration des nanoparticules peut être amélioré afin d'obtenir des particules de tailles inférieures à 200 nm. De plus, il serait intéressant d'étudier leur stabilité au cours du temps dans différents solvants, par exemple dans l'eau physiologique. Enfin, le cœur hydrophobe des nanoparticules contenant du PFOB laisse la possibilité d'encapsuler un principe actif hydrophobe tel que la Doxorubicine, médicament anticancéreux couramment employé en chimiothérapie.

La visualisation par IRM de biomatériaux constitué de polymère n'est pas possible sans ajout d'agent de contraste. Or, la visualisation de dispositif médicaux implantables offre la possibilité de s'assurer de sa localisation et de son implantation, et dans le cas d'implants résorbables, de pouvoir suivre le processus de dégradation.

La fonctionnalisation par thiol-ène des PHA avec du perfluorodécane-thiol (C₈F₁₇) nous a également permis d'envisager l'élaboration de revêtement de biomatériaux visibles par IRM ¹⁹F. Ici, nous avons utilisé le copolymère PHA-g-(C₈F₁₇) pour recouvrir la surface d'un support obtenu par impression 3D à base de PLA-PHA. La structure du PHA-g-(C₈F₁₇) a été étudiée dans le détail et a mis en évidence des zones riches en fluor. Ceci est dû à la réorganisation des chaînes fluorées, particulièrement hydrophobes. Les mesures du temps de relaxation transversale (T₂) obtenues par des expériences d'Echo de Hahn ont révélé des T₂ de l'ordre de 1,2 ms, suggérant que le PHA-g-(C₈F₁₇) pourrait être visualisable avec des séquences IRM adaptées aux temps de relaxation très courts appelées UTE (ultrashort time echo) et ZTE (zero time echo). En effet, les tissus ou matériaux dont le temps de relaxation T₂ est inférieur à 2 ms ne peuvent pas être détectés de manière fiable par les séquences d'impulsions IRM conventionnelles. Les séquences d'impulsions à temps d'écho nul (ZTE) et à temps d'écho ultra-court (UTE) utilisent des paramètres d'acquisition spécialisés pour permettre la détection de composants ayant des T₂ très courts. Ces séquences n'étant pas disponibles de façon standard sur les appareils d'IRM, il serait intéressant de développer une séquence UTE spécifique pour ce copolymère fonctionnel afin de pouvoir permettre sa visualisation et ainsi, étendre ses potentielles applications.

Des études préliminaires réalisées au laboratoire ont d'ores et déjà démontré le caractère biocompatible des supports tridimensionnels réalisés à partir de PHA fluorés, ce qui s'avère très encourageant pour le développement des copolymères fonctionnels élaborés au cours de cette thèse. L'IRM ^{19}F , n'est pas développée actuellement en application clinique, cependant, des avancées très prometteuses semblent encourager son accélération. En effet, la société Celsence s'est récemment vue accorder par la FDA l'autorisation d'étude au stade clinique de leur produit commercial : « Cell Sense » un agent traceur perfluorocarboné breveté, utilisé pour observer le trafic cellulaire par IRM ^{19}F .

En conclusion, nous avons produit des PHA_{MCL} fonctionnalisables par voie chimio-enzymatique et avons démontré leur intérêt pour des applications en imagerie, sans recours à des agents de contraste inorganiques.

Valorisation scientifique du travail de thèse

Articles dans des revues scientifiques

Amphiphilic and perfluorinated poly(3-hydroxyalkanoate) nanocapsules for ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging.

<https://doi.org/10.3390/bioengineering8090121>

Bioengineering 2021, 8, 121

M. LE GAL, C. SIMON-COLIN, B. LARRAT, E. RENARD, V. LANGLOIS

Synthesis of Fluorinated Polyhydroxyalkanoates from Marine Bioresources as a Promising Biomaterial Coating.

<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00770>

Biomacromolecules 2021,22, 4510-4520

M. LE GAL, A. RIOS DE ANDA, L. MICHELY, C. SIMON-COLIN, E. RENARD, V. LANGLOIS

Communication internationale

Polyhydroxyalkanoates from marine bacteria for the development of MRI-visible biomaterials.

3rd World congress on biopolymers & bioplastics (Online Webinare). 28 juillet 2020

M. LE GAL, E. RENARD, V. LANGLOIS, C. SIMON-COLIN

Communications nationales

Production de polyhydroxyalcanoates fonctionnalisables à partir de bactéries marines.

40^{èmes} journées du Groupe Français des Polymères section Grand Ouest. 23-24 mai 2019 –

Orléans

M. LE GAL, V. LANGLOIS, C. SIMON-COLIN

Production de polyhydroxyalcanoates fonctionnalisables à partir de bactéries marines.

GDR Polymères et Océans. 24-26 juin 2019 – Créteil

M. LE GAL, V. LANGLOIS, C. SIMON-COLIN

Marine bacteria for the production of unsaturated polyhydroxyalkanoates.

Journée du Groupe Français des Polymères section Ile de France. 3 juillet 2019 – Cergy-pontoise

M. LE GAL, E. RENARD, V. LANGLOIS, C. SIMON-COLIN

Autres communications

Communications orales

Exploration de la biodiversité microbienne marine pour la production de polyhydroxyalcanoates et étude de leur potentiel pour l'élaboration de biomatériaux visibles en IRM.

Forum des docs-postdocs du LM2E. les 18-19 janvier 2018 ; 4-5 février 2019 ; 6-7 février 2020 - Brest

M. LE GAL, V. LANGLOIS, C. SIMON-COLIN

Exploration de la biodiversité microbienne marine pour la production de polyhydroxyalcanoates et étude de leur potentiel pour l'élaboration de biomatériaux visibles en IRM.

Journée des doctorants de l'ICMPE. Les 1 décembre 2017 ; 28 novembre 2019 – Thiais

M. LE GAL, V. LANGLOIS, C. SIMON-COLIN

Exploration de la biodiversité microbienne marine pour la production de polyhydroxyalcanoates et étude de leur potentiel pour l'élaboration de biomatériaux visibles en IRM.

Journée de l'unité Étude des Écosystèmes Profonds. 27 mars 2018 – Brest

M. LE GAL, V. LANGLOIS, C. SIMON-COLIN

Posters

Exploration of the marine microbial biodiversity for the production of polyhydroxyalkanoates and design of new MRI-visible PHA-based biomaterials.

Journée des doctorants de l'ICMPE. 30 Novembre 2018 – Thiais

M. LE GAL, V. LANGLOIS, C. SIMON-COLIN

Polyhydroxyalkanoates from marine bacteria for the development of MRI-visible biomaterials.

Journées virtuelles de l'EDSML. Juillet - Aout 2020

M. LE GAL, V. LANGLOIS, C. SIMON-COLIN

Titre : Exploration de la biodiversité microbienne marine pour la production de polyhydroxyalcanoates et étude de leur potentiel pour l'élaboration de nouveaux biomatériaux visibles en IRM.

Mots clés : Polyhydroxyalcanoates, PHA_{MCL}, IRM, biomatériaux, copolymère greffé

Résumé : Les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont des polymères naturels produits par une grande variété de bactéries. Ces polyesters naturels sont à la fois biosourcés, biodégradables et biocompatibles. Ils présentent donc un intérêt majeur pour des applications dans le domaine biomédical. Dans le cadre de cette thèse, les capacités de production de différentes souches bactériennes, issues de la biodiversité bactérienne marine ont été étudiées. Trois souches appartenant au genre *Pseudomonas* se sont avérées être des candidates prometteuses pour la production de PHA_{MCL} insaturés lorsqu'elles sont cultivées à partir d'un mélange d'huile de coprah et d'acide 10-undécénoïque. L'optimisation de la production a permis la biosynthèse de PHA_{MCL} de structure originale et contrôlée, comportant de 10% à 80% d'insaturation, avec des rendements de production jusqu'à 38%. Leur caractérisation par SEC et DSC a révélé des biopolymères de hauts poids moléculaires et une faible cristallinité. Les analyses FTIR, RMN et GCMS ont permis de déterminer leur structure chimique et de confirmer la position terminale des insaturations, permettant la

réalisation des futures fonctionnalisations par chimie-click. Deux dispositifs visibles par IRM ont été développés. D'une part, un PHA fluoré amphiphile, PHA-g-(F;PEG), a été synthétisé par une réaction de thiol-ène. Des nanocapsules, à base de PHA-g-(F;PEG), chargées avec du bromure de perfluorooctyle, obtenues par émulsion-évaporation, d'un diamètre proche de 250-300 nm, s'avèrent visibles en IRM ¹⁹F avec un temps d'acquisition de 15 min. D'autre part, le copolymère PHA-g-(C₈F₁₇) a été préparé par greffage de perfluorodécane-thiol. La caractérisation de la microstructure par MEB-EDX et DSC (modulée et conventionnelle) a montré la formation de microdomaines fluorés. Les expériences d'Echo de Hahn ont démontré un T2 de l'ordre de 1,2 ms, approprié pour des séquences de détection UTE. De ce fait, les biomatériaux préparés par impression 3D et recouverts de PHA-g-C₈F₁₇ ont le potentiel d'être utilisés comme nouveaux agents de contraste pour l'IRM ¹⁹F. Ces résultats mettent en avant un projet de thèse pluridisciplinaire, depuis la culture bactérienne jusqu'à la valorisation des biomolécules synthétisées.

Titre : Exploration of marine microbial biodiversity for polyhydroxyalkanoates production and development of new MRI-visible biomaterials.

Keywords : Polyhydroxyalkanoates, PHA_{MCL}, MRI, biomaterials, grafted copolymer

Abstract: Polyhydroxyalkanoates (PHA) are natural polymers produced by a wide variety of bacteria. These natural polyesters are biobased, biodegradable and biocompatible. They are therefore of major interest for applications in the biomedical field. In the present thesis, the production capacities of different bacterial strains issued from the marine bacterial biodiversity have been studied. Three strains belonging to the genus *Pseudomonas* were found to be promising candidates for the production of unsaturated PHA_{MCL} when grown from a mixture of coprah oil and 10-undecenoic acid. Optimization of the production allowed the biosynthesis of PHA_{MCL} of original and controlled structure, with 10% to 80% unsaturation, and production yields reaching 38%. Their characterization by SEC and DSC revealed high molecular weight biopolymers with low crystallinity. FTIR, NMR and GCMS analyses allowed to determine their chemical structure and to confirm the terminal position of unsaturation, allowing future

functionalization by click-chemistry. Two MRI visible devices have been developed. On the one hand, an amphiphilic fluorinated PHA, PHA-g-(F;PEG), was synthesized by a thiol-ene reaction. Nanocapsules, based on PHA-g(F;PEG) loaded with perfluorooctyl bromide obtained by emulsion-evaporation, with a diameter close to 250-300 nm, were found to be visible in ¹⁹F MRI with an acquisition time of only 15 min. On the other hand, the PHA-g-(C₈F₁₇) copolymer was prepared by grafting perfluorodecanethiol. Microstructure characterization by SEM-EDX and DSC (modulated and conventional) showed the formation of fluorinated microdomains. Hahn Echo experiments showed a T2 of the order of 1.2 ms, suitable for UTE detection sequences. Therefore, biomaterials prepared by 3D printing and coated with PHA-g-(C₈F₁₇) have the potential to be used as novel contrast agents for ¹⁹F MRI. These results highlight a multidisciplinary thesis project, from bacterial culture to the valorization of the synthesized biomolecules.